

**Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß-  
und Kinderchirurgie der Universität Würzburg**

**Direktor: Univ. Prof. Dr. med. C.-T. Germer**

**Molekulare Onkoimmunologie**

**Univ. Prof. Dr. A.M. Waaga-Gasser**

**Über die Auswirkung der Toll-like Rezeptor 7- und Toll-like Rezeptor 8-  
Expression auf das Tumorwachstum und die Chemotherapieresistenz in  
humanen Pankreaskarzinomzellen**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Niels Matthes**

**aus Würzburg**

**Würzburg, September 2017**

**Referent:** Prof. Dr. med. Martin Gasser  
**Korreferent:** Prof. Dr. med. Volker Kunzmann  
**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 08.05.2020

**Der Promovend ist Arzt**

**Für Lina, Jann und Anna**



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Adenokarzinom des Pankreas .....	2
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	3
1.1.2 Molekulare Eigenschaften .....	3
1.1.3 Diagnostik .....	4
1.1.4 Klassifikation .....	4
1.1.4.1 TNM-Klassifikation.....	4
1.1.4.2 UICC-Klassifikation.....	5
1.1.4.3 Graduierung.....	6
1.1.4.4 R-Klassifikation .....	6
1.1.5 Therapie.....	7
1.2 Toll-like Rezeptoren (TLR) .....	8
1.2.1 Toll-like Rezeptor 7 .....	10
1.2.2 Toll-like Rezeptor 8 .....	10
1.3 TLR7- und TLR8-Liganden .....	10
1.3.1 Resiquimod (R848).....	11
1.3.2 Gardiquimod .....	11
1.4 Vorarbeiten.....	11
1.5 Ziel der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Material .....	13
2.1.1 Zellen .....	13
2.1.2 Primer .....	13
2.1.3 siRNA.....	13
2.1.4 Transfektionsreagenz .....	14
2.1.5 Kits .....	14
2.1.6 Verbrauchsmittel .....	14
2.1.7 Medien, Lösungen und Chemikalien .....	14
2.1.8 Geräte .....	15
2.1.9 Software.....	16

2.2 Methoden .....	16
2.2.1 Zellkultur .....	16
2.2.2 Zellzahlbestimmung .....	17
2.2.3 RNA-Isolierung .....	17
2.2.4 Reverse Transkription .....	18
2.2.5 Bestimmung der Menge und Reinheit von RNA und cDNA .....	19
2.2.6 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion .....	19
2.2.7 siRNA-Transfektion .....	22
2.2.8 Proliferationsassay .....	23
2.2.9 Proliferationsassay nach siRNA-Transfektion.....	24
2.2.10 Bestimmung der mittleren letalen Dosis (LD50) .....	24
2.2.11 Chemotherapieresistenzassay .....	25
2.2.12 Statistische Auswertung .....	25
3 Ergebnisse .....	26
3.1 TLR-Expression .....	26
3.1.1 TLR7- und TLR8-Expression nach lentiviraler Transduktion in den PANC1-Zellen .....	26
3.1.2 TLR7- und TLR8-Expression nach siRNA-Transfektion .....	27
3.2 Stimulationsversuche .....	28
3.2.1 Zellviabilität unter R848 und Gardiquimod.....	28
3.2.2 Proliferation unter R848 nach TLR-Knockdown durch siRNA- Transfektion .....	30
3.2.3 Ergebnis des LD50-Versuchs mit 5-FU .....	31
3.2.4 R848 induzierte Chemotherapieresistenz.....	32
3.2.5 NF- $\kappa$ B-Veränderung nach R848-Stimulation .....	34
3.2.6 COX-2- und IL-6-Expression nach R848-Stimulation .....	35
4 Diskussion .....	37
5 Zusammenfassung .....	42
6 Literaturverzeichnis .....	43
7 Abkürzungsverzeichnis.....	50
Danksagung .....	
Lebenslauf.....	

# 1 Einleitung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt weltweit bis zum heutigen Zeitpunkt eine ungelöste Herausforderung mit nahezu vergleichbarer Inzidenz und Mortalität dar. Es ist das tödlichste Karzinom des Gastrointestinaltraktes mit einer sehr schlechten 5-Jahresüberlebensrate von ca. 8% und der vierthäufigste Grund für ein malignombedingtes Sterben (RKI - Krebs in Deutschland, 2013; Siegel R et al. 2013). Die bisher einzig mögliche kurative Therapie besteht in der operativen Resektion. Unglücklicherweise haben nur etwa 20% der Patienten bei Diagnosestellung einen resektablen Befund, deren 5-Jahres-Überlebensrate nach erfolgter operativer Resektion des Karzinoms 10-25% beträgt (Saif MW. 2007 und 2011).

Vorklinische und epidemiologische Studien lassen ein Entzündungsgeschehen als zentralen Angelpunkt des neoplastischen Prozesses und als starken Treiber für die Karzinogenese des Pankreas vermuten (Balkwill F et al. 2004; Coussens LM et al. 2002). Diese Ansicht wird zusätzlich verstärkt, nachdem NF- $\kappa$ B, ein wichtiger Regulator der angeborenen Immunität, mit der Entwicklung von Tumoren in Verbindung gebracht wird (Greten FR et al. 2004; Pikarsky E et al. 2004). Zusätzlich wird das Immunsystem durch Stimulation der *Pattern recognition-receptors* (PRRs) aktiviert (Ketloy C et al. 2008; Ochi A et al. 2012; Cherfils-Vicini J et al. 2010). Zu diesen gehören die Toll-like Rezeptoren (TLRs). TLRs können durch eine Reihe von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs), z.B. Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) oder bakterielle und virale Nukleinsäure (Janeway CR Jr. 1989), aktiviert werden. Daneben gibt es noch *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), die durch Entzündung und Zellschäden entstehen und die TLRs stimulieren (Rubartelli A et al. 2007). In letzter Zeit wurde die gesteigerte Expression von TLRs in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (Grimm M et al. 2010). TLRs induzieren die Aktivierung des Adaptermoleküls MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*), was zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und dem MAP-Kinase-Signalweg führt, wodurch unter anderem vor Zelltod schützende antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und eine chronische

Entzündung hervorrufende Proteine wie COX-2 (Cyclooxygenase-2) gebildet werden (Grimm M et al. 2010; Bowie A et al. 2000). COX-2 und TLRs haben zusammen eine massive Auswirkung auf die Transformation normaler Zellen zu Krebszellen sowie der Angiogenese, reduzierten Apoptose und Immunsuppression maligner Tumoren (Harris RE 2007). Eine vorausgegangene Arbeit zeigte, dass die Expression von TLR7 und TLR8 mit dem Tumorstadium des kolorektalen Karzinoms korreliert und ein reduziertes tumorbedingtes Überleben bei hohen TLR7- und TLR8-Expressionen in den kolorektalen Karzinomzellen bedingt (Grimm M et al. 2010).

Im Gegensatz dazu zeigen andere Forschungsergebnisse einen positiven Effekt im Kampf gegen das Tumorwachstum durch eine gezielte Aktivierung des Immunsystems über die TLRs. So wird der TLR7-Agonist Imiquimod für die Behandlung des Basalzellkarzinoms verwendet. Andere synthetische TLR7- und TLR8-Agonisten wie Resiquimod (R848) oder Gardiquimod sind entwickelt worden. R848 ist ein selektiver Ligand für TLR7 in der Maus und TLR7 und TLR8 im Menschen (Bong AB et al. 2002; Dunne A et al. 2011).

### ***1.1 Das Adenokarzinom des Pankreas***

Das Adenokarzinom des Pankreas ist mit Abstand (ca. 90%) der häufigste maligne Tumor der Bauchspeicheldrüse. Es gibt zwar zahlreiche weitere Tumore der Bauchspeicheldrüse, wie das Papillenkarzinom, intraduktale papillär-muzinöse Tumoren (IPMT) oder endokrine Tumoren (Insulinom, Gastrinom, Somatostatinom), die aber in der Gesamtheit eine untergeordnete Rolle spielen und auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden soll.

Trotz steter Entwicklungen in den letzten Dekaden bzgl. diagnostischer, operativer, onkologischer und pharmazeutischer Verfahren konnte keine signifikante Prognoseverbesserung für das Pankreaskarzinom erzielt werden. Bei nahezu vergleichbarer Inzidenz und Mortalität kommt die Diagnose einem Todesurteil nah. Aufgrund seines aggressiven Wachstums mit frühzeitiger Metastasierung stellt es das tödlichste Karzinom des Gastrointestinaltraktes mit einer sehr schlechten 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 10% (RKI -



Krebs in Deutschland 2013) dar. Es ist der vierthäufigste Grund für ein malignombedingtes Sterben (Siegel R et al. 2013). Die bisher einzig mögliche kurative Therapie besteht in der operativen Resektion, jedoch ist bei Diagnosestellung nur jeder fünfte Patient potentiell resektabel. Selbst bei diesen Patienten besteht nach erfolgter Resektion des Karzinoms eine niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von 10-25% (Saif MW, 2007. Winter JM et al. 2006).

### **1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie**

Das Pankreaskarzinom ist ein maligner Tumor der Bauchspeicheldrüse, einem hormon- und Verdauungssäfte-produzierendem Organ (endokrine und exokrine Funktion), der in dem überwiegenden Teil der Fälle von dem Gangsystem (exokrin) innerhalb des Pankreas ausgeht und somit auch als duktales Adenokarzinom des Pankreas bezeichnet wird. Als Risikofaktoren gelten u.a. Pankreatitiden (Lowenfels AB et al. 1993), Nikotinabusus, Übergewicht (Fryzek JP et al. 2005; Parkin DM et al. 2011) und familiäre Belastung (Ghadirian P et al. 1991; Schenk et al. 2001).

Die Inzidenzrate liegt bei ca. 12,4 pro 100000 Personen und die Mortalitätsrate bei 10,9 pro 100000 Personen (Howlader N et al. 2014).

Aufgrund der Tatsache, dass frühe Stadien des Pankreaskarzinoms oft keine oder nur sehr unspezifische Beschwerden hervorrufen, wird der aggressiv wachsende und frühzeitig metastasierende Tumor erst spät und in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert. Aus diesem Grund ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit ca. 8% sehr niedrig und weist im Vergleich mit allen Krebserkrankungen die niedrigste Überlebensrate auf. Trotz einiger Fortschritte in der operativen und konservativen Therapie zeigt sich hier nur ein stabiler Verlauf (RKI - Krebs in Deutschland, 2013; Siegel R et al. 2013).

### **1.1.2 Molekulare Eigenschaften**

Die Sequenzierung des Genoms von Adenokarzinomen des Pankreas erbrachte in mehr als der Hälfte der untersuchten Proben eine genetische Veränderung von K-Ras (Onkogen), p16<sup>ink4A</sup>, Tp53 und SMAD4

(Tumorsuppressorgene) (Jones S et al. 2008; Matthaei H et al. 2015).

### **1.1.3 Diagnostik**

Bei Verdacht auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms erfolgt eine ausführliche klinische, laborchemische und apparative Diagnostik für das Staging. Als Tumormarker fungieren das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9) und das Carcinoembryonale Antigen (CEA), die jedoch keine ausreichende Sensitivität (CA 19-9: 60-70 %; CEA: 30-60 %) und Spezifität (CA 19-9: 70-85 %; CEA: 80-90 %) besitzen (Winter et al. 2013). Ihr Nutzen liegt aber in der postoperativen Verlaufskontrolle und dem Monitoring unter einer Chemotherapie (Ballehanannia UK et al. 2012; Locker GY et al. 2006).

Anschließend erfolgt die apparative Diagnostik gestaffelt mit Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie sowie Endosonographie. Mittels der bildgebenden Verfahren kann über die Resektabilität, aber nicht immer sicher zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom unterschieden werden. Deshalb ist eine histologische Sicherung anzustreben, die bei potentiell resektablen Befunden nach operativer Therapie erfolgen kann. Bei nichtresektablen Tumoren ist eine risikoarme Punktion (sonographisch, CT-gesteuert oder endosonographisch) zur Histologiegewinnung empfohlen (S3 Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013).

### **1.1.4 Klassifikation**

Unter diesem Abschnitt werden die gängigen Klassifikationen für das Pankreaskarzinom beschrieben. Sie dienen der Beurteilung des Tumors, sind Entscheidungshilfe für die Therapie und lassen eine Aussage über die Prognose zu (Wittekind C 2013).

#### **1.1.4.1 TNM-Klassifikation**

Das Ausmaß der malignen Tumorerkrankung mit Tumorgöße, Invasion in benachbartes Gewebe und Lymphknoten- sowie Fernmetastasierung werden

mithilfe der TNM-Klassifikation beurteilt.

T bezeichnet den Tumor und seine Ausdehnung, N beschreibt das Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und M das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

**Tbl. 1: TNM-Nomenklatur für das Pankreaskarzinom**

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ (Frühstadium ohne invasives Wachstum)
T1	Größter Durchmesser des Primärtumors $\leq 2$ cm; Tumor auf das Pankreas beschränkt
T2	Größter Durchmesser des Primärtumors $> 2$ cm; Tumor auf das Pankreas beschränkt
T3	Tumor überschreitet die Organgrenze, aber noch keine Infiltration in den Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior
T4	Infiltration in angrenzende arterielle Gefäße (Truncus coeliacus, A. mesenterica superior)
<b>N</b>	<b>Regionäre Lymphknoten</b>
NX	Keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Befall regionärer Lymphknoten
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
MX	Keine Beurteilung der Fernmetastierung möglich
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

#### **1.1.4.2 UICC-Klassifikation**

Durch die *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) erfolgt eine Stadieneinteilung anhand der TNM-Klassifikation. Diese Stadieneinteilung ist für die anzuwendende Therapie und die Prognose von Bedeutung.

**Tbl. 2: UICC-Stadien**

<b>UICC-Stadien 2010</b>	<b>TNM-Klassifikation</b>		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1-T3	N1	M0
Stadium III	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

### **1.1.4.3 Graduierung**

Mit Hilfe der Graduierung wird der Differenzierungsgrad der Zellen beschrieben, der weitere Informationen bzgl. der Prognose geben soll (Lüttges et al. 2000).

**Tbl. 3: Differenzierungsgrade (Grading)**

<b>G= Differenzierungsgrad der veränderten Zellen</b>	
GX	Differenzierungsgrad nicht zu bestimmen
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

### **1.1.4.4 R-Klassifikation**

Die Residualtumorklassifikation beschreibt den Tumorstatus nach operativer Therapie.

**Tbl. 4: R-Klassifikation**

<b>R= Residualtumor (Resttumor nach Operation)</b>	
RX	Residualtumor kann nicht bestimmt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Nachweis eines Residualtumors
R2	Makroskopischer Nachweis eines Residualtumors

### 1.1.5 Therapie

Die Therapie richtet sich nach den erhobenen Befunden. Besteht ein kurativer Ansatz, d.h. es handelt sich um einen potentiell resektables Adenokarzinom des Pankreas, so ist der Goldstandard und bisher die einzig erfolgversprechende Therapie die Operation mit enbloc-Resektion aller tumorbetreffenen Strukturen und Anstreben einer R0-Situation unter onkologischen Gesichtspunkten (Doi R et al. 2008). Das operative Ausmaß hängt dabei von der Lokalisation des Primärtumors im Pankreas und seiner Ausdehnung in peripankreatische Gewebe und Strukturen ab. Bei einer Lokalisation im Pankreaskopfbereich ist die rechtsseitige Teilresektion (Duodenopankreatektomie mit Pylorusresektion nach Kausch-Whipple oder pyloruserhaltend nach Traverso-Longmire), bei einer Lokalisation im Pankreasschwanz die Pankreaslinksresektion und bei diffuser Tumorausbreitung in der Bauchspeicheldrüse die Pankreatektomie empfohlen (S3 Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013). Durch Tumorausbreitung betroffene peripankreatische Strukturen und Gewebe sind wenn möglich mit dem Ziel eine R0-Situation zu erreichen mitzuresezieren (Nikfarjam M et al. 2009; Leach SD et al. 1998; Sasson AR et al. 2002; Hartwig W et al. 2009).

Bei Infiltration des Truncus coeliacus und/oder der Arteria mesenterica superior gilt der Tumor aufgrund hoher postoperativer Morbidität und Mortalität als nicht resektabel (S3 Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013).

Bei ausgeprägten, tumorbedingten Stenosen des Ductus hepaticus communis (DHC) mit Cholestase und Cholangitis, kann präoperativ zur Verbesserung des präoperativen Patientenzustands eine Entlastung mittels eines endoskopisch eingebrachten Gallengangstents oder durch eine perkutane transhepatische Cholangiodrainage (PTCD) erfolgen (S3 Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013).

Postoperativ ist eine adjuvante Chemotherapie aufgrund einer hohen Rezidivrate empfohlen. Die dafür verwendeten Chemotherapeutika sind Gemcitabine und 5-Fluorouracil (5-FU).

In einigen klinischen Studien wird bei primär nicht resektablen Tumoren eine

neoadjuvante Chemotherapie verabreicht, mit dem Ziel den Tumor dadurch zu verkleinern, so dass dieser wiederum potentiell resektabel ist. (Evans DB et al. 2008; Gillen S et al. 2010).

Sollte es sich definitiv um ein soweit fortgeschrittenes Tumorleiden handeln, dass keine kurative operative Therapie mehr zulässt, so ist eine Leitlinien-gerechte palliative Chemotherapie oder *Best Supportive Care* (BSC) empfohlen.

## **1.2 Toll-like Rezeptoren (TLR)**

Toll-like Rezeptoren sind Strukturen des angeborenen Immunsystems. Sie gehören der Gruppe der *Pattern-recognition receptors* (PPRs) an und werden von verschiedenen Zellen des Körpers, insbesondere Immunzellen, ausgebildet. In ihrer Funktion erkennen sie Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Dies sind Strukturen verschiedenster Mikroorganismen und ermöglichen dem Immunsystem des Körpers, das Eindringen von bakteriellen, viralen und weiteren Mikroorganismen zu erkennen. Zusätzlich können diese Rezeptoren noch durch *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), zelluläre oder nukleäre Proteine, die z.B. im Rahmen einer Zellnekrose auftreten, stimuliert werden (Kaczmarek A et al. 2013; Krysko DV et al. 2011). Dadurch wird entweder eine infektiöse exogene (PAMPs) oder nichtinfektiöse endogene (DAMPs) Entzündungsreaktion ausgelöst. Besonders der Aktivierung durch DAMPs wird eine Aufrechterhaltung einer chronischen Inflammation zugeschrieben. Mittlerweile ist eine Vielzahl an TLRs entdeckt und beschrieben worden. Für Säuger sind bisher 10 humane (TLR1-10, s. Tbl. 5) und 12 murine (TLR1-9, 11-12) bekannt.

Des Weiteren wurde bereits in verschiedenen Arbeiten der Nachweis von TLRs in malignen Tumoren wie dem Lungenkarzinom (Cherfils-Vicini J et al. 2010) und kolorektalem Karzinom (Grimm M et al. 2010) erbracht.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen von Pankreastumorgewebe in der Arbeitsgruppe Molekulare Onkoimmunologie von Frau Prof. Dr. Waaga-Gasser

konnte auch in den Pankreaskarzinomzellen TLR7 und TLR8 nachgewiesen werden, auf die im Rahmen dieser Arbeit weiter eingegangen werden soll.

**Tbl. 5:** humane Toll-like Rezeptoren

<b>TLR</b>	<b>exprimierende Zellen</b>
TLR1	<i>Immunzellen:</i> Monozyten, Makrophagen, B- u. T-Zellen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) <i>Nichtimmunzellen:</i> Fibroblasten, Astrozyten, epitheliale Zellen, Keratinozyten
TLR2	<i>Immunzellen:</i> Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten <i>Nichtimmunzellen:</i> Fibroblasten, Astrozyten, epitheliale Zellen, Keratinozyten
TLR3	<i>Immunzellen:</i> Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) <i>Nichtimmunzellen:</i> Fibroblasten, Astrozyten, epitheliale Zellen, Keratinozyten
TLR4	<i>Immunzellen:</i> Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten <i>Nichtimmunzellen:</i> Fibroblasten, Astrozyten, epitheliale Zellen, Keratinozyten
TLR5	<i>Immunzellen:</i> Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten <i>Nichtimmunzellen:</i> Fibroblasten, Astrozyten, epitheliale Zellen, Keratinozyten
TLR6	<i>Immunzellen:</i> Monozyten, Makrophagen, B- u. T-Zellen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) <i>Nichtimmunzellen:</i> Fibroblasten, Astrozyten, epitheliale Zellen, Keratinozyten
TLR7	<i>Immunzellen:</i> B-Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen <i>Karzinomzellen:</i> Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom
TLR8	<i>Immunzellen:</i> Monozyten, myeloide dendritische Zellen <i>Karzinomzellen:</i> Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom
TLR9	<i>Immunzellen:</i> B-Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen, <i>Nichtimmunzellen:</i> Gastrointestinale epitheliale Zellen
TLR10	<i>Immunzellen:</i> B-Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen

### **1.2.1 Toll-like Rezeptor 7**

Toll-like Rezeptor 7 (TLR7) ist ein endosomaler Toll-like Rezeptor, der im Immunsystem auf dendritische Zellen und B-Zellen beschränkt zu sein scheint. TLR7 besitzt den gleichen Liganden wie TLR8. Beide Rezeptoren werden durch Einzelstrang-RNA (engl. *single stranded RNA*, ssRNA) durch Viren oder körpereigene Strukturen aktiviert. Vor allem Uracil (U)- und Guanin/Uracil (GU)-reiche Sequenzen zeigten sich als starke Stimulatoren (Heil F et al. 2004). In weiteren Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden das *small interfering-RNA* (siRNA) ohne Anteil von Uracil oder Guanosin TLR7 stimuliert (Hornung V et al. 2005). Trotz ihrer Gemeinsamkeiten zeigten sich in Arbeiten mit spezifischen Agonisten Unterschiede in den Signalwegen. TLR7-Agonisten führten zu einer Aktivierung des Interferon-Signalwegs in plasmazytoiden dendritischen Zellen, während die Aktivierung von TLR8 vorwiegend zu einer Produktion proinflammatorischer Zytokine in myeloiden dendritischen Zellen und Monozyten führte (Gorden KB et al. 2005).

In den letzten Jahren konnte auch der Nachweis einer TLR7- und TLR8-Expression auf Tumorzellen erbracht werden (Cherfils-Vicini J et al. 2010; Grimm M et al. 2010). In der Arbeit von Cherfils-Vicini et al. wurde gezeigt, dass die Stimulation der beiden TLRs ein Überleben der Tumorzellen und eine Chemotherapieresistenz induziert. Grimm et al. wiesen nach, dass die Expression der TLRs abhängig vom UICC-Stadium war und eine ausgeprägte Expression mit einer schlechteren Prognose verbunden war.

### **1.2.2 Toll-like Rezeptor 8**

Der Toll-like Rezeptor 8 befindet sich ebenfalls wie TLR7 nicht auf der Zelloberfläche, sondern ist intrazellulär an Endosomen exprimiert. Auch TLR8 wird durch ssRNA stimuliert, jedoch ist dies auch von bestimmten RNA-Sequenzen abhängig (Forsbach A et al. 2008).

## **1.3 TLR7- und TLR8-Liganden**

Für TLRs im Allgemeinen sind verschiedenste exogene Liganden bakteriellen,



viralen, fungalen oder parasitären Ursprungs, als auch endogene Liganden beschrieben worden. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren auch synthetische Liganden entwickelt, die teilweise wie Imiquimod bereits in der klinischen Anwendung sind.

### **1.3.1 Resiquimod (R848)**

R848 ist ein Imidazoquinolin-Bestandteil, das eine hohe antivirale Aktivität besitzt. R848 aktiviert über die TLRs 7 und 8 das Immunsystem über den MyD88-Signalweg (Hemmi H et al. 2002, Jurk M. et al. 2002) Die Stimulation der Rezeptoren ist für TLR7 mit einer Konzentration von 50 ng/ml – 5 µg/ml und für TLR8 von 0,5 – 5 µg/ml möglich. Die Folgen der Stimulation sind u.a. die Aktivierung des Immunsystems, Zytokinfreisetzung und Apoptoseschutz.

### **1.3.2 Gardiquimod**

Gardiquimod ist ebenfalls ein Imidazoquinolin-Bestandteil. Im Vergleich zu Imiquimod reicht ein Zehntel der Dosis (0,1 µg/ml) aus, um über TLR7 NF-κB zu aktivieren. Eine Aktivierung von TLR8 erfolgt dagegen erst ab einer Konzentration von 3 µg/ml mit nur leichter Reaktion.

## **1.4 Vorarbeiten**

Die Arbeit beruht auf bereits in der Forschungsgruppe Molekulare Onkoimmunologie unter Frau Prof. Dr. Waaga-Gasser gemachte histologische und molekularbiologische Untersuchungen. In den histologischen Untersuchungen konnte im Pankreaskarzinomgewebe von Patienten eine TLR7- und TLR8-Expression detektiert werden. Die darauffolgenden Versuche, die Toll-like Rezeptoren in etablierten Pankreaskarzinomzelllinien mit Immunhistochemie und quantitativer real-time PCR zu detektieren, waren frustrierend. Trotz des Austestens verschiedener Antikörper und Primer konnte keine suffiziente Überexpression der TLRs erkannt werden. Aus diesem Grund wurde eine Überexpression für die besagten TLRs in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC1 induziert.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es nach dem histologischen Nachweis einer TLR7- und TLR8-Expression in Pankreaskarzinomzellen aus Patientengewebe die Bedeutung dieser Expression auf das inflammatorische Tumormikromilieu einer Pankreaskarzinomzelllinie zu untersuchen. Es sollte die daraus resultierende Auswirkung auf die Zellproliferation und die Zellviabilität und die Effekte unter Chemotherapeutikumzugabe untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

Die verwendete Zelllinie PANC1 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen. Sie ist eine duktales Adenokarzinomzelllinie des Pankreas menschlichen Ursprungs. Sie wurde 1973 von einem 56-jährigen Mann gewonnen (Lieber M et al. 1975). Die Verdoppelungszeit beträgt etwa 52 h.

Durch die Firma Sirion Biotech (Martinsried, Deutschland) wurde eine stabile Überexpression von TLR7, TLR8 und eines Leervektors mittels lentiviraler Transduktion indiziert. Die Zellen werden im weiteren als TLR7<sup>+</sup>- und TLR8<sup>+</sup>-PANC1 bezeichnet. Für die Zellen mit dem Leervektor erfolgt keine gesonderte Bezeichnung.

#### 2.1.2 Primer

Die Sequenzen der Primer sind unter 2.2.6 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion aufgeführt.

**Tbl. 6:** *verwendete Primer*

Primer	Hersteller
COX-2 (PTGS2)	Qiagen, Hilden, D
IL-6	Qiagen, Hilden, D
NF-κB	Biomers.net GmbH, Ulm, D
TLR7	Biomers.net GmbH, Ulm, D
TLR8	Biomers.net GmbH, Ulm, D
18s-RNA	Biomers.net GmbH, Ulm, D

#### 2.1.3 siRNA

Die Sequenzen der siRNAs sind unter 2.2.7 siRNA-Transfektion aufgeführt.

**Tbl. 7:** *verwendete siRNA*

<b>siRNA</b>	<b>Hersteller</b>
TLR7 siRNA ID #: s27844	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
TLR8 siRNA ID #: s27920	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

### **2.1.4 Transfektionsreagenz**

Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000 von Invitrogen (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) verwendet.

### **2.1.5 Kits**

**Tbl. 8:** *Übersicht über verwendete Kits*

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
RT <sup>2</sup> First Strand Kit	Qiagen, Hilden, D

### **2.1.6 Verbrauchsmittel**

Verbrauchsmittel wie Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen, 6-well, 12-well und 96-well Zellkulturplatten, 1,5 und 2 ml Caps wurden von Sarstedt (Nürnberg, D), Greiner (Frickhausen, D), TPP (Trasadingen, CH) und NUNC (Braunschweig, D) bezogen.

### **2.1.7 Medien, Lösungen und Chemikalien**

**Tbl. 9:** *verwendete Medien, Lösungen und Chemikalien*

<b>Produkt</b>	<b>Herstelle</b>
5-FU	Medac GmbH, Wedel, D
alamarBlue	AbD Serotec, Oxford, UK
DMEM	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
FCS	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
G418	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Gardiquimod	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
MTS-Reagenz	Promega GmbH, Mannheim, D

Opti-MEM	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
PBS	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin 10000µg/ml	Biochrom GmbH, Berlin, D
Resiquimod	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
RNase-freies Wasser	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
SYBR Green I	Eurogentec, Seraing, Belgien
Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% (w/v)	Biochrom GmbH, Berlin, D

## 2.1.8 Geräte

**Tbl. 10:** verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
accu-jet pro-Pipette	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Arbeitsbank P-030-02	C.B.S. Scientific Co., San Diego, CA, USA
DNA-Engine Opticon 2 Real-Time Cyclers	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
HeraSafe Arbeitsbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Kühl-/Gefrierschränke	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, D Phillip Kirsch GmbH, Offenburg, D
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, D
MRX microplate reader	Dynex-Technologies GmbH, Denkendorf, D
MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
NanoDrop 2000c	NanoDrop products, Wilmington, DE, USA
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Waage CP4201	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad Haake SWB25	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zellkulturschrank Heracell	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge Combispin	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

## 2.1.9 Software

Tbl. 10: verwendete Software

Software	Hersteller
Biolinx 2.21	Dynex-Technologies GmbH, Denkendorf, D
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleissheim, D
NanoDroop 2000/2000c	NanoDrop products, Wilmington, DE, USA
OpenOffice	The Apache Software Foundatio, Los Angeles, CA, USA
Opticon Monitor 2	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Gemäß den Angaben von ATCC erfolgte die Kultivierung der PANC1-Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem Anteil von 10 % an FCS (fetal calf serum) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C im Zellkulturschrank herangezogen. Es erfolgte alle 2 Tage ein Mediumwechsel.

Für die Subkultivierung wurden die adhärent wachsenden Zellen bei einer Wachstumsdichte von ca. 80-90 % nach Entfernen des Mediums und einmaligem Spülen mit PBS mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Durch Zugabe von 10ml Kulturmedium wurde diese Reaktion gestoppt und die Zellen anschließend zentrifugiert. Das daraus entstehende Zellpellet wurde in frisches Kulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 gesplittet und auf die neuen Kulturflaschen aufgeteilt. Musste eine bestimmte Anzahl an Zellen für einen Versuch genutzt werden, so wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (s. 2.2.2). Für die Versuche wurden Zellen bis zur Passage 20 verwendet.

Bezüglich der PANC1-Zellen mit induzierter Überexpression wurde noch zusätzlich in das Kulturmedium 1 % des Antibiotikums G418 hinzugegeben, da bei diesen Zellen im Rahmen der lentiviralen Transduktion eine

Antibiotikaresistenz gegen eben dieses Antibiotikum induziert wurde, um im weiteren Verlauf der Zellkultivierung die TLR7- und TLR8-überexprimierenden Zellen durch diesen Selektionsvorteil vor einer Überwucherung nicht überexprimierender Zellen zu schützen. Die weitere Handhabung dieser Zellen erfolgte gleich denen ohne lentivirale Überexpression.

### **2.2.2 Zellzahlbestimmung**

Die Zelldichte wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde dafür mit einer 0,5 %-igen Lösung des Vitalfarbstoffs Trypanblau im Verhältnis 1:10 gemischt und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Anhand des Färbeverhaltens kann zwischen vitalen (hellblauen) und toten (dunkelblau) Zellen unterschieden werden. Es wurden die lebenden Zellen in jedem der vier Abschnitte der Zählkammer bestimmt und aus der Gesamtzahl ein Mittelwert gebildet. Der Mittelwert wurde anschließend mit dem Faktor  $10^5$  multipliziert, was als Ergebnis die Anzahl an lebenden Zellen pro Milliliter Zellsuspension ergab:

$$\text{Zellen/ml} = (\text{Anzahl d. Zellen/Anzahl d. ausgezählten Quadrate}) \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

### **2.2.3 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit. Die Handhabung erfolgte gemäß den Angaben des zugehörigen Handbuchs. Es wurden dafür maximal  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet, um eine Verstopfung des Säulensystems und damit Einbußen in Menge und Reinheit der RNA zu vermeiden.

Nach Bestimmung der Zellzahl über die Neubauer-Zählkammer wurde die benötigte Menge in ein 2 ml Eppendorf-Cap überführt, für 5 min bei  $300 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand vom Pellet vorsichtig abpipettiert. Zum Lösen der Zellen wurden 350  $\mu\text{l}$  Buffer RLT hinzugegeben und anschließend mit der Pipette und dem Vortexer gemischt. Das Lysat wurde in eine QIAshredder spin Säule aufgetragen, die auf einem 2 ml Eppendorf-Cap aufgebracht war, und bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Danach Zugabe von 70 % Ethanol und sorgfältiges Durchmischen mit der Pipette. Die weiteren Schritte erfolgen mit der auf eine 2 ml Eppendorf Cap aufgebrachten RNeasy spin

Säule. Zuerst wurden 700 µl der Probe die RNeasy spin Säule gegeben und erneut für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach Zugabe von 700 µl Buffer RW1 erfolgte die Zentrifugation für 15 s bei 8000 x g mit Verwerfen des Durchflusses. Nach Applikation von 500 µl Buffer RPE wurde für 2 min bei 8000 x g zentrifugiert, um noch verbliebenes Ethanol sicher auszuwaschen. Die RNeasy spin Säule wurde danach auch eine 1,5 ml Eppendorf-Cap gesetzt, 50 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert um die RNA zu eluieren.

Die Proben wurden danach bei -20 °C gelagert oder zur cDNA-Synthese weiterverwendet.

## 2.2.4 Reverse Transkription

Für die Herstellung einer cDNA wurde das RT<sup>2</sup> First Strand Kit verwendet. Die Handhabung erfolgte gemäß den Angaben des zugehörigen Handbuchs. Vor Benutzung wurden die benötigten Kit-Reagenzien für 10-15 s abzentrifugiert. Danach erfolgte die Herstellung und Zugabe des DNA-Elimination-Mixes zu jeder Probe. Es wurde ein Gesamtvolumen von 10 µl hergestellt, bestehend aus:

RNA	x µl (=1 µg)
Buffer GE	2 µl
<u>RNase-freiem Wasser</u>	<u>x µl</u>
Gesamtvolumen	10 µl

Die Proben wurden daraufhin für 5 min bei 42 °C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis gelagert. Es wurde der Reverse-Transcription Mix mit einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt, bestehend aus:

5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
<u>RNase-freiem Wasser</u>	<u>3 µl</u>
Gesamtvolumen	10 µl



Der Reverse-Transcription Mix wurde zu den Proben mit DNA-Elimination Mix hinzugegeben und durchmischt. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 15 min bei 42 °C und für 5 min bei 95 °C. Abschließend erfolgte die Zugabe von 91 µl RNase-freiem Wasser. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert oder für die anschließende PCR weiterwendet.

### **2.2.5 Bestimmung der Menge und Reinheit von RNA und cDNA**

Um die Menge und Reinheit der hergestellten RNA und cDNA bestimmen zu können, erfolgte eine Messung mit dem Thermo NanoDrop 2000c. Es wurde dafür die zugehörige Software NanoDrop verwendet. Nach Erstellen einer Blindprobe mit 2 µl destilliertem Wasser wurden die einzelnen Proben (je 2 µl) gemessen. Nach Messung der Wellenlängen bei 230, 260 und 280 nm der RNA oder cDNA berechnete die Software die 260/280- und 260/230-Verhältnisse, die eine Aussage über die Reinheit der Proben zulassen. So galt beim 260/280-Verhältnis ein Wert um 1,8 für DNA und um 2,0 für RNA als rein. Ein Wert von 1,8-2,2 beim 260/230-Verhältnis wurde als rein interpretiert. Niedrigere Werte deuteten bei beiden auf Verunreinigungen hin. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Konzentration der DNA und RNA in ng/µl. Der über die Software erstellte Bericht wurde in eine Excel-Tabelle zur weiteren Bearbeitung exportiert.

### **2.2.6 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion**

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion erlaubt eine spezifische in vitro Vervielfältigung beliebiger DNA-Abschnitte und die Quantifizierung der DNA. Für die Quantifizierung wird die Fluoreszierung gemessen, die während eines PCR-Zyklus entsteht. Diese nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Als Fluoreszenzfarbstoff wird SYBR Green I verwendet, das die Eigenschaft besitzt an doppelsträngige DNA zu binden. Die daraus entstehende Fluoreszenz wird am Ende der Elongation gemessen.

Für diese Arbeit wurde der MESA Green qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay No ROX der Fa. Eurogentec verwendet. Dieser ist eine Zusammensetzung aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), MeteorTaq DNA-Polymerase,

MgCl<sub>2</sub> (4 mM), SYBR Green I und Stabilisatoren. Der Reaktionsmix wurde wie folgt hergestellt:

2x reaction buffer	12,5 µl
Forward primer	1,25 µl
Reverse primer	1,25 µl
Template	2 µl
<u>RNase- u. DNase freies Wasser</u>	<u>8 µl</u>
Gesamtvolumen	25 µl

Die für PCR verwendeten Primer und ihre Sequenzen sind in Tbl. 11 aufgeführt.

**Tbl. 11:** *Sequenzen der verwendeten Primer*

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
TLR7	Forward: 5'-GTG ATG CTG TTT TGT C-3' Reverse: 5'-CAG ATC CAG GTC ACA C-3'
TLR8	Forward: 5'-CAA ACT GCC ACC CTA C-3' Reverse: 5'-CTC GGA CAG TGC TTAA-3'
18s-RNA	Forward: 5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GGT TCG-3' Reverse: 5'-TTA TTG CTC AAT CTC GGG TGG CTG-3'
COX-2	Designed by Qiagen
IL-6	Designed by Qiagen
NF-κB	Forward: 5'-GGC TAC ACC GAA GCA ATT GAA-3' Reverse: 5'-CAG CGA GTG GGC CTG AGA-3'

TLR7-, TLR8-, NF-κB- und 18s-RNA-Primer wurden von biomers.net bezogen. IL-6- und COX-2-Primer kamen von Qiagen. Als Housekeeping-Gen wurde 18s-RNA verwendet.

Der angesetzte Reaktionsmix wurde in 8er-Streifen (PCR TW 8 Tube strips; Biozym, Hessisch Oldendorf, D) gegeben, die mit den dazugehörigen durchsichtigen Caps (Biozym) verschlossen wurden. Anschließend erfolgte ein kurzes Abzentrifugieren für 5 s. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und für jedes Gen eine Leerkontrolle mit Wasser mit einbezogen.

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte mit dem DNA Engine Opticon 2 System.

Die Laufbedingungen für die quantitative real-time PCR waren wie folgt:

MeteorTaq-Aktivierung		5 min	95 °C
40 Zyklen	Denaturierung	15 s	95 °C
	Annealing	20 s	60 °C
	Elongation	40 s	72 °C

Denaturierung bedeutet, dass die Wasserstoffbrücken der doppelsträngigen cDNA durch Hitze gespalten werden und sich die cDNA somit in Einzelstränge trennt. Da dies kein irreversibler Prozess ist, können sich durch Abkühlung im Rahmen des Annealings die Primer an die DNA-Einzelstränge wieder anlagern. In der daran anschließenden Elongation erfolgt die Synthese des komplementären Strangs vom Primer aus in 5'-3'-Richtung. Es erfolgten 40. Zyklen dieses Vorgangs.

Die Daten wurden mit der Opticon Monitor 2 Software und Excel analysiert. Die relative Expression wurde mittels der  $\Delta\Delta C(T)$  angegeben, die folgendermassen berechnet wurde:

$\Delta C(T)$ :

Kontrolle:  $C(T)$  Gene of interest -  $C(T)$  House keeping gene

Untersuchtes Gen:  $C(T)$  Gene of interest -  $C(T)$  House keeping gene

$\Delta\Delta C(T)$ :

$\Delta C(T)$  Untersuchtes Gen -  $\Delta C(T)$  Kontrolle

Fold change:

$2^{-\Delta\Delta C(T)}$

Positiver  $\Delta\Delta C(T)$  = Verschlechterung

Negativer  $\Delta\Delta C(T)$  = Verbesserung

Der  $C(T)$ -Wert gibt die Zykluszahl an, bei der das exponentielle Wachstum

erstmalig über einen gesetzten Schwellenwert ansteigt.

## 2.2.7 siRNA-Transfektion

Um die Auswirkungen der TLR-Agonisten auf die TLR7<sup>+</sup>- und TLR8<sup>+</sup>-Zellen bestimmen zu können, wenn die Rezeptoren wieder herabreguliert sind, wurde eine siRNA-Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt.

siRNA ist die Abkürzung für small interfering RNA. siRNAs sind kurze, bis 20-25 Basenpaare lange RNA-Abschnitte. Mit Hilfe bestimmter siRNAs kann die Transkription von Zielgenen herabreguliert werden (Knockdown). Hierfür muss die siRNA jedoch durch die Zellmembran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, in das Innere der Zelle gelangen. Dafür nutzt man die Lipofektion (Felgner PL et al. 1987), d.h. die siRNA wird mit Hilfe von Liposomen in die Zelle transportiert.

Die verwendeten siRNAs und ihre Sequenzen sind in Tab. 12 aufgelistet.

**Tbl. 12:** *Sequenzen der siRNAs*

siRNA	Sequenz
TLR7	Sense: 5'-GAG CAU ACA GCU UAG CAA Att-3' Antisense: 5'-UUU GCU AAG CUG UAU C`GCU Ctg-3'
TLR8	Sense: 5' GGA UCU UGA AUU CAA CUA Utt-3' Antisense: 5'-AUA GUU GAA UUC AAG AUC Cag-3'

Für die Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^6$  pro Feld in 6-well Platten in 2 ml Standardmedium DMEM mit den notwendigen Zusätzen am Vortag ausgesät und im Zellkulturschrank inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 50 % der Zellen konfluent sind, um die Wirksamkeit der Transfektion nicht herabzusetzen. Am Folgetag wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, bevor anschließend 1,5 ml Medium ohne Zusätze hinzugegeben wurde. Für die Transfektion erfolgte pro Feld die Zugabe des Transfektionsreagenz. Für die Herstellung des Transfektionsreagenz wurden 200 pmol der gewünschten siRNA in 250 µl Opti-MEM gegeben und vermischt. 10µl Lipofectamine wurden ebenfalls in 250 µl

Opti-MEM gelöst und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden beide Ansätze miteinander gemischt und weitere 20 min bei RT belassen. Dann erfolgte die Zugabe zu den zu transfizierenden Zellen. Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium gegen das Standardmedium DMEM mit seinen Zusätzen ausgetauscht und weitere 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Danach erfolgte die RNA-Extraktion wie beschrieben.

## 2.2.8 Proliferationsassay

Um das Ausmaß der R848-Stimulation auf die Zellproliferation bei den TLR7- und TLR8-überexprimierenden Zellen bestimmen zu können, wurden Triplets von Leervektor-, TLR7<sup>+</sup>- und TLR8<sup>+</sup>-PANC1-Zellen mit einer Dichte von 800 Zellen pro Well in 96-well Platten ausgesät und für 24 h in 100 µl Standardmedium bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden Medium-gefüllte Wells verwendet. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und zusätzlich 5 µg/ml R848 oder 10 µg/ml Gardiquimod hinzugegeben. An den Tagen 5 und 10 wurden die dafür vorgesehenen Platten mit 10µl alamarBlue (AbD Serotec) pro Well gemäß dem Herstellerprotokoll versetzt. AlamarBlue ist Resazolin, ein Farbstoff, der als Redoxindikator verwendet wird. Wird Resazolin reduziert, so entsteht daraus irreversibel Resorufin, das rosafarben und fluoreszierend ist. Die Fluoreszierung ist proportional zu den metabolisch aktiven und lebenden Zellen. Nach erneuter Inkubation unter Standardbedingungen für 4 h wurde die Wellenlänge bei 570 und 630 nm mit einem Spektrometer (Dynatech MRX) und der Biolinx 2.21 Software gemessen. Als Negativkontrolle wurde alamarBlue in Medium verwendet. Die gemessenen Werte wurden in eine Excel-Tabelle überführt und mit der vom Hersteller angegebenen Formel anschließend die Reduktion des Zellmediums und somit die Proliferation berechnet:

$$\begin{array}{l} \text{Differenz in \% zw.} \\ \text{behandelten und} \\ \text{Kontrollzellen} \end{array} = (O2 \times A1) - (O1 \times A2) / (O2 \times P1) - (O1 \times P2) \times 100$$

- O1 = Extinktion oxidiertes alamarBlue bei 570 nm
- O2 = Extinktion oxidiertes alamarBlue bei 630 nm
- A1 = Extinktion Testwells bei 570 nm
- A2 = Extinktion Testwells bei 630 nm
- P1 = Extinktion der unbehandelten Kontrolle bei 570 nm
- P2 = Extinktion der unbehandelten Kontrolle bei 630 nm

## **2.2.9 Proliferationsassay nach siRNA-Transfektion**

Um den Nachweis zu erbringen, dass die Wirkung von R848 auf die Zellproliferation über TLR7 und TLR8 induziert wird, wurde der Knockdown der TLR7- und TLR8-Expression durch siRNA-Transfektion angestrebt (s. 2.2.7.), bevor eine Stimulation mit R848 erfolgte. Die Bestimmung erfolgte anschließend mit alamarBlue wie unter 2.2.8 beschrieben.

## **2.2.10 Bestimmung der mittleren letalen Dosis (LD50)**

Die mittlere letale Dosis soll eine Dosis einer Substanz beschreiben, unter der in einem definierten Zeitraum 50 % der Zellen gestorben sind. Für die Bestimmung der Viabilität wurde der CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) verwendet. Mit diesem kolorimetrischen Test kann über die Anzahl der lebenden Zellen die Proliferation oder Zytotoxizität bestimmt werden. Das Reagenz besteht aus einer Zusammensetzung von MTS [3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] und PES (Phenazine ethosulfate). Die Zellvitalität wird durch die Reduktion des gelben Farbstoffes durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums in violette Formazan bestimmt. Die Quantität von Formazan kann bei 490 nm bestimmt werden und ist proportional zu der Anzahl an noch lebenden, stoffwechselaktiven Zellen (Cory AH et al. 1991).

PANC1-Zellen mit Leervektor wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^3$  Zellen pro Feld in 96-well Platten ausgesät und in 100 µl DMEM für 24 h inkubiert. Am Folgetag wurde frisches Medium mit 5-FU (Medac) in den Konzentrationen 10, 100, 1000 und 10000 µmol/l für weitere 48h hinzugegeben, bevor erneut ein Mediumwechsel mit Hinzugabe von 5-FU-freiem DMEM erfolgte. Nach 24 h

wurden 20 µl CellTiter 96 AQueous One Solution Reagenz des CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) zu den 100 µl DMEM gegeben und nach 1 h Einwirkzeit die Absorption bei 490 nm in einem ELISA-Spektrometer/Mikroplatten-Lesegerät (Dynatech MRX) gemäß den Empfehlungen des Herstellers gemessen. Als LD50 wurde die 5-FU-Konzentration bezeichnet bei der 50 % der Zellen innerhalb von 3 d starben.

### **2.2.11 Chemotherapieresistenzassay**

Um den Effekt von 5-FU in Kombination mit R848 beurteilen zu können, wurden Leervektor-, TLR7<sup>-</sup>- und TLR8<sup>+</sup>-PANC1-Zellen mit einer Dichte von 2500 Zellen/Well in 96-well Platten für 24 h in 100 µl Standardmedium inkubiert. Am Folgetag wurden 10 µg/ml R848 und 1000 µmol/l 5-FU beim Mediumwechsel hinzugegeben und die einzelnen Platten für 3, 6 oder 9 Tage weiter inkubiert. Die Messung erfolgte gemäß den Schritten unter 2.2.8 beschrieben mit alamarBlue.

### **2.2.12 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse erfolgte mit dem zweiseitigen t-Test für ungepaarte Proben mit dem Programm Microsoft Excel. Als signifikant wurden p-Werte kleiner 0,05 festgelegt. Für die Berechnung wurden nur Versuche verwendet, bei denen mindestens eine Dreifachbestimmung erfolgte.

## 3 Ergebnisse

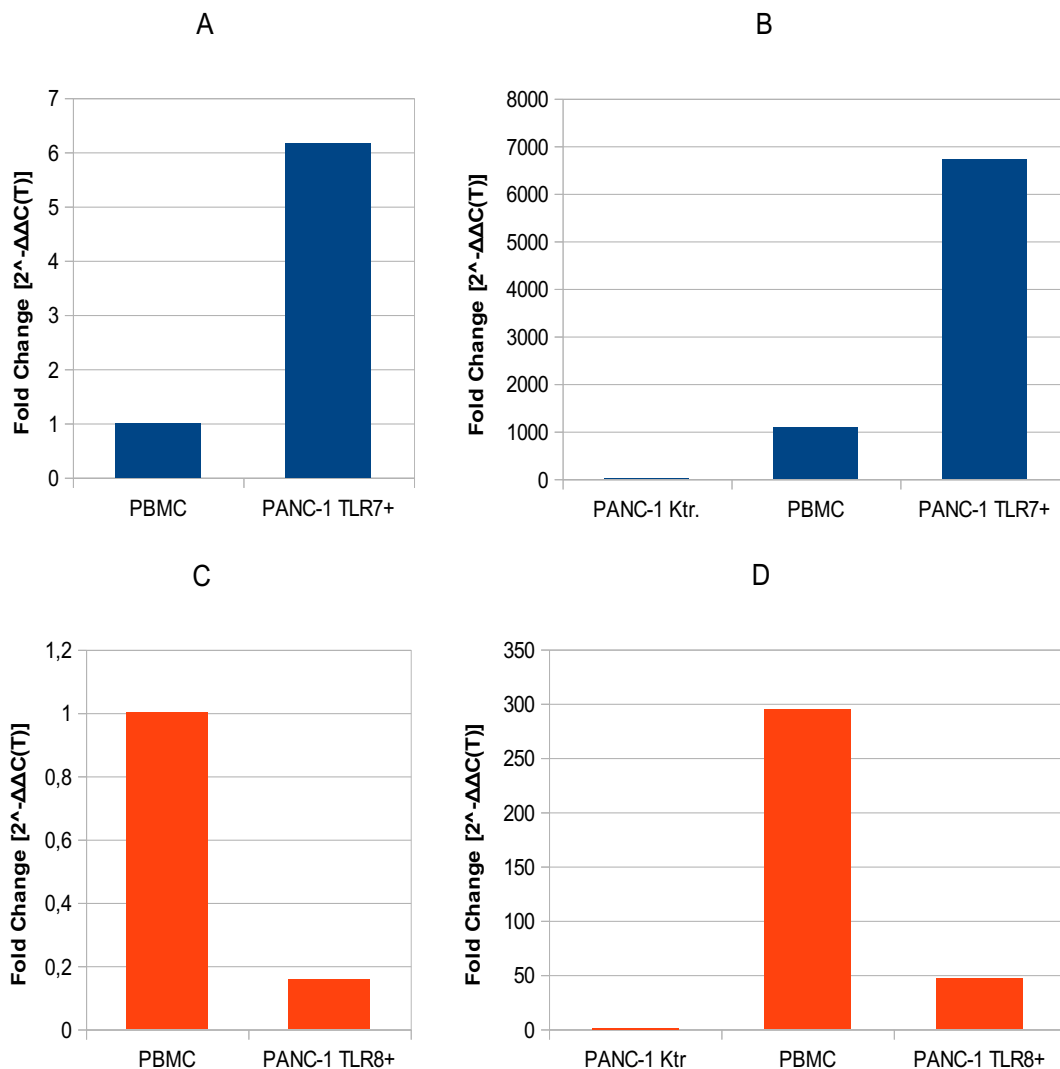
### 3.1 TLR-Expression

#### 3.1.1 TLR7- und TLR8-Expression nach lentiviraler Transduktion in den PANC1-Zellen

Mittels qPCR erfolgte die Bestimmung der TLR-Expression für TLR7 und TLR8 auf den PANC1-Zellen mit lentiviraler Überexpression. Als Kontrolle wurde die Leervektor-PANC1-Zelle verwendet. In den durchgeführten Kontrollen zeigte sich eine deutliche Überexpression des jeweiligen Toll-like Rezeptors. So exprimierten TLR7<sup>+</sup>-PANC1-Zellen im Vergleich zu Leervektor-PANC1-Zellen TLR7 über 600000% höher (Abb. 1B), während die TLR8-überexprimierenden PANC1-Zellen dementsprechend TLR8 um > 500 % mehr exprimierten als die Vergleichszellen (Abb. 1D).

Zusätzlich wurde die TLR7-Expression von TLR7<sup>+</sup>-PANC1 im Vergleich zu mononukleären Zellen des Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) bestimmt. Die PBMCs entstammten einer Blutprobe des Promoventen und wurden dankenswerterweise durch Frau Dipl.-Biol. T. Grimmig bis zur RNA aufgearbeitet. In Abb. 1A ist die deutliche Überexpression von TLR7 der TLR7<sup>+</sup>-PANC1 im Vergleich zu den PBMCs dargestellt. Interessanterweise zeigte sich für TLR8, dass die PBMCs eine höhere Expression aufwiesen als die TLR8<sup>+</sup>-PANC1 (Abb. 1C).

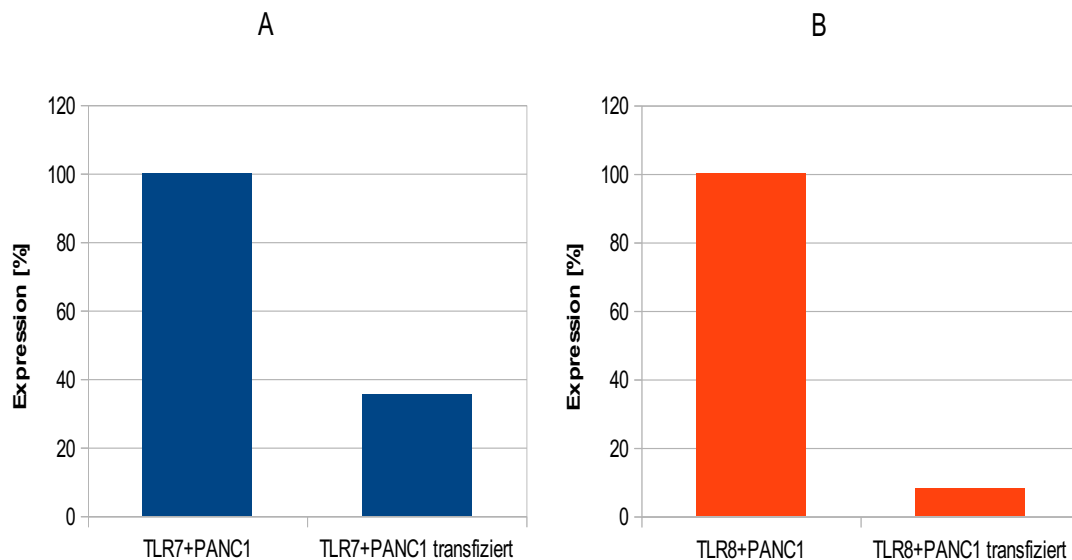




**Abb. 1:** Expression von TLR7 und TLR8 von PANC1-Zellen nach lentiviraler Überexpression im Vergleich zur Leervektor-Zellen und PBMCs. **A:** TLR7<sup>+</sup>-PANC1 zeigen eine höhere Expression von TLR7 als PBMCs. **B:** Die Expression von TLR7 im Vergleich zu Leervektorzellen ist um ein Vielfaches erhöht. **C:** TLR8<sup>+</sup>-PANC1 exprimieren weniger TLR8 als PBMCs **D:** Im Vergleich zur Leervektorkontrolle deutliche Überexpression von TLR8.

### 3.1.2 TLR7- und TLR8-Expression nach siRNA-Transfektion

Nach erfolgreicher siRNA-Transfektion mit Lipofectamine 2000 konnte die Expression von TLR7 bei TLR7<sup>+</sup>-PANC1 um 64 % (Abb. 2A) und von TLR8 bei TLR8<sup>+</sup>-PANC1 um 92 % (Abb. 2B) reduziert werden.



**Abb. 2:** Expression von TLR7 und TLR8 nach erfolgreichem Knockdown mit siRNA. **A:** Erfolgreicher Knockdown von TLR7 in den TLR7<sup>+</sup>-PANC1. Hier ist die Expression um 64% reduziert. **B:** TLR8<sup>+</sup>-PANC1 exprimieren nach siRNA-Transfektion nur noch 8% im Vergleich zu nichttransfizierten TLR8<sup>+</sup>-PANC1.

## 3.2 Stimulationsversuche

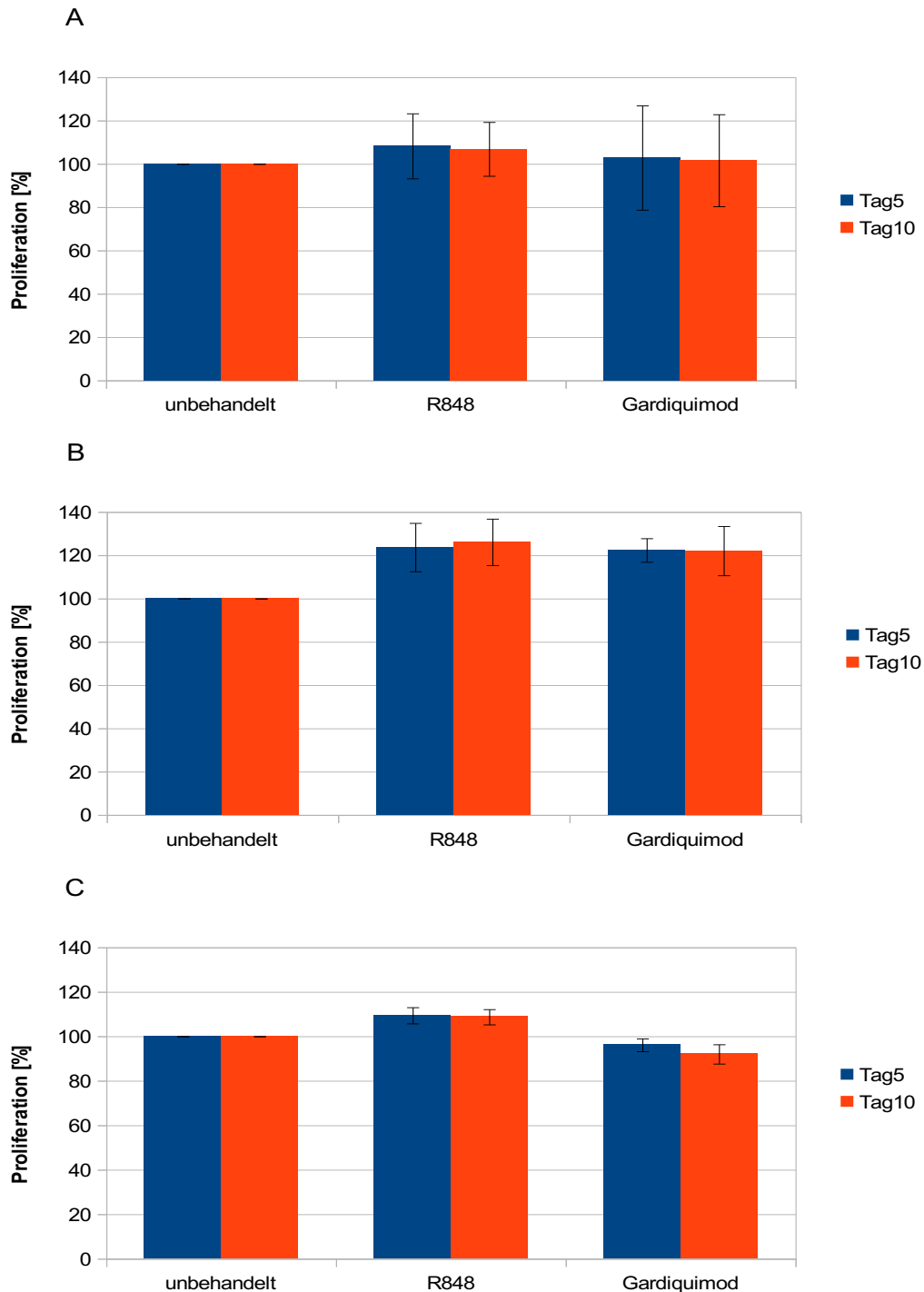
### 3.2.1 Zellviabilität unter R848 und Gardiquimod

Um die Auswirkung der TLRs 7 und 8 auf die Zellviabilität bestimmen zu können, erfolgte eine Stimulation mit 5µg/ml R848 und 10 µg/ml Gardiquimod.

Für die Leervektorzellen konnte weder unter R848 noch unter Gardiquimod eine signifikante Wachstumsveränderung festgestellt werden. Unter R848 kam es zwar am Tag 5 zu einem Wert von 109 % und am Tag 10 zu einem Wert von 106 %, jedoch lag die Standardabweichung an beiden Messtagen bei ca. 7,5 %, so dass keine Signifikanz bestand. Unter Gardiquimod-Stimulation zeigte sich ein Proliferationsverhalten gleich der unbehandelten Leervektorkontrolle (101 % und 99 %) (Abb. 3A).

Bei TLR7<sup>+</sup>-PANC1 kam es unter R848 und Gardiquimod sowohl nach 5 d als auch nach 10 d zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation (Abb. 3B). Für Gardiquimod konnte dies trotz der hohen Dosis von 10 µg/ml nur für TLR7<sup>+</sup>-PANC1 nicht jedoch für TLR8<sup>+</sup>-PANC1 nachgewiesen werden (Abb. 3C). Dies bestätigt die bisherigen Erfahrungen mit Gardiquimod und es wurde aus diesem

Grund für die weiteren Versuche mit R848 gearbeitet.



**Abb. 3:** Proliferationsverhalten von Leervektor-PANC1, TLR7<sup>+</sup>PANC1 und TLR8<sup>+</sup>-PANC1 nach 5 und 10 Tagen unter R848- und Gardiquimod **A:** Proliferationsverhalten der PANC1-Zellen mit Leervektor. Es zeigt sich keine Proliferationsveränderung unter R848 oder Gardiquimod. **B:** TLR7<sup>+</sup>-PANC1 zeigen sowohl unter R848- als auch unter Gardiquimodstimulation nach 5 d und nach 10 d ein signifikante Proliferationssteigerung ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Von Tag 5 bis Tag 10 besteht allerdings keine weitere signifikante Proliferation. **C:** TLR8<sup>+</sup>-PANC1 haben nur

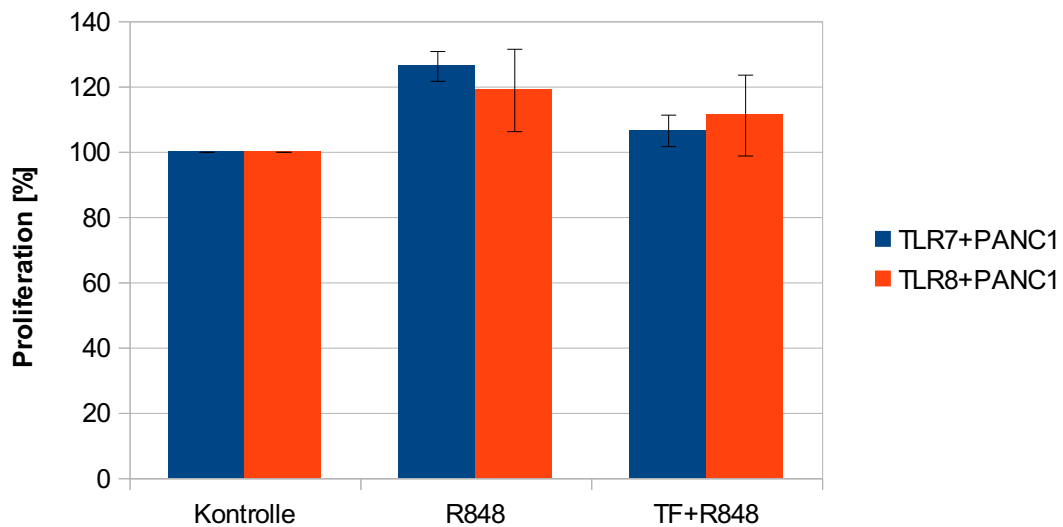
unter R848-Stimulation eine signifikant gesteigerte Proliferation an den Messtagen 5 und 10 ( $p < 0,05$ ). Auch hier besteht zwischen Tag 5 und Tag 10 keine gesteigerte Proliferation. Die Stimulation mit Gardiquimod zeigte im Gegensatz zu den TLR7<sup>+</sup>-PANC1-Zellen keinen proliferationsfördernden Effekt.

### **3.2.2 Proliferation unter R848 nach TLR-Knockdown durch siRNA-Transfektion**

Nachdem eine wachstumsfördernde Wirkung im Proliferationsversuch nach Stimulation mit R848 gemessen wurde, sollte mit dem folgenden Versuch eine Verifizierung angestrebt werden. Ziel war es durch gezieltes vorübergehendes Abschalten der Toll-like Rezeptoren das gesteigerte Wachstum durch R848 zu unterbinden. Der Knockdown der Rezeptoren wurde durch siRNA-Transfektion angestrebt und die Stimulation der Zellen erfolgte mit 5 µg/ml R848.

Nach Durchführung oben genannter Maßnahmen wurde am 5. Tag nach Stimulation die Proliferationsrate mit alamarBlue bestimmt (s. 2.2.8). Nichttransfizierte und unstimulierte Zellen wurden als Kontrollgruppe als 100 % gesetzt. In Abb. 4 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt. Die stimulierten Zellen hatten verglichen mit der Kontrollgruppe ein signifikant gesteigertes Wachstum mit 126 % (TLR7<sup>+</sup>PANC1) und 119 % (TLR8<sup>+</sup>PANC1) bei einem p-Wert kleiner 0,05. Für die transfizierten Zellen zeigte sich ein anderes Bild. Es bestand trotz der Stimulation mit R848 keine signifikante Proliferationssteigerung. Im Vergleich zwischen den stimulierten und transfizierten Zellen zeigte sich bei den TLR7<sup>+</sup>PANC1-Zellen eine signifikant niedrigere Proliferation nach Transfektion (126 % vs. 106 %;  $p < 0,05$ ). Für TLR8-überexprimierende Zellen konnte eine abgeschwächte, aber nicht signifikante Wachstumshemmung gezeigt werden (119 % vs. 111 %;  $p = 0,41$ ).

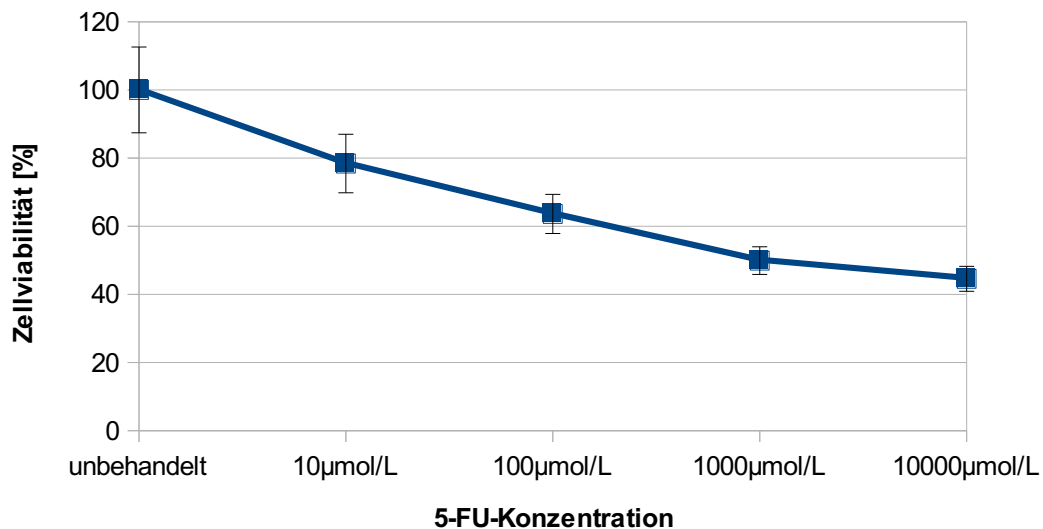
In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass der Knockdown mit siRNA-Transfektion von TLR7 und TLR8 eine durch R848 stimulierte Wachstumssteigerung abschwächt.



**Abb. 4:** Proliferation von TLR7<sup>+</sup>-PANC1 und TLR8<sup>+</sup>-PANC1 unter R848-Stimulation mit und ohne Transfektion. Unter der Stimulation mit R848 zeigen sowohl TLR7<sup>+</sup>-PANC1 (126%;  $p < 0,05$ ) als auch TLR8<sup>+</sup>-PANC1 (119%;  $p < 0,05$ ) nach 5 Tagen ein signifikantes Wachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Erfolgte zuvor ein Knockdown der TLR-Expression mittels siRNA-Transfektion, so zeigte sich bei beiden Zelllinien trotz Stimulation mit R848 kein gesteigertes Wachstum zu der unstimulierten Kontrolle und es zeigte sich ein reduziertes Wachstum im Vergleich zu stimulierten, aber nicht transfizierten Zellen. Für TLR7<sup>+</sup>-PANC1 war diese Reduktion signifikant (126 % vs. 106 %;  $p < 0,05$ ). Bei TLR8<sup>+</sup>-PANC1 bestand keine Signifikanz (119 % vs. 111 %;  $p > 0,05$ ).

### 3.2.3 Ergebnis des LD50-Versuchs mit 5-FU

Um in den weiteren Versuchen eine Aussage bezüglich der Chemotherapieresistenz oder Chemotherapiesensitivität machen zu können, musste die LD50 für 5-FU bestimmt werden. Das Chemotherapeutikum wurde in steigender Dosis beginnend bei 10  $\mu\text{mol/l}$  in Zehnerpotenzen bis auf 10000  $\mu\text{mol/l}$  zu den Zellen gegeben. Nach achtundvierzigstündiger Einwirkzeit erfolgte der Tausch gegen frisches Standardmedium, bevor nach weiteren 24 h die Vitalitätsmessung mit dem MTS-Test und die Auswertung erfolgten. Es zeigte sich für die hier verwendeten Zellen eine LD50 von 1000  $\mu\text{mol/l}$  5-FU (Abb. 5).



**Abb. 5:** LD50 für 5-FU bei PANC1-Zellen. Die Austestung erfolgte in Zehnerpotenzen von  $10^1$  bis  $10^4$  µmol/l. Nach 48 h wurde das 5-FU-haltige Medium gegen frisches Standardmedium getauscht und nach weiteren 24 h erfolgte die Auswertung. Hier zeigten sich bei  $10^4$  µmol/l 50 % der Zellen nicht mehr vital. Somit wurde die LD50 bei  $10^4$  µmol/l festgelegt.

### 3.2.4 R848 induzierte Chemotherapieresistenz

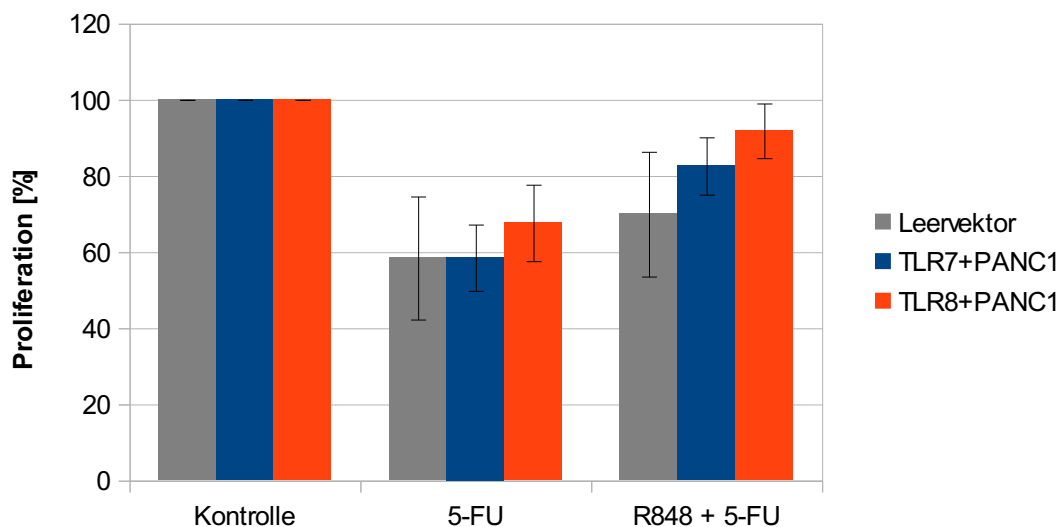
Nachdem die LD50 für 5-FU bestimmt worden war, konnte in einem weiteren Versuch die Auswirkung der R848-Stimulation und der dadurch gezeigten Proliferationssteigerung auf die TLR7- und TLR8-überexprimierenden Zellen unter 5-FU getestet werden.

Alle drei Zellreihen zeigten unter der Chemotherapiegabe ein signifikant reduziertes Wachstum. Für die Leervektor- und TLR7<sup>+</sup>-PANC1-Zellen war das Wachstum um ca. 42 % und bei den TLR8-positiven Zellen um ca. 33% reduziert ( $p < 0,05$ ).

Wurde den Zellen aber 24 h vor der 5-FU-Gabe der TLR-Agonist R848 zugegeben, so war die Wachstumshemmung deutlich abgeschwächt. Nach Auswertung der Daten bestand für die Leervektorzellen auch hier ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle (69 % vs. 100 %;  $p < 0,05$ ). Bei den anderen beiden Zellreihen bestand nur bei TLR7<sup>+</sup>-PANC1-Zellen noch ein signifikant reduziertes Wachstum (83 % vs. 100 %;  $p < 0,05$ ). Für die TLR8<sup>+</sup>-

PANC1-Zellen bestand keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe bzgl. der Proliferationshemmung (92 % vs. 100 %,  $p = 0,06$ ).

Betrachtet man die Zellreihen, die 5-FU erhielten, mit denen, die R848 und das Chemotherapeutikum bekamen, so konnte für beide TLR-überexprimierenden PANC1-Zellen nach vorangegangener R848-Gabe eine signifikant erhöhte Vitalität der Zellen trotz Chemotherapeutikum in einer LD50-Dosierung nachgewiesen werden (TLR7<sup>+</sup>PANC1: 59 % vs. 82 %;  $p < 0,05$ ; TLR8<sup>+</sup>PANC1: 68 % vs. 92 %;  $p < 0,05$ ). In Abb. 6 ist dies dargestellt.



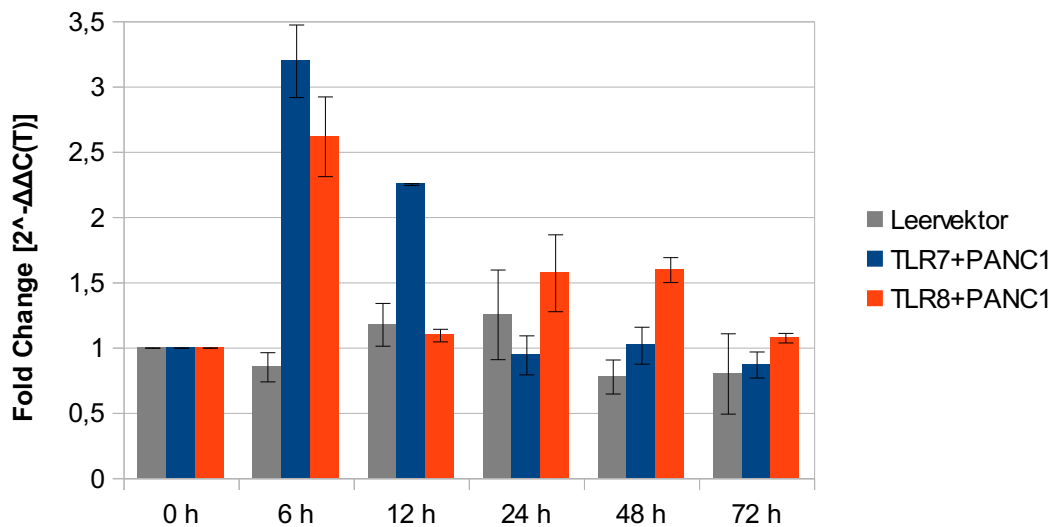
**Abb. 6:** Zellviabilität und Proliferationsverhalten von TLR7<sup>+</sup>PANC1 und TLR8<sup>+</sup>PANC1 unter 5-FU mit und ohne R848-Stimulation. Alle drei Zellreihen zeigen am 5.Tag nach Chemotherapiegabe ein signifikant reduziertes Wachstum zur Kontrolle (58 %, 59 % u. 68 % vs. 100 %;  $p < 0,05$ ). Wurde den Zellen aber vor der 5-FU-Gabe R848 verabreicht, dann ist dieser Effekt abgeschwächt. Bei TLR8 besteht keine signifikante Abschwächung mehr (92 % vs. 100 %;  $p = 0,06$ ), während bei den TLR7<sup>+</sup>PANC1 (82 % vs. 100%;  $p < 0,05$ ) und den Leervektorzellen (69 % vs. 100%;  $p < 0,05$ ) die Abschwächung weiterhin noch signifikant ist. Vergleicht man abschließend das Wachstum der Zellen mit 5-FU mit den Zellen die Resiquimod und 5-FU erhalten haben, so zeigt sich ein signifikanter Anstieg des Wachstums der TLR7 und TLR8 positiven Zellen (59 % vs. 82 % u. 68 % vs. 92 %;  $p < 0,05$ ), während der Effekt für den Leervektor ausbleibt (58 % vs. 69 %;  $p = 0,4$ ).

### 3.2.5 NF- $\kappa$ B-Veränderungen nach R848-Stimulation

Ein Augenmerk wurde auf NF- $\kappa$ B gelegt. NF- $\kappa$ B spielt in der durch Stimulation von TLR7 und TLR8 ausgelösten Signalkaskade eine bedeutende Rolle, da es unter anderem die Transkription von COX-2 und IL-6 verstärkt (Karin M. 2006). COX-2 wie auch IL-6 spielen eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung eines inflammatorischen Mikromilieus und des Tumorwachstums (Balkwill F et al. 2005; Dambrauskas Z et al. 2010; Del Prete A et al. 2011; Grivennikov S et al. 2008).

Nach Stimulation der drei Zellreihen mit dem TLR7- und TLR8-Agonisten R848 erfolgte die RNA-Gewinnung nach 6, 12, 24, 48 und 72 h. Gemäß den in Material und Methoden angegebenen Verfahren wurde die cDNA hergestellt und die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden Zellen ohne Stimulation verwendet. In der Auswertung zeigte sich nach 6 h für TLR7<sup>+</sup>PANC1 ein durchschnittlicher Anstieg um mehr als das Dreifache und für TLR8<sup>+</sup>PANC1 ein Anstieg um mehr als das Doppelte. Bei einem p-Wert kleiner 0,05 war dies zusätzlich signifikant. Nach 12 h bestand nur noch bei den TLR7-positiven Zellen eine signifikante Überexpression. Im weiteren zeitlichen Ablauf schwächte die Expression wieder auf das Ausgangsniveau ab. Die Leervektorzellen zeigten keine erhöhte NF- $\kappa$ B-Expression nach Stimulation. In allen Zeitfenstern schwankte die Expression um den Kontrollwert ohne signifikante Veränderungen (Abb. 7).



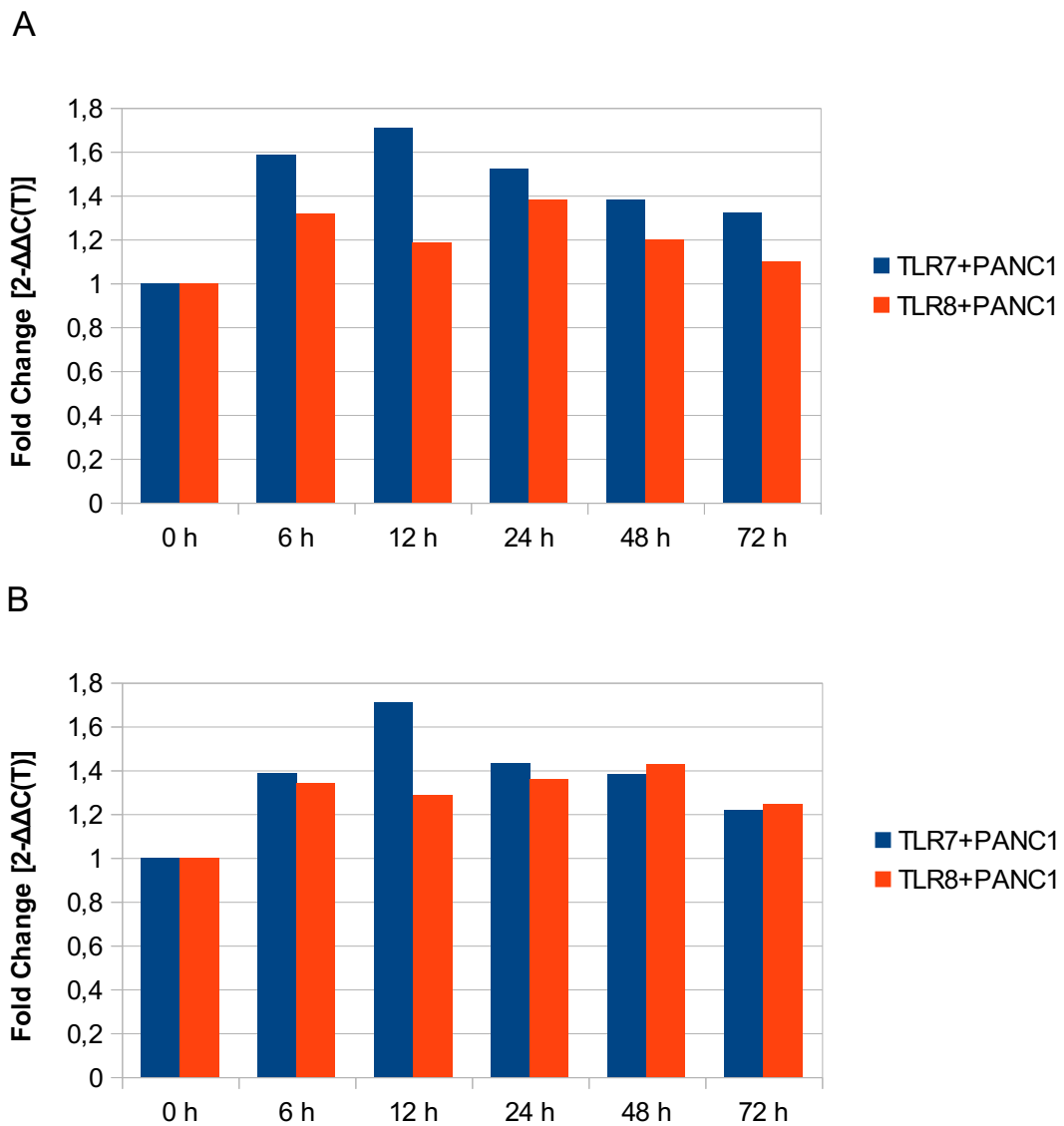


**Abb. 7:** *NF-κB-Expression nach Resiquimod-Stimulation.* TLR7<sup>+</sup>PANC1 zeigt nach 6 und 12 h eine signifikante Expressionssteigerung mit einem FC von 3,2 und 2,3. ( $p > 0,05$ ). Für TLR8<sup>+</sup>PANC1 konnte nach 6 h ein signifikanter Anstieg mit einem FC von 2,6 ( $p < 0,05$ ) gemessen werden. Im weiteren Verlauf kam es zu einem Rückgang der gesteigerten Expression auf das Ausgangsniveau. Die Leervektorzellen zeigten keinerlei signifikante Veränderungen unter der R848-Stimulation.

### 3.2.6 COX-2- und IL-6-Expression nach R848-Stimulation

Nachdem eine gesteigerte NF-κB-Expression für TLR7 und 8-exprimierende Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde eine qPCR-Analyse von COX-2 und IL-6 durchgeführt. Sowohl COX-2 als auch IL-6 haben bedeutende Auswirkungen auf die Tumorgenese durch Aufrechterhaltung der Inflammation, Wachstumsanregung und Apoptoseinhibierung.

In Abb. 8 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt. Sowohl bei COX-2 (Abb. 8A) als auch bei IL-6 (Abb. 8B) zeigt sich ein Trend zur erhöhten Expression mit einem Peak bei 12 h. Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es zu einer langsamen, aber beständigen Regredienz. Signifikanzen konnten hierfür nicht nachgewiesen werden.



**Abb: 8:** qPCR-Ergebnisse der Expression von COX-2 und IL-6 nach R848-Stimulation. **A:** COX-2-Expression ist nach 6 und 12 h erhöht und fällt im weiteren Verlauf wieder ab. Der Effekt ist für TLR7<sup>+</sup>PANC1 größer als für TLR8<sup>+</sup>PANC1. **B:** Auch bei IL-6 zeigt sich ein Anstieg der Expression mit einem Peak bei 12 h für die TLR7<sup>+</sup>PANC1. TLR8-positive Zellen kommen kaum über das Normniveau hinaus.

## 4 Diskussion

Zurückliegend wurde für das kolorektale Karzinom gezeigt, dass Tumorzellen TLR7 und TLR8 exprimieren. Die Expression von TLR7 und TLR8 durch Tumorzellen und infiltrierende Immunzellen war mit dem Tumorprogress vergesellschaftet, wobei ein reduziertes tumorspezifisches Überleben bei Patienten mit hoher TLR7- und TLR8-Expression bestand (Grimm M et al. 2010). In weiteren Vorarbeiten konnte eine vermehrte Expression von TLR7 und TLR8 ebenso in Tumorproben bei Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung der TLR7- und TLR8-Expression auf das Proliferationsverhalten der exprimierenden Tumorzellen nach Stimulation mit einem spezifischen Agonisten mit und ohne Gabe eines Chemotherapeutikums untersucht. Zusätzlich wurde mit siRNA-Transfektion die Expression der Rezeptoren herabgeregelt, um evtl. Proliferationsveränderungen auf die TLR-Expression rückführen zu können.

Die Stimulation mit Resiquimod (848) oder Gardiquimod bewirkt eine signifikante Proliferationssteigerung bei TLR7-exprimierenden Zellen nach bereits 5 Tagen. Für TLR8 konnte dies nur unter Resiquimod beobachtet werden. Cherfils-Vicini et al. zeigten 2010 bereits für Zellen des Lungenkarzinoms ein gesteigertes Tumorwachstum nach Stimulation mit TLR7- und TLR8-Agonisten. In weiteren Studien wurde auch bei Einsatz von TLR7- und 8-Agonisten beim multiplen Myelom ein Fortschreiten der Erkrankung beschrieben.

Im Weiteren erfolgte eine siRNA-Transfektion, um den gezeigten Proliferations-effekt nach R848-Stimulation zu überprüfen. Es zeigte sich, dass der Wachstumseffekt daraufhin gehemmt war. Hierzu ist anzumerken, dass Zagon et al. 2008 postulierten, dass eine Hemmung des Tumorzellwachstums nach R848-Stimulation über einen OGF-Rezeptor erfolgt. Dieser scheint jedoch in PANC1-Zellen nicht vorhanden zu sein, da kein reduziertes Wachstum nach siRNA-Knockdown im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bestand.

Ursächlich hierfür könnte eine Mutation oder Funktionslosigkeit des Tumorsuppressors p16<sup>INK4a</sup> sein, da dies eine Blockierung der wachstumshemmenden OGF-OGFR-Achse bedingt (Cheng F et al. 2009).

Die Chemotherapie stellt bei nichtresektablen Pankreaskarzinomen ein übliches Vorgehen dar. Jedoch führt die Behandlung mit Chemotherapeutika wie 5-FU oder Gemcitabine lediglich zu einem mittleren Überleben von 5,65 Monaten und einer 1-Jahresüberlebensrate von nur 18% (Burriss HA III et al. 1997). Die Hauptursache dafür sind der Tumorzelle eigene oder auch erworbene Eigenschaften (Izumiya M et al. 2012). Neuere Daten zeigen, dass der Notch-2-Rezeptor für die Chemotherapieresistenz ebenfalls eine Rolle spielt (Güngör C et al. 2011). Interessanterweise wurden auch TLR7 und TLR8 mit der Expression von Notch-2-Rezeptoren in Verbindung gebracht (Hu X et al. 2008). In dieser Arbeit war der zytotoxische Effekt von 5-FU bei zuvor über TLR7 und TLR8 stimulierten Zellen signifikant reduziert. Für die TLR8-positiven PANC1-Zellen konnte sogar im Vergleich mit den unbehandelten Zellen kein signifikanter Vitalitätsverlust mehr nachgewiesen werden. Somit sind TLR7 und TLR8, wenn sie von einer Pankreastumorzelle exprimiert werden, mitverantwortlich für die reduzierte Chemotherapiesensitivität. Dies bestätigt die Beobachtungen von Cherfils-Vicini et al. für TLR7- und TLR8-exprimierende Lungenkarzinomzellen. Die 5-FU-Monotherapie kommt beim Pankreaskarzinom primär erst in der Palliation zur Geltung. Zuvor wird beim metastasierten, nicht resektablen Pankreaskarzinom eine Kombinationstherapie mit FOLFIRINOX angewendet. Man muss hier zu bedenken geben, dass in dieser Arbeit eine Dosis eingesetzt wurde, die das Sterben von 50 % der Zellen in einem zuvor definierten Zeitraum bedingt. Das ist in der klinischen Praxis aus therapeutischer und ethischer Sicht keine Option, da dies auch stärkste Auswirkungen auf gesunde Zellen mit einer hohen Replikationsrate (Schleimhäute, Zellen der Hämatopoese) hätte und massive Nebenwirkungen mit sich brächte. Aus diesem Grund wird schließlich auch eine Kombinationstherapie angewandt, die das Ziel hat über Synergien der eingesetzten Therapeutika bei besserer Verträglichkeit eine erhöhte zytotoxische Wirkung zu entfalten. Man muss aber mutmaßen, dass selbst eine

solche Kombinationstherapie einen abgeschwächten Effekt bei TLR7- und TLR8-exprimierenden Pankreaskarzinomzellen zeigen würde. Bezüglich dieser Aussage sind aber weitere Untersuchungen notwendig.

Ein erhöhtes invasives Wachstum und gesteigerte Angiogenese wurde durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2) nach Aktivierung von TLR2 und TLR9 mit der Folge einer Entzündungsreaktion und Tumorprogress für Magenkarzinomzellen beschrieben (Chang YJ et al. 2005). Für Pankreaskarzinome lässt eine gesteigerte COX-2-Expression vermuten, dass die Malignome die allgemeinen Merkmale einer chronischen Entzündung mit den grundlegenden Eigenschaften der Karzinogenese (Mutagenese, Mitogenese, Angiogenese, Apoptoseresistenz, Metastasierung und Immunsuppression) vereinen. All diese Prozesse sind mit der COX-2-gesteuerten Prostaglandinbiosynthese verbunden (PGE-2) (de Moraes E et al. 2007; Dvorak HF 2005; Yip-Schneider MT et al. 2000). 2007 beschrieben Hattermann K et al. die Aktivierung des COX-2-Signalweges über TLR8 als einen starken Antrieb für die Biosynthese der Eicosanoide PGE-2 und Thromboxane A2 (TXA2). Das lässt vermuten, dass die Immunantwort bei ssRNA-Virus-Infektionen eine Folge der entzündungsfördernden Lipidmediatoren über den TLR8-Signalweg ist.

Es ist zu erwähnen, dass die COX-2-Expression in den untersuchten TLR7- und TLR8-positiven Zellreihen unter Stimulation tatsächlich hochreguliert, wenn auch nicht signifikant war. Das lässt vermuten, dass TLR7 und TLR8 für die Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündungsreaktion beim Pankreaskarzinom verantwortlich sind.

Die Stimulation von TLR7 und TLR8 in den PANC1-Zellen führte zur deutlich gesteigerten Synthese des Transkriptionsfaktors NF-κB. NF-κB ist von zentraler Bedeutung für das Auslösen und die Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen durch die Synthese von Entzündungsmediatoren. Es ist auch bekannt, dass die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms auf eine Dysregulation vieler Signalelemente, u.a. des NF-κB-Signalwegs, zurückzuführen ist (Prabhu et al. 2014; Thu YM, Richmond A 2010; Wang Z et al. 2011). Wie für die EGF-EGFR-Signalkaskade beschrieben, führt dieser Signalweg zur Aktivierung von antiapoptotischen Signalwegen (Bcl-2, bcl-XL)

(Meteoglu I et al. 2008).

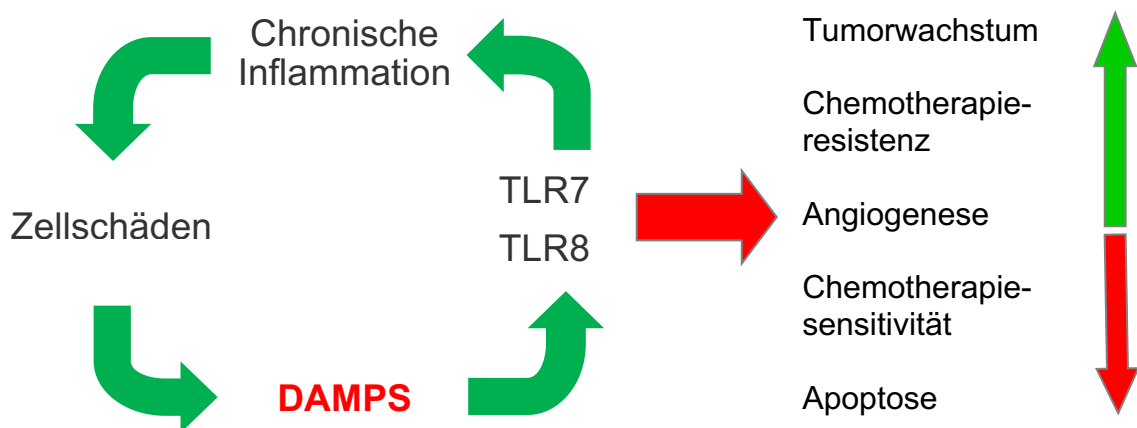
Weiterhin konnte eine gesteigerte Synthese von Interleukin-6 (IL-6) gemessen werden. Interleukin-6 wird seit geraumer Zeit eine große Bedeutung für die Angiogenese, Tumorproliferation und Metastasierung zugeschrieben. So kommt es durch IL-6 beim Pankreaskarzinom zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion, was für die Angiogenese und damit für weiteres Tumorstadium notwendig ist (Holmer R et al. 2014; Tang RF et al. 2005). Auch für das multiple Myelom wurde eine Proliferationssteigerung durch IL-6 nach TLR-Stimulation beschrieben (Bohnhorst J et al. 2006).

Bis heute sind verschiedene Agonisten für TLR7 und/oder TLR8 gefunden worden. Resiquimod (R848) besitzt die Fähigkeit der Immunstimulation über die Aktivierung des murinen TLR7 und der humanen TLR7 und TLR8 (Hemmi H et al. 2002; Jurk M et al. 2002). Aufgrund dessen wurde Resiquimod als Immunmodulator in verschiedenen vorklinischen Modellen und in klinischen Studien getestet. Es wurde als starker Aktivator der kutanen Immunantwort (Saunders DN et al. 2003) und als potentiell Therapeutikum in der Therapie der AML beschrieben (Smits EL et al. 2010). Auch für weitere TLR7- und TLR8-Agonisten konnte eine antitumorale Wirkung beschrieben werden. Loxoribine steigerte die Wirksamkeit der Chemotherapie bei B-CLL (Pellacani A et al. 1999), SIMRAs (*stabilized immune modulatory RNA*) induzierten eine antitumorale und starke Immunreaktion bei Lungen- und Kolonkarzinomzellen im Mausmodell (Wang D et al. 2010) und Imiquimod besitzt heute bereits einen Stellenwert in der Lokalthherapie des Basalioms (Sand M et al. 2010; Schön M et al. 2003; Wu JK et al. 2003). Im Gegensatz dazu konnte für TLR-Agonisten allerdings immer tumorproliferative Effekte gezeigt werden. So kam es unter der Anwendung von TLR-Agonisten bei Lungenkarzinomzellen über TLR7 zu einer gesteigerten Viabilität, Metastasierung und Chemoresistenz (Cherfils-Vicini J et al. 2010), bei humanen multiplen Myelom-Zellen zur Tumorstadium über TLR1-7 (Bohnhorst J et al. 2006) und bei kolorektalen Karzinomzellen zur verstärkten Metastasierung über TLR4 (Hsu RY et al. 2011). Die Ursachen für diese gegensätzlichen Ergebnisse sind bisher nicht geklärt. Es ist anzunehmen, dass dafür genetische Eigenschaften der Zellen, die Interaktion der Tumorzellen

untereinander sowie mit dem umgebenden Stromagewebe und dem dortigen in komplexen Schritten ablaufenden Mikromilieu verantwortlich sind. Dies sollte in weiteren Studien aufgearbeitet werden.

## 5 Zusammenfassung

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass TLR7- und TLR8-exprimierende Pankreastumorzellen ein signifikant gesteigertes Wachstum aufwiesen, wenn eine Stimulation dieser Rezeptoren erfolgte. In dieser Arbeit erfolgte dies mit Resiquimod. Weiterhin konnte durch eine gezielte Herabregulierung der Toll-like Rezeptoren gezeigt werden, dass der nachgewiesene proliferative Effekt von Resiquimod von TLR7 und TLR8 abhängig war. Neben der Proliferationsförderung bedingten die stimulierten TLRs eine herabgesetzte Chemotherapiesensitivität gegenüber 5-Fluorouracil, das in der Chemotherapie des Pankreaskarzinoms eine wichtige Rolle spielt. Zusätzlich zeigte sich in der molekulargenetischen Untersuchung mit quantitativer real-time PCR eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung eines inflammatorischen Mikromilieus und der Karzinogenese besitzt. TLR7 und TLR8 besitzen eine gewichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Tumorwachstums und reduzierten Chemosensitivität des Pankreaskarzinoms.



**Abb. 9:** Modell der Hypothese: *Circulus vitiosus* des Pankreaskarzinoms. Im Rahmen des chronischen Entzündungsgeschehens kommt es durch Zellschäden zur Freisetzung von DAMPs, die eine Stimulation der TLRs 7 und 8 bedingen. Dies hat wiederum zur Folge, dass über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B weitere proinflammatorische Enzyme und Zytokine entstehen, die den Entzündungsprozess aufrechterhalten.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Balkwill F and Coussens LM: Cancer: An inflammatory link. *Nature* 431: 405-406, 2004.
2. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A: Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7: 211-7, 2005.
3. Ballehaninna UK, Chamberlain RS: The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol* 3: 105-19, 2012.
4. Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, Fløttum M, Knudsen L, Børsen M, Espevik T, Sundan A: Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 20: 1138-44, 2006.
5. Bong AB, Bonnekoh B, Franke I, Schön M, Ulrich J and Gollnick H: Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. *Dermatology* 205: 135-138, 2002.
6. Bowie A and O'Neill LA: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: Signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67: 508-514, 2000.
7. 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* 175: 8242-52, 2005.
8. Cheng F, McLaughlin PJ, Verderame MF, Zagon IS: The OGF-OGFr axis utilizes the p16INK4a and p21WAF1/CIP1 pathways to restrict normal cell proliferation. *Mol Biol Cell* 20: 319-27, 2009.
9. Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, Magdeleinat P, Mami-Chouaib F, Dieu-Nosjean MC, Fridman WH, et al: Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest* 120: 1285-1297, 2010.
10. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3: 207-12, 1991.
11. Coussens LM and Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867, 2002.
12. Dambrauskas Z, Giese N, Gulbinas A, Giese T, Berberat PO, Pundyus J, Barauskas G, Friess H: Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 16: 1845-53, 2010.

13. de Moraes E, Dar NA, de Moura Gallo CV, Hainaut P: Cross-talks between cyclooxygenase-2 and tumor suppressor protein p53: Balancing life and death during inflammatory stress and carcinogenesis. *Int J Cancer* 121: 929-37, 2007.
14. del Prete A, Allavena A, Santoro G, Fumarulo R, Corsi MM, Mantovani A: Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochem Med* 21: 264-75, 2011.
15. Doi R, Imamura M, Hosotani R, Imaizumi T, Hatori T, Takasaki K, Funakoshi A, Wakasugi H, Asano T, Hishinuma S, Ogata Y, Sunamura M, Yamaguchi K, Tanaka M, Takao S, Aikou T, Hirata K, Maguchi H, Aiura K, Aoki T, Kakita A, Sasaki M, Ozaki M, Matsusue S, Higashide S, Noda H, Ikeda S, Maetani S, Yoshida S; Japan Pancreatic Cancer Study Group: Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg Today* 38: 1021-8, 2008.
16. Dunne A, Marshall NA and Mills KH: TLR based therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 11: 404-411, 2011.
17. Dvorak HF: Angiogenesis: Update 2005. *J Thromb Haemost* 3: 1835-42, 2005.
18. Evans DB, Varadhachary GR, Crane CH, Sun CC, LEE JE, Pisters PW, Vauthey JN, Wang H, Cleary KR, Staerke GA, Charnsangavej C, Lano EA, Ho L, Lenzi R, Abbruzzese JL, Wolff RA: Preoperative gemcitabine-based chemoradiation for patients with resectable adenocarcinoma of the pancreatic head. *J Clin Oncol* 26: 3496-502, 2008.
19. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7, 1987.
20. Forsbach A, Nemorin JG, Montino C, Müller C, Samulowitz U, Vicari AP, Jurk M, Mutwiri GK, Krieg AM, Lipford GB, Volmer J: Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J Immunol* 180: 3729-38, 2008.
21. Fryzek JP, Schenk M, Kinnard M, Greenson JK, Garabrant DH: The association of body mass index and pancreatic cancer in residents of southeastern Michigan, 1996-1999. *Am J Epidemiol* 162: 222-8, 2005.
22. Ghadirian P, Boyle P, Simard A, Baillargeon J, Maisonneuve P, Perret C: Reported family aggregation of pancreatic cancer within a population-based case-control study in the Francophone community in Montreal, Canada. *Int J Pancreatol* 10: 183-96, 1991.
23. Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Büschenfelde C, Friess H, Kleeff J: Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med* 7: e1000267, 2010.
24. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai

- MA, Alkan SS, Vasilakos JP: Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* 174: 1259-68, 2005.
25. Greten FR and Karin M: The IKK/NF-kappaB activation pathway – a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 206: 193-199, 2004.
  26. Grimm M, Kim M, Rosenwald A, Heemann U, Germer CT, Waaga-Gasser AM and Gasser M: Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133<sup>+</sup> cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumorigenesis and tumour progression. *Eur J Cancer* 46: 2849-2857, 2010.
  27. Grivennikov S, Karin M: Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer Cell* 13: 7-9, 2008.
  28. Güncör C, Zander H, Effenberger KE, Vashist YK, Kalina T, Izbicki JR, Yekebas E, Bockhorn M: Notch signaling activate by replication stress-induced expression of midkine drives epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 71: 5009-19, 2011.
  29. Harris RE: Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammationogenesis of cancer. *Subcell Biochem* 42: 93-126, 2007.
  30. Hartwig W, Hackert T, Hinz U, Hassenpflug M, Strobel O, Büchler MW, Werner J: Multivisceral resection for pancreatic malignancies: risk-analysis and long-term outcome. *Ann Surg* 250: 81-7, 2009.
  31. Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P: The Toll-like receptor 7/8-ligand Resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J* 21: 1575-85, 2007.
  32. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirsching C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-29, 2004.
  33. 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* 3: 196-200, 2002.
  34. Holmer R, Goumas FA, Waetzig GH, Rose-John S, Kalthoff H: Interleukin-6: a villain in the drama of pancreatic cancer development and progression. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 13: 371-90, 2014.
  35. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougères A, Endres S, Hartmann G: Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11: 263-70, 2005.
  36. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF,

- Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/), based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015.
37. Hu X, Chung AY, Wu I, Foldi J, Chen J, Ji JD, Tateya T, Kang YJ, Han J, Gessler M, Kageyama R, Ivashkiv LB: Integrated regulation of Toll-like receptor responses by Notch and interferon-gamma pathways. *Immunity* 29: 691-703, 2008.
  38. Izumiya M, Kabashima A, Higuchi H, Igarashi T, Sakai G, Iizuka H, Nakamura S, Adachi M, Hamamoto Y, Funakoshi S, Takaishi H, Hibi T: Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 32: 3847-53, 2012.
  39. Janeway CA Jr: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54: 1-13, 1989.
  40. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW: Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321: 1801-6, 2008.
  41. 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* 3: 499, 2002.
  42. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV: Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38: 209-23, 2013.
  43. Karin M: Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441: 431-6, 2006.
  44. Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Ruxrungtham K: Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates. *Vet Immunol Immunopathol.* 125: 18-30, 2008.
  45. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P: Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 32: 157-64, 2011.
  46. Leach SD, Lee JE, Charnsangavej C, Cleary KR, Lowy AM, Fengolio CJ, Pisters PW, Evans DB: Survival following pancreaticoduodenectomy with resection of the superior mesenteric-portal vein confluence for adenocarcinoma of the pancreatic head. *BR J Surg* 85: 611-7, 1998.

47. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3 Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer:032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
48. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G: Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15: 741-7, 1975.
49. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr: ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* Nov 24: 5313-27; 2006.
50. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L: Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 328: 1433-7, 1993.
51. Lüttges J, Schemm S, Vogel I, Hedderich J, Kremer B, Klöppel G: The grade of pancreatic ductal carcinoma is an independent prognostic factor and is superior to the immunohistochemical assessment of proliferation. *J Pathol* 191: 154-61, 2000.
52. Matthaei H, Semaan A, Hruban RH: The genetic classification of pancreatic neoplasia. *J Gastroenterol* 50: 520-32, 2015.
53. Meteoglu I, Erdogan IH, Meydan N, Erkus M, Barutca S: NF-kappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear renal cancer cell carcinoma tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 27: 53, 2008.
54. Nikfarjam M, Sehmbey M, Kimchi ET, Gusani NJ, Shereef S, Avella DM, Staveley-O'Carroll KF: Additional organ resection combined with pancreaticoduodenectomy does not increase postoperative morbidity and mortality. *J Gastrointest Surg* 13: 915-21, 2009.
55. Ochi A, Graffeo CS, Zambirinis CP, Rehman A, Hackman M, Fallon N, Barilla RM, Henning JR, Jamal M, Rao R, et al: Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *J Clin Invest* 122: 4118-4128, 2012.
56. Ospelt C, Gay S: TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Apr; 42(4): 495-505.
57. Parkin DM, Boyd L, Walker LC: The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer* 105 Suppl 2: S77-81, 2011.
58. Pellacani A, Tosi P, Zinzani PL, Ottaviani E, Albertini P, Magagnoli M, Tura S: Cytotoxic combination of loxoribine with fludarabine and mafosfamide on freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 33: 147-53, 1999.
59. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E and Ben-Neriah Y: NF-

- kappaB functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431: 461-466, 2004.
60. Prabhu L, Mundade R, Korc M, Loehrer PJ, Lu T: Critical role of NF- $\kappa$ B in pancreatic cancer. *Oncotarget* 5: 10969-75, 2014.
  61. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe. Berlin, 2013.
  62. Rubartelli A and Lotze MT: Inside, outside, upside down: Damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* 28: 429-436, 2007.
  63. Saif MW: Controversies in the adjuvant treatment of pancreatic adenocarcinoma. *JOP* 8: 545-552, 2007.
  64. Saif MW: Pancreatic neoplasm in 2011: An update. *JOP* 12: 316-321, 2011.
  65. Sand M, Sand D, Thrandorf C, Paech V, Altmeyer P, Bechara FG: Cutaneous lesions of the nose. *Head Face Med* 6: 7, 2010.
  66. Sasson AR, Hoffman JP, Ross EA, Kagan SA, Pingpank JF, Eisenberg BL: En bloc resection for locally advanced cancer of the pancreas: is it worthwhile? *J Gastrointest Surg* 6: 147-57, 2002.
  67. Sauder DN, Smith MH, Senta-McMillian, Soria I, Meng TC: Randomized, single-blind, placebo-controlled study of topical application of the immune response modulator resiquimod in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3846-52, 2003.
  68. Schenk M, Schwartz AG, O'Neal E, Kinnard M, Greenson JK, Fryzek JP, Ying GS, Garabrant DH: Familial risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 93: 640-4, 2001.
  69. Schön M, Bong AB, Drewniok C, Herz J, Geilen CC, Reifenberger J, Benninghoff B, Slade HB, Gollnick H, Schön MP: Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* 95: 1138-49, 2003.
  70. Siegel R, Naishadham D and Jemal A: Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63: 11-30, 2013.
  71. Smits EL, Cools N, Lion E, Van Camp K, Ponsaerts P, Berneman ZN, Van Tendeloo VF: The Toll-like receptor 7/8 agonist resiquimod greatly increases the immunostimulatory capacity of human acute myeloid leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother* 59: 35-46, 2010.
  72. Tang RF, Wang SX, Zhang FR, Peng L, Wang SX, Xiao Y, Zhang M: Interleukin -1 $\alpha$ , 6 regulate the secretion of vascular endothelial growth factor A, C in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4: 460-3, 2005.
  73. Thu YM, Richmond A: NF- $\kappa$ B inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 213-26,

- 2010.
74. Wang D, Precopio M, Lan T, Yu D, Tang JX, Kandimalla ER, Agrawal S: Antitumor activity and immune response induction of dual agonist of Toll-like receptors 7 and 8. *Mol Cancer Ther* 9: 1788-97, 2010.
  75. Wang Z, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Azmi AS, Gunn JR, Kong D, Bao B, Ali S, Gao J, Mohammad RM, Miele L, Korc M, Sarkar FH: Activated K-ras and INK4/Arf deficiency cooperate during the development of pancreatic cancer by activation of Notch and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *PLoS One* 6: e20537, 2011.
  76. Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, Hodgins MB, Sauter PK, Hruban RH, Riall TS, Schulick RD, Choti MA, Lillemoe KD, Yeo CJ: 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg* 10: 1199-210, 2006.
  77. Winter JM, Yeo CJ, Brody JR: Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 107: 15-22, 2013.
  78. Wittekind C: Pathologische Klassifikation, Tumorstaging und R-Klassifikation des Pankreaskarzinoms, Kapitel in: Beger HG, Büchler MW, Dralle H, Lerch M, Malfertheiner P, Mössner J, Riemann JF (Hrsg.): *Erkrankungen des Pankreas*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013.
  79. Wu JK, Siller G, Whitehead K: Treatment of Bowen's disease and basal cell carcinoma of the nose with imiquimod 5% cream. *Australas J Dermatol* 44: 123-5, 2003.
  80. Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ: Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 21: 139-46, 2000.
  81. Zagon IS, Donahue RN, Rogosnitzky M, McLaughlin PJ: Imiquimod upregulates the opioid growth factor receptor to inhibit cell proliferation independent of immune function. *Exp Biol Me* 233: 968-79, 2008.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
d	Tag
DAMP	damage-associated molecular pattern
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetal calf serum
FOLFIRINOX	<i>Folinsäure</i> , 5-Fluorouracil, <i>Irinotecan</i> , Oxaliplatin
g	Gramm
g	Gravidität
h	Stunde
IL-6	Interleukin 6
IRAK	Interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	IFN-regulatory factor
JAK	Janus-aktivierte Kinase
l	Liter
LD	letale Dosis
M	Molar (mol/l)
m	Meter
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )



MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
MyD88	myeloid differentiation primary-response protein 88
μ	Mikro ( $10^{-6}$ )
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
p	Piko ( $10^{-12}$ )
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PRR	pattern recognition receptor
qPCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
R848	Resiquimod
SIMRA	stabilized immune modulatory RNA
siRNA	short-interfering ribonucleic acid
ss	single stranded
STAT	signal transducer and activator of transcription
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	tumor-necrosis factor
TRAF	tumor-necrosis factor associated factor
UICC	Union internationale contre le cancer
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius
%	Prozent
5-FU	5-Fluorouracil



## **Danksagung**

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich noch einige persönliche Dankesworte anfügen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Waaga-Gasser und Herrn Prof. Dr. Gasser für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema arbeiten zu dürfen und in ihrer Arbeitsgruppe eine Dissertation durchführen zu können. Weiterhin gilt beiden mein Dank für die liebevolle Betreuung, Motivation und Unterstützung, für den gegebenen Freiraum beim wissenschaftlichen Arbeiten sowie für die ermöglichten selbständigen Präsentationen auf Kongressen.

Mein Dank gilt auch Frau Sabine Müller und Frau Mariola Dragan für die Einführungen in die Grundlagen der Laborarbeit und Zellkultur.

Ich danke weiterhin Marc Faber, Tanja Grimmig, Eva Moll, Ramona Mönch und Malte Vetterlein für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor.

Selbstverständlich danke ich auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für die gesamte Unterstützung während der Zeit des Studiums und der Promotion.

Zu guter Letzt danke ich vor allem meiner Frau Anna-Maria für ihre Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit, aus welchem Grund ihr und unseren gemeinsamen Kindern diese Arbeit gewidmet ist.

