

Aus dem Institut für translationale Immunologie (TIM)  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluss von Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI)  
aus Weizen auf das subkutane Tumorwachstum in  
immunkompetenten Mäusen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin oder Zahnmedizin oder der physiologischen Wissenschaften  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Soleiman Fabris Roohani  
aus Kabul

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter

2. Gutachter

Tag der Promotion: 30.05.2025

„Hat man sein *warum?* des Lebens, so verträgt man sich fast  
mit jedem *wie?*“

(Friedrich Wilhelm Nietzsche, Götzen-Dämmerung, 1888)

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung / Ziel der Dissertation .....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturdiskussion .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Geschichtlicher Hintergrund des Weizens.....</b>	<b>8</b>
2.1.1	Erkrankungen durch den Konsum von Weizen .....	9
2.1.2	Zöliakie.....	9
2.1.3	Die Symptome einer Zöliakie .....	12
2.1.4	Die Diagnostik und Therapie einer Zöliakie.....	12
<b>2.2</b>	<b>Nicht-Zöliakie-Weizen-Sensitivität (NCWS).....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Abgrenzung zwischen Zöliakie, NCWS, Weizenallergie und ATI-Sensitivität 14	
2.2.2	Definition einer Nicht-Zöliakie-Weizen-Sensitivität (NCWS).....	15
<b>2.3</b>	<b>Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI).....</b>	<b>16</b>
2.3.1	Charakteristika und Funktion von ATI .....	16
2.3.2	ATI als Stimulatoren des angeborenen Immunsystems .....	17
2.3.3	Aggravation von Autoimmunerkrankungen durch den Konsum von ATI ...	20
2.3.4	Klinische Relevanz der ATI .....	20
2.3.5	ATI verstärken Adipositas und Fettleberhepatitis .....	21
2.3.6	Therapie einer ATI-Sensitivität .....	22
2.3.7	Einteilung pflanzlicher Nahrungsmittel nach Ihrer ATI-Aktivität .....	22
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Tiere .....	23
3.1.2	Futter.....	23
3.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe.....	23
3.1.4	Geräte .....	25
3.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	26
3.1.6	Verwendete Zelllinie .....	27
3.1.7	Antikörper.....	28
3.1.8	Software .....	28
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Zellkulturmethoden.....	29
3.2.2	Narkotisierung der Versuchstiere .....	32

<b>3.3</b>	<b>Subkutane Injektion der Tumorzellen</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b>Entnahme der Tumoren</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Immunhistochemie</b> .....	<b>33</b>
3.5.1	Einbettung.....	33
3.5.2	Anfertigung von Gewebeschnitten .....	34
3.5.3	Immunhistologie .....	34
3.5.4	Hämatoxylinfärbung .....	35
3.5.5	Sirius Rot Färbung .....	36
3.5.6	Immunhistochemische Auswertung.....	36
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Wachstumskurven der Tumorzellen nach subkutaner Injektion</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Tumorumlumina</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Tumorgewicht</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>Immunhistochemische Auswertung</b> .....	<b>44</b>
4.4.1	CD 8.....	44
4.4.2	CD 68.....	46
4.4.3	FOX P3 .....	48
4.4.4	CD 31 .....	50
4.4.5	YM 1.....	52
4.4.6	Sirius Rot Färbung .....	54
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Quellenverzeichnis</b> .....	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>71</b>
<b>9.</b>	<b>Curriculum Vitae</b> ..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	

## I. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
G	Gauge (Durchmesser)
g	Rotation
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BMI	Body mass index
bp	base pair, Basenpaare
C57BL/6J	C57 black 6 Jackson
CLE	konfokale Laserendomikroskopie
CCL2	chemokine ligand 2, chemokinligand 2
CD 4	cluster of differentiation 4
CD 4 <sup>+</sup>	CD 4 (Cluster of differentiation 4) positive T cell, CD 4 <sup>+</sup> positive T-Zelle
CD 8	cluster of differentiation 8
CD 8 <sup>+</sup>	CD 8 positive cytotoxic T cells, CD 8 positive T-Zelle
CD 31	cluster of differentiation 31
CD 31 <sup>+</sup>	CD 31 positive Endothelzellen, CD 31 positive endothelial cells
CD 68	cluster of differentiation 68
CD 68 <sup>+</sup>	CD 68 positive Makrophagen, CD 68 positive macrophages
cm	centimeter, Zentimeter
D	Deutschland
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritic cell, dendritische Zelle
DCs	dendritic cells. dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
FMF	familiäres Mittelmeerfieber
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FODMAPS	fermentierbare Oligo-, Di-, Monosaccharide und Polyole
Fox P3	forkhead box P3
Fox P3 <sup>+</sup>	forkhead box P3 positive cell
ECM	extracellular matrix, vaskuläre, extrazelluläre Matrix
GFD	Gluten-free diet, glutenfreie Diät
HLA-DQ2	human leukocyte antigen DQ2, humanes Leukozyten-Antigen DQ2
HLA-DQ8	human leukocyte antigen DQ8, humanes Leukozyten-Antigen DQ8
IL	Interleukin
Kg	Kilogramm
LC	Lung cancer, Lungenkrebs
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MC	Monozyten
MASLD	metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, metabolischer Dysfunktion assoziierte, steatotische Lebererkrankung
MΦ	Makrophagen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease, Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	non-alcoholic Steatohepatitis, Nichtalkoholische Steatohepatitis
NCGS	non-celiac gluten sensitivity Nicht-Zöliakie-Glutensensitivität

NCWS	non-celiac wheat sensitivity, Nicht-Zöliakie-Weizen-Sensitivität
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
rpm	revolutions per minute
RT	room temperature, Raumtemperatur
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
TAMs	Tumor-associated macrophages, tumorassoziierte Makrophagen
TIM	Institut für Translationale Immunologie
TG2	tissue transglutaminase 2, Gewebetransglutaminase
TLR4	Toll-like-receptor 4, Toll-like-Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
YM 1	M2 macrophages, M2 Makrophagen
YM 1+	M2 positive cells, M2 positive Zellen

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1	Verbreitung des Weizenanbaus. Abbildung aus (1).
Abbildung 2-2	Immunologie der Zöliakie. Abbildung aus (2).
Abbildung 2-3	Endoskopische Diagnostik. Abbildung aus (1).
Abbildung 2-4	Röntgenstruktur des ATI 0.19 mit 4 $\alpha$ -Helices. Abbildung aus (4).
Abbildung 2-5	Entzündungsfördernde Wirkung von ATI. Abbildung aus (3).
Abbildung 4.1	Wachstumskurven der Tumorfläche von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung nach subkutaner Injektion von 750,000 LC-1 Tumorzellen in die linke Flanke.
Abbildung 4.2	Wachstumskurven der Tumorfläche von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) nach subkutaner Injektion von 200,000 LC-1 Tumorzellen in die rechte Flanke.
Abbildung 4.3:	Tumorvolumina von Tieren ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung 30 Tage nach subkutaner Injektion von 200,000 bzw. 750,000 LC-1 Tumorzellen.
Abbildung 4.4:	Tumorgewicht von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung 30 Tage nach subkutaner Injektion von 200,000 bzw. 750,000 LC-1 Tumorzellen.
Abbildung 4.5:	Immunhistochemische Auswertung CD8 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung
Abbildung 4.6:	Immunhistochemische Auswertung CD68 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung

Abbildung 4.7:	Immunhistochemische Auswertung FOX P3 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung
Abbildung 4.8:	Immunhistochemische Auswertung CD31 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung
Abbildung 4.9:	Immunhistochemische Auswertung YM1 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung
Abbildung 4.10:	Immunhistochemische Auswertung Sirius Rot Färbung im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung

## 1. Einleitung / Ziel der Dissertation

Weizen enthält viele Nährstoffe, die die für sein Wachstum notwendige Energie und Aufbaustoffe bereitstellen. Als elementarer Baustein dienen Proteine und hier besonders das Gluten. Der Anteil des Glutens am Gesamtprotein des Weizens beträgt rund 90 % (1). Für die weizenbedingten, entzündlichen Erkrankungen spielen nur die Proteine eine Rolle. Bei der Struktur des Glutens überwiegen biochemisch betrachtet zwei Aminosäuren, das Prolin und das Glutamin. Diese zwei Aminosäuren induzieren besondere Proteinstrukturen, welche von menschlichen Verdauungsenzymen nicht vollständig abgebaut werden können. Es verbleiben deshalb nach dem Verdauungsprozess des Glutens Proteinbestandteile, die Glutenpeptide. Gesunde Patienten werden durch diese Peptide nicht beeinträchtigt. Patienten, die unter der Krankheit Zöliakie leiden, entwickeln durch diese Peptide jedoch eine immunologische Reaktion (Th1 T-Zellaktivierung in der Lamina propria des oberen Dünndarms). Es erfolgt dann, u.a. bei vorhandener notwendiger, aber nicht hinreichender genetischer Prädisposition (Expression von HLA-DQ2 oder HLA-DQ8) auf Antigen präsentierenden Zellen der Lamina propria eine Aktivierung und Expansion glutenspezifischer T- Zellen und eine Entzündung der Dünndarmschleimhaut. Neben dem vorherrschenden Gluten enthält Weizen auch viele andere Proteine, die ca. 10-15 % des Gesamtproteins ausmachen (1, 6). Darunter finden sich auch sehr viele allergene Enzyme und regulatorische Proteine, die u.a. bei der Keimreifung des Weizens eine Rolle spielen (6-8).

Zu diesen Proteinen gehören die Amylase-Trypsin-Inhibitoren des Weizens (ATI). ATI wird eine Rolle bei der Kornentwicklung, aber auch der Parasitenabwehr zugesprochen. Sie verhindern den vorzeitigen Abbau der Speicherkohlenhydrate und des Speicherproteins. Sie dienen dem Weizenkeimling ggf. auch als Energiereservoir. ATIs haben zwei wesentliche Funktionen: Zum einen hemmen Sie das Enzym Amylase, welche die als Kohlenhydratspeicher dienende Stärke in Glucose umwandelt. Glucose ist ein wichtiger Energielieferant des Keimlings. Zum anderen hemmen ATI proteinspaltende Enzyme wie Trypsin, die auch im Weizen exprimiert werden. Trypsin ist (neben der Speichelamylase) ein wichtiges Verdauungsenzym, welches im Menschen durch das Pankreas freigesetzt wird. Die ATI gehören zu der großen Familie von Nicht-Glutenproteinen im Weizen, welche unsere Arbeitsgruppe in diversen präklinischen und klinischen Studien als Aktivatoren des angeborenen Immunsystem untersucht hat (1, 9-12). Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung an den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4). Der TLR4 ist ein zentraler Rezeptor des angeborenen Immunsystems. Durch ihre Molekülstruktur sind die ATI schwer angreifbar für Verdauungsenzyme wie Proteasen und können bei Menschen mit einer ATI-Sensitivität zunächst eine leichte Inflammation im Darm auslösen (1, 9, 13). Bei Patienten mit zusätzlich bestehenden, chronischen Erkrankungen wie z.B. den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, bei Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, aber auch bei Diabetes Mellitus Typ 2 wird durch den Konsum von ATI neben dem angeborenen Immunsystem auch das durch die Krankheit bereits aktivierte, adaptive Immunsystem zusätzlich stimuliert. Mechanistisch verlassen durch Nahrungs-ATI aktivierte Monozyten-Makrophagen den Darm über das Gefäßsystem und wandern in die peripheren entzündeten Organe ein, um dort als „Adjuvanz“ die T-Zell vermittelte Entzündung zu verstärken (10, 14). Es greifen somit zwei Regelkreise ineinander. Der Regelkreis des angeborenen Immunsystems über den TLR4-Rezeptor und der Regelkreis der spezifischen T-Zell-Reaktionen im Rahmen der bestehenden, chronischen Erkrankung (1). Studien als auch klinische Erfahrungen zeigen, dass gerade deshalb Patienten mit schwerwiegenden, chronischen Erkrankungen von einer weizenfreien Diät profitieren können (1, 3, 15).

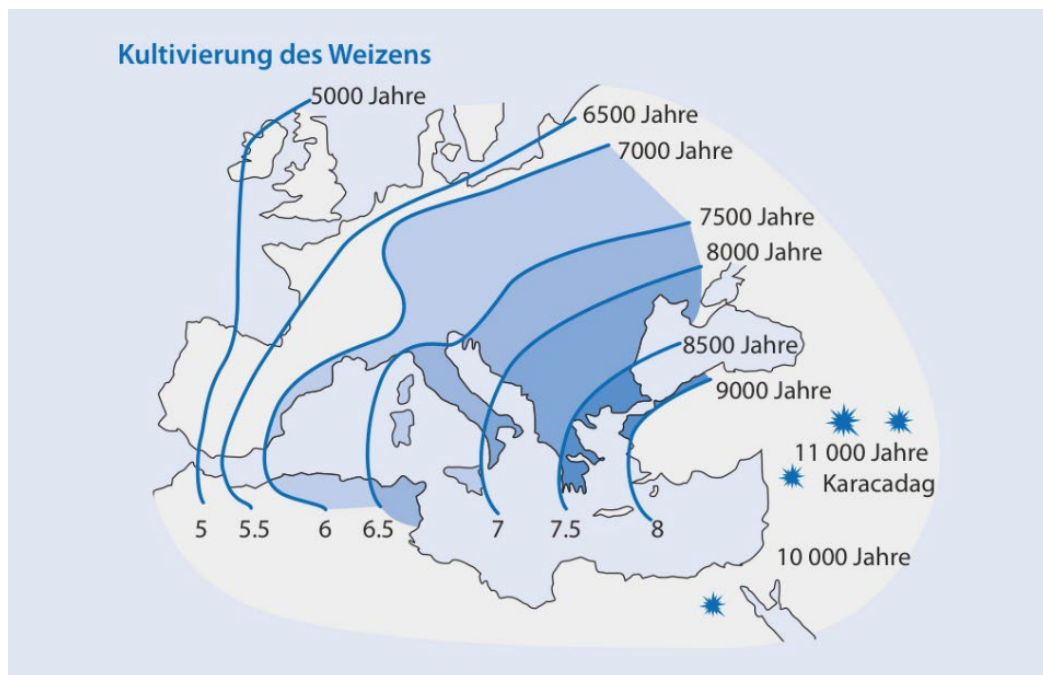
Das Ziel dieser Arbeit war es nun den Einfluss nutritiver ATI auf die Förderung extraintestinaler, peripher liegender Entzündungen, zum ersten Mal in einem Tumormodell, zu untersuchen. Dies erfolgte anhand eines Tumorzell-Implantationsmodells. Immunkompetente Mäuse wurden in zwei Kohorten unterteilt und vor Studienbeginn auf eine ATI-freie Diät gesetzt. In der Interventionsgruppe werden die Versuchstiere zu Studienbeginn auf eine ATI-haltige, aber sonst identische Ernährung umgestellt. In der Kontrollgruppe wurden die Tiere während der gesamten Studienphase weiterhin ATI-frei ernährt. Den Mäusen wurden in beiden Kohorten zu Studienbeginn Tumorzellen eines Adenokarzinoms der Lunge subkutan in die Flanke injiziert. Das Ausmaß der (ggf. Tumor-fördernden, immunsuppressiven, oder auch Tumor-hemmenden) Inflammation wurde durch das Wachstum des Tumors in beiden Kohorten und histologisch mittels Inflammationsmarkern in den Gewebeschnitten der Tumoren ermittelt und verglichen. Es sollte besonderes Augenmerk auf die folgenden Aspekte gelegt werden:

- Messung der Tumorgöße im Verlauf und am Endpunkt
- Messung des Tumolvolumens am Endpunkt
- Messung des Tumorgewichts am Endpunkt
- Expression inflammatorischer Marker und Infiltration von Immunzellen im Tumorrand und Tumorkern

Anschließend wurden mittels weiterer Verfahren die o.g. Arbeitshypothese überprüft.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 Geschichtlicher Hintergrund des Weizens



**Abbildung 2-1 Verbreitung des Weizenanbaus**  
(Übernommen mit Genehmigung der Autoren.)

Die ersten Funde stammen aus dem Osten der heutigen Türkei. Der Weizenanbau verbreitete sich in den folgenden Jahrtausenden auch in Mitteleuropa. Abbildung aus (1).

Weizen hat seinen Ursprung in den Ländern des Nahen Ostens. Der Anbau erfolgte u.a. im heutigen Irak, der Türkei und im Iran. Erste Nachweise stammen aus der Zeit um 10.000 v. Chr. Die ersten Formen des Weizens waren Einkorn (*Triticum monococcum*) und Emmer (*Triticum dicoccum*). Im Verlauf der Zeit erlangte Weizen durch expansive Züchtung größeren Bekanntheitsgrad. Völker der Antike wie die Römer, Ägypter und Griechen bauten Weizen in größerem Umfang an (16).

Im 19. Jahrhundert konnte im Zuge der Industrialisierung und der damit einhergehenden, maschinellen Weiterentwicklung Weizen in weitaus größeren Mengen geerntet werden. Die Entwicklung neuer Weizensorten, welche eine Resistenz gegenüber Schädlingen und Krankheiten aufwiesen war ein wichtiger Meilenstein in der Geschichte des Weizens.

Weizen ist ein weit verbreitetes Grundnahrungsmittel. Länder wie Russland, China und Indien stellen die weltweit größten Weizenproduzenten dar (16-18).

### **2.1.1 Erkrankungen durch den Konsum von Weizen**

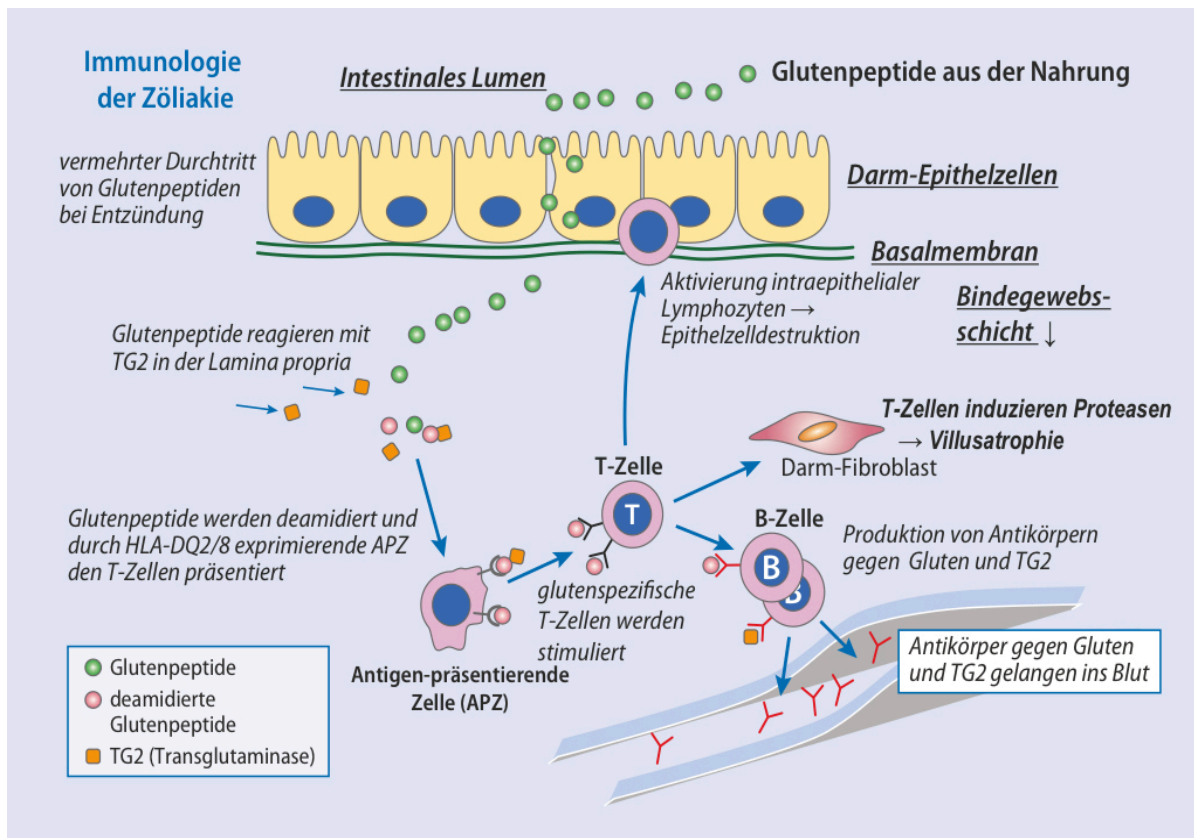
#### **2.1.2 Zöliakie**

Menschen, die unter der Erkrankung Zöliakie leiden, vertragen den Konsum diverser Getreidesorten wie z.B. Weizen, Gerste, Roggen, Dinkel, Emmer, Einkorn und Grünkern nicht. Die Zufuhr von glutenhaltigen Nahrungsbestandteilen geht bei Betroffenen mit einer starken, inflammatorischen Reaktion des Dünndarms einher. Die Zöliakie ist eine Autoimmunerkrankung, welche genetisch die Histokompatibilitätsantigene HLA-DQ2 und DQ-8 aufweist und durch das Autoantigen Gewebetransglutaminase aggraviert wird (1).

Diese chronische Entzündungsreaktion kann dazu führen, dass der Darm seine Fähigkeit verliert, Nährstoffe aufzunehmen. In Folge dieser Malabsorptionsstörung können Mangelerscheinungen wie Anämien, Osteoporose oder auch Nervenschädigungen auftreten. Neben intestinalen Symptomen wie Diarrhö, Steatorrhö und Obstipationen, charakterisiert sich dieses Krankheitsbild auch durch extraintestinale Symptome wie z.B. Neuropathien, Ataxien und auch dermatologischen Manifestationen. Mit der Zöliakie ist eine genetische Veranlagung für schwere Autoimmunerkrankungen assoziiert. Dazu zählen die Autoimmunthyreoditis, Typ-1-Diabetes, sowie Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis. Eine unbehandelte und nicht entdeckte Zöliakie kann oftmals diese bereits schwerwiegenden Erkrankungen aggravierend (1, 6, 19-22).

Schließlich kann eine dauerhaft unbehandelte Zöliakie das Risiko für die Bildung gastrointestinaler Malignome erhöhen. Die Diagnostik einer Zöliakie erfolgt über einer endoskopischen Biopsie aus dem Dünndarm. Anfangs wurde zudem ein zusätzlicher Bluttest, der sogenannte Anti-Endomysium-Antikörper identifizieren kann, entwickelt. Dieser Test spielt seit 1996 diagnostisch betrachtet keine Rolle mehr (1). Im Jahr 1997 hat die Arbeitsgruppe um Schuppan et al. das Autoantigen der Zöliakie, die Gewebetransglutaminase (TG2), identifiziert (1, 23).

Dieses Antigen ist ein körpereigenes Molekül gegen das die Autoantikörper gerichtet sind. Autoantikörper entstehen bei Autoimmunerkrankungen. Bei gesunden Personen existieren keine relevanten Autoantikörper. Mithilfe dieser Entdeckung konnte ein Test auf Gewebetransglutaminase etabliert werden, welcher es erlaubt, hoch sensitiv und hochspezifisch eine aktive Zöliakie nicht invasiv zu diagnostizieren. So können auch Personen, die keine schweren oder typischen Zöliakiesymptome haben, leicht identifiziert werden (24).



**Abbildung 2-2 Immunologie der Zöliakie.**

Abbildung aus (2). (Übernommen mit Genehmigung der Autoren.)

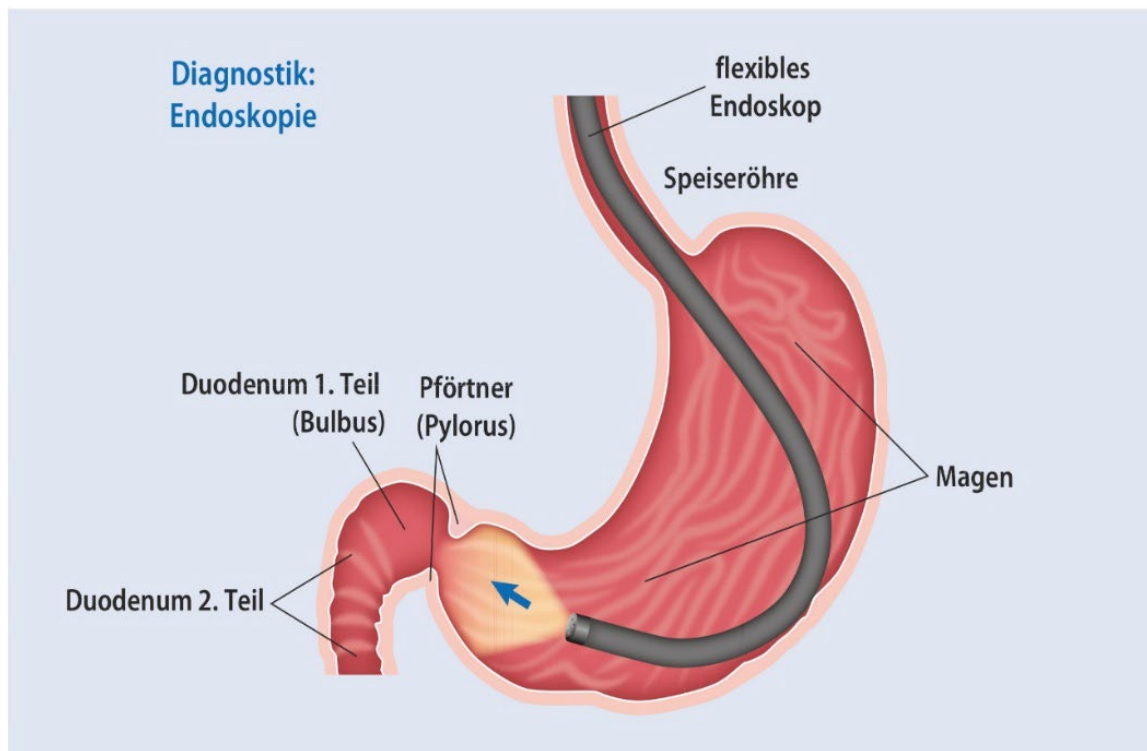
Mit der Nahrung aufgenommene, ungelöste Glutenpeptide erreichen die unter dem Darmepithel liegende Gewebsschicht (Lamina propria). Dort werden Sie durch die bei Entzündungen vermehrt aus den Zellen freigesetzte Gewebetranstglutaminase (TG2) chemisch verändert (aus einer neutralen Ladung wird eine negative Ladung). Dadurch binden sie stärker an die Oberflächenmoleküle HLA-DQ2 oder HLA-DQ8. Auf den antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und TG2 bilden diese Komplexe mit Glutenpeptiden. Diese werden durch Aufnahme durch APZ aufgenommen, verarbeitet und phagozytiert. An HLA-DQ2 HLA-DQ8 gebundenes Glutenpeptid aktiviert und expandiert glutenspezifische T-Lymphozyten. Der Kontakt führt zur Bildung von T-Zellklonen, welche das Dünndarmgewebe angreifen und zusätzlich B-Lymphozyten aktivieren. Die B-Lymphozyten bilden Antikörper gegen Gluten und TG2. Die aktivierten Immunzellen setzen Botenstoffe (Zytokine, Chemokine) frei, die andere Zellen (Makrophagen/Fibroblasten) aktivieren. Dies führt zu einer Freisetzung von gewebeerstörenden Enzymen. Gluten kann zudem von Darmepithelzellen aufgenommen und über HLA-DQ2 oder -DQ8 den Immunzellen präsentiert werden. Eine dadurch bedingte Expression von Gefahrenmolekülen aktiviert Killerzellen und zytotoxische T-Zellen. Dies hat eine Schädigung der Epithelzellen, sowie einen Schleimhautumbau mit Zottenatrophie und eine daraus resultierenden Malabsorptionsstörung zur Folge (1, 5).

### **2.1.3 Die Symptome einer Zöliakie**

Patienten mit einer Zöliakie können die typischen Symptome einer entzündlichen Erkrankung des Dünndarms aufweisen. Dieser Symptomkomplex besteht aus abdominalen Beschwerden wie Erbrechen, Nausea, Flatulenzen ein aufgeblähtes Abdomen, Bauchschmerzen, Blähungen, Diarrhöen, Anämie, Osteoporose, Gewichtsverlust und Malabsorption (22, 25, 26). Es kann jedoch auch ohne das Vorliegen dieser Symptome eine Zöliakie bestehen. Erstaunlicherweise äußert sich bei einer großen Anzahl von Menschen mit einer Zöliakie eine Bandbreite an anderen Symptomen, welche zunächst nicht mit einer Erkrankung des Magen-Darm-Trakts assoziiert werden würden wie z.B. mit einer chronischen Müdigkeit, Konzentrationsstörungen, Infertilität (Frau und Mann), Epilepsien oder einer depressiven Verstimmung. Erklären lässt sich dieses große Spektrum an anderen Symptomen mit der durch die Zöliakie bedingte Malabsorptionsstörung (10, 22). In Folge einer verminderten Aufnahme von Nährstoffen, Vitaminen sowie Mineralien können neben den o.g. Symptomen auch eine Vielzahl an Autoimmunerkrankungen wie eine Autoimmunhepatitis, Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, oder ein Diabetes mellitus Typ 1 bis hin zu malignen Tumoren (intestinales T-Zell-Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphom) auftreten. Es sind zudem genetische, chromosomal bedingte Erkrankungen wie das Down-Syndrom, oder das Ullrich-Turner-Syndrom mit einer Zöliakie assoziiert (21).

### **2.1.4 Die Diagnostik und Therapie einer Zöliakie**

Die Diagnose einer Zöliakie wird bei Verdacht zunächst mittels Serologie erhoben. Die Patienten mit aktiver Erkrankung haben erhöhte Antikörper der Klasse IgA (Ttg-IgA) gegen die Gewebetransglutaminase, welche um das 2- bis 1000-Fache des Normwertes erhöht sind. Eine Zöliakie kann hier meist auch noch monatelang nachdem der Patient sich auf eine glutenfreie Diät umgestellt hat, nachgewiesen werden. Dies ist mit der langen Halbwertszeit der im Blut zirkulierenden Antikörper begründet. Die Zeit bis die Antikörper unter glutenfreier Diät um die Hälfte abfallen beträgt 30-60 Tage (1). Bestanden bei Patienten vor Beginn einer glutenfreien Diät leichte oder unspezifische Symptome, ohne Beleg einer Zöliakie, so sollte vor Entnahme einer Serologie bzw. einer geplanten Endoskopie für 1-3 Monate eine normale Kost mit täglich 10-15 g Gluten eingenommen werden.



**Abbildung 2-3 Endoskopische Diagnostik.**

Abbildung aus (1). (Übernommen mit Genehmigung der Autoren.)

Einführen eines Flexoskops unter Sicht über den Ösophagus, in den Magen und dem oberen Duodenum.

Entnahme einer Biopsie aus dem proximalen, mittleren, sowie distalen Anteil des Duodenums.

Fällt der Antikörpertest positiv aus, so erfolgt zwecks Bestätigung der Diagnose einer Zöliakie eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (27). Im Rahmen dieser Untersuchung wird eine Biopsie aus dem oberen Dünndarm des Patienten entnommen und histopathologisch untersucht. Für die histologische Diagnostik der Zöliakie sollen mindestens 6 Biopsien aus verschiedenen Abschnitten des Duodenums wie dem Bulbus duodeni, dem mittleren und distalen Duodenum (jeweils 2) entnommen werden (28-30). Im Anschluss wird das Ausmaß der Zotten-/Kryptenarchitektur des Dünndarms mittels der modifizierten Marsh-Oberhuber-Klassifikation beurteilt (31, 32). Charakteristische histologische Veränderungen der Zöliakie sind z.B. eine partielle oder totale Zottenatrophie, eine Kryptenhyperplasie, sowie Veränderungen des Zotten- / Kryptenverhältnisses (1).

Patienten mit der gesicherten Diagnose einer Zöliakie müssen gegenwärtig unabhängig von Symptomen, oder möglichen Begleiterkrankungen lebenslang eine glutenfreie Diät (GFD) einhalten (1, 26). Die täglich zugeführte Glutenmenge sollte bei < 20 mg pro Tag liegen (33, 34). Ziel ist, neben der Abnahme der intestinalen und extraintestinalen Beschwerden, eine Normalisierung der Schleimhaut des Dünndarms, sowie der Vermeidung von Makro-/ Mikronährstoffmangel und den bereits erwähnten, daraus resultierenden Begleiterkrankungen. Insbesondere konnte bei Kindern mit einem initial festgestellten Defizit des Längenwachstums durch strikte Einhaltung einer GFD ein Aufholwachstum nach bereits 6 Monaten beobachtet werden (35, 36). Patienten mit der gesicherten Diagnose einer Zöliakie sollten eine individuell auf sie zugeschnittene Ernährungstherapie erhalten. Es sollten zudem nach Einleitung einer GFD in regelmäßigen Abständen ärztliche Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden, in denen der Body Mass Index (BMI) und besonders bei Kindern Gewicht, Länge und Pubertätsstadium ermittelt werden. Im Rahmen der Kontrolluntersuchungen sollten bei einem initial nachgewiesenen Mangel folgende Laborparameter zusätzlich kontrolliert werden: Blutbild, Eisenparameter wie Ferritin/Transferrinsättigung, 25-OH-Vitamin D, Folsäure, Vitamin B12 bzw. Holo-Transcobalamin, Zinkspiegel und Thyreoidea-stimulierendes Hormon (37).

## **2.2 Nicht-Zöliakie-Weizen-Sensitivität (NCWS)**

### **2.2.1 Abgrenzung zwischen Zöliakie, NCWS, Weizenallergie und ATI-Sensitivität**

Bei einer Nicht-Zöliakie-Weizen-Sensitivität handelt sich um eine Unverträglichkeit des Organismus gegenüber der Zufuhr von Weizen. Das Symptombild ist ähnlich wie bei einer Zöliakie und äußert sich in Darmbeschwerden. Es handelt sich um eine Ausschlussdiagnose, denn es ist keine Zöliakie und keine klassische (Soforttyp) Weizenallergie nachzuweisen (1). Der Ausschluss einer Zöliakie erfolgt über eine Serologie auf Antikörper gegen Transglutaminase, sowie die Dünndarmhistologie. Ist eine Zöliakie diagnostisch ausgeschlossen, sollte im weiteren Verlauf eine Weizenallergie ausgeschlossen werden. Hier wird differenziert zwischen einer typischen Weizenallergie (IgE-vermittelt), sowie einer atypischen (Nicht-IgE-vermittelt, u.a. Eosinophilen-vermittelt) Weizenallergie (1).

Zur Bestätigung des Verdachts einer IgE-vermittelten Weizenallergie wird ein Weizen-spezifisches IgE im Blutserum bestimmt bzw. ein Haut-Prick-Test mit Weizenextrakt vorgenommen (38). Hierbei unterscheidet sich eine IgE-vermittelte Weizenallergie in Ihrem Erscheinungsbild je nach Lebensalter. Im Säuglings- und frühen Kindesalter sind es die typischen Symptome einer klassischen, allergischen Soforttyp Reaktion an Haut, Atemwegen, Gastrointestinaltrakt und Herz-Kreislaufsystem gut zu diagnostizieren (39). Bei Erwachsenen hingegen kann u.a. eine durch einen Trigger induzierte Form der Weizen-abhängigen Anstrengungs-induzierten Anaphylaxie (WDEI= Wheat Dependent Exercise Induced Anaphylaxis) vorliegen, die schwere systemische Reaktionen hervorrufen kann (40). Eine Nicht-IgE-vermittelte Reaktion ist durch gastrointestinale Reaktionen, u.a. Bauchschmerzen, Blähungen, Diarrhöe oder Obstipation gekennzeichnet, welche meist erst 2-10 Stunden nach Verzehr des Weizens auftreten. Eine Nicht-IgE-vermittelte (Typ 2) Weizenallergie ist durch eine Aktivierung von eosinophilen Granulozyten im Duodenum der Patienten ca. 30 Minuten nach Nahrungsmittelprovokation und mit konfokaler Laser-Endomikroskopie (CLE) live nachzuweisen und durch Visualisation einer unmittelbaren, intestinalen Permeabilitätsstörung nach endoskopischem Auftragen des allergenen Nahrungsmittels auf die Duodenalschleimhaut diagnostizierbar (41, 42). Im Erwachsenenalter dominiert diese Nicht-IgE-vermittelte (Typ 2) Weizenallergie (38). Hier sind primär Patienten mit der Diagnose „Reizdarm“ betroffen, vorwiegend mit einer Reaktion gegen Weizen >> Milch, Soja oder Hefe. Die Symptome bessern sich dramatisch mit Ausschluss des identifizierten Nahrungsallegens.

### **2.2.2 Definition einer Nicht-Zöliakie-Weizen-Sensitivität (NCWS)**

Eine Nicht-Zöliakie-Weizen-Sensitivität kann durch den Verzehr verschiedener Weizeninhaltsstoffe wie ATIs (Stimulation des TLR4), eine Typ 2 Weizenallergie bei Reizdarm, sowie (nicht entzündlich und klinisch weniger imponierend, durch im Weizen enthaltene fermentierbare Oligo-, Di-, Monosacharide und Polyole (FODMAPS) ausgelöst werden (8, 9, 43). Nachdem klinisch, laborchemisch und endoskopisch der Ausschluss einer Zöliakie, sowie mittels Ausschlussdiät über mindestens 2 Wochen und ggf. endoskopisch (CLE) einer Typ 2 Weizenallergie (4% der Bevölkerung!) erfolgt ist, wird der Verdacht einer ATI-Sensitivität weiterverfolgt (25). Sowohl die Typ 2 Weizenallergie also auch die ATI-Sensitivität erklären alle

Facetten der entzündlichen NCWS, u.a. die Symptome eines Reizdarmsyndroms, welche sich meist sowohl in intestinalen (Meteorismus), als auch extra- intestinalen Beschwerden wie Müdigkeit, Kopf-Glieder und Muskelschmerzen manifestieren (41, 42). Eine NCWS tritt wenige Stunden, oder in bis zu einem Tag nach Konsum von Weizen auf. Diese Symptome verschwinden häufig auch schnell nach Verzicht auf Weizen. Aufgrund dieser Erkenntnisse handelt es sich bei der sehr häufigen NCWS (10-15% der weizenkonsumierenden Bevölkerung) um eine Typ 2 allergische oder eine ATI-vermittelte Aktivierung des angeborenen Immunsystems, wie im folgenden Kapitel detailliert erläutert wird. (1).

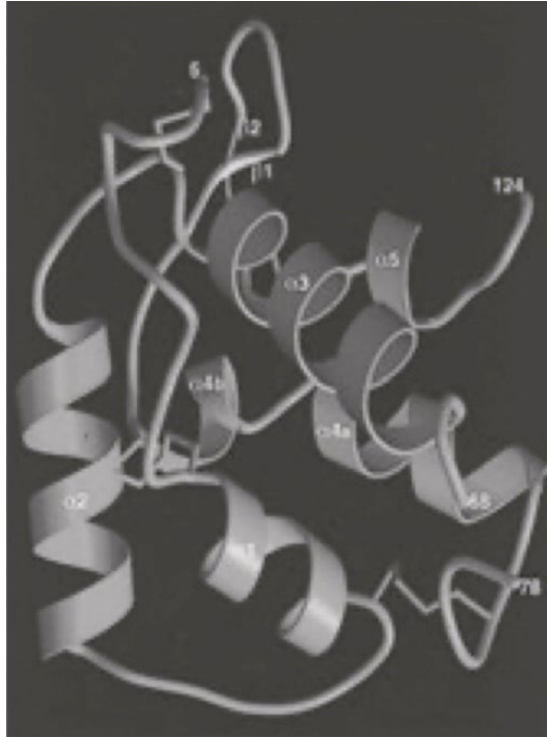
## **2.3 Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI)**

### **2.3.1 Charakteristika und Funktion von ATI**

Die ATI sind eine Gruppe von 11-17 isoformen, Nicht-Glutenproteinen, die Zellen des angeborenen Immunsystems über den TLR4 stimulieren, aber auch als klassische Weizen Soforttyp-Allergene fungieren können. Es handelt sich um allergene Proteine mit jeweils 124-168 Aminosäuren. Sie kommen als Monomere, Dimere und Tetramere vor. Unter diesen 11 Nicht- Glutenproteinen existieren drei definierte Haupt-ATI: Das CM3.,0.19, 0.28. ATI spielen eine Rolle bei der Keimreifung und Schädlings-Resistenz (1, 44, 45).

ATI kommen in allen glutenhaltigen Nahrungsmitteln vor. Neben Weizen auch in Dinkel, Emmer und Einkorn, und mit etwas geringerer Aktivität auch in Roggen und Gerste. Sie besitzen eine kompakte Struktur und sind durch Backen und durch gastrointestinale Enzyme nahezu kaum abbaubar. Der besondere Molekülaufbau der ATI macht sie schwer angreifbar für Proteasen.

ATI bleiben während der kompletten Passage des Darmtrakts, also vom Duodenum bis zum Ende des Kolons biologisch aktiv und i.W. Abbau-resistent (10).



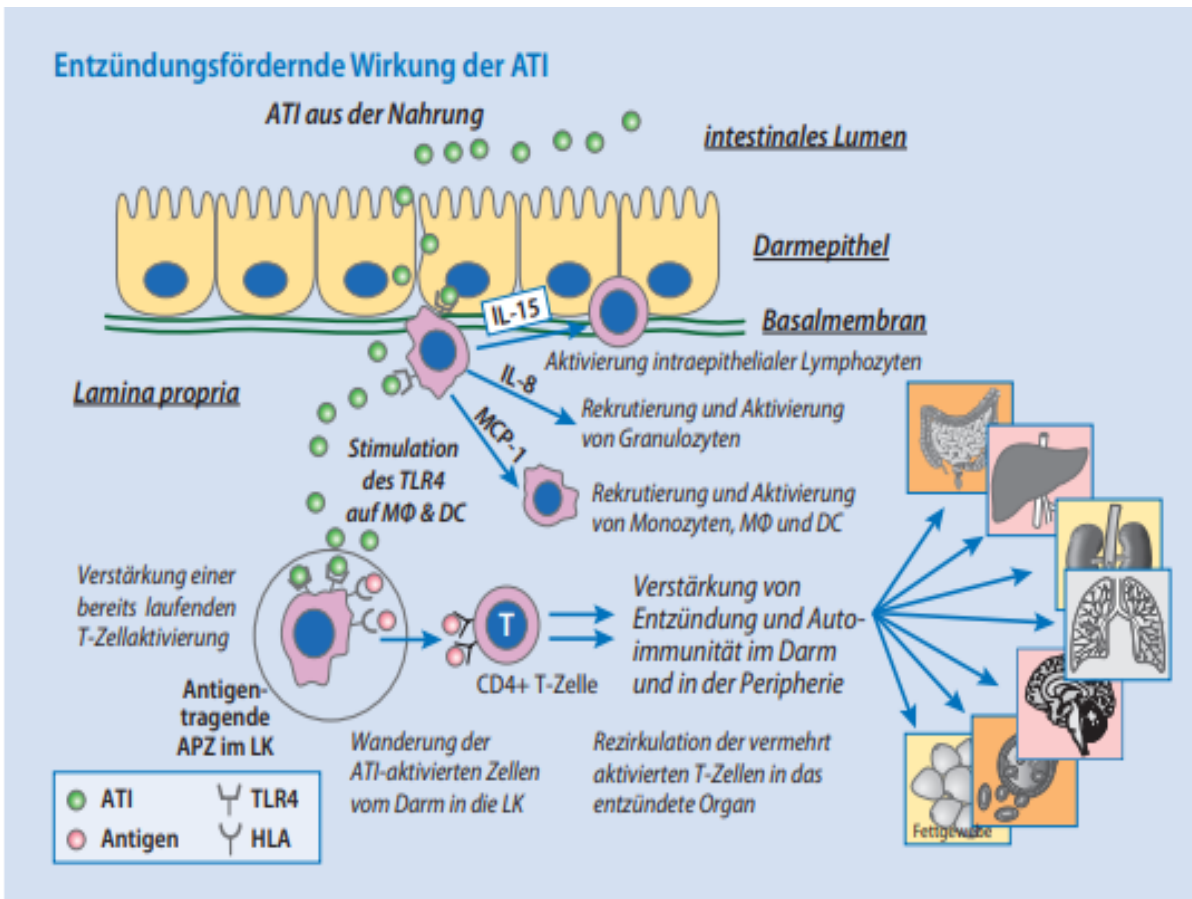
**Abbildung 2-4**  
**Röntgenstruktur des ATI-Typ 0.19 mit**  
**4 $\alpha$ -Helices.**

Abbildung aus (4). (Übernommen mit Genehmigung der Autoren.)

### **2.3.2 ATI als Stimulatoren des angeborenen Immunsystems**

Während bei einer Weizenallergie, oder eine Zöliakie immunologisch betrachtet das adaptive, T-Zell-vermittelte Immunsystem reagiert, werden im Rahmen einer NCWS durch ATI in Folge des Konsums der ATI-Zellen des angeborenen Immunsystem über den TLR4 stimuliert. Insbesondere Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (10). Dies hat eine leichte Inflammation zur Folge, welche jedoch im Vergleich zu einer Zöliakie nicht konventionell makroskopisch, oder histologisch in endoskopischen Untersuchungen nachweisbar ist. Bei näherer Betrachtung lassen sich jedoch eine erhöhte Zahl an Entzündungszellen in der Darmwand nachweisen, welche nach dem Kontakt mit ATI, Aktivierungsmarker auf Ihrer Oberfläche exprimieren. Aktivierungsmarker sind Proteine, die Entzündungszellen auf der Oberfläche zeigen, wenn sie stimuliert werden.

Der Nachweis erfolgt mit spezifischen Antikörpern in einer Gewebeprobe. ATI binden nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip an den TLR4 des Darms (9). Der TLR4 wird gewöhnlich von bakteriellen Zellwandbestandteilen, den Lipopolysacchariden aktiviert (1, 9).



**Abbildung 2-5 Entzündungsfördernde Wirkung von ATI.**

Abbildung aus (3). (Übernommen mit Genehmigung der Autoren.)

ATI aus der Nahrung werden unverdaut über das Darmepithel in die darunterliegende Bindegewebsschicht Lamina propria aufgenommen. Dadurch wird der zelluläre Anteil des angeborenen Immunsystems wie Monozyten und dendritische Zellen stimuliert und es erfolgt eine Bindung an den Toll-Like-Rezeptor 4. Die stimulierten Zellen setzen diverse Botenstoffe wie Interleukin-8/-15, Monozyten/Makrophagen und das chemotaktische Protein 1 frei, welche eine Signalkaskade freisetzen und weitere Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren. Zu diesen Zellen gehören auch im Blut zirkulierende Monozyten, welche zu MΦ und DC transferiert werden. Intestinal bereits stimulierte Zellen des angeborenen Immunsystems bewegen sich in nahegelegene Lymphknoten. Die antigenpräsentierenden Zellen des lymphatischen Systems verstärken dadurch die T Zell Aktivierung. Nach dem Prinzip eines Adjuvanzeffektes werden diese CD4+ T-Zellen durch den stimulatorischen Effekt der ATI zusätzlich aktiviert. Zu diesen aktivierten Zellen gehören Monozyten, Makrophagen und DC. Dieser beschriebene, immunologische Prozess erläutert weshalb nutritive ATI initial bestehende Erkrankungen autoimmuner-/metabolischer Genese weiter aggravieren (1, 3).

### **2.3.3 Aggravation von Autoimmunerkrankungen durch den Konsum von ATI**

In Folge des Konsums von ATI werden Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie z.B. Makrophagen, oder dendritische Zellen aktiviert und wandern in umgebende Lymphknoten des Darms aus. In den Lymphknoten treffen die Zellen des angeborenen Immunsystems auf T-Zellen, welche aus dem Blutstrom in die Lymphknoten zirkulieren. Diese T-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems sind bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formkreis, bei einer multiplen Sklerose, oder bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa bereits aktiviert und werden nun durch den Stimulus der angeborenen Immunzellen im Rahmen eines Adjuvanzeffekts zusätzlich aktiviert (10, 46-48).

### **2.3.4 Klinische Relevanz der ATI**

Mit der Nahrung zugeführt, verstärken Weizen ATIs in tierexperimentellen Studien chronisch entzündliche Darmerkrankungen, die nichtalkoholische Steatohepatitis, oder auch Erkrankungen wie den Morbus Alzheimer (19, 20, 47, 49). Bei Erkrankungen wie dem familiären Mittelmeerfieber, einer hereditären autoinflammatorischen Erkrankung, zeigten humane Studien an Patienten einen signifikanten Effekt unter einer ATI-freien Diät (15). Dies zeigt die hohe klinische, als auch wissenschaftliche Relevanz des Darms als größtes, immunologisches Organ und der Kommunikation mit anderen Körperorganen. Die Bedeutung der ATI als Stimulator des Immunsystems ist außerordentlich hoch, da ein großer Anteil der Weltbevölkerung sich von Weizen und anderen glutenhaltigen Nahrungsmitteln ernährt (50). Der Konsum von ATI führt auch bei gesunden Menschen zu einer Inflammation im Darm, welche unproblematisch ist. Bei Patienten mit autoimmun-/ chronisch-entzündlichen Erkrankungen können diese jedoch in Folge des ATI-Konsums rapide Fortschreiten und eine Verstärkung bereits aktiver Inflammationen weiter fördern (9, 10).

### **2.3.5 ATI verstärken Adipositas und Fettleberhepatitis**

Adipositas bezeichnet eine über dem Normwert liegende Vermehrung des Körperfettanteils, welche mit einem u.a. erhöhten, kardiovaskulären Risiko verbunden ist. Die Klassifikation der Adipositas erfolgt mittels des Body Mass Index (BMI) (51). Die Ursache für die Entstehung dieses Krankheitsbildes liegt in einer Imbalance zwischen einer erhöhten Kalorienzufuhr und im Verhältnis dazu verringerten Kalorienabnahme (1). Die überschüssige Energie in Form von Lipiden akkumuliert nicht nur im Fettgewebe, sondern auch in anderen Organen wie der Muskulatur, des Pankreas und der Leber. Diese ektopische Fettspeicherung fördert eine Insulinresistenz, chronische Inflammationen und das Auftreten eines metabolischen Syndroms (52). Eine Adipositas liegt ab einem BMI von  $30 \text{ kg/m}^2$  vor und stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die Entstehung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD), sowie einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) dar, welche in fortgeschrittenen Stadien eine Leberfibrose, als auch Leberzirrhose zur Folge haben können (20). Neben diesen Faktoren stellt auch der Darm einen Ort für metabolische und immunologische Impulse dar, die einen Entzündungsprozess und den Stoffwechsel des gesamten Organismus beeinflussen. Somit ist die Darm-Leber-Achse ein wichtiger Modulator von Lebererkrankungen, insbesondere auch einer NASH. Der Einfluss spezifischer Mikro- und Makronährstoffe wird zunehmend als wichtiger Einflussfaktor in der Pathogenese einer NAFLD und NASH angesehen, welche eine Erkrankung aggraviert. Die Ergebnisse weiterer Studien zeigen, dass in Grundnahrungsmitteln enthaltene Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI), als proinflammatorisch wirkende Mikronährstoffe in kalorienirrelevanten Mengen, die der durchschnittlichen, täglichen Weizenaufnahme des Menschen entsprechen Gewichtszunahme, Leberfibrose/-steatose und Entzündungen in Verbindung mit einer Ausdehnung der viszeralen Fettgewebsmasse fördern (15, 49, 53).

In einer weiteren randomisierten, kontrollierten Studie an Patienten mit bioptisch nachgewiesener, metabolischer Dysfunktion assoziierten steatotischen Lebererkrankung (MASLD) wurde der Einfluss einer ATI-freien Ernährung auf Leber-, sowie weiterer metabolischer Parameter untersucht. Es zeigte sich, dass, eine bereits kurzfristige ATI-freie Diät zu signifikanten Verbesserungen der Leber- und Stoffwechselfparameter geführt hat. Diese Ergebnisse unterstreichen die

stimulatorische Wirkung der ATI auf das angeborene Immunsystem und eine daraus abgeleitete Aggravierung intestinaler, als auch extraintestinaler Entzündungen (49).

### **2.3.6 Therapie einer ATI-Sensitivität**

Die Therapie einer ATI-Sensitivität besteht im Verzicht einer glutenfreien und somit auch ATI-freien Diät (15). Dies ist damit zu begründen, dass alle glutenfreien Lebensmittel in der Regel nahezu ATI-frei sind. Patienten mit einer nachgewiesenen ATI-Sensitivität müssen jedoch keine strenge, glutenfreie Diät einhalten wie bei Patienten mit einer Zöliakie, oder einer Weizenallergie. Dies ist mit der Menge des konsumierten ATIs zu erklären. Eine Verminderung der täglich zugeführten ATI um 95% wird daher Betroffenen bei dem Vorliegen einer ATI-Sensitivität empfohlen (1, 10).

### **2.3.7 Einteilung pflanzlicher Nahrungsmittel nach Ihrer ATI-Aktivität**

Das jeweilige Anbaugebiet und die Sorte der entsprechenden, pflanzlichen Nahrungsmittel haben einen Einfluss in Bezug auf dessen ATI-Bioaktivität, sowie ATI-Gehalt. Die ATI-Bioaktivität ist somit von geographischen und damit auch verbundenen, klimatischen Bedingungen im jeweiligen Anbaugebiet abhängig. Es ist hierbei festgestellt worden, dass es globale Unterschiede in der ATI-Bioaktivität von Pflanzen welche in Europa, Nordamerika und Asien angebaut werden. Der Nachweis einer ATI-Bioaktivität lässt sich mittels eines Aktivierungstest an Makrophagen nachweisen. Das ATI aus dem entsprechenden Nahrungsmittel wird extrahiert und aktiviert den TLR4 auf den Makrophagen, welche weitere Entzündungsmediatoren wie Interleukin-8 (IL-8) freisetzen. Die ATI-Bioaktivität wird im Zuge von Verarbeitungsprozessen des Nahrungsmittels (Backen, Kochen) meist nur gering reduziert. Nahrungsmittel werden nach dem Grad Ihrer ATI-Bioaktivität kategorisiert. Bei Getreidesorten wie Weizen, Roggen und Gerste ist eine hohe ATI-Bioaktivität gemessen worden, eine mittlere ATI-Bioaktivität beinhalten Soja, Quinoa, Buchweizen sowie Erbsen. Bei diesen glutenfreien Nahrungsmitteln sind die darin enthaltenen ATI instabil, da sie im Zuge Ihrer Verarbeitung (Backen), oder durch gastrointestinale Proteasen inaktiviert werden und somit keine klinische Relevanz haben (1, 10)

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Tiere

Mäuse:

C57BL/6j (10-12 Wochen, weiblich, 20-25g)    Hauseigener Tierstall der  
Universitätsmedizin Mainz

##### 3.1.2 Futter

###### 3.1.2.1 Zein Futter

Inhaltsstoffe: Mais-Protein (Zein) 22%, Kohlenhydrate, Lipide, Mineralien, essenzielle Aminosäuren und Vitamine

###### 3.1.2.2 ATI-Futter

Inhaltsstoffe: Zein, Kohlenhydrate, Lipide, Mineralien, essenzielle Aminosäuren und Vitamine, definierter ATI-Gehalt (1.5% des Zeins), extrahiert und gereinigt aus Weizenmehl; ansonsten identisch mit der ATI-freien Diät.

##### 3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe

<u>Name</u>	<u>Hersteller und Firmensitz</u>
Aceton	Roth (Karlsruhe, D)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen, D)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen, D)
Calciumchlorid	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethylformamid (DMF)	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen, D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Dulbeccos modified eagle's medium (DMEM)	Sigma (Deisenhofen, D)

Eosin	Sigma (Deisenhofen, D)
Ethanol (EtOH) 70% vergällt	Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol (EtOH) absolut	Roth (Karlsruhe, D)
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Roth (Karlsruhe, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma (Deisenhofen, D)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt, D)
Genitacin (G418)	Sigma (Deisenhofen, D)
Glucose	AppliChem(Darmstadt,D)
Glutaraldehyd	Sigma (Deisenhofen, D)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen, D)
Glycin	Sigma (Deisenhofen, D)
Hämatoxylin	Sigma (Deisenhofen, D)
Isopropanol	Sigma (Deisenhofen, D)
Isofluran	Piramal (Halberg, D)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumhexacyanidoferrat (II)	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumhexacyanidoferrat (III)	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe, D)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe, D)
Ketamin	HamelN (HamelN, D)
L-Glutamin	Life Technologies (USA)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Magnesiumsulfat	Roth (Karlsruhe, D)
Matrigel Growth Factor Reduced (GFR)	
Basement Membrane Matrix, CLS 356230	Corning (USA)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Nicht-essenzielle Aminosäuren 100x (NEAA)	Thermo Fisher (USA)
Nuklease-freies Wasser	Qiagen (Hilden, D)
Paraffin	Merck (Darmstadt, D)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, D)
Pen-Strep	Life Technologies (USA)

Polyethylenimin, linear, Mw 40000	Polyscience (USA)
Saccharose	Roth (Karlsruhe, D)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth (Karlsruhe, D)
Triton-X-100	Roth (Karlsruhe, D)
Trypan-Blau-Lösung	Sigma (Deisenhofen, D)
Trypsin	Life Technologies (USA)
Xylen	AppliChem (DA,D)

### 3.1.4 Geräte

#### Name

#### Hersteller und Firmensitz

Analysewaage BP 2215	Sartorius (Göttingen, D)
Anästhesiesystem Mouse Auto Flow System Modell EZ-AF9000	EZ Systems (USA)
Autoklav Systec V150	Systec (Wettenberg, D)
Bunsenbrenner (Butan, Propan) -	Campinggaz (Hungen, D)
Computer Optiplex 7010	Dell (USA)
CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera cell 240	Thermo Scientific (USA)
Drucker HL-4150CDN	Brother (Nagoya, J)
Eismaschine ZNE 125	Ziegra (Isernhagen, D)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Lab.A1 Zeiss (D)
Fluoreszenzmikroskop-Kamera AxioCam MRc	Zeiss (D)
Flüssigstickstofftank Locator 6PLus	Thermo Scientific (USA)
Gefrierschrank (-20 °C) Liebherr Premium	Liebherr (Bieberach, D)
Gefrierschrank (-80 °C) Hera Freeze HFU 586	Thermo Scientific (USA)
Inkubationsschüttler Certomat BS-T MaxQ 6000	B. Braun (Melsung, D)
In vivo Imaging System IVIS® Lumina II	Caliper life science (USA)
Kühlschrank (4 °C) / (4 °C/-20 °C)	Liebherr (Bieberach, D)
Messschieber, Elektronik Digital Caliper	Kwb GmbH (Stuhr, D)
Mikrotom RM2255	Leica Mikrosysteme (D)
Mikrotom-Wasserbad HI1210	Leica Mikrosysteme (D)
Mikroskop Axiovert40 CFL CK2	Zeiss (Oberkochen, D)
Mikroskop Leica DMI8 Inverse Mikroskope	Leica Mikrosysteme (D)
Olympus	(Center Valley, USA)

Mikrowelle MWD 2925 GC	Alaska (Viernheim; D)
Mikro 22R Heraeus	(Hanau, D)
pH-Meter HI 9321	Windaus (D)
Gene Quant pro Tecan	(Männedorf, CH)
GE Healthcare	(Solingen, D)
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, D)
Thermoschüttler Thermo mixer compact	Eppendorf (Hamburg, D)
Paraffinausgießstation EG1150H	Leica Micro Systems (D)
Rotor Avanti JA 25.50	Beckman Coulter (USA)
Schüttler Vibrax VXR IKA	(Staufen, D)
Serologische Pipettierhilfe Pipetus AkkuHirschmann	(München, D)
Sicherheitswerkbank Hera Safe KS	Thermo Scientific (USA)
Quarzküvette Hellma	(Müllheim, D)
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific industry (USA)
UV-Tisch CN TFX	LTF-Labortechnik (D)
Waage Junior 500C Precisa Gravimetrics	(Dietikon, CH)
Wasseraufbereitungssystem Purelab Ultra	ELGA Veolia (Celle, D)
Wasserbad JB4 Aqualine 2	Grant (Shepreth, UK)
Zellzähler TC20 BioRad	(München, D)
Zentrifuge Avanti J-26XP	Beckmann coulter (USA)
400 R	Heraeus (Hanau, D)
5810 R	Eppendorf (Hamburg, D)

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

<u>Name</u>	<u>Hersteller und Firmensitz</u>
Deckgläser 24x50mm	Diagonal (Münster, D)
Falconröhrchen 15 ml	Greiner (D)
Falconröhrchen 50 ml	Greiner (D)
Injektionsspritze	Braun (Kronberg, D)
Kryo-Einfrierröhrchen	Greiner (D)
Microtom-Klingen	Leica mikrosysteme (D)

Injektionsnadel	22 G	Braun (Kronberg, D)
	25 G	BD (Franklin Lakes, USA)
	30 G	BD (Franklin Lakes, USA)
Pasteurpipetten		Carl Roth (Karlsruhe, D)
Petrischale		Greiner (D)
Pipettenspitzen		Greiner (D)
Pipettenspitzen gestopft		Greiner (D)
Polysine Objektträger		Neolab (Heidelberg, D)
Reaktionsgefäße	0,2 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
	1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
	2,0 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Serologische Pipetten	5 ml	Greiner (D)
	10 ml	Greiner (D)
	25 ml	Greiner (D)
Slides zur Bestimmung der Zellzahl		Biorad (München, D)
Spritzen	1 ml	Biosciences (USA)
	5 ml	Biosciences (USA)
	10 ml	Biosciences (USA)
	20 ml	Biosciences (USA)
Zellkulturplatten	6-Well	Greiner (D)
	12-Well	Greiner (D)
	24-Well	Greiner (D)
	96-Well	Greiner (D)
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup>	Greiner (D)
	75 cm <sup>2</sup>	Greiner (D)
	125 cm <sup>2</sup>	Greiner (D)
Zellsieb	70 µm	Greiner (D)
	100 µm	Greiner (D)

### 3.1.6 Verwendete Zelllinie

Die verwendeten Tumorzellen, welche den Versuchstieren subkutan in die Flanke injiziert worden sind, stammen der Krebszelllinie Lung carcinoma (LC) ab. Es handelt sich um eine murine Lungenkrebszelllinie von einer Cre-induzierten

Scgb/KrasG12V/p53flox/flox – Mauslunge. Für eine solche Transplantation wird die Lunge einer Cre-induzierten Maus zunächst isoliert. Die Präparation und Lagerung des Gewebes erfolgt kryokonserviert. Es wurden sichtbare Tumore isoliert und in einem Gefäß mit eisgekühlten PBS gesammelt. Das Gewebe wurde zerkleinert, mittels einer 1ml Spritze aufgenommen und durch eine 22 Gauge Nadel in die Flanke einer syngenen Maus gespritzt. Nachdem dieses Transplantat herangewachsen ist, wurde der Flankentumor isoliert und für die Erstellung einer Einzelsuspension verwendet. Diese wurde über mehrere Passagen kultiviert und es erfolgte die Generierung stabiler Einzelklone.

### 3.1.7 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Host</b>	<b>Anti-Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
CD 8	Kaninchen	Maus	Abcam
CD 31	Kaninchen	Maus	Abcam
CD 68	Kaninchen	Maus, Ratte	Abcam
FOX P3	Kaninchen	Ratte, Maus	Invitrogen
YM 1	Kaninchen	Maus	Stemcell Technologies

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Host</b>	<b>Hersteller</b>
Goat anti-Rabbit IgG Antibody (H+L) Biotinylated	Ziege	Vector laboratories
Goat Anti-Mouse IgG (HRP)	Ziege	Abcam

### 3.1.8 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Illustrator	Adobe Systems (USA)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc. (USA)
Microsoft Office 10 Education	Microsoft (USA)
Windows 10 Education	Microsoft (USA)
Endnote 20 V5	Clarivate (USA)
Microscope Imaging Software	Leica Mikrosysteme (D)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkulturmethoden**

Die Arbeit mit eukaryotischen Zellen wurde unter aseptischen Bedingungen an einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Jegliche Materialien wurden zuvor autoklaviert, desinfiziert oder steril filtriert. Alle Zellen wurden in einem Inkubator mit Begasung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **3.2.1.1 Auftauen von Zellen**

Zum Auftauen von Zellen in Kryoröhrchen wurden diese im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zügig in ein 15 ml Falcon mit 5 ml kaltem Kulturmedium überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 300g für 5 Minuten. Von dem Überstand dieser Zellsuspension wird ein Aliquot für die Viabilitätsassays entnommen. Die Zellen wurden in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und anschließend in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 15 ml Medium überführt. Nach ca. 10 – 12 Stunden ist eine mikroskopische Kontrolle der adhärennten Zellen notwendig, um das Anheften der Zellen sicherzustellen.

#### **3.2.1.2 Kultivierung der LC-Zellen**

Alle verwendeten Zellen wuchsen adhärennt und wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 10-15 ml Nährmedium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage nach Erreichen einer Konfluenz von 60-80 % passagiert. Für die Kultivierung der verwendeten LC-Zelllinie ist als Medium DMEM 1g Glucose, 15% FBS, 5ml Pen/Strep verwendet worden.

#### **3.2.1.3 Passagieren der Zellen**

Um eine kontinuierliche Zellproliferation zu gewährleisten, ist es notwendig, dass die Zellen nach Erreichen einer bestimmten Konfluenz erneut passagiert werden. Es ist erforderlich, dass diese adhärennten Zellen aus ihrem Zellverband mittels enzymatischer Spaltung herausgelöst werden. Dies erfolgt mittels der Serinprotease Trypsin. Das Enzym bewirkt eine Trennung der Zell-Zellverbindungen, sowie die Ablösung der an der Kulturflasche angehefteten Zellen. Die nun abgelösten Zellen

werden in einer definierten Zellzahl in Suspension gebracht und in ein neues Kulturgefäß überführt. Das Ablösen dieser Zellen wird durch vorsichtiges Schwenken und Abklopfen der Flasche begünstigt. Die Einwirkzeit des Trypsins ist hierbei zu beachten. Die Wirkung wird mittels Zugabe von 5ml Kulturmedium gestoppt. Diese Zellsuspension wird anschließend 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und aus dem Zellpellet wird durch die Zugabe von neuem Kulturmedium eine neue Zellsuspension hergestellt, welche auf andere Kulturgefäße aufgeteilt wird.

#### **3.2.1.4 Einfrieren der Zellen**

Vor dem Einfrieren der Zellen sollten diese zuvor auf ihre Vitalität geprüft werden und eine Kontamination ausgeschlossen werden. Die Zellen werden vor dem Einfrieren gezählt. Eine Zellzahl zwischen  $10^6$  bis  $10^7$  wird empfohlen. Für das Einfrieren der Zellen werden ein Kühlmedium wie Eis, oder ein Kühlschrank und 2 ml Kryoröhrchen benötigt. Diese sollten mit dem Namen der Zelllinie, der Zellzahl und dem Datum der Kryokonservierung gekennzeichnet werden. Das Einfriermedium besteht aus 70-75% Kulturmedium, 15-20% FCS, 10% DMSO. Die Kryoröhrchen werden maximal bis zum Eichstrich (1,8 ml) befüllt. Dies besteht aus 0,9 ml FCS, 0,1 ml DMSO, 0,8 ml Kulturmedium. Die Zellsuspension wird vor dem Einfrierprozess zunächst trypsinisiert. Anschließend werden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 5 min bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Die nun zentrifugierten Zellen werden in dem Einfriermedium resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in DMSO resuspendiert. Danach wird diese Zellsuspension in die zuvor beschrifteten Kryoröhrchen gefüllt. Abschließend werden die Zellen zunächst bei -26 Grad Celsius in einem Gefrierschrank überführt und langfristig in einem Stickstoffbehälter konserviert.

#### **3.2.1.5 Mykoplasma-Test**

Die Kultivierung der Zellen erfordert eine regelmäßige Kontrolle auf Kontamination. Ein Nachweis erfolgt mittels eines Mykoplasmen PCR Tests. Mykoplasmen binden an die zu kultivierenden Zellen und werden mittels DNA-Isolation nachgewiesen. Spezielle Primer hybridisieren mit Genabschnitten der 16S rRNA von Mykoplasmen und erzeugen im Falle einer Kontamination ein spezifisches DNA-Amplifikat von 270 bzw. 280 bp. Für die interne Kontrolle wurden Primer gegen das exprimierte Hypoxanthin-

Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen verwendet. Für die DNA-Isolation wurden die Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und für 5 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen und für 10 Minuten bei 100 °C erhitzt. Das anschließende Zentrifugieren bei 13000 rpm erlaubt das Sammeln des DNA-enthaltenden Überstands in einem neuen Reaktionsgefäß. Für die anschließende PCR wurde die DNA 1:10 verdünnt.

Mykoplasmen zählen zu der Gattung der Parasiten und befinden sich häufig im Respirationstrakt und im Urogenitalsystem von Mensch und Tier. Die Übertragung von einem Individuum auf den anderen erfolgt mittels Tröpfcheninfektion, oder direktem Kontakt. Eine Kontamination auf eine kultivierte Zellreihe erfolgt im Wesentlichen auf zwei Wegen: Die übertragenen Mykoplasmen stammen entweder direkt vom Experimentator selbst, oder von einer bisher kontaminierten Zelllinie in eine nicht kontaminierte. Eine Kontamination erkennt man an einer verschlechterten Zellproliferation, sowie einer Veränderung der Zellmorphologie. Mykoplasmen entziehen dem Kulturmedium seine Nährstoffe und bewirken dadurch eine Schädigung und Apoptose der zu kultivierenden Zellreihe. Mikroskopisch ist eine Mykoplasma Kontamination an einem körnigen Aussehen der Zellen zu erkennen. Diese nimmt man als kleine, dunkle Punkte wahr. Darüber hinaus verlieren die Zellen Ihre Adhärenz.

#### **3.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl**

Um die Zellzahl zu bestimmen, wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wird bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert.

Der Überstand des Röhrchens wird verworfen. Das Zellpellet am Boden des Röhrchens wird nun in 5 ml neuem Zellmedium resuspendiert. Es wird nun 50 µl dieser Zellsuspension in einem 1:1 Verhältnis mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau versetzt. Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff, der von vitalen Zellen mit intakter Zellmembran nicht aufgenommen werden kann. Apoptotische Zellen werden jedoch mittels Trypanblau gefärbt, sodass gefärbte Zellen bei einer Zählung nicht berücksichtigt werden. Eine Bestimmung der Zellzahl erfolgt entweder mittels einer Neubauer-Zählkammer oder einem automatisierten Zellzähler.

### **3.2.1.7 Neubauer-Zählkammer**

Die Neubauer Zählkammer soll vor Benutzung mittels Ethanol gereinigt werden. Für das Auszählen der Zellen wird die Kammer mit einem Deckglas abgedeckt und 5  $\mu\text{l}$  einer Trypanblau gefärbten Zellsuspension unter dem Deckglas pipettiert. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Zählkammer vollständig mit der pipettierten Zellsuspension bedeckt sein sollte. Zwecks der Ermittlung der Zellzahl werden nun alle ungefärbten Zellen der vier Eckquadranten ausgezählt. Die Fläche eines Eckquadrates beträgt 1  $\text{mm}^2$ . Die Kammertiefe der Zählkammer beträgt 0,1 mm. Das nun ausgezählte Volumen des Raumes beträgt 0,1 $\text{mm}^3$  (1 $\mu\text{l}$ ). Nun wird nach dem Auszählen der vier Eckquadranten der Mittelwert (Z) bestimmt und dieser mit dem Kammerfaktor (KF)  $1 \times 10^4$ , sowie dem Verdünnungsfaktor (VF) multipliziert. Die Berechnung erfolgt somit nach der Formel:  $Z \times \text{KF} \times \text{VF} = \text{Gesamtzahl der Zellen pro Milliliter}$ .

### **3.2.1.8 Automatisierter Zellzähler**

Die zu bestimmende Zellzahl wird nachdem bereits genannten Schema mit Trypanblau versetzt. Danach werden 5  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension auf ein Slide pipettiert. Nun ermittelt der Zellzähler die Anzahl der vitalen Zellen unter dem Ausschluss der Trypanblau gefärbten Zellen.

### **3.2.2 Narkotisierung der Versuchstiere**

Die Versuchstiere werden vor Applikation der Zellen mittels eines speziellen Systems anästhesiert. Das Gerät sediert die Tiere temporär durch eine konstante Zufuhr eines Gemischs aus Sauerstoff und dem inhalativen Narkotikum Isofluran. Die Flussrate des Gases ist speziell für Mäuse eingestellt und versetzt die Tiere in einen sanften Dämmer Schlaf. Unter Sedation und entsprechender Lagerung werden die Tiere an der Lokalisation der Injektion zuvor das Fell rasiert, um eine möglichst genaue Punktion zu ermöglichen.

### **3.3 Subkutane Injektion der Tumorzellen**

Bei der subkutanen Injektion werden der Maus die LC-Tumorzellen in die rechte bzw. linke Flanke injiziert. Die Zellen sind zuvor aliquotiert und in ihren gewünschten Zellzahlen in entsprechende Falcons überführt worden. Die Zellen werden in einer Suspension aus PBS und Matrigel, welches eine extrazelluläre Matrix um den initiierten Tumor bildet, gegeben. Es bildet sich am Ort der Injektion mittels des verdünnten Matrigels ein festes, rundliches Tumorgebilde. Diese Suspensionen werden bis zum Zeitpunkt der Injektion eisgekühlt zwischengelagert, da ansonsten das Matrigel bei 37 Grad Celsius ein festes Gel bildet. Dies gilt es vor der subkutanen Injektion der Suspension zu verhindern. Die Zellsuspension wird in einer 1 ml Spritze aufgenommen und mit Hilfe einer 22 Gauge-Nadel in die Flanke einer Maus gespritzt.

### **3.4 Entnahme der Tumoren**

Nach Versuchsende werden die Mäuse in einem Behälter mit hochkonzentrierter Isofluran Lösung gesetzt. Dies leitet den letalen Prozess ein. Postmortal wird das Fell, das kutane und subkutane Gewebe der Versuchstiere entfernt und die Tumoren aus der Flanke freipräpariert. Das kugelige, entnommene Tumorgebilde wird von jeglichem, subkutanen Fett vollständig gelöst und das Volumen der Tumoren mittels eines Messschiebers, sowie das Gewicht jedes einzelnen Tumors mit einer Grammwaage ermittelt. Die Ermittlung des Volumens eines ellipsoid geformten Tumors erfolgt hierbei mittels der Formel  $V = \text{Länge (A)} \times \text{Weite (B)} \times \text{Höhe (C)}$ . Die Berechnung der Tumorroäche erfolgte mittels der Formel  $A = \text{Länge (A)} \times \text{Breite (B)}$ . Ein Teil der entnommenen Tumoren werden anschließend in Stickstoff und ein anderer Teil in Paraformaldehyd konserviert.

### **3.5 Immunhistochemie**

#### **3.5.1 Einbettung**

Die zuvor konservierten Tumoren werden in Paraffin eingebettet. Die Paraffinierung dient der Konservierung, sowie der besseren Schneidbarkeit von Gewebeproben. Die Einbett-Temperatur beträgt ca. 55 Grad Celsius. Vor Einbettung wird zunächst das

Fixierungsmittel in Wasser ausgewaschen. Anschließend erfolgt eine Entwässerung mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe mittels Isopropanol. Danach wird das Gewebe in Xylol inkubiert und schließlich in das heiße Paraffin eingebracht. Aus dem heißen Paraffin werden die Gewebeproben in einzelne, kleine Blöcke eingegossen.

### **3.5.2 Anfertigung von Gewebeschnitten**

Das Anfertigen von Gewebeschnitten erfolgt mittels eines Mikrotoms. Das zuvor in Paraffin eingebettete Gewebe wird nach Abkühlung in einzelne „Scheiben“ geschnitten. Die Schneiddicke der Scheiben beträgt 2-4  $\mu\text{m}$ . Die angefertigten Schnitte werden zuerst auf ein Kaltwasserbecken aufgefangen (ca. 15°C) und danach in ein Heißwasserbad von ca. 40 °C gelegt, um glatt auf einen Objektträger gezogen werden zu können. Die nun auf dem Objektträger aufgezogenen Schnitte werden über Nacht bei etwa 37 °C getrocknet.

### **3.5.3 Immunhistologie**

Mittels der Immunhistologie gelingt der Nachweis von Antigenen im Gewebeschnitt. Es werden spezifische Antikörper verwendet, welche gegen das gesuchte Antigen gerichtet sind. Diese müssen an das entsprechende Antigen binden. Vor Beginn dieses Prozesses ist zunächst zwecks Detektion der auf dem Gewebeschnitt enthaltenen Antigene eine Vorbehandlung notwendig. Es werden durch Formalin bedingte Eiweißvernetzungen, die einige Antigene demaskieren könnten, aufgebrochen. Dies erfolgt zuerst mittels Erhitzung der Gewebeschnitte bei 60°C in einem Inkubator für 1 Stunde. Durch diese Prozedur wird das Paraffin vollständig weggeschmolzen. Daran schließt sich eine Rehydratation an. Die Gewebeschnitte werden zuerst in zwei Durchgängen jeweils für 10 Minuten in Xylen und danach in einer absteigenden Konzentrationsreihe in Isopropanol gegeben. Anschließend erfolgt eine erneute Erhitzung der Gewebeschnitte zwecks Antigendemaskierung. Das Gewebe wird hier für eine Stunde in 10 mM Citratpuffer, pH 6,0 erhitzt. Danach werden die Objektträger für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gekühlt. Um unerwünschte und unspezifische Peroxidasebindungen zu vermeiden, werden die Gewebeschnitte in 3,0 % Hydrogenperoxid für 15 Minuten behandelt. Es erfolgt danach eine Hemmung

von unspezifischen Bindungen mittels 2,5 % Pferdeserum in TBS-T für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Nun werden Antikörper dem Gewebe hinzugeführt, welche spezifisch an das gesuchte Antigen gerichtet sind und dadurch an diese Strukturen haften. Mittels der indirekten Methode wird nach Zugabe des Primärantikörpers ein weiterer, farbgebender Sekundärantikörper zum Nachweis des gebundenen Primärantikörpers hinzugegeben. Dieser bindet an den ersten Antikörper und ist mit einem zu entwickelnden Farb-Marker versehen. Es folgt danach eine Behandlung des Gewebes nach der ABC-Methode. Es stellt die geläufigste Methode zum in situ Nachweis von Antigenen dar. Der Name resultiert aus der Bezeichnung Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex ab. Als Substrat steht das 3'3 – Diaminobenzidin (DAB) zur Verwendung, was zu einer Braunfärbung des markierten Antigens führt. Das DAB ist sowohl Alkohol- als auch Xylol-stabil, so dass Xylol-haltige Mittel verwendet werden können.

#### **3.5.4 Hämatoxylinfärbung**

Der blaue, chemische Farbstoff Hämatoxylin ist ein spezieller Farbstoff, welcher nicht angefärbte Gewebeareale blau gegenfärbt. Es werden insbesondere Zellkerne angefärbt und andere Strukturen in einem geringeren Umfang. Die Färbung mit Hämatoxylin erfolgt nach der DAB-Färbung. Die Färbedauer beträgt 20 Sekunden. Anschließend werden die Gewebeschnitte in Leitungswasser gereinigt und einem abschließenden Dehydrierungsprozess mit Isopropanol und Xylene unterzogen. Nach dem Trocknen werden einige Tropfen eines Histokitt Einbettmediums auf die Objektträger aufgebracht, Deckgläser aufgelegt und mit einer Pipettenspitze abgestrichen, um unerwünschte Lufteinschlüsse sowie überflüssiges Einbettmedium zu entfernen. Bei Raumtemperatur werden auf die Gewebeschnitte Deckgläser aufgebracht. Die nun fertigen Objektträger werden bei Raumtemperatur getrocknet und stehen danach zur weiteren Verwendung bereit.

### **3.5.5 Sirius Rot Färbung**

Die Sirius Rot Färbung dient zur Darstellung und Differenzierung von fibrillärem Kollagen Typ I und Typ III in histologischen Präparaten. Die zu färbenden Objektträger werden zunächst entparaffiniert und anschließend in destillierten Wasser hydratisiert. Die Gewebeschnitte werden danach in Sirius Rot Lösung für 60 Minuten eingetaucht und bei Raumtemperatur eingefärbt.

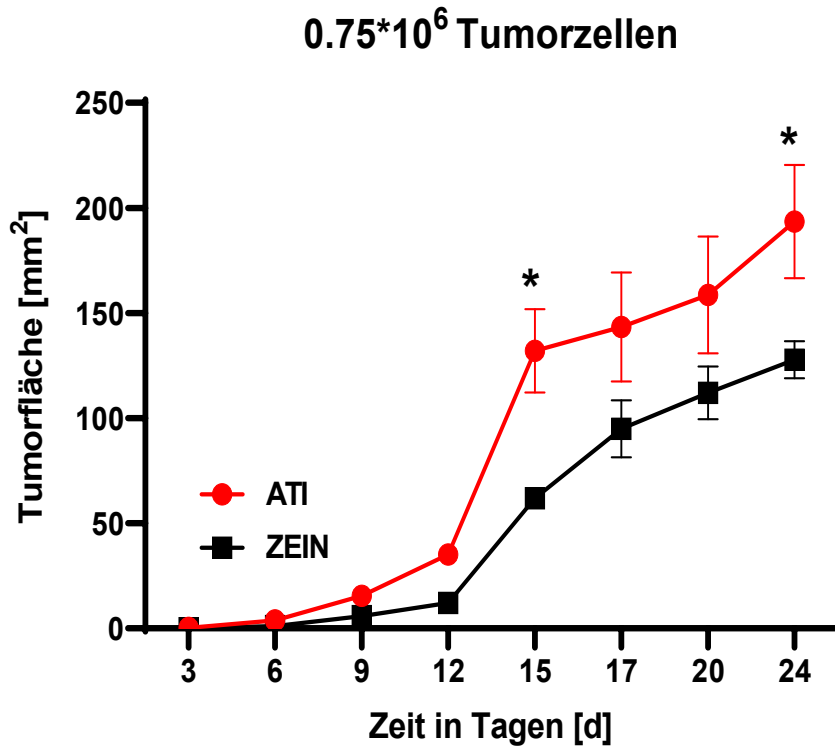
Danach werden die Objektträger zügig in Essigsäurelösung gereinigt. Es erfolgt anschließend eine Dehydrierung mittels Ethanol.

### **3.6.6 Immunhistochemische Auswertung**

Nach Abschluss der Färbungsprozesse folgt die Zellauszählung. Es werden für repräsentative Gewebeschnitte die Anzahl der jeweils angefärbten und somit nachgewiesenen Tumorzellen mit den jeweiligen Antikörpern mittels eines speziell hochauflösend darstellenden Mikroskops ausgezählt. Dies wird für die Gewebeschnitte der Tumoren in der Interventionsgruppe (ATI-haltig Nahrung) und für die in der Kontrollgruppe (ATI-freie Nahrung) angefertigt. Es wird jeweils der prozentuale Anteil der positiven Zellen im Verhältnis zu der Gesamtfläche der Tumoren ermittelt. Es erfolgt eine separate Auszählung der positiven Zellen im Tumorrand des Präparates, sowie im Tumorkern. Die Zellauszählung wird nach einem festen Schema durchgeführt. Für die Gewebeschnitte eines jeden Versuchstieres werden pro angefärbten Antikörper jeweils 5 hochauflösende Aufnahmen im Vergrößerungsmaßstab von 1:40 jeweils vom Tumorrand und vom Tumorkern angefertigt. Anschließend wird aus diesen 5 erstellten Aufnahmen der durchschnittliche, prozentuale Anteil der nachgewiesenen Zellen erhoben. Nachdem gleichen Prinzip ist der prozentuale Anteil von kollagenem Bindegewebe nach Färbung der Tumorpräparate mit dem Sirius Rot Kit ermittelt worden.

## 4. Ergebnisse

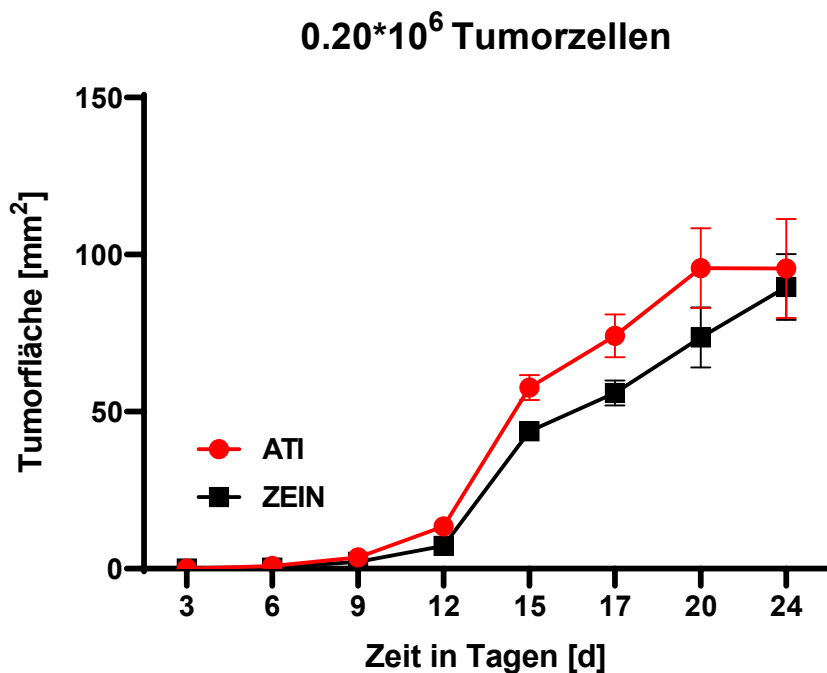
### 4.1 Wachstumskurven der Tumorzellen nach subkutaner Injektion



**Abbildung 4.1: Wachstumskurven der Tumorfläche von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung nach subkutaner Injektion von 750,000 LC-1 Tumorzellen in die linke Flanke.**

Die Tumormaße wurden an verschiedenen Zeitpunkten mithilfe eines Messschiebers gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 10 Tieren pro Gruppe. Der zweifaktorielle ANOVATst mit Bonferroni-Korrektur wurde zum Vergleich der Tumormaße zwischen den Gruppen zu jedem Messzeitpunkt verwendet. \*,  $p < 0,05$  vs. Tumorfläche zum gleichen Zeitpunkt in der Kontrollgruppe.

Zur Etablierung der adäquaten Tumorzellzahl wurden im Rahmen der Vorversuche Wachstumskurven nach subkutaner Injektion erstellt. Der Zweck dieser Vorversuche bestand in der Eintitrung der Tumorzellzahl für den eigentlichen Hauptversuch. Im Vorversuch wurden vier Kohorten zu  $n=2$  gebildet. Den Versuchstieren wurden vier unterschiedliche Tumorzellzahlen subkutan gespritzt ( $1 \cdot 10^6$  /  $1 \cdot 0,75 \cdot 10^6$  /  $1 \cdot 0,50 \cdot 10^6$  /  $0,25 \cdot 10^6$ ). Jedem Versuchstier wurde im Vorversuch zwei unterschiedliche Tumorzellzahlen in die jeweils rechte und linke Flanke injiziert. Die Tiere wurden alle 3 Tage exploriert, und es wurden die Durchmesser der Tumore und das Körpergewicht in Gramm erhoben. Die Erkenntnisse aus diesen Vorversuchen haben gezeigt, dass eine Zellzahl von  $0,75 \cdot 10^6$  sich als eine für den Versuch passende Zellzahl erwiesen hat. Die Versuchstiere wurden anschließend im Hauptversuch in zwei Kohorten mit jeweils 10 Mäusen unterteilt. Den insgesamt 20 Tieren wurden in diesem Hauptversuch in Gruppen zu  $n=10$  jeweils zwei unterschiedliche Tumorzellzahlen subkutan gespritzt. In die linke Flanke wurden  $0,75 \cdot 10^6$  Zellen gespritzt und in die rechte Flanke  $0,20 \cdot 10^6$  Zellen. Beide Kohorten wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn auf eine weizenfreie Ernährung (Zein) gesetzt, um konstante und definierte Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Die Tiere in der Interventionsgruppe wurden zu Versuchsbeginn auf eine definierte Basisdiät mit einem kleinen, aber signifikantem Anteil ATI (1.5% des Proteinanteils, Zein) umgestellt, während die Versuchstiere aus der Kontrollgruppe weiterhin mit der sonst komplett identischen, ATI-freien, Zein-basierten Diät gefüttert wurden. Die Tiere wurden alle 3 Tage exploriert, und es wurden die Tumorgöße des subkutan wachsenden Tumors mittels Messcaliper und das Körpergewicht in Gramm erhoben. Hier wurde, wie in Abbildung 4.1 dargestellt, bereits ab dem 9. Versuchstag mit der höheren Tumorzellzahl von  $0,75 \cdot 10^6$  ein deutliches Tumorstadium in beiden Kohorten gesehen, jedoch war der Anstieg in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgeprägter. Zwischen Versuchstag 9 und 12 setzt sich dieser Trend weiter fort. An Versuchstag 15 war zwischen den Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied zu erkennen. Das Tumorstadium in der Kontrollgruppe war sonst ebenfalls stetig, aber geringer als in der ATI-haltigen Gruppe, erreichte aber bis auf Tag 15 bis zu Tag 24 noch keine Signifikanz.



**Abbildung 4.2: Wachstumskurven der Tumorfläche von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung nach subkutaner Injektion von 200,000 LC-1 Tumorzellen in die rechte Flanke.**

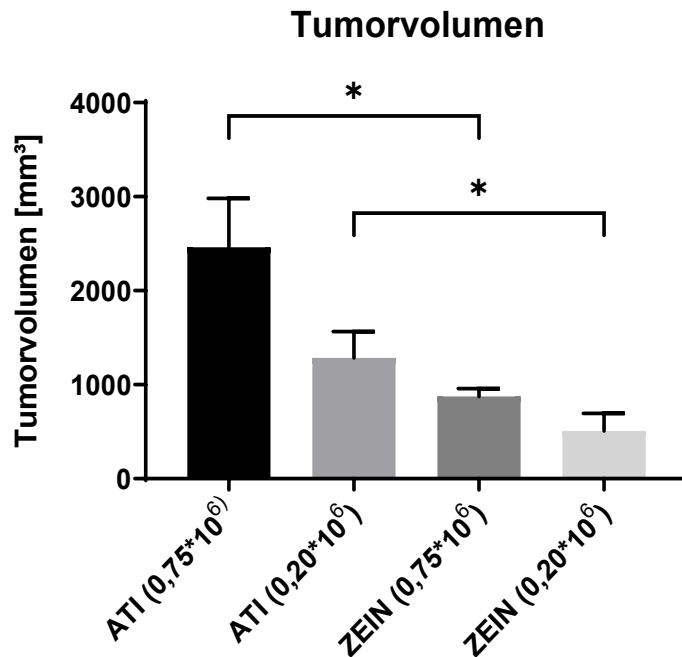
Die Tumormasse wurden an verschiedenen Zeitpunkten mithilfe eines Messschiebers (Formel:  $A = \text{Länge (A)} \times \text{Breite (B)}$ ) gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 10 Tieren pro Gruppe. Der zweifaktorielle ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur wurde zum Vergleich der Tumormasse zwischen den Gruppen zu jedem Messzeitpunkt verwendet.

In die rechte Flanke der Versuchstiere wurde im Hauptversuch in beiden Kohorten (ATI-haltigen als auch ATI-freien Gruppe) eine Tumorzellzahl von  $0.20 \cdot 10^6$  injiziert. Die Auswertung des Tumorwachstums nach Injektion mit der geringeren Tumorzellzahl von  $0.20 \cdot 10^6$  Tumorzellen in die rechte Flanke (Abb. 4.2) der Tiere, welche mit ATI-haltiger Nahrung gefüttert wurden, zeigte im Vergleich mit der ATI-freien Kontrollgruppe in den ersten Versuchstagen 3,6 und 9 einen sehr marginalen Anstieg der Tumorgröße. Ab Versuchstag 9 war ein geringfügig stärkerer Wachstumsanstieg in der Interventionsgruppe als in der Kontrollgruppe zu erkennen. Diese Beobachtung setzte sich im gesamten Versuchsverlauf fort.

Zwischen Versuchstag 15 und 20 war ein nahezu linearer Wachstumsanstieg zu verzeichnen. In der Interventionsgruppe erreichte das Tumorwachstum an

Versuchstag 20 seinen Höhepunkt und stabilisierte sich von Versuchstag 20 bis 24 auf diesem Niveau, während in der Kontrollgruppe von Versuchstag 12 bis zum letzten Versuchstag 24 ein kontinuierlich aufsteigendes Wachstum der Tumorgroße auf einem niedrigeren Niveau zu erkennen war. Es zeigte sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Tumorgroße zwischen beiden Gruppen nach Injektion von  $0.20 \cdot 10^6$  Tumorzellen.

## 4.2 Tumorvolumina



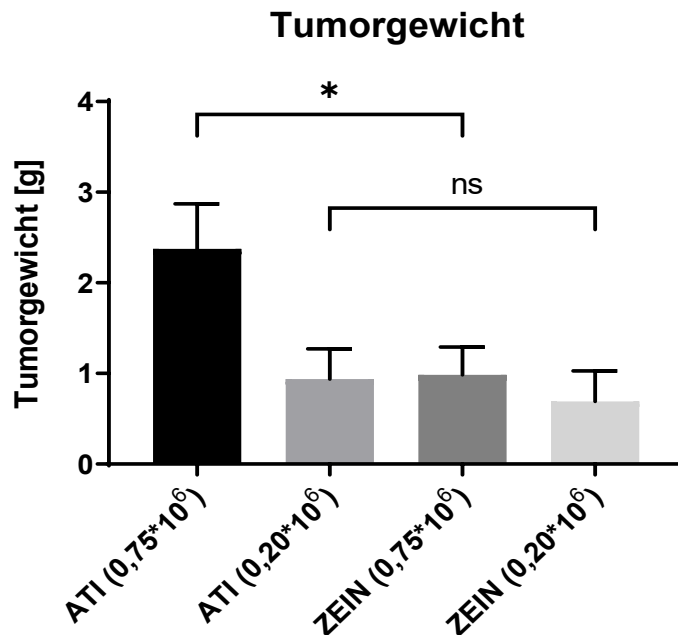
**Abbildung 4.3: Tumorvolumina von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) 30 Tage nach subkutaner Injektion von 200,000 bzw. 750,000 LC-1 Tumorzellen.**

Die Tumorvolumina wurden nach Resektion und Freipräparation ausgemessen (Formel:  $V = \text{Länge (A)} \times \text{Weite (B)} \times \text{Höhe (C)}$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils 10 Tieren pro Gruppe. Der ungepaarte T-Test wurde zum Vergleich der Tumorvolumina zwischen den Gruppen mit derselben applizierten Tumorzellzahl verwendet. \*,  $p < 0,05$  vs. Tumorvolumen mit gleicher applizierter Tumorzellzahl.

Nach Abschluss des Versuchs wurden den Versuchstieren aus beiden Kohorten (ATI-haltigen und ATI-freien Gruppe) die subkutan gespritzten Tumoren entnommen, sowie von jeglicher Haut und Unterhautgewebe frei präpariert. Das Tumorvolumen wurde in  $\text{mm}^3$  gemessen und der Durchschnitt in der jeweiligen Kohorte grafisch dargestellt. Es war zunächst allgemein zu beobachten, dass die Zielvolumina der Tumoren in der Interventionsgruppe (ATI-haltig) mit der Zellzahl  $0,75 \cdot 10^6$ , sowie  $0,20 \cdot 10^6$  im Verhältnis zu denen in der Kontrollgruppe (ATI-frei) insgesamt größer waren. Es war ein linearer Abfall der Volumina zu erkennen.

Das größte Volumen mit  $2.462,39 \text{ mm}^3$  wurde bei einer Tumorzellzahl von  $0.75 \cdot 10^6$  in der Interventionsgruppe verzeichnet, darauf folgte das Volumen der Interventionsgruppe mit einer Zellzahl von  $0.20 \cdot 10^6$  betrug  $1.285,01 \text{ mm}^3$ . An dritter Stelle folgte das Volumen der Kontrollgruppe mit  $876,63 \text{ mm}^3$  bei einer Zellzahl von  $0.75 \cdot 10^6$ , sowie an letzter Stelle ein Tumolvolumen in Höhe von  $507,34 \text{ mm}^3$  in der Gruppe mit der Zellzahl von  $0.20 \cdot 10^6$ . Hierbei wurde hinsichtlich des Gesamtvolumens zwischen dem Tumolvolumen in der Interventionsgruppe mit  $0.75 \cdot 10^6$  und dem Volumen in der Kontrollgruppe mit ebenfalls  $0.75 \cdot 10^6$  ein statistisch signifikanter Größenunterschied ermittelt. Einen ebenfalls statistisch signifikanten Unterschied entnahm man der Abbildung 4.3 beim Blick auf die Zielvolumina mit der geringeren Zellzahl von  $0.20 \cdot 10^6$  der Interventionsgruppe im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe mit der gleichen Zellzahl von  $0.20 \cdot 10^6$ .

### 4.3 Tumorgewicht



**Abbildung 4.4: Tumorgewicht von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung 30 Tage nach subkutaner Injektion von 200,000 bzw. 750,000 LC-1 Tumorzellen.**

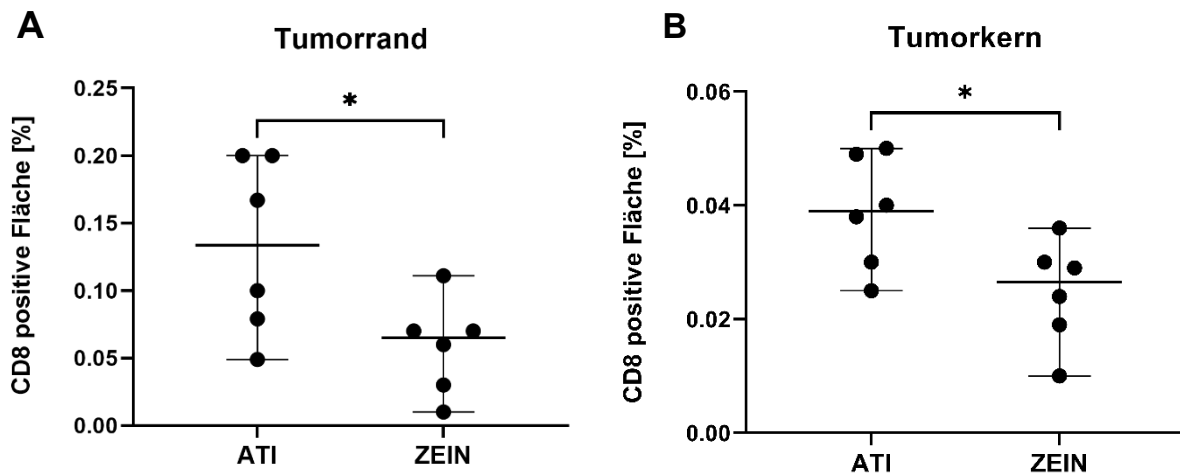
Das Tumorgewicht wurde nach Resektion und Freipräparation ausgemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils 10 Tieren pro Gruppe. Der ungepaarte T-Test wurde zum Vergleich des Tumorgewichts zwischen den Gruppen mit derselben applizierten Tumorzellzahl verwendet. \*,  $p < 0,05$  vs. Tumorzellzahl. ns, nicht signifikant.

Es wurde das durchschnittliche Gewicht in Gramm der resezierten und präparierten LC-1 Tumoren ermittelt und graphisch gegeneinander aufgetragen. Das größte Gesamtgewicht in Höhe von durchschnittlich 2,36 g hatten die in der linken Flanke der Versuchstiere subkutan injizierten Tumoren der Interventionsgruppe mit einer Tumorzellzahl von  $0,75 \cdot 10^6$  erzielt. Darauf folgend sieht man die Tumoren in der Kontrollgruppe mit einem Gewicht von 0,98 g bei einer Tumorzellzahl von  $0,75 \cdot 10^6$ . Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Tumorgewicht zugunsten der Interventionstiere mit  $0,75 \cdot 10^6$  injizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren mit derselben Tumorzellzahl.

An dritter Position stehen die Tumoren der Interventionsgruppe mit einem Tumorgewicht von 0,94 g einer Zellzahl von  $0.20 \cdot 10^6$ , welche in die rechte Flanke der Tiere injiziert wurden. An letzter Stelle folgte ein Gesamtgewicht von 0,69 g der Tumoren mit einer Tumorzellzahl von  $0.20 \cdot 10^6$ , welche in der Kontrollgruppe subkutan in die rechte Flanke der Versuchstiere gespritzt wurden.

#### 4.4 Immunhistochemische Auswertung

##### 4.4.1 CD 8

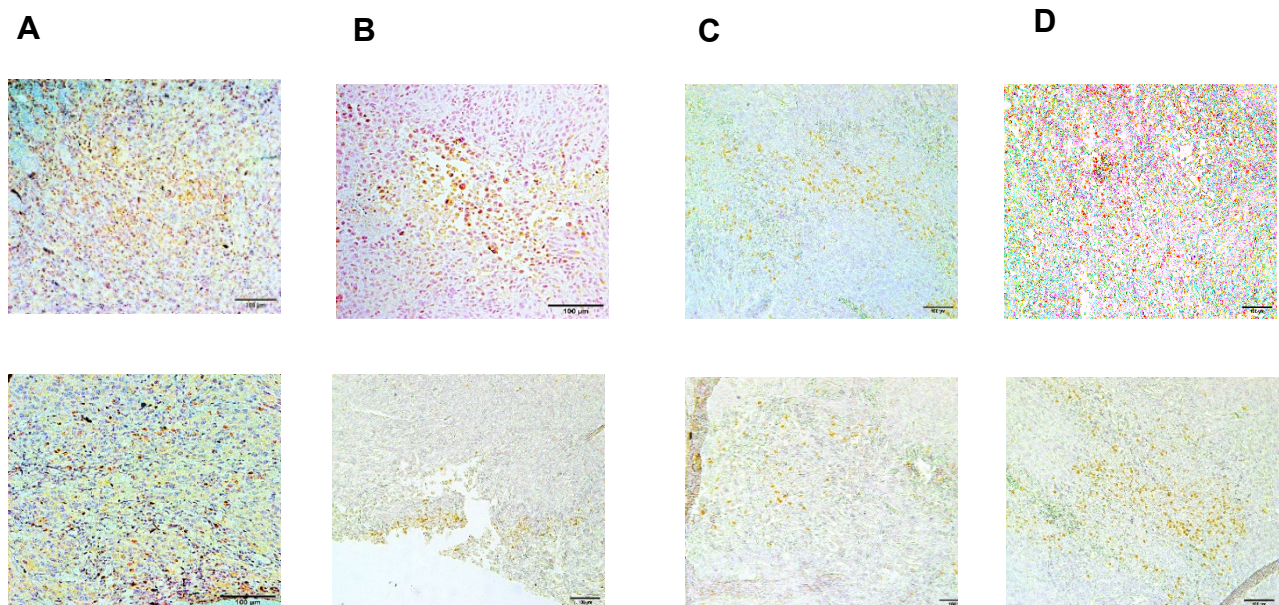


**Abbildung 4.5: Immunhistochemische Auswertung CD8 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung**

Das Tumorgewebe wurde präpariert und repräsentative Schnitte mit einem spezifischen Antikörper für CD8 angefärbt. A) Anteil der Fläche von CD8 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorrand. B) Anteil der Fläche von CD8 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorkern. Der ungepaarte T-Test wurde zum Vergleich des Anteils der Fläche von CD 8 positiven Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung jeweils für den Tumorrand und dem Tumorkern verwendet. \*,  $p < 0,05$ , ns, nicht signifikant

Für die Auszählung und Ermittlung positiver Immunzellen wurden pro Antikörper 5 hochauflösende Aufnahmen im Vergrößerungsmaßstab 1:40 jeweils vom Tumorrand und vom Tumorkern angefertigt. Aus diesen 5 erstellten Aufnahmen wurde der

prozentuale Mittelwert der nachgewiesenen Immunzellen ermittelt. Es ist aus Abbildung 4.5 A zu erkennen, dass der prozentuale Anteil CD 8 positiver Zellen im Tumorrand größer als im Tumorkern ist. Innerhalb des Tumorrandes verteilen sich die Stichproben der Interventionsgruppe, sowie der Kontrollgruppe in einem ähnlichen, prozentualen Größenbereich. Aus den Abbildungen 4.5 A und B ist zu entnehmen, dass im Tumorkern der prozentuale Anteil an CD 8 positiver Zellen insgesamt geringer ist als im Tumorrand. Die Anzahl CD 8 positiver Zellen im Tumorkern ist in der Interventionsgruppe geringfügig größer als in der Kontrollgruppe. Insgesamt betrachtet ist der prozentuale Anteil CD 8 positiver Zellen in der Interventionsgruppe sowohl im Tumorrand als auch im Tumorkern signifikant erhöht.



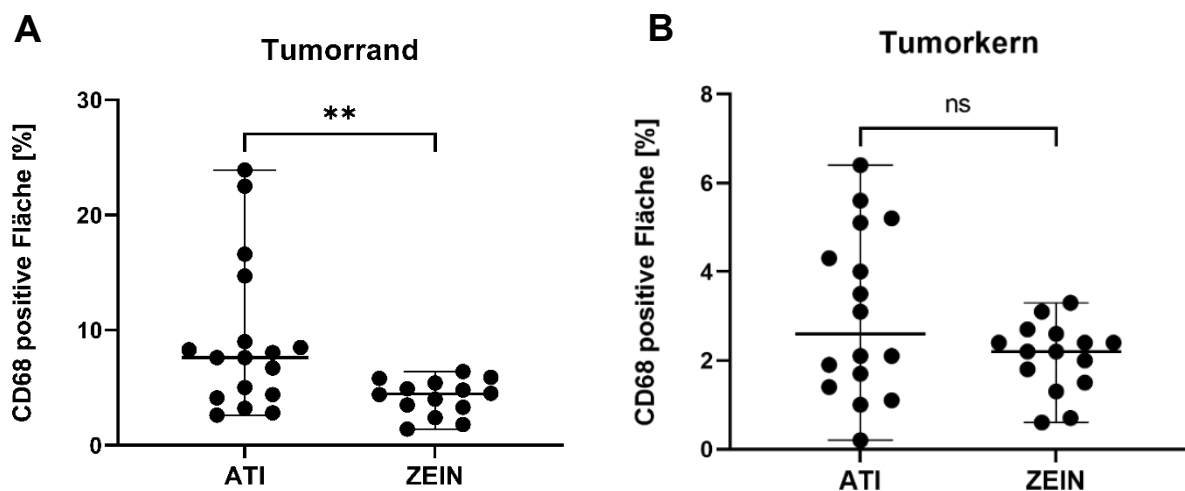
**Immunhistochemische Abbildungen CD8 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger (A und C) vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung (B und D).**

Repräsentative Bildausschnitte des Tumorrands (A und B) und Tumorkerns (C und D). (Maßstab 100µm).

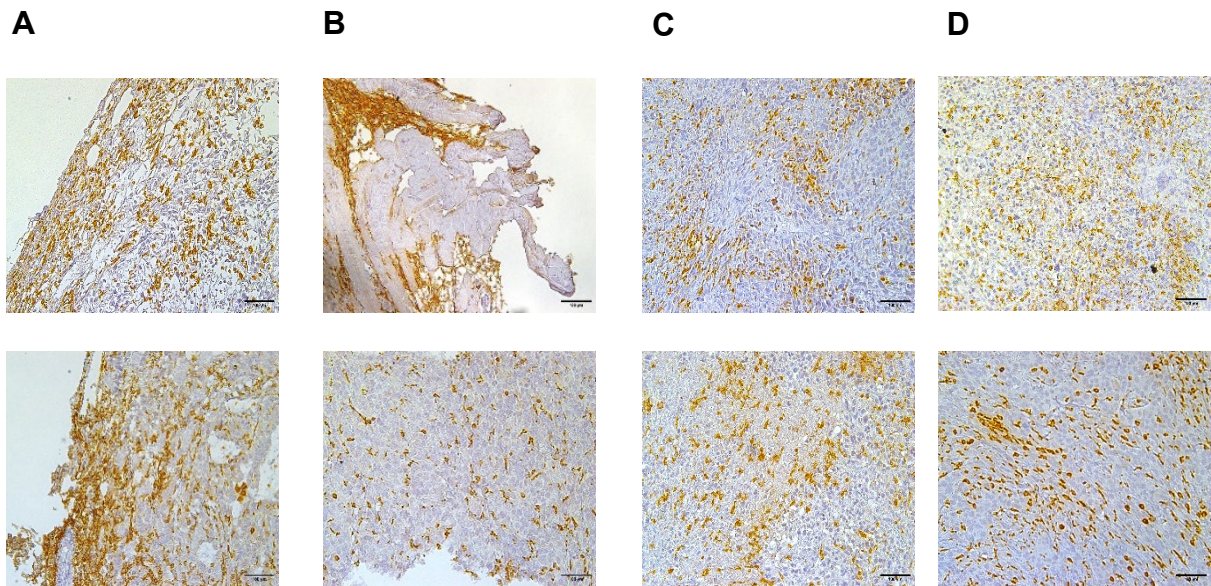
Nach Resektion und Präparation der Tumoren erfolgte eine immunhistochemische Auswertung. Hierzu wurden repräsentative Schnitte der Tumoren angefertigt und mit einem spezifischen CD 8 Antikörper angefärbt mit dem Ziel CD 8 positive (Tumorzytotoxische) T-Zellen in den Tumorpräparaten zu quantifizieren. Es wurde jeweils der

prozentuale Anteil der CD 8 positiven Zellen im Verhältnis zu der Gesamtfläche der Tumoren der Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe ermittelt. Differenziert wurde hierbei zwischen der Anzahl der positiven Zellen im Tumorrand (C) des Präparates, sowie dem Tumorkern (D).

#### 4.4.2 CD 68



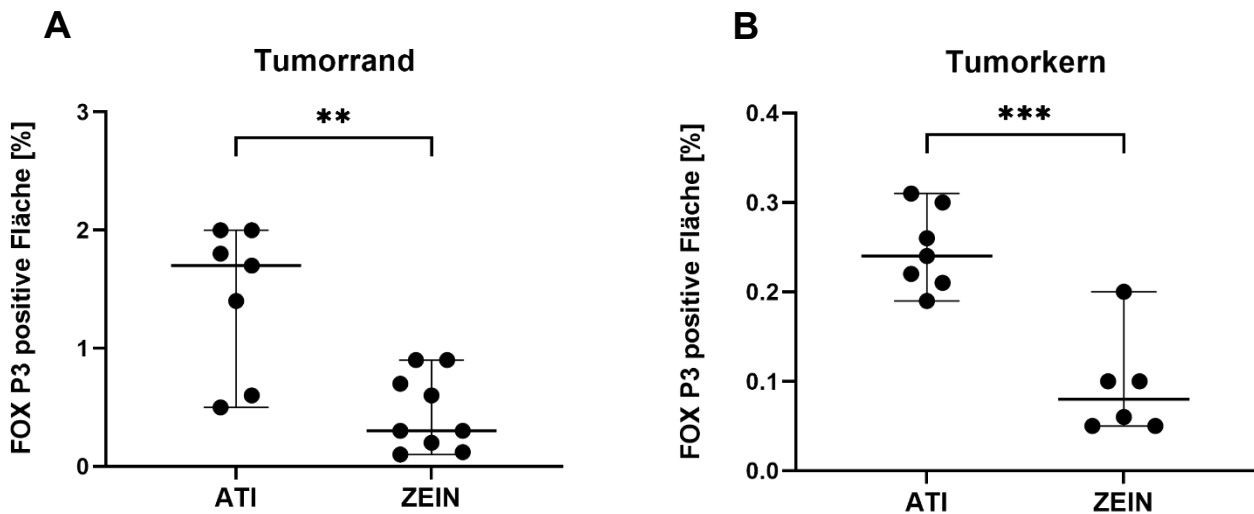
Ein Vergleich zwischen den angefärbten Tumoren der Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe zeigt zudem, dass in der Interventionsgruppe sowohl im Kern als auch im Rand des Tumors insgesamt größere CD 68 positive Flächen nachgewiesen werden konnten als in der Kontrollgruppe.



**Immunhistochemische Abbildungen CD 68 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger (A und C) vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung (B und D).**

Repräsentative Bildausschnitte des Tumorrands (A und B) und Tumorkerns (C und D).  
(Maßstab 100µm).

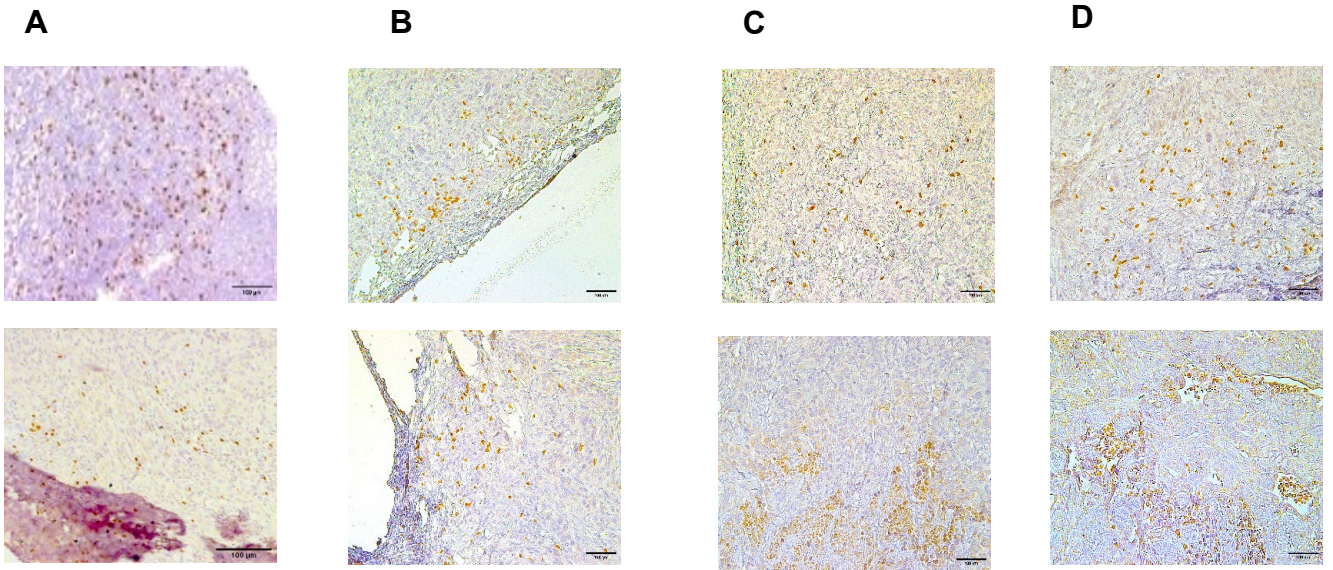
#### 4.4.3 FOX P3



**Abbildung 4.7: Immunhistochemische Auswertung FOX P3 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung**

Das Tumorgewebe wurde präpariert und repräsentative Schnitte mit einem spezifischen Antikörper für FOX P3 angefärbt. A) Anteil der Fläche von FOX P3 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorrand. B) Anteil der Fläche von FOX P3 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorkern. Der ungepaarte T-Test wurde zum Vergleich des Anteils der Fläche von FOX P3 positiven Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung jeweils für den Tumorrand und dem Tumorkern verwendet. \*,  $p < 0,05$ , ns, nicht signifikant

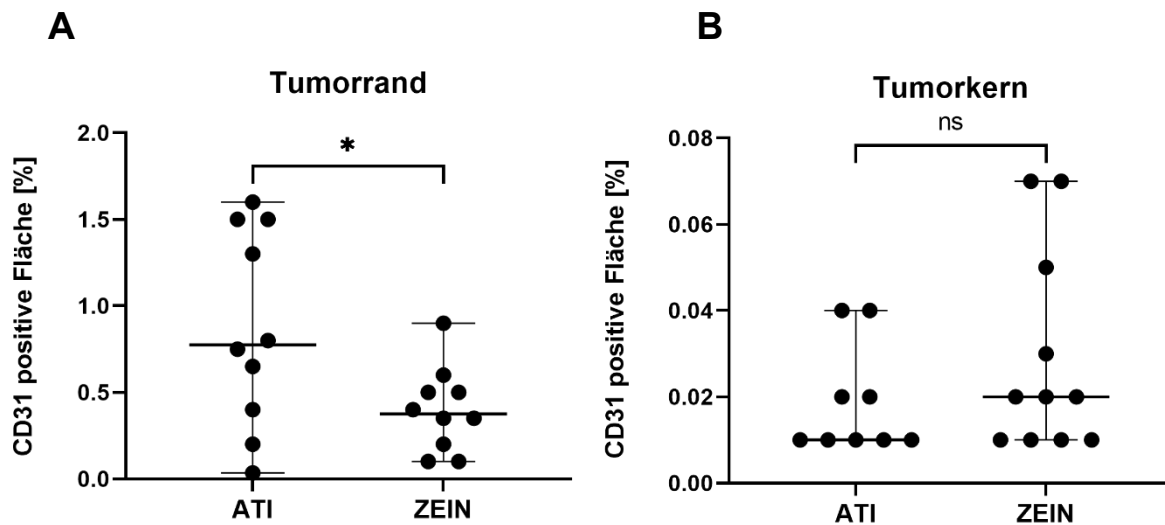
Das Anfärben der Tumorzellen des Tumorrandes mit dem Antikörper gegen FOX P3 ergab eine prozentual größere Anzahl FOX P3 positiver Zellen, primär regulatorische T Zellen (Treg), in der Interventionsgruppe als in der Kontrollgruppe (Abbildung 4.7A). Im gleichen Verhältnis ist eine ebenfalls größere Zahl FOX P3 positiver Zellen in der Interventionsgruppe der Tumoren des Tumorkerns (Abbildung 4.7B) erkennbar. Das Gesamtverhältnis FOX P3 positiver Zellen ist jedoch im Tumorrand größer als im Tumorkern



**Immunohistochemische Abbildungen FOX P3 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger (A und C) vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung (B und D).**

Repräsentative Bildausschnitte des Tumorrands (A und B) und Tumorkerns (C und D). (Maßstab 100µm).

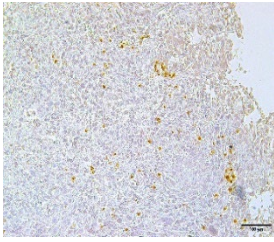
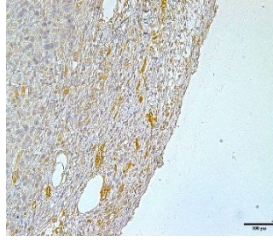
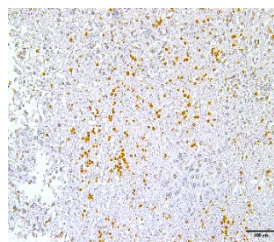
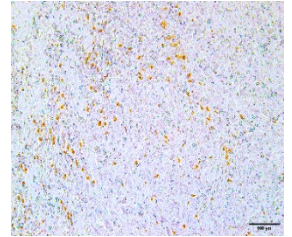
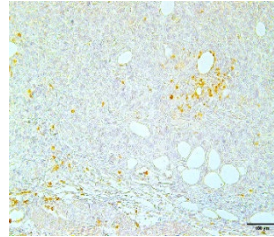
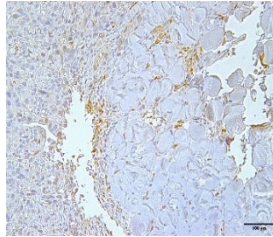
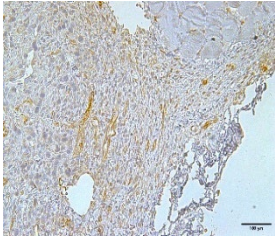
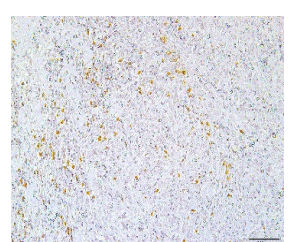
#### 4.4.4 CD 31



**Abbildung 4.8: Immunhistochemische Auswertung CD 31 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung**

Das Tumorgewebe wurde präpariert und repräsentative Schnitte mit einem spezifischen Antikörper für CD 31 angefärbt. A) Anteil der Fläche von CD 31 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorrand. B) Anteil der Fläche von CD 31 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorkern. Der ungepaarte T-Test wurde zum Vergleich des Anteils der Fläche von CD 31 positiven Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung jeweils für den Tumorrand und dem Tumorkern verwendet. \*,  $p < 0,05$ , ns, nicht signifikant

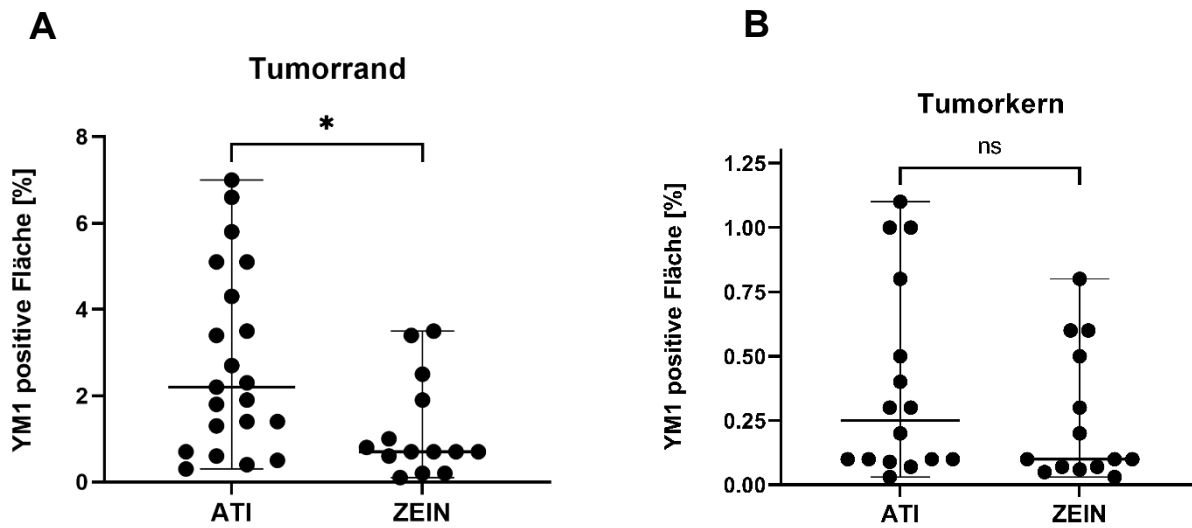
Die immunhistochemische Auswertung mit dem Antikörper Endothelzell-spezifischen Antikörper gegen CD 31 zeigt bei der Analyse des Tumorrandes einen signifikant höheren Anteil CD 31 positiver Areale in der Interventionsgruppe zu denen in der Kontrollgruppe (Abbildung 4.8A). Im Tumorkern ist die Gesamtzahl der positiv angefärbten Flächen mit dem Antikörper CD 31 geringer als im Tumorrand (Abbildung 4.8 B). Außerdem ist zu erkennen, dass in der Kontrollgruppe die größere Zahl CD 31 positiver Zellen detektiert wurde. Die Anzahl CD 31 positiver Zellen fallen in der Interventionsgruppe geringer aus.

**A****B****C****D**

**Immunohistochemische Abbildungen CD 31 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger (A und C) vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung (B und D).**

Repräsentative Bildausschnitte des Tumorrands (A und B) und Tumorkerns (C und D).  
(Maßstab 100µm).

#### 4.4.5 YM 1

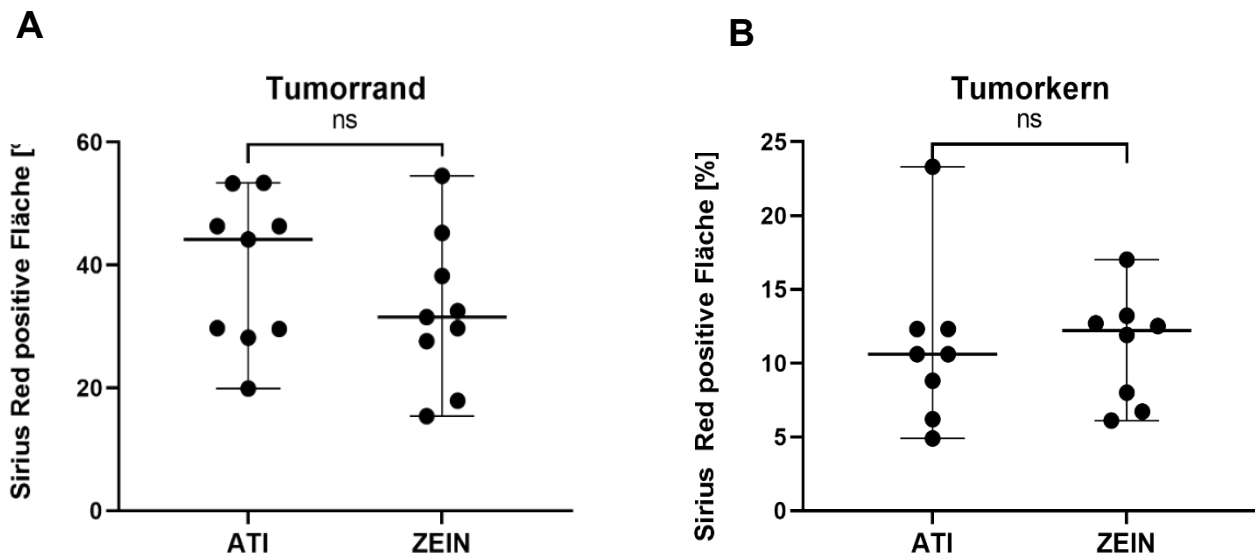


**Abbildung 4.9: Immunhistochemische Auswertung YM 1 positiver Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung**

Das Tumorgewebe wurde präpariert und repräsentative Schnitte mit einem spezifischen Antikörper für YM 1 angefärbt. A) Anteil der Fläche von YM1 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorrand. B) Anteil der Fläche von YM1 positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorkern. Der ungepaarte T-Test wurde zum Vergleich des Anteils der Fläche von YM 1 positiven Zellen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung jeweils für den Tumorrand und dem Tumorkern verwendet. \*,  $p < 0,05$ , ns, nicht signifikant



#### 4.4.6 Sirius Rot Färbung

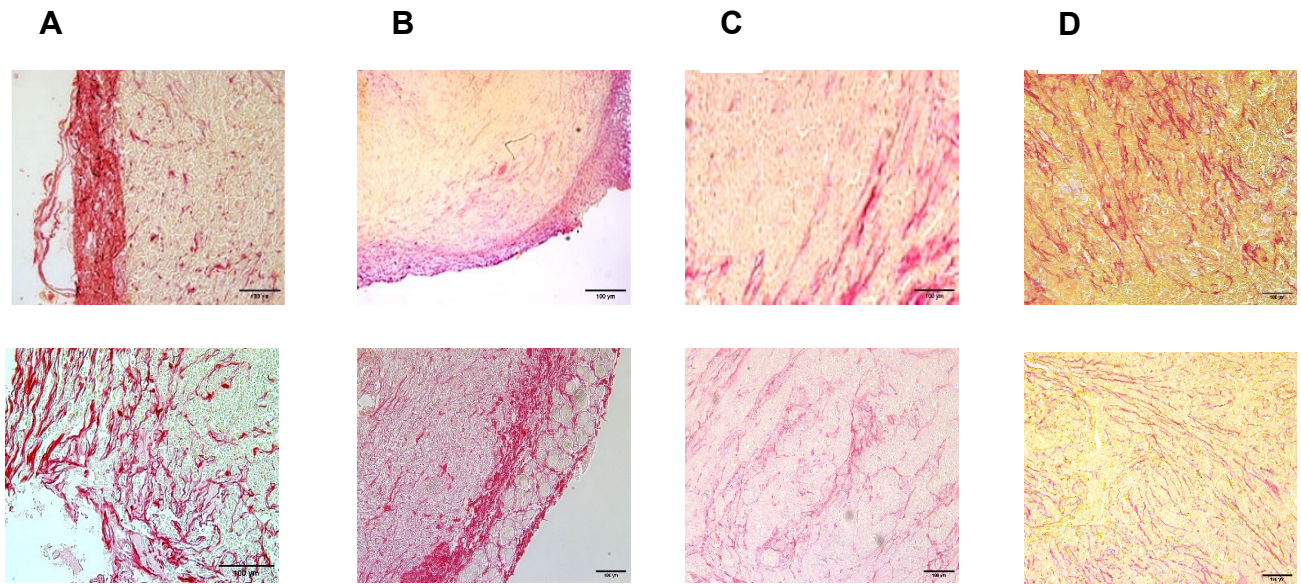


**Abbildung 4.10: Immunhistochemische Auswertung Sirius Rot Färbung im Tumorgewebe von Tieren mit mit ATI-haltiger vs ATI-freier (ZEIN) Nahrung**

Das Tumorgewebe wurde präpariert und repräsentative Schnitte mit Sirius Rot Färbung behandelt. A) Anteil der Fläche von Sirius Rot gefärbten Arealen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorrand. B) Anteil der Fläche von Sirius Rot gefärbten Arealen im Verhältnis zur Gesamtfläche im Tumorkern. Der ungepaarte T-Test wurde zum Vergleich des Anteils der Fläche von Sirius Rot gefärbten Arealen im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung jeweils für den Tumorrand und dem Tumorkern verwendet. \*,  $p < 0,05$ , ns, nicht signifikant

Zur Darstellung und Ermittlung des Anteils von Kollagen, sowie kollagenem Bindegewebe wurden die histologischen Tumorpräparate mittels eines Sirius Rot Färbekits behandelt. Der prozentuale Anteil der Sirius Rot gefärbten Fläche wurde im Verhältnis zur Gesamtfläche ermittelt. Es wurde differenziert zwischen dem Sirius Rot gefärbten Anteil im Tumorrand und im Tumorkern. Eine Unterscheidung im Anteil des Sirius Rot positiven Arealen zwischen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe ist ebenfalls vorgenommen worden. Allgemein betrachtet ist der Anteil an Sirius Rot angefärbten Gewebe im Tumorrand größer als im Tumorkern. Wie man aus Abbildung 4.10 A entnehmen kann, ist im Tumorkern der prozentuale Anteil der mit Sirius Rot angefärbten Fläche zwischen Interventionsgruppe und Kontrollgruppe ungefähr

identisch. In Abbildung 4.10 B erkennt man im Tumorkern eine geringfügig größere Zahl an angefärbten Sirius Rot Arealen als in der Kontrollgruppe



**Immunohistochemische Abbildungen Sirius Rot Färbung im Tumorgewebe von Tieren mit ATI-haltiger (A und C) vs. ATI-freier (ZEIN) Nahrung (B und D).**

Repräsentative Bildausschnitte des Tumorrands (A und B) und Tumorkerns (C und D). (Maßstab 100µm).

## 5. Diskussion

Neben der wichtigen Rolle von genetischen-, epigenetischen- sowie Umweltfaktoren, die in der Ätiologie und Pathogenese entzündlicher Erkrankungen eine tragende Rolle spielen, kann die Anpassung von Ernährung einen komplementären Ansatz zur Behandlung immungetriebener Erkrankungen darstellen (54). In mehreren präklinischen Studien an Patienten mit multipler Sklerose zeigte sich z.B. ein modulierender Einfluss von Speisesalzen und Fett, welche als Schlüsselmerkmale der westlichen, hyperkalorischen Ernährungsweise gelten (53). In diesem Sinne fördern hohe Konzentrationen von Salzen und Fetten proinflammatorische Prozesse von T-Effektor-Zellen und M2 Makrophagen, welche eine Aggravation von Entzündungsprozessen zur Folge haben kann (48, 53, 55). Ferner existieren vermehrt Hinweise darauf, dass neben der Modulation einer T-Zell-Antwort aufgrund einer Ernährung nach westlichem Vorbild, Ernährungsgewohnheiten sowohl die Zusammensetzung als auch die Funktionalität des Magen-Darm-Mikrobioms beeinflussen (56). Während des Säuglingsalters entwickelt sich die mikrobielle Kernzusammensetzung des Magen-Darm-Traktes. Dies wird zum Teil von der Art der Entbindung bei der Geburt und der Intensität des Stillens beeinflusst (57, 58). Mikrobielle Störungen können während dieser frühen Entwicklungsphase durch z.B. Infektionen, Antibiotikabehandlung und ungesunder Ernährungsweise die Anfälligkeit für zukünftige Erkrankungen erhöhen (59). Das intestinale Mikrobiom ist für die Verdauung von Nährstoffen, der Produktion von bioaktiven Molekülen, sowie des Konkurrierens mit kolonisierenden Krankheitserregern verantwortlich (60). Das Mikrobiom beeinflusst dabei lokale, physiologische Prozesse wie z.B. die Darmmotilität, Permeabilität, die Hormonsekretion, die Funktionsfähigkeit peripher liegender Organe, oder systemische Entzündungsprozesse (61, 62). Es wurde zudem in Studien gezeigt, dass in Afrika lebende Kinder mit traditionellen Ernährungsgewohnheiten eine veränderte Struktur des Darmmikrobioms aufwiesen im Vergleich zu denjenigen, europäisch stämmigen Kindern, die eine moderne, westliche Ernährungsweise vollzogen (63).

Im Besonderen gilt es, auf die Folgen und den Einfluss des in der westlichen und mittlerweile nahezu weltweiten Ernährung prävalenten Weizens einzugehen. Es stellt sich die Frage, ob eine Inflammation durch glutenhaltige Getreide, insbesondere Weizen, lediglich Patienten mit Zöliakie oder zellbiologisch und jetzt auch

immunologisch nachweisbar mit der häufig beobachteten Nicht-Zöliakie-Weizensensitivität (NCWS) betrifft. Es ist erwiesen, dass eine GFD bei Patienten mit einer diagnostizierten Zöliakie essenziell ist (34, 64). Das klinische Erscheinungsbild der Patienten mit einer Zöliakie ist dabei vielfältig. Ein Drittel der Patienten zeigen schwere Symptome wie Malabsorption, Durchfall, Gewichtsverlust sowie Vitamin- und Mineralstoffmangel (65). Ein größerer Anteil an Patienten leidet unter nicht klassischen Symptomen gastrointestinalen, oder extraintestinalen Beschwerden (66). Die Bestimmung eines maximalen Glutengrenzwertes ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Bisherige Erkenntnisse zeigten z.B. bei Kindern, die sich 14 Monate lang glutenfrei ernährten, bereits nach einer täglichen Einnahme von 200mg Gluten eine signifikante Zunahme der Anzahl von intraepithelialen Lymphozyten und eine Abnahme der Zottenhöhe und Kryptentiefe im Darmbiopsat (67). Eine italienische Studie zeigte bereits bei ca. 30% der Erwachsenen Zöliakiepatienten bei einem 12-wöchigen Konsum von 50mg Gluten zunehmende Beschwerden und eine entzündliche Veränderungen in der Zotten-/ Kryptenarchitektur (67). Bei der Zöliakie handelt es sich eindeutig um eine T-Zellreaktion gegen Glutenpeptide bei genetisch prädisponierten Patienten (Vorliegen von HLA-DQ2 oder -DQ8) (5, 68, 69). Eine glutenfreie und damit primär weizenfreie Diät ist jedoch nicht nur bei Patienten mit einer diagnostizierten Zöliakie, sondern auch denjenigen mit einer NCWS notwendig (26, 70).

Neben den durch Gluten provozierten Symptomen bei Zöliakie und der Typ 2 Weizenallergie bei Patienten mit Reizdarmsyndrom (41, 42) können auch ATIs zu klinischen Symptomen der NCWS beitragen (70). Mit ihrer hohen Resistenz gegenüber Hitze und Proteasen sind ATIs weitere Auslöser einer entzündlichen NCWS. In diesem Zusammenhang weisen glutenfreie Produkte wie Buchweizen, Hafer, Hirse und Quinoa neben einem geringen Gehalt an fermentierbaren Oligo-, Di-, Monosachariden und Polyolen (FODMAPs), welche nach mikrobieller Verstoffwechslung zu Blähungen und nicht-entzündlichen Magen-Darm-Beschwerden führen können, keine ATI-Bioaktivität auf (10, 71). Die immunaktivierenden Effekte der ATI sind in unseren tierexperimentellen und klinischen Studien klar belegt worden. Dies gilt im Besonderen bei Autoimmun- und systemischen Erkrankungen, aber auch bei Allergien (11, 14, 15, 47, 49).

Zusätzlich zur Modulation des intestinalen Mikrobioms stellt damit auch die Identifizierung und ggf. das Meiden bestimmter (immunaktiver)

Nahrungskomponenten, insbesondere der Weizen-ATI, eine weitere Intervention dar, welche Entzündungsreaktion im Körper günstig beeinflussen kann und potenziell auch auf das Wachstum von Tumoren Einfluss nehmen könnte. Der mögliche Einfluss nutritiver ATI als Stimulans auf die Progression von intestinalen und extraintestinalen (peripheren) Inflammationen stellt einen immunologisch komplexen Vorgang dar. Die Stimulation durch ATI erfolgt über eine Aktivierung des TLR4 vorwiegend auf Makrophagen und dendritischen Zellen in der Lamina propria des Darms. Diese Zellen können in der Folge über die Blutgefäße in die Peripherie auswandern, aber auch das Mikrobiom direkt im Sinne einer Dysbiose modulieren (9, 10, 13, 20). Entzündliche Prozesse wie z.B. Autoimmunerkrankungen können somit durch den Konsum von Weizen und damit ATI gefördert werden (14, 47).

Die in dieser Studie untersuchten Versuchstiere wurden in der Kontrollgruppe mit einer ATI-freien und in der Interventionsgruppe mit einer ATI enthaltenden Diät gefüttert. Vor Beginn des Versuchs wurden die Versuchstiere beider Kohorten über mehrere Wochen mit einer ATI-freien Diät gefüttert, um eine Weizen- und damit ATI-freie Basisdiät sicherzustellen. Ferner entstammen die Versuchstiere der gleichen C57BL/6 Zuchtlinie. Den Tieren beider Kohorten wurde eine identische Tumorzellzahl subkutan appliziert. Es zeigte sich in der Interventionsgruppe, welche mit definierten, aufgereinigten ATI, entsprechend einem normalen Weizenkonsum des Menschen, gefüttert wurde, ein schnelleres Tumorstadium im Vergleich zu der Kontrollgruppe sowohl im Verlauf als auch zum Ende des Versuchs. Eine statistisch signifikante Verminderung im ermittelten Tumorgewicht zugunsten der Interventionstiere (ATI-freie, aber ansonsten identische Diät) stellt einen weiteren Beleg für die krankheitsfördernde, extraintestinale Immunmodulation durch ATI dar, hier erstmals in einem Tumormodell.

Immunhistochemische Auswertungen und der Nachweis von Entzündungszellen, Immunzellmarkern, sowie fibrotischen Anteilen in den Tumorpräparaten unterstreichen diese Ergebnisse auch funktionell-immunologisch.

In ähnlich angelegten Studien verstärkten u.a. nutritive ATIs eine experimentelle Kolitis (46). Es zeigte sich zudem, dass ATIs das Darmmikrobiom verändern, indem diese zur Expression mehrerer, antimikrobieller Gene führen (46). Natürliche Bakterienstämme des Darms, welche eine entzündungshemmende Wirkung haben, wurden zudem durch den Konsum von ATIs reduziert, und ATIs verhinderten das Wachstum nützlicher Darmbakterien auch direkt in *in vitro* Kulturen (46). Weitere Studien

unterstreichen sowohl tierexperimentell als auch klinisch den Einfluss und die Folgen eines ATI-Konsums: Eine Aktivierung myeloider Zellen bedingt (hier durch ATI in der Nahrung) fördert eine präexistente, immunologische Erkrankung im Darm selbst oder in der Peripherie (10, 20, 47, 53). In histopathologischen Untersuchungen des (sonst gesunden) Darms wird jedoch keine mit klassischen Methoden der Histologie relevante Entzündung oder Schädigung nach ATI-Konsum festgestellt. Eine leichte Vermehrung aktivierter, myeloider Zellen ist mittels Immunhistochemie aber nachweisbar (14, 20), eine hochsignifikant erhöhte Stimulation myeloider Zellen ist hier in den mesenterialen Lymphknoten zu finden (10), was auf eine Emigration, der durch ATI aktivierten; myeloiden Zellen im Darm hindeutet (10). Es zeigte sich im Vergleich zwischen der induzierten Kolitis an unserer bereits zuvor erwähnten Studie und den Auswirkungen der ATI auf der in meinem Experiment applizierten Tumors, dass der Konsum von ATI in beiden Fällen eine immunologische Wirkung entfaltet, indem Zellen des angeborenen Immunsystems durch Bindung an deren Toll-Like Rezeptor 4 (TLR4) aktiviert werden, die offensichtlich in meinen Experimenten in das Mikro-Environment des (entzündeten) Tumorgewebes einwandern. Diese nun im Darm aktivierten, angeborenen Immunzellen interagieren möglicherweise direkt mit den Zellen des adaptiven Immunsystems, also den T-Zellen im Tumor. Bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. bei Multiple Sklerose und einer induzierten Colitis sind CD 4 T-Zellen bereits aktiviert. Durch den Konsum der ATI erfolgt eine zusätzliche, verstärkende T- Zell Aktivierung offensichtlich über die aus dem Darm nach ATI-Aktivierung emigrierten Monozyten-Makrophagen (Adjuvanzeffekt) (1, 14, 46). In meiner Studie bewirkt dieser immunologische Prozess hingegen, dass infolge eines Konsums von ATI das immunsuppressive, bereits existierende Mikro-Environment des subkutan applizierten Tumors aktiviert wird. Eine daraus resultierende Vermehrung Tumor assoziierter YM1-positiver Makrophagen, welche M2-typisch polarisiert sind und damit das Tumorwachstum fördern (TAMs) können u.a. zu einer Verminderung der Tumorzytotoxischen CD 8+ Zellen führen und so die Tumorprogression fördern. Insgesamt betrachtet zeigte sich eine geringgradige Zahl an CD 8+ Zellen im Tumorkern, als auch im Tumorrand, jedoch war die Anzahl CD 8+ Zellen der Tumore in der Interventionsgruppe, welche mit ATI gefüttert worden sind im Tumorrand, als auch im Tumorkern signifikant erhöht. Meine Immunhistochemischen Auswertungen der Tumore unterstreichen diese Beobachtung durch eine ebenfalls erhöhte Anzahl an Gesamtmakrophagen (CD 68 positiv) und insbesondere auch YM 1 positiven M2-

typischen Makrophagen in der Interventionsgruppe, welche mit ATI gefüttert wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche mit einer ATI-freien Diät gefüttert wurde. M2-typische Makrophagen können die Tumorprogression auch mittels direkter Interaktion mit den Tumorzellen, durch Förderung von Bindegewebsumbau, mittels Stimulation der Neoangiogenese und durch die Stimulation von immunsuppressiven regulatorische T Zellen (Tregs) unterstützen (72). Deshalb wurde die Tumorangiogenese mittels immunhistochemischer Färbung für das Endothelzell-Protein CD 31 (PECAM-1) quantifiziert. Der Antikörper gegen CD 31 zeigte bei der Analyse des Tumorrandes einen signifikant höheren Anteil CD 31 positiver Areale in der Interventionsgruppe (ATI-haltige Ernährung) verglichen mit der Kontrollgruppe (ATI-freie Ernährung). Im Tumorkern in beiden Kohorten war die Gesamtzahl der CD31 positiven Zellen geringer als im Tumorrand, was durch den geringeren Bindegewebsanteil erklärbar ist. Eine Aktivierung des immunsuppressiv wirkenden Tumormilieus ließ sich mittels Quantifizierung der Tregs zeigen. Tregs konnten mittels des Antikörpers FOX P3 im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Hierbei war das Verhältnis FOX P3 positiver Zellen im Tumorrand (signifikant) und insbesondere im Tumorkern (hoch signifikant) in der Interventionsgruppe (ATI-haltige Ernährung) gegenüber der ATI-freien Gruppe erhöht. Die Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen (insbesondere CD 8 positiv) wird durch das Vorhandensein regulatorischer T- Zellen gehemmt. Tregs hemmen somit die zytotoxische Aktivität, welches in der Konsequenz die Tumorpheriferation unterstützt. Dies spiegelt sich nicht notwendigerweise in einer Verminderung der CD8 positiven T Zellen wider. Eine Analyse des Anteils von Kollagen, sowie kollagenem Bindegewebe der Tumorpräparate erfolgte im Rahmen der immunhistochemischen Auswertungen mittels Sirius Rot Färbung. Es zeigte sich allgemein betrachtet ein größerer Anteil mit Sirius Rot angefärbten Gewebe im Tumorrand als im Tumorkern. Dieser Befund korreliert mit der erhöhten Anzahl vorhandener Immunzellen in der Peripherie des Tumors. Die Parallele zwischen meinen Ergebnissen und denen weiterer Studien zeigen somit in der Gesamtbetrachtung eine durch ATI bedingten Einfluss auf lokale (intestinale), als auch in der Körperperipherie ablaufende Entzündungsprozesse (13, 19). Ferner stellt sich die Frage, ob gesunde Menschen durch eine Weizen- bzw. ATI-haltige Ernährungsweise Krankheiten entwickeln können. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass ATIs bei bereits erkrankten Patienten als Co-Stimulanzen (Adjuvantien) einer bereits laufenden Immunreaktion fungieren können (3, 6, 20). Dieser Aspekt deckt sich

mit meinen Befunden. Die subkutan applizierten Tumoren in die Flanken meiner Versuchstiere sind durch eine intestinale Stimulation mittels ATI-haltigem Futter stärker gewachsen als bei denjenigen Versuchstieren, welche eine ATI-freie Diät erhielten.

Meine Ergebnisse stellen nun einige, wichtige Punkte und Herausforderungen dar, was den Konsum von Weizen und weizenhaltigen Produkten anbelangt. Zunächst stellt sich die Frage, inwiefern die Ergebnisse aus Tierversuchen repräsentativ für den Menschen stehen. Es scheint zunächst offensichtlich zu sein, dass Mausmodelle möglicherweise nur unvollständig den menschlichen Zustand widerspiegeln können. Bei näherer Betrachtungsweise ähnelt sich jedoch das Darm-Immunsystem sowie das Darm-Mikrobiom von Maus und Mensch (46). Es liegt daher nahe, dass in Folge des Konsums von ATIs nicht nur das Immunsystem adjuvant beeinflusst wird, sondern auch wichtige Bakterienarten, welche für den Aufbau eines antiinflammatorischen Darmmilieus verantwortlich sind unterdrückt werden könnten. Hierzu gibt es auch eine Vielzahl meist korrelativer Humanstudien (3, 15, 41, 73). Eine weitere Überlegung ist, ob unsere Mausexperimente trotz des angepassten durchschnittlichen, menschlichen Weizenkonsums im Darm mit dem Menschen vergleichbar prozessiert werden und so auch vergleichbare Immunreaktionen auslösen. Aufgrund Ihrer Hitzestabilität beim Backen und Ihrer Widerstandsfähigkeit gegen den Abbau durch Magensäure und weiteren Proteasen erreichen ATIs den Dün- als auch Dickdarm sowohl bei Mensch und Maus nahezu unverändert (8, 9). Es kann basierend auf diesen Daten erwartet werden, dass in beiden Spezies die Bioaktivität nutritiver ATI im Darm identisch ist.

Dies bestätigen auch kontrollierte klinische Studien an unserem Institut für Translationale Immunologie, in den über einen Zeitraum von 3-6 Monaten an Patienten mit definierten, chronischen Erkrankungen eindeutig ein krankheitsverstärkender Effekt durch den Konsum von Weizen gegenüber einer i.W. weizenfreien Diät nachgewiesen werden konnte. Dieser Effekt ließ sich neben ausgeprägteren krankheitsspezifischen Beschwerden und anhand klinischer Parameter sowie anhand immunologischer, molekularbiologischer/biochemischer und auch zellbiologischer Parameter belegen (14, 15, 46, 47, 74). Es bestätigte sich z.B. bei einer kleinen, randomisierten Pilotstudie an Patienten mit der Diagnose familiäres Mittelmeerfieber (FMF), einer autoinflammatorischen, autosomal rezessiven inflammatorischen Erkrankung, dass der Verzehr von Weizen und damit von Weizen ATIs zu einer Immunaktivierung und Verschlimmerung des FMF innerhalb weniger Tage führte. Dies

zeigte sich in der Aggravierung des Symptombildes mit abdominellen und generalisierten Schmerzen, sowie anhand signifikant erhöhter Serumspiegel des Akutphaseproteins SAA und erhöhten zirkulierenden, proinflammatorischen Zellen (CD 14/IL-1 $\beta$ -Monozyten und CD 14+/TNF- $\alpha$ ) bei den FMF-Patienten bereits 12 Stunden nach Weizenprovokation (15). Vergleichbare Ergebnisse ergaben auch Studien an Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) und Colitis ulcerosa, mit multipler Sklerose und mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) (49). Die prospektive Studie zu einer glutenfreien (ATI-freien) Diät bei Patienten mit PSC und assoziierter Kolitis ergab eine verringerte Expression mehrerer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine im Sigma (IL6, IL8, CCL2 und TNF), sowie einen Abfall der Leberfibrosemarker Thrombospondin-2 und -4 im Serum nach einer 8-wöchigen Gluten und ATI-Restriktion (74). Eine Untersuchung an Patienten mit multipler Sklerose (MS) bestätigte den Einfluss von nutritiven, diätischen Weizen-ATIs auf die Aktivierung von Immunzellen wie periphere, im Blut zirkulierende Monozyten, was mit einer Verbesserung des Schmerz-Scores verbunden war (14). Bei Patienten mit NASH führte eine ATI-freie Diät zu signifikanten Verbesserungen der Leber- und Stoffwechselfparameter (49). Ferner zeigte in diesem Zusammenhang ein Modell einer experimentell induzierten, autoimmunen Enzephalitis (EAE) bei C57BL/6J-Mäusen unter der Gabe einer definierten ATI-haltigen Nahrung signifikant höhere, klinische EAE-Werte im Vergleich zu denjenigen Mäusen, die eine ATI-freie Kontrolldiät erhielten. Dies spiegelte sich in einer erhöhten Anzahl, sowie in einer Aktivierung von proinflammatorischen Darm-, Lymphozyten-, Milz- und ZNS-infiltrierenden T-Lymphozyten wider (14). Ähnliches gilt für ein Modell der NASH in der C57BL/6J Mäuse nach Konsum einer fettreichen Diät nahrung inklusive definierter ATI-haltiger Nahrung stark erhöhte Serumtriglyceride- und Transaminasenerhöhung zeigten im Vergleich denjenigen Versuchstieren, welche nur mit eine fettreichen Diät nahrung gefüttert wurden (20). Die Ergebnisse dieser Studien stimmen gut mit meinen experimentell erhobenen Daten überein, die in Analogie gezeigt haben, dass ATIs in Folge der Bindung an den TLR4 Rezeptor zu einer Hochregulierung von Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen führt. In der Gesamtbetrachtung der genannten Studien mit den Ergebnissen meiner experimentellen Arbeit wird der pathogene Effekt in Folge eines ATI-Konsums klar veranschaulicht. ATI stimulieren somit generell aktivierte Immunzellen.

**Die Ergebnisse meiner Studie verdeutlichen zudem eine zusätzliche, neue Erkenntnis: ATI stimulieren auch das aktivierte, immunsuppressive Environment bei Tumoren durch M2-typische Tumorstromafördernde Makrophagen (TAMs).**

Ein weiterer, essenzieller Faktor ist neben der Menge der konsumierten ATI auch die jeweilige Weizenquelle. Untersuchungen des TIM haben gezeigt, dass in modernen Weizensorten häufig eine höhere ATI-Konzentration und insbesondere ATI-Bioaktivität enthalten ist als in alten Weizenquellen wie z.B. Einkorn. Aus diesen Erkenntnissen kann demnach abgeleitet werden, dass neben der Menge des Weizenkonsums die proinflammatorische Aktivität, sowie ggf. eine Dysbiose von der jeweiligen Weizenquelle abhängig ist (10). Für unsere tierexperimentellen Versuche ist das Futter mit oder ohne Zufügen von ATI (1.5% des Proteins im Futter) isoliert aus einer modernen, hexaploiden Weizensorte hergestellt worden. Letztlich gilt es in Anbetracht dieser eindeutigen präklinischen und auch klinischen Befunde die kritische Frage zu stellen, welche Aspekte eine Rolle bei der Entwicklung einer Weizen- und ATI-bedingten Entzündung spielen und inwieweit auch gesund erscheinende Personen mit ggf. einer bestimmten Krankheits-Disposition eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Weizenkonsum aufweisen könnten. Aktuellere Daten zeigen, dass ATIs vorrangig zu einem Progress bereits bestehender Erkrankungen führen, weniger eine bestimmte Krankheit erzeugen (43, 46, 48). Darüber hinaus ist zu erwarten, dass sich individuelle, genetische Merkmale begünstigend auf die Anfälligkeit einer Weizen- bzw. ATI-basierten Diät auswirken könnten. Schließlich ist davon auszugehen, dass bei der Entstehung der ATI-bedingten NCWS multiple Faktoren eine Rolle spielen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass mehrere Umweltfaktoren gepaart mit einem veränderten Lebensstil ausschlaggebend in der Genese einer NCGS sein können. Dazu gehören z.B. Stress, Alkoholabusus, ggf. auch Medikamente wie NSAR oder auch PPIs (75-77).

## 6. Zusammenfassung

Weizen und verwandte Getreidesorten wie Gerste, Dinkel, Roggen und auch alte Sorten wie Einkorn und Emmer stellen in der Weltbevölkerung ein wesentliches Grundnahrungsmittel dar. Der Konsum kann jedoch auch zur Entstehung von weizenbedingten Erkrankungen führen. Unsere bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, dass der Konsum von Getreide, sowie den im Getreide enthaltenen Proteine zur Entstehung bzw. zur Verstärkung bestimmter Erkrankungen, insbesondere von Autoimmun- und metabolischen Erkrankungen beiträgt (15, 20, 47, 49, 74). Das Ziel dieser Arbeit war es nun den Einfluss nutritiver Getreideproteine aus der Gruppe der Amylase-Trypsin-Inhibitoren aus Weizen (ATI), welche dieser krankheitsfördernden Aktivität zugrunde liegen, auf das Tumorwachstum anhand eines experimentellen Tumorumplantationsmodells aufzuzeigen. In der Vergangenheit stellten sich präklinische Tiermodelle für die Untersuchung der Krankheitsmodulation durch ATI als hierfür besonders geeignet dar. Die relativ gute genetische und physiologische Übereinstimmung zwischen Maus und Mensch hat sich besonders bewährt, um auch nutritiv bedingte Erkrankungen zu erforschen. In dieser Arbeit wurde eine von unserem Institut generierte Lungen-Adenokarzinom-Tumorzelllinie kultiviert und den Versuchstieren subkutan in ihre Flanke injiziert. Die Wachstumsrate und finale Größe des Tumors galten als primäre und klinisch relevante Parameter, um den Einfluss nutritiver ATI zu messen. ATI fördern eine präexistente (extraintestinale) Inflammation, u.a. bei Autoimmunerkrankungen. Dies erfolgt über eine Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) auf Makrophagen und dendritischen Zellen, welche nach Ihrer Aktivierung im Darm in die Peripherie auswandern, sowie über eine dysbiotische Modulation des intestinalen Mikrobioms Entzündungen fördern können (9, 10, 20, 33). Vor Beginn des Versuchs wurden C57BL/6j-Mäuse bis zum Alter von 10-12 Wochen mit einem ATI-freien Standardfutter (22% Protein als Zein aus Mais) gefüttert. In der Interventionsgruppe wurden die Tiere mit Beginn des Experimentes auf eine ATI-haltige Nahrung (1.5% des Zein-Proteins ersetzt durch ATI) umgestellt, während die Versuchstiere der Kontrollgruppe weiterhin mit dem ATI-freien Futter gefüttert wurden. **Es zeigten sich im Verlauf auch zum Endpunkt unter regelmäßigen, engmaschigen Messungen eindeutige Unterschiede derjenigen Tiere, welche mit ATI-haltiger Nahrung gefüttert wurden. Dies spiegelte sich in einer erhöhten Tumorwachstumsgeschwindigkeit, und einem größeren Tumolvolumen und Tumorgewicht wider.**

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen den pathogenen Einfluss der ATI. Die immunhistochemische Analyse mittels der Antikörper CD 68, YM 1, CD 8, CD 31, FOX P3, sowie eine Ermittlung des Anteils von Kollagen und kollagenem Bindegewebe mittels Sirius Rot Färbung bestätigten meine Ergebnisse. Es zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl YM1 positiver Zellen in der Interventionsgruppe, in welcher die Tiere mit einer ATI-haltigen Nahrung gefüttert wurden, im Vergleich zu denen in der Kontrollgruppe, welche weiterhin ATI-freiem Futter erhielten. Eine Vermehrung YM1- und CD 68 positiver Makrophagen, welche M2-typische Tumor assoziierte Makrophagen (TAM) repräsentieren, welche über verschiedene Mechanismen das Tumorwachstum fördern. Meine Immunhistochemischen Auswertungen der Tumore unterstreichen diesen Mechanismus. CD 8+ Zellen im Tumorrand und auch im Tumorkern sind in beiden experimentellen Gruppen, welche mit ATI gefüttert wurde signifikant erhöht. Meine Ergebnisse zeigten ebenfalls eine signifikant erhöhte Population CD 68 positiver Makrophagen im Tumorrand in der mit ATI gefütterten Gruppe. Diese Makrophagen sind vorwiegend YM 1 positiv und damit M2-typisch polarisiert. Das CD 68 Gen kodiert für ein Transmembran-Glykoprotein, welches von Monozyten und Gewebemakrophagen in erhöhtem Maße exprimiert wird und eine Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen vermittelt, sowie die Phagozytose fördert (78). Dies unterstreicht die Rolle dieser Makrophagen als immunsuppressive, das Tumorwachstum fördernde, myeloide Zellen in Folge eines ATI-Konsums. Der immunhistochemische Nachweis des endothelialen Rezeptorproteins CD 31 (PECAM-1) bestätigte eine Tumorangiogenese vermehrt in den peripheren, bindegewebigen Anteilen des Tumors in beiden Kohorten (ATI-haltig/ATI-frei). Das Anfärben des Tumorrandes mit dem Antikörper gegen FOX P3 ergab eine signifikant größere Anzahl FOX P3 positiver Zellen, primär regulatorische T Zellen (Treg), in der Interventionsgruppe (ATI-haltige Nahrung), verglichen mit der Kontrollgruppe (ATI-freie Nahrung). FOX P3 stellt einen essenziellen Transkriptionsfaktor für die Bildung und Funktion, ebenfalls immunsuppressiver Tregs dar. Tregs reagieren auf spezifisches Antigen (u.a. der Tumorzellen) mit der Sekretion immunsuppressiver Zytokine (79). Insgesamt wurde in der Interventionsgruppe (ATI-haltige Nahrung) gegenüber der Kontrollgruppe (ATI-freie Nahrung) das immunsuppressive Mikro-Environment des Tumors deshalb von mindestens 2 zentralen, zellulären Effektoren in einem höheren Maß aktiviert und erklärt damit ausreichend die verstärkte Tumorprogression. Diese Erkenntnisse bestätigten zudem die Tumormessungen im

Verlauf, sowohl in der frühen Phase des Wachstums als auch zum Endpunkt des Experimentes, zuletzt mit einem statistisch signifikant größeren Tumolvolumen und höherem Tumorgewicht derjenigen Versuchstiere, welche mit ATI-haltiger Nahrung gefüttert wurden. Die Ermittlung des Anteils an Kollagen, sowie kollagenem Bindegewebe erfolgte mittels Sirius Rot Färbung. Es zeigte einen höheren Anteil von Sirius Rot gefärbten Gewebe im Tumorrand (Tumorkapsel) als im Tumorkern. Dieses Ergebnis korreliert plausibel mit den bereits zuvor dargelegten Befunden. Es bestätigt den höheren Anteil vorliegender Immunzellen in der bindegewebigen Tumorperipherie.

Zusammenfassend konnte hier erstmals gezeigt werden, dass nutritive ATIs einen maßgeblichen Beitrag nicht nur in der Aggravation und als Stimulans von klassisch entzündlichen, autoimmunen und metabolischen Erkrankungen leisten, sondern auch das immunsuppressive Mikroenvironment von soliden Tumoren fördern können. Diese Ergebnisse mögen zunächst in Anbetracht der bisherigen Studien über den Einfluss von ATI auf klassische Inflammationsprozesse (6, 12, 14, 15, 19, 48) unerwartet sein, lassen sich aber durch den entscheidenden Beitrag myeloider Zellen nach intestinaler ATI-Stimulation erklären. Hier scheinen die Tumorzellen selbst in den einwandernden Monozyten-Makrophagen eine immunsuppressive Repolarisierung zu induzieren, wie bereits vielfach beschrieben (9, 10, 14). **Die Ergebnisse meiner experimentellen Studie zeigen damit eine wichtige, neue Erkenntnis zu den ATI: ATI stimulieren das aktivierte, immunsuppressive Environment bei Tumoren durch vermehrten Influx von Tumorwachstum fördernden M2-typischen Makrophagen (TAMs).** Die mögliche tumorpräventive, oder sogar therapeutisch adjuvante Wirkung einer ATI-freien Diät, zumindest bei TAM-reichen Tumoren, welche als aus dieser Studie geschlussfolgert werden kann, könnte in der translationalen Tumorforschung im Rahmen einer nutritiven Interventionsstudie an Patienten ggf. überprüft werden, insbesondere, wenn leicht zu messende, nicht invasive Marker der Tumorprogression, oder einer M2-typischen Polarisation von Makrophagen zur Verfügung stehen. Es sind somit weitere Untersuchungen erforderlich, um die gesundheitlichen Auswirkungen durch den Konsum von ATI abschätzen zu können und inwieweit eine Weizen- und ATI-freie, oder reduzierte Ernährungsweise bei Tumorerkrankungen einen medizinischen Nutzen darstellt.

## 7. Quellenverzeichnis

1. Schuppan D, Gisbert-Schuppan K. Tägliches Brot: Krank durch Weizen, Gluten und ATI: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
2. Schuppan D. Zöliakie. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. 2016;59(7):827-35.
3. Schuppan D, Zevallos V. Wheat amylase trypsin inhibitors as nutritional activators of innate immunity. *Dig Dis*. 2015;33(2):260-3.
4. Oda Y, Matsunaga T, Fukuyama K, Miyazaki T, Morimoto T. Tertiary and quaternary structures of 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å resolution. *Biochemistry*. 1997;36(44):13503-11.
5. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1912-33.
6. Bellinghausen I, Weigmann B, Zevallos V, Maxeiner J, Reißig S, Waisman A, et al. Wheat amylase-trypsin inhibitors exacerbate intestinal and airway allergic immune responses in humanized mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(1):201-12.e4.
7. Afzal M, Sielaff M, Distler U, Schuppan D, Tenzer S, Longin CFH. Reference proteomes of five wheat species as starting point for future design of cultivars with lower allergenic potential. *NPJ Sci Food*. 2023;7(1):9.
8. Zevallos VF, Raker VK, Maxeiner J, Scholtes P, Steinbrink K, Schuppan D. Dietary wheat amylase trypsin inhibitors exacerbate murine allergic airway inflammation. *Eur J Nutr*. 2019;58(4):1507-14.
9. Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2012;209(13):2395-408.
10. Zevallos VF, Raker V, Tenzer S, Jimenez-Calvente C, Ashfaq-Khan M, Rüssel N, et al. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1100-13.e12.
11. Sielaff M, Curella V, Neerukonda M, Afzal M, El Hassouni K, Distler U, et al. Hybrid QconCAT-Based Targeted Absolute and Data-Independent Acquisition-Based Label-Free Quantification Enables In-Depth Proteomic Characterization of Wheat Amylase/Trypsin Inhibitor Extracts. *J Proteome Res*. 2021;20(3):1544-57.
12. Ziegler K, Neumann J, Liu F, Fröhlich-Nowoisky J, Cremer C, Saloga J, et al. Nitration of Wheat Amylase Trypsin Inhibitors Increases Their Innate and Adaptive Immunostimulatory Potential in vitro. *Front Immunol*. 2018;9:3174.
13. Neumann J, Ziegler K, Gelléri M, Fröhlich-Nowoisky J, Liu F, Bellinghausen I, et al. Nanoscale distribution of TLR4 on primary human macrophages stimulated with LPS and ATI. *Nanoscale*. 2019;11(19):9769-79.
14. Zevallos VF, Yogev N, Hauptmann J, Nikolaev A, Pickert G, Heib V, et al. Dietary wheat amylase trypsin inhibitors exacerbate CNS inflammation in experimental multiple sclerosis. *Gut*. 2023;73(1):92-104.
15. Carroccio A, Mansueto P, Soresi M, Fayer F, Di Liberto D, Monguzzi E, et al. Wheat Consumption Leads to Immune Activation and Symptom Worsening in Patients with Familial Mediterranean Fever: A Pilot Randomized Trial. *Nutrients*. 2020;12(4).
16. Preuschen G, Shaw BT, Campbell JR, Curtis SE. Norman Ernest Borlaug - The green Revolution. *Encyclopaedia Britannica*. 2024.
17. H. Thomas Stalker MLW, Jack R. Harlan. Harlan's Crops and Man: People, Plants and Their Domestication: American Society of Agronomy, Inc. and Crop Science Society of America, Inc.; 12 March 2021.
18. Evans LT. Feeding the Ten Billion - Plants and Population Growth November 1998. 264 p.
19. Dos Santos Guilherme M, Zevallos VF, Pesi A, Stoye NM, Nguyen VTT, Radyushkin K, et al. Dietary Wheat Amylase Trypsin Inhibitors Impact Alzheimer's Disease Pathology in 5xFAD Model Mice. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17).

20. Ashfaq-Khan M, Aslam M, Qureshi MA, Senkowski MS, Yen-Weng S, Strand S, et al. Dietary wheat amylase trypsin inhibitors promote features of murine non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2019;9(1):17463.
21. Gale L, Wimalaratna H, Brotodiharjo A, Duggan JM. Down's syndrome is strongly associated with coeliac disease. *Gut*. 1997;40(4):492-6.
22. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*. 2019;17(1):142.
23. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*. 1997;3(7):797-801.
24. Dieterich W, Laag E, Schöpfer H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1317-21.
25. Schiapatti A, Savioli J, Venero M, Borrelli de Andreis F, Perfetti L, Meriggi A, Biagi F. Pitfalls in the Diagnosis of Coeliac Disease and Gluten-Related Disorders. *Nutrients*. 2020;12(6).
26. Felber J, Bläker H, Fischbach W, Koletzko S, Laaß M, Lachmann N, et al. Aktualisierte S2k-Leitlinie Zöliakie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol*. 2022;60(5):790-856.
27. Bruins MJ. The clinical response to gluten challenge: a review of the literature. *Nutrients*. 2013;5(11):4614-41.
28. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1731-43.
29. Lebowitz B, Kapel RC, Neugut AI, Green PH, Genta RM. Adherence to biopsy guidelines increases celiac disease diagnosis. *Gastrointest Endosc*. 2011;74(1):103-9.
30. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1981-2002.
31. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11(10):1185-94.
32. Villanacci V, Ceppa P, Tavani E, Vindigni C, Volta U. Coeliac disease: the histology report. *Dig Liver Dis*. 2011;43 Suppl 4:S385-95.
33. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(1):160-6.
34. Akobeng AK, Thomas AG. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(11):1044-52.
35. Yachha SK, Srivastava A, Mohindra S, Krishnani N, Aggarwal R, Saxena A. Effect of a gluten-free diet on growth and small-bowel histology in children with celiac disease in India. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(8):1300-5.
36. Aydogdu S, Midyat L, Cakir M, Tumgor G, Yuksekkaya HA, Baran M, et al. Long-term effect of gluten-free diet on growth velocity in Turkish children with celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2009;54(10):2183-7.
37. Pietzak MM. Follow-up of patients with celiac disease: achieving compliance with treatment. *Gastroenterology*. 2005;128(4 Suppl 1):S135-41.
38. Worm M, Reese I, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Bischoff SC, Claßen M, et al. Leitlinie zum Management IgE-vermittelter Nahrungsmittelallergien. *Allergo Journal*. 2015;24:38-77.
39. Lebowitz B, Rubio-Tapia A. Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2021;160(1):63-75.
40. Nowak-Węgrzyn A, Chehade M, Groetch ME, Spergel JM, Wood RA, Allen K, et al. International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome: Executive summary-Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):1111-26.e4.
41. Fritscher-Ravens A, Schuppan D, Ellrichmann M, Schoch S, Röcken C, Brasch J, et al. Confocal endomicroscopy shows food-associated changes in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2014;147(5):1012-20.e4.

42. Fritscher-Ravens A, Pflaum T, Möisinger M, Ruchay Z, Röcken C, Milla PJ, et al. Many Patients With Irritable Bowel Syndrome Have Atypical Food Allergies Not Associated With Immunoglobulin E. *Gastroenterology*. 2019;157(1):109-18.e5.
43. Skodje GI, Sarna VK, Minelle IH, Rolfsen KL, Muir JG, Gibson PR, et al. Fructan, Rather Than Gluten, Induces Symptoms in Patients With Self-Reported Non-Celiac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology*. 2018;154(3):529-39.e2.
44. Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Bonfili L, Cecarini V, Giangrossi M, Falconi M, et al. Interfering with the high-affinity interaction between wheat amylase trypsin inhibitor CM3 and toll-like receptor 4: in silico and biosensor-based studies. *Sci Rep*. 2017;7(1):13169.
45. Altenbach SB, Vensel WH, Dupont FM. The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Res Notes*. 2011;4:242.
46. Pickert G, Wirtz S, Matzner J, Ashfaq-Khan M, Heck R, Rosigkeit S, et al. Wheat Consumption Aggravates Colitis in Mice via Amylase Trypsin Inhibitor-mediated Dysbiosis. *Gastroenterology*. 2020;159(1):257-72.e17.
47. Engel S, Klotz L, Wirth T, Fleck AK, Pickert G, Eschborn M, et al. Attenuation of immune activation in patients with multiple sclerosis on a wheat-reduced diet: a pilot crossover trial. *Ther Adv Neurol Disord*. 2023;16:17562864231170928.
48. Timmermans S, Bogie JFJ, Vanmierlo T, Lütjohann D, Stinissen P, Hellings N, Hendriks JJA. High Fat Diet Exacerbates Neuroinflammation in an Animal Model of Multiple Sclerosis by Activation of the Renin Angiotensin System. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2014;9(2):209-17.
49. Armandi A, Bespaljko H, Mang A, Huber Y, Michel M, Labenz C, et al. Short-term reduction of dietary gluten improves metabolic-dysfunction associated steatotic liver disease: A randomised, controlled proof-of-concept study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2024;59(10):1212-22.
50. USDA. Grain: World Markets and Trade In: Service USDoAFA, editor. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf2023>.
51. Obesity and overweight [Internet]. 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
52. Rasouli N, Molavi B, Elbein SC, Kern PA. Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2007;9(1):1-10.
53. Fleck AK, Schuppan D, Wiendl H, Klotz L. Gut-CNS-Axis as Possibility to Modulate Inflammatory Disease Activity-Implications for Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
54. Allison DB, Bassaganya-Riera J, Burlingame B, Brown AW, le Coutre J, Dickson SL, et al. Goals in Nutrition Science 2015–2020. *Frontiers in Nutrition*. 2015;2.
55. Stephanie Hucke ME, Marie Liebmann , Martin Herold , Nicole Freise , Annika Engbers , Petra Ehling , Sven G. Meuth , Johannes Roth , Tanja Kuhlmann , Heinz Wiendl , Luisa Klotz. Sodium chloride promotes pro-inflammatory macrophage polarization thereby aggravating CNS autoimmunity. *Journal of Autoimmunity Elsevier*. 2016.
56. Li H, Zhu Y, Zhao F, Song S, Li Y, Xu X, et al. Fish oil, lard and soybean oil differentially shape gut microbiota of middle-aged rats. *Scientific Reports*. 2017;7(1):826.
57. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB, O'Shea CA, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome*. 2017;5(1):4.
58. Dinan TG, and John F Cryan. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *The journal of physiology* 5952 (2017): 489–503 Web. 2016.
59. Korpela K, Salonen A, Virta LJ, Kekkonen RA, Forslund K, Bork P, de Vos WM. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nature Communications*. 2016;7(1):10410.
60. Kamada N, Kim Y-G, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, Núñez G. Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete with the Gut Microbiota. *Science*. 2012;336(6086):1325-9.
61. Schéle E, Grahemo L, Anesten F, Hallén A, Bäckhed F, Jansson J-O. The Gut Microbiota Reduces Leptin Sensitivity and the Expression of the Obesity-Suppressing Neuropeptides Proglucagon

- (Gcg) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) in the Central Nervous System. *Endocrinology*. 2013;154(10):3643-51.
62. Reigstad CSea. "Gut Microbes Promote Colonic Serotonin Production through an Effect of Short-chain Fatty Acids on Enterochromaffin Cells." *The FASEB journal : the official journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 294 (2015): 1395–1403 Web. 2015.
  63. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Pouillet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(33):14691-6.
  64. Carlo Catassi EF, Giuseppe Iacono, Cinzia D'Agate, Ruggiero Francavilla, Federico Biagi, Umberto Volta, Salvatore Accomando, Antonio Picarelli, Italo De Vitis, Giovanna Pianelli, Rosaria Gesuita, Flavia Carle, Alessandra Mandolesi, Italo Bearzi, Alessio Fasano. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease<sup>2</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007.
  65. Tack GJ, Verbeek WHM, Schreurs MWJ, Mulder CJJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2010;7(4):204-13.
  66. Volta U, Caio G, Stanghellini V, De Giorgio R. The changing clinical profile of celiac disease: a 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral center. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:194.
  67. Catassi C, Rossini M, Rättsch IM, Bearzi I, Santinelli A, Castagnani R, et al. Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: a clinical and jejunal morphometric study. *Gut*. 1993;34(11):1515-9.
  68. Sollid LM, Lundin KE. [Disease mechanisms in coeliac disease]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2003;123(22):3230-3.
  69. Verdu EF, Schuppan D. Co-factors, Microbes, and Immunogenetics in Celiac Disease to Guide Novel Approaches for Diagnosis and Treatment. *Gastroenterology*. 2021;161(5):1395-411.e4.
  70. Catassi C, Elli L, Bonaz B, Bouma G, Carroccio A, Castillejo G, et al. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients*. 2015;7(6):4966-77.
  71. Geisslitz S, Ludwig C, Scherf KA, Koehler P. Targeted LC-MS/MS Reveals Similar Contents of  $\alpha$ -Amylase/Trypsin-Inhibitors as Putative Triggers of Nonceliac Gluten Sensitivity in All Wheat Species except Einkorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(46):12395-403.
  72. Niedobitek G, Barros MH, Dreyer JH, Hauck F, Al-Sheikhyaqoob D. Tumorassozierte Makrophagen. *Der Pathologe*. 2015;36(5):477-84.
  73. Caio G, Lungaro L, Segata N, Guarino M, Zoli G, Volta U, De Giorgio R. Effect of Gluten-Free Diet on Gut Microbiota Composition in Patients with Celiac Disease and Non-Celiac Gluten/Wheat Sensitivity. *Nutrients*. 2020;12(6).
  74. Liwinski T, Hübener S, Henze L, Hübener P, Heinemann M, Tetzlaff M, et al. A prospective pilot study of a gluten-free diet for primary sclerosing cholangitis and associated colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2023;57(2):224-36.
  75. König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A, et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2016;7(10):e196.
  76. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, Gewirtz AT. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 2015;519(7541):92-6.
  77. Bjarnason I, Ward K, Peters T. THE LEAKY GUT OF ALCOHOLISM: POSSIBLE ROUTE OF ENTRY FOR TOXIC COMPOUNDS. *The Lancet*. 1984;323(8370):179-82.
  78. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993;81(6):1607-13.
  79. Weaver KMC. *Janeway Immunologie* 2018.

## 8. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir während meines Medizinstudiums sowie in der Phase meines experimentellen Forschungsprojektes stets mit Unterstützung und Rückhalt zur Seite gestanden haben.

Ebenso danke ich meinem Professor für die freundliche Überlassung dieses Themas sowie für die fachliche Begleitung und das Maß an Menschlichkeit, Empathie, Vertrauen und Wertschätzung, das mir entgegengebracht wurde.

Mein Dank gilt zudem meiner Betreuerin, die mich in der Anfangsphase meiner Zeit als Doktorand unterstützt hat. Ferner bin ich auch einigen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und ihre Ratschläge dankbar.

Meine Zeit als Doktorand und Hilfswissenschaftler werde ich stets in positiver Erinnerung behalten.



## Wissenschaftliche Publikationen – Originalarbeiten

**Meningeal Solitary Fibrous Tumor: A Single-Center Retrospective Cohort Study.** Siyer Roohani <sup>1 2 3</sup>, Yasemin Alberti <sup>4</sup>, Maximilian Mirwald <sup>1</sup>, Felix Ehret <sup>1 3</sup>, Carmen Stromberger <sup>5</sup>, **Soleiman Fabris Roohani** <sup>1</sup>, Katja Bender <sup>1</sup>, Anne Flörcken <sup>3 6</sup>, Sven Märdian <sup>7</sup>, Daniel Zips <sup>1 3</sup>, David Kaul <sup>1</sup> Sarcoma. 2024 Jan 17;2024: 8846018.doi: 10.1155/2024/8846018.