

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

**Synthetische Curcuminoide und Garcinoide als niedermolekulare
Medikamente zur Modulation von Krebszellen und des
Immunmicroenvironment beim malignen Melanom**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Mark André Henry Traenckner
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2025

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

Tag der Promotion: 17.02.2025

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer (engl.)
AMD3100	Plerixafor, ein CXCR4 Antagonist
APC	Antigen präsentierende Zellen
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophage (engl.)
BRAF-Gen	B- Rat Fibrosarcoma (engl.)
BRAF-V600-Mutation	Mutation des Gens BRAF im Codon 600
CAFs	Cancer Associated Fibroblasts (engl.)
CCL-3	Chemokine Ligand 3 (engl.)
CD	Cluster of Differentiation (engl.)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
KI95	Konfidenzintervall 95
CXCL12	C-X-C Chemokin 12
CXCR4	Chemokin Rezeptor Typ 4
D	Deutschland
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern (engl.)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FIZZ1	Found In Inflammatory Zone 1 (engl.)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophagen Colony Stimulating Factor (engl.)
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin
iNOS (NOS2)	Inducible Nitric Oxide Synthase (engl.)
LDH	Laktatdehydrogenase
LDTF	Lineage Determining Transcription Factor (engl.)
LPS	Lipopolysaccharid
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cells (engl.)
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen
MEM	mrc1 (CD206) exprimierende Makrophagen
MHC	Major Histocompatibility Complex (engl.)
miRNA	Mikro-RNA
MoDC	Monocyte-derived Dendritic Cell (engl.)
MRC1	Mannose Receptor C-Type 1 (engl.)

ncRNA	nicht kodierende RNA
NGS	New Generation Sequencing (engl.)
p53	Protein 53
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (engl.)
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1 (engl.)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1 (engl.)
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (engl.)
PRR	Pattern Recognition Receptor (engl.)
R1-/R2-Resektion	R1-Resektion: Makroskopisch wurde der Tumor entfernt. In der Histopathologie sind jedoch kleinere Tumoranteile im Resektionsrand nachweisbar. R2-Resektion: Größere, makroskopisch sichtbare Teile des Tumors konnten nicht reseziert werden (Erhalt lebenswichtiger Strukturen)
RAS	Rat Sarcoma (engl.)
RB Gen	Retinoblastoma Gen
S100B	Das S100 Kalzium bindende Protein B ist ein Protein der S-100 Protein Familie
SEM	Standardfehler
SOCS3	Suppressor of Cytokine Signaling 3 (engl.)
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription Factor 3 (engl.)
SW480	Eine von einem humanen Kolorektalkarzinom abgeleitete Zelllinie
TAM	Tumor Assoziierter Makrophage
TCR	T-Zell Rezeptor
Teff	T-Effektorzelle
TGF- β	Transforming Growth Factor beta (engl.)
T _H	T-Helferzelle
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TLR	Toll Like Receptor (engl.)

TME	Tumor Microenvironment (engl.)
TMN-Klassifikation	T – Tumor, M – Metastasierung, N – Nodus (Lymphknoten)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha (engl.)
TP53 Gen	Tumor Protein 53 Gen
Treg	regulatorische T-Zelle
UICC	Union internationale contre le cancer
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A (engl.)
WHO	World Health Organization (engl.)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sechs Charakteristika von Tumorzellen.....	17
Abbildung 2: Zwei weitere 2011 benannte Charakteristika von Tumorzellen.....	18
Abbildung 3: Zellen des TME und die charakteristischen Typen des TME	23
Abbildung 4: Zellinteraktionen im TME	24
Abbildung 5: Zyklische Interaktion von Malignomen und dem Immunsystem	26
Abbildung 6: Die Heterogenität und Charakterisierung von Makrophagen.....	29
Abbildung 7: Immunonkologische Therapiehypothese zur Behandlung hepatozellulärer Karzinome	31
Abbildung 8: STAT3 und das TME	42
Abbildung 9: Biochemische Daten und Strukturformeln der zu testenden Wirkstoffe	56
Abbildung 10: Beispielhafte Photographie der äußeren (links) und inneren Oberfläche (rechts) der linken Lunge eines Versuchstiers.....	66
Abbildung 11 Bearbeitung der H&E Schnitte mittels ImageJ	67
Abbildung 12: Beispiel der nur stellenweise vorhandenen Melaninablagerungen bei vornehmlich solider lokoregionärer Infiltration von Lungenmetastasen in einer HE-Färbung	69
Abbildung 13: Beispiel einer diffusen lokoregionären Infiltration von Lungenmetastasen in einer HE-Färbung.....	70
Abbildung 14: Ausfall des Wirkstoffs Difid bei niedrigen Konzentrationen	71
Abbildung 15: Zytotoxizität von LPS in an THP-1 Makrophagen	72
Abbildung 16: Lineare Regressionskurve zur Berechnung der Steigung der Trendlinie bei 59 °C Annealing Temperatur am Beispiel eines GAPDH Primers	75
Abbildung 17: Graph zur Visualisierung der Effizienzänderung in der Verdünnungsreihe. Test bei 59 °C Annealing Temperatur am Beispiel eines GAPDH Primers	76
Abbildung 18: Lineare Regressionskurve zur Berechnung der Steigung der Trendlinie bei 59 °C Annealing Temperatur am Beispiel eines GAPDH Primers	77
Abbildung 19: Graph zur Visualisierung der Effizienzänderung in der Verdünnungsreihe	78
Abbildung 20: Zytotoxizität von Garcinoiden und Curcuminoiden an Makrophagen	83
Abbildung 21: Zytotoxizität von Garcinoiden und Curcuminoiden an benignen Zellen	84
Abbildung 22: Zytotoxizität von Garcinoiden und Curcuminoiden an malignen Zellen	85
Abbildung 23: Evaluation der Arbeitslösungen, Platte 1	87
Abbildung 24: Evaluation der Arbeitslösungen, Platte 2	87
Abbildung 25: Evaluation der Arbeitslösungen, Platte 3	88
Abbildung 26: Evaluation der Arbeitslösungen, Platte 4	88
Abbildung 27: Assay Methode für die Evaluation der Arbeitslösungen	89
Abbildung 28: In vivo Toxizität der Wirkstoffe Isogarcinol und MePip	90
Abbildung 29: Körpergewicht der Versuchstiere im Zeitverlauf	91

Abbildung 30: Milzgewicht und Lungengewicht der Versuchstiere im Vergleich.....	92
Abbildung 31: Makroskopische Metastasenzählung nach Größe im Vergleich.....	93
Abbildung 32: Messung der gewebefreien Fläche der HE-Präparate.....	94
Abbildung 33: Evaluation und Vergleich der Polarisierung von humanen THP-1 Makrophagen nach Erntezeitpunkt.....	95
Abbildung 34: Evaluation der verlängerten Polarisierung von humanen THP-1 Makrophagen nach Erntezeitpunkt.....	96
Abbildung 35: Relative Expression der Makrophagenphänotypmarker nach indizierter Polarisierung.....	97
Abbildung 36: Evaluation und Vergleich des Polarisierungseffekts an murinen BMDM und humanen THP-1 Makrophagen.....	98
Abbildung 37: Evaluation und Vergleich des Polarisierungseffekts bei murinen BMDM.....	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	46
Tabelle 2: Zellkulturmedien	48
Tabelle 3: Geräte.....	48
Tabelle 4: Kits.....	50
Tabelle 5: Primer für rt-qPCR (Quantitative real time PCR).....	50
Tabelle 6: Reagenzien	51
Tabelle 7: Rezepte	53
Tabelle 8: Zytokine, verwendet für die rt qPCR.....	54
Tabelle 9: Antikörper, verwendet für die immunhistochemischen Färbeversuche	54
Tabelle 10: Zelllinien, verwendet für Zytotoxizitätsassays, rt qPCR und Tierversuch.....	55
Tabelle 11: Zellkulturmethoden der für Zytotoxizitätsassays, rt-qPCR und Tierversuch verwendeten Zelllinien	57
Tabelle 12: IC ₅₀ Curcuminoide und Garcinoide	82

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Inhaltsverzeichnis.....	9
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	12
1.1 Krebs	12
1.2 Karzinogenese und molekulare Grundlagen der Tumorbilogie.....	13
1.3 Das Maligne Melanom	19
1.3.1 Epidemiologie	19
1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren	19
1.3.3 Diagnostik.....	19
1.3.4 Therapie	20
1.4 Tumor microenvironment	21
1.4.1 Tumor microenvironment als zentraler Regulator der Tumorbilogie.....	21
1.5 Makrophagen.....	25
1.5.1 Grundsätzliche Biologie	25
1.5.2 Antigenpräsentation und Phagozytose	25
1.5.3 Plastizität und Polarisierung von Makrophagen.....	26
1.5.4 Makrophagenpolarisation - <i>In vitro</i> Modelle.....	32
1.5.5 Hintergrund der evaluierten Genexpressionsmarker.....	32
1.6 Antineoplastische Therapien.....	36
1.6.1 Onkologische Immuntherapie	36
1.6.2 STAT3 als Ziel in der Immuntherapie	40
1.7 Antitumor-Naturstoffe und Referenzsubstanzen	43
1.7.1 Curcumin	43
1.7.2 MePip.....	43
1.7.3 Garcinol und Isogarcinol	44
1.8 Mausmodelle in der immunologischen Krebsforschung.....	44
1.9 Ziel und Fragestellung.....	46

2	Material und Methoden	46
2.1	Material.....	46
2.1.1	Verbrauchsmaterial	46
2.1.2	Zellkulturmedien	48
2.1.3	Geräte.....	48
2.1.4	Kits.....	50
2.1.5	Primer	50
2.1.6	Reagenzien	51
2.1.7	Rezepte	53
2.1.8	Zytokine	54
2.1.9	Antikörper	54
2.1.10	Wirkstoffe	56
2.2	Methoden.....	57
2.2.1	Zellkulturmethoden.....	57
2.2.2	qPCR Analyse	62
2.2.3	Tierversuch.....	65
2.2.4	Auswertung des Tierversuchs.....	65
2.2.5	Qualitätskontrolle und Versuchsetablierung	71
2.2.6	Statistische Analyse	80
3	Ergebnisse.....	81
3.1	Screening der Wirkstoffe.....	81
3.1.1	Zytotoxizität (Resazurin-Reduktions-Assay).....	81
3.2	<i>In vivo</i> Testung	90
3.2.1	<i>In vivo</i> Toxizität der Wirkstoffe Isogarcinol und MePip.....	90
3.2.2	<i>In vivo</i> Testung von Isogarcinol und MePip.....	91
3.3	Hämatoxylin und Eosin (HE)- Färbung	94
3.4	Makrophagenrepolarisation	94
4	Diskussion	100
4.1	Allgemeine Schwächen der Modelle.....	101
4.1.1	Zytotoxizitätsassay	101

4.1.2	Makrophagenpolarisation.....	102
4.1.3	Tiermodell.....	103
4.2	Evaluation der Wirkstoffe	105
4.2.1	<i>In vitro</i> Evaluation der Wirkstoffe	105
4.2.2	Makrophagenrepolarisation	105
4.2.3	<i>In vivo</i> Evaluation der Wirkstoffe.....	108
4.2.4	Ausblick	108
5	Zusammenfassung.....	112
6	Literatur	113
7	Danksagung	125
8	Tabellarischer Lebenslauf	126

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1 Krebs

Der umgangssprachlich genutzte Begriff Krebs bezeichnet eine maligne (böartige) Erkrankungen, wie beispielsweise Karzinome, Sarkome, Leukämien oder maligne Lymphome. Die Erschließung neuer Behandlungsmöglichkeiten und -mechanismen zur Krebstherapie ist von höchster Relevanz, da Krebs die zweithäufigste Todesursache weltweit ist (2). In Deutschland sind 2018 ca.233.000 Frauen und 265.000 Männer an Krebs erkrankt (3). Weiterhin ist aufgrund des demographischen Wandels von einer Zunahme der Erkrankungsfälle auszugehen (3). Die Vielfalt der Krebserkrankungen und ihre Heterogenität erschweren Diagnose und Therapie (2, 4, 5). Bei Männern entwickelt sich Krebs, in genannter Reihenfolge, am häufigsten in Prostata, Lunge, Darm, Harnblase und Leber. Bei Frauen ist Brustkrebs die häufigste Krebsart. Dem Brustkrebs folgen, ebenfalls in genannter Reihenfolge, Karzinome der Lunge, kolorektale Karzinome, sowie Endometrium- und Schilddrüsenkarzinome (6). Die Einteilung von Neoplasien in gut- (benigne) und böartig (maligne) ist potentiell irreführend. Maligne Krebserkrankungen können mit einer geringeren Krankheitslast einhergehen, als benigne Neoplasien. Beispielsweise ist der klinische Verlauf von myelodysplastische Syndromen in der Regel belastender, als bisher nicht metastasierte papilläre Schilddrüsenkarzinome (3). Ein weiteres Beispiel für die Heterogenität von Krebsarten ist die Bezeichnung „Borderline-Tumor“. Eine Neoplasie, die nicht klar als benigne oder maligne eingestuft werden kann.

Es besteht daher ein klinischer Konsens, dass in Expertenrunden, bei sogenannten multidisziplinären Tumorboards (Tumorkonferenzen), diskutiert werden sollte, wie genau der einzelne Patient behandelt wird (7). Biomedizinische Aspekte der Krebstherapie, wie die genaue Typisierung der Krebsart, seine bisherige Behandlung in Form von medikamentösen oder chirurgischen Therapien werden evaluiert und in die Auswahl des Therapieverfahrens miteinbezogen. Andere Patientenfaktoren, wie der Patientenwille, die Ausgeprägtheit des Therapiewunschs und soziale Faktoren, wie die familiäre Unterstützung und häusliche Versorgung sollen ebenso für Therapieentscheidungen hinzugezogen werden (7).

Die Weiterentwicklung molekulargenetischer Verfahren, speziell mit der Nutzung von New Generation Sequencing ((NGS), deutsch: massives paralleles Sequenzieren des Transkriptoms), bieten, bei vertretbarem Aufwand, neue Möglichkeiten für personalisierte Therapien. Die diversen identifizierten Antigene und targetierbaren Mutationen eignen sich als Zielstrukturen für die Krebsimmuntherapie (8). Der Einsatz der Medikamente, die diese molekulare Pathomechanismen ausnutzen und so dem Immunsystem ermöglichen sollen der Krebserkrankung zu trotzen, sind weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. In den letzten

Jahren wurden bereits diverse neue targetierbare Mutationen entdeckt und passende Medikamente entwickelt. Für komplexe Fälle kann in molekularen Tumorboards die Entscheidung über etwaige Therapieansätze und Studieneinschlüsse von passenden Patienten diskutiert werden. Das Etablieren dieser Tumorboards stellt in der klinischen Onkologie eine Herausforderung dar (9).

Nachfolgend sollen Informationen über die Grundlagen der Tumorbioogie und die moderne Therapie von Malignomen dargelegt werden. Es soll das Verständnis für die immunologischen Interaktionen von Tumorzellen, speziell in Bezug auf die Rolle von Makrophagen im TME geschult werden, um Implikationen dieser zellulären Interaktionen für neue Therapiemöglichkeiten einordnen zu können. Ebenfalls soll die Herangehensweise der für diese Dissertation betriebenen Grundlagenforschung verständlich erläutert werden. Abschließend soll auch ein Ausblick auf mögliche weitere Untersuchungen gegeben werden und der Zusammenhang zum aktuellen Stand der Forschung bei der Therapie von Malignomen. Dabei ist der Hinweis wichtig, dass hierzu gegebene Informationen keinesfalls den Anspruch auf Vollständigkeit haben können. Gerade molekulare immunonkologische Mechanismen sind hochkomplex und können daher nicht in Gänze beleuchtet werden. Es soll ein Einblick in das zentrale Thema dieser Arbeit, die Erschließung neuer Behandlungsmöglichkeiten und -mechanismen zur Krebstherapie, ermöglicht werden.

1.2 Karzinogenese und molekulare Grundlagen der Tumorbioogie

Krebs ist eine komplexe genetische Erkrankung, die durch Mutationen von DNA entstehen kann. Die Risikofaktoren für die Entstehung der Mutationen sind vielfältig und je nach entartendem Gewebe unterschiedlich. Jedoch ist das hohe Alter, durch die Verlängerung der Karzinogenese selbst, der größte Risikofaktor für Krebs (10). Mutierte Gene, wie beispielsweise TP53 oder RB, sind teilweise Bestandteil zellulärer Regulationssysteme, speziell des Zellzyklus.

Schon Mitte des 20. Jahrhunderts wurden überzeugende Arbeiten veröffentlicht, die die Existenz einer Tumormunität zeigten (8, 11, 12). Hanahan und Weinberg beschrieben im Jahre 2000 sechs Kennzeichen von Krebs (engl.: hallmarks of -cancer), welche sie im Jahre 2011 mit einem verbesserten Verständnis der Tumorbioogie um ermöglichende und entstehende Charakteristika erweiterten. Seither entwickelte sich die immunonkologische Forschung quasi exponentiell. Die Eigenschaften von Malignomen sollen im Folgenden zum besseren Verständnis therapierelevanter Grundlagen der Tumorbioogie kurz abgehandelt werden.

1. Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose)

Viele alterierte Signalwege resultieren in einer Inaktivierung des programmierten Zelltods. Der Prozess des programmierten Zelltods funktioniert somit bei vielen Malignomen nicht mehr, sodass ein unkontrolliertes Zellwachstum ermöglicht wird (13). Tumorzellen entwickeln verschiedene Wege, die eigene Apoptose zu verhindern. Der häufigste bekannte Mechanismus ist der Verlust der Funktion des TP53 Tumorsuppressorgens. Tumorsuppressorgene sind den Zellzyklus negativ regulierende, proliferationshemmende Gene. Sie beeinflussen neben den positiv regulierenden, proliferationsfördernden Protoonkogenen (Onkogenen) das Fortschreiten des Zellzyklus. Dabei ist die Mutation eines Tumorsuppressorgens auf zwei Allelen oder die eines Onkogens auf einem Allel nötig. Mutationen dieser Gene resultieren oft in der Veränderung von essentiellen intrazellulären Signalwegen oder Reparaturmechanismen. Die p53 Proteine erkennen kritische Zellschäden und halten daraufhin die Progression des Zellzyklus an und ermöglichen Reparaturmechanismen, die Zellschäden ausmerzen oder die Apoptose der geschädigten Zelle auslösen. Über Sensoren wird entschieden, ob das Genom exzessiv geschädigt ist oder das intrazelluläre Milieu über eine suboptimale Konzentration von Nucleotiden, Glucose oder Sauerstoff verfügt. Je nach Dauer und Intensität und der Signale erfüllen die p53 Proteine eine der genannten Funktionen. Allerdings sind die Effekte von aktivierten p53 Proteinen, bzw. des zugehörigen TP53 Tumorsuppressorgens sehr komplex und je nach Kontext, Zelltyp und Persistenz von empfangenen Signalen unterschiedlich (1).

1. Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen

Ähnlich der Vermeidung von Apoptose durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen können Tumorzellen, ebenfalls durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen, eine Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen entwickeln. Diese führt zur Aktivierung von die Zellteilung beschleunigenden Signalwegen. Je nach Signalen, die die Zelle erreicht, „entscheidet“ sie sich zu proliferieren, in einen Zustand der Ruhe zu verfallen (engl.: cellular senescence) oder gegebenenfalls apoptotische Signalwege zu aktivieren (1). Beispielsweise spielt das RB-Protein eine zentrale Rolle als Kontrollpunkt zellulärer regulatorischer Kreisläufe, die diverse extra- und intrazelluläre Signale integrieren (14). RB induziert speziell wachstumshemmende Signale, die ihren Ursprung meist extrazellulär finden, weshalb die Mutation des RB Tumorsuppressorgens zur malignen Transformation einer Zelle beitragen kann (1).

2. Aufrechterhalten der Zellproliferation

Telomere, die sich an den Enden von Chromosomen befinden, sind zentral in die Immortalisierung von Krebszellen involviert. Sie verkürzen sich normalerweise progressiv bei

wiederkehrender Zellteilung. Die Telomerase ist bei Stammzellen, wie auch bei Krebszellen, in der Regel kontinuierlich aktiv. Sie kann die telomerische DNS wieder aufbauen und hilft die Zellproliferation aufrecht zu erhalten (15).

3. Fortwährende Angiogenese

Tumorgewebe muss, wie gesunde Gewebe auch, mit Nährstoffen versorgt werden. Man kann die tumorassoziierte, oft ungerichtete Neovaskularisierung von Tumoren bereits früh in ihrer Entwicklung beobachten. Dabei ist die erhöhte Ausschüttung von proangiogenetischen Faktoren, wie beispielsweise VEGF-A (engl.: vascular endothelial growth factor A), zu beobachten. Er wird heutzutage erfolgreich bei verschiedenen Krebstherapien, beispielsweise durch den monoklonalen Antikörper Bevacizumab, targetiert (16).

4. Selbstversorgung mit Wachstumssignalen

Krebszellen können auf unterschiedliche Weisen ihre Proliferation aufrechterhalten. Beispielsweise kann die Produktion von autokrinen Wachstumsfaktoren, die an Oberflächenrezeptoren binden, Zellproliferation ermöglichen. Andererseits ist auch die Stimulation von tumorassoziierten Stromazellen möglich, die die benötigten Wachstumsfaktoren produzieren.

5. Gewebeinvasion und Metastasierung

Der Prozess der Metastasierung (Bildung von Metastasen) bestimmt im Zuge einer Krebserkrankung bei den meisten Malignomen maßgeblich die Prognose und ist für über 90 % der tumorassoziierten Mortalität verantwortlich (17). Er ist pathophysiologisch hochkomplex und involviert zahlreiche Signalwege und zelluläre Prozesse. Er tritt, im Vergleich zur Angiogenese, eher spät in der Tumorentwicklung auf. Es ist daher nicht überraschend, dass metastasierende Tumorzellpopulationen eine höhere genomische Variabilität zeigen als nicht metastasierende Zellklone, da sie ihre Fähigkeit der Adhäsion im Zellverband verlieren, sowie die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Migration erlangen müssen. Die wohl am besten beschriebene Alteration von metastasierenden Krebszellen ist der Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin (auch Cadherin 1 genannt). Er ist Teil der pathologischen Transition von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp bei der zellulären Entwicklung eines Karzinoms (1, 18).

6. Genominstabilität und Mutationen

Sammeln sich Mutationen im Genom einer Zelle an, wird es mit der Zeit instabil. Die mutierten Zellen verändern ihren Phänotyp und entdifferenzieren. Es entwickelt sich, unter anderem eine intratumorale genetische Heterogenität, da einzelne Zellen unterschiedlich mutieren und sich epigenetisch verändern (19). Entsprechend kann auch die Immunogenität der Tumorzellen in

verschiedenen Arealen des Tumors unterschiedlich sein. Der Tumor ruft dann beispielsweise in einem bestimmten Areal eine besonders starke Entzündungsreaktion hervor und schrumpft, während er in einem anderen Areal für das Tumorstadium vorteilhaftere Mutationen erlangt und aggressiver wächst (20). In diesem Kontext ist allerdings zu erwähnen, dass eine starke Entzündungsreaktion das Tumorstadium, zum Beispiel über eine Überexpression von PD-L1, auch fördern kann (21). Heute wissen wir, dass die Entwicklung von Krebserkrankungen auf zellulärer Ebene von sogenannten Treibermutationen dominiert wird, die für das Ansprechen bei gezielten Therapien maßgeblich sind. Da die Mutation für den Wachstumsvorteil der Tumorzelle verantwortlich ist, ist ein Targetieren dieser Mutation sinnvoll. Viele andere Mutationen im Genom eines Tumors sind für die Entwicklung von malignen Eigenschaften unerheblich. Das Unterscheiden dieser Treibermutationen von anderen Mutationen ist daher essentiell für den Therapieerfolg (22).

8. Tumor-fördernde Entzündung

Chronische Entzündungen können die Entwicklung der Charakteristika von Tumorzellen einleiten und unterstützen. Tatsächlich geht man davon aus, dass ca. 25 % der Karzinome aufgrund von chronischen Entzündungen und Infektionen entstehen (23). Immunzellen tragen durch die Sezernierung von bioaktiven Molekülen, wie Wachstumsfaktoren, Matrixmetalloproteinasen oder mutagenen Substanzen (z. B. Sauerstoffradikale) zur Progression der Tumorerkrankung bei. Sie helfen auf diese Weise dabei ein wachstumsförderndes Mikromilieu zu generieren (1, 24).

9. Spezifische Veränderungen des Energie- und Intermediärstoffwechsels

Die hohe Wachstumsrate von Tumorzellen erfordert die Dysregulation des physiologischen Metabolismus. Sie limitieren ihren Energiestoffwechsel auf die Glykolyse, ohne den Krebszyklus zu nutzen, was zu einem ineffizienten und dadurch unproportional erhöhten Umsatz von Glucose führt. Interessanterweise gehen diese metabolischen Veränderungen mit denselben Treibermutationen einher, die für andere Charakteristika von Tumorzellen verantwortlich sind. Beispielsweise sind aktivierte Onkogene oder mutierte Tumorsuppressorgene, wie RAS oder TP53, mit der verstärkten Glykolyse assoziiert (1).

10. Immunevasion

Krebszellen können von Immunzellen erkannt und abgetötet werden. Jedoch sind Mechanismen der Immuninduktion störanfällig und werden von Tumorzellen unterwandert. Es entsteht eine immunologische Toleranz gegenüber entarteten Zellen, welche die Ausbreitung von malignen Tumoren ermöglicht. Im gesunden Organismus schützt das Immunsystem mittels Immunüberwachung (engl. Immunosurveillance) vor der Entstehung von Malignomen (25, 26). Es ist daher wenig überraschend, dass immunsupprimierte Individuen ein erhöhtes

Risiko für die Entwicklung von Malignomen tragen. Die Immunevasion, die in der Pathogenese von Tumoren zum Tragen kommt, wird im angloamerikanischen Sprachraum durch den Begriff „Immunoediting“ bezeichnet. Es beschreibt den Fluchtmechanismus der Tumorzellen, der über eine Modulation von Immunzellen fungiert. Durch den Prozess des „Immunoediting“ gelingt es z. B., die Immunreaktion von zytotoxischen Immunzellen gegen die zelleigenen Antigene zu modulieren, um weiter proliferieren zu können. Sie erzeugen also eine niedrigere Immunogenität gegenüber den Immunzellen (25, 27).

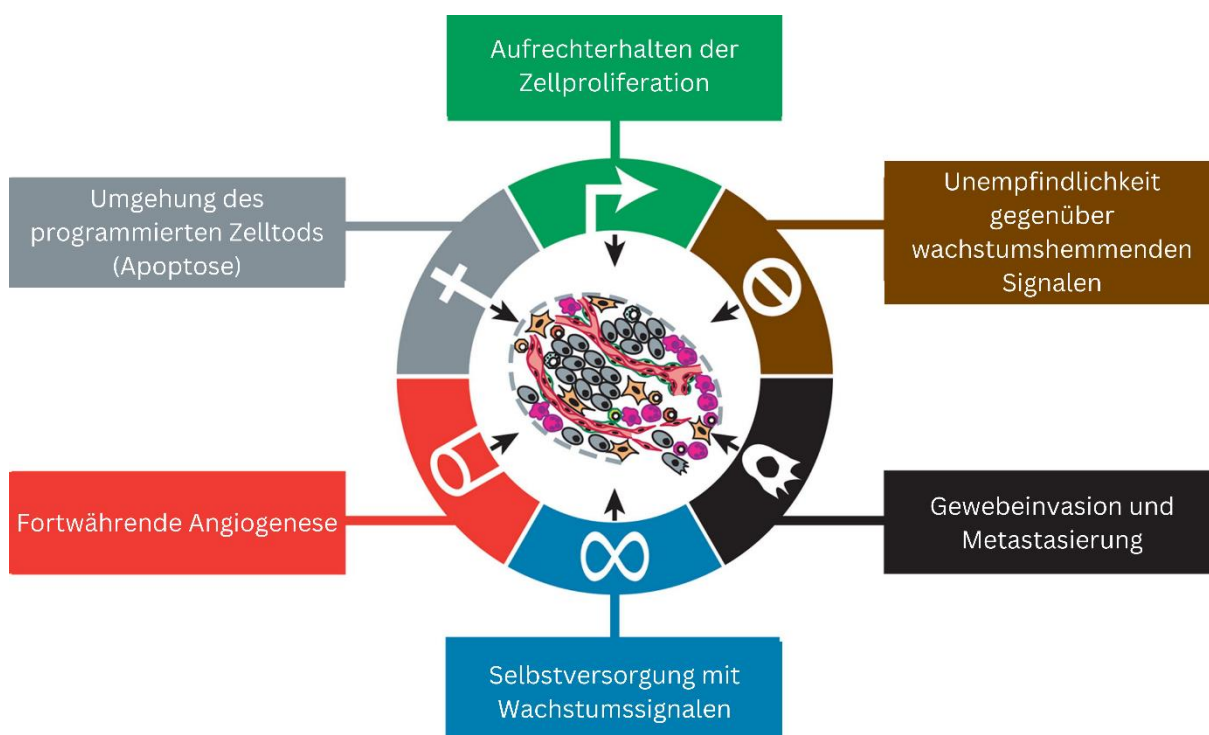


Abbildung 1: Sechs Charakteristika von Tumorzellen

Diese Darstellung umfasst die sechs charakteristischen Fähigkeiten, die im Jahr 2000 von Hanahan und Weinberg publiziert wurden (modifiziert nach (1)).

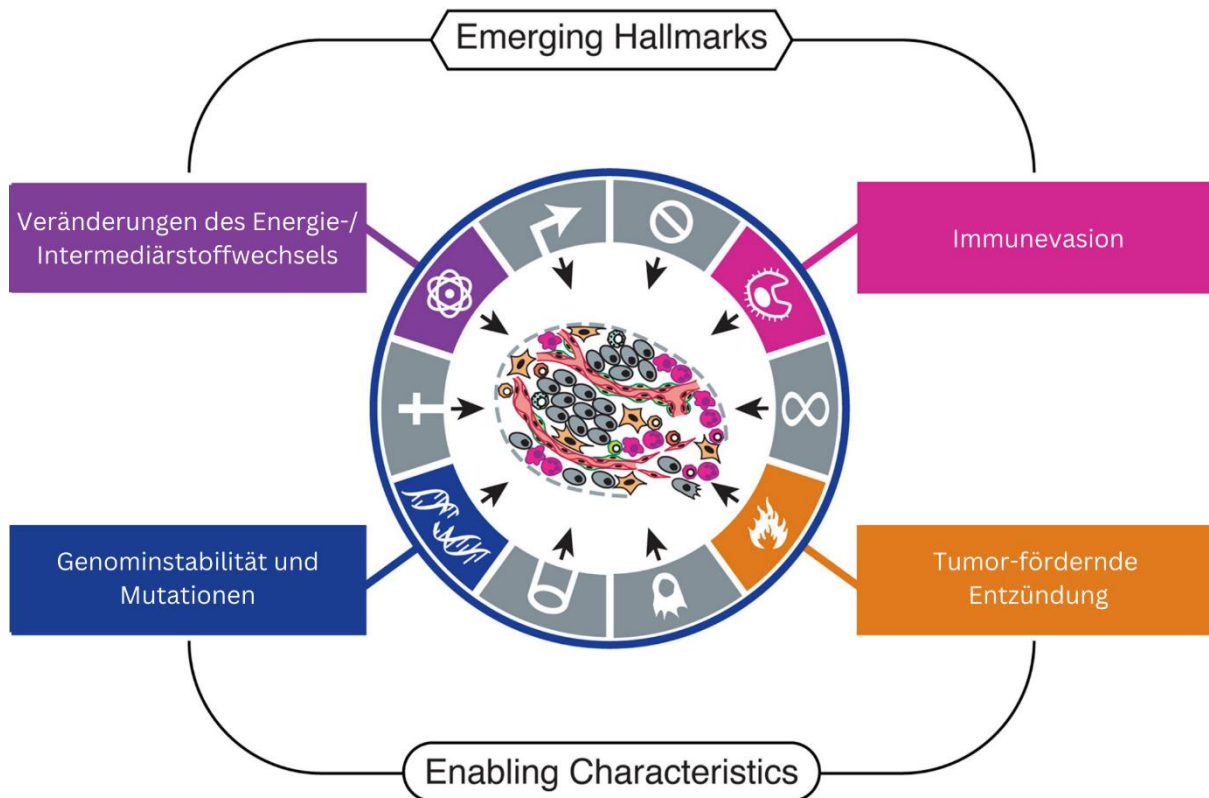


Abbildung 2: Zwei weitere 2011 benannte Charakteristika von Tumorzellen

Zwei weitere 2011 benannte Charakteristika von Tumorzellen, die an der Karzinogenese einiger und vielleicht aller Krebsarten beteiligt sind: Eines davon ist die Fähigkeit, den zellulären Stoffwechsel zu verändern oder umzuprogrammieren, um die neoplastische Vermehrung möglichst effektiv zu unterstützen. Die zweite Fähigkeit ermöglicht es den Krebszellen, sich der immunologischen Zerstörung zu entziehen, insbesondere durch T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Da beide Fähigkeiten in ihrer vollen Bedeutung noch nicht vollständig begriffen sind, werden sie im Englischen als "emerging hallmarks" bezeichnet. Darüber hinaus erleichtern zwei weitere Merkmale der Neoplasie den Erwerb sowohl von Kernmerkmalen als auch von neuen Merkmalen. Genomische Instabilität und damit auch Mutabilität verleihen Krebszellen genetische Veränderungen, die das Fortschreiten des Tumors vorantreiben. Entzündungen durch angeborene Immunzellen, die Infektionen bekämpfen und Wunden heilen sollen, können stattdessen dazu führen, dass sie die Entwicklung mehrerer Hallmark-Fähigkeiten unterstützen, wodurch die tumorfördernden Folgen von Entzündungsreaktionen zum Tragen kommen (modifiziert nach (1)).

Malignome sind nicht nur als eine Anhäufung überproportional proliferierender Zellen zu verstehen. Vielmehr sollten sie als ein Gewebe verstanden werden, in dem die eigentlichen Tumorzellen mit vielen anderen, phänotypisch veränderten Zellen des Tumorstromas interagieren (1). Sie bilden ein Mikromilieu, dass als Tumor microenvironment (TME) bezeichnet und im Kapitel 1.4. gesondert behandelt wird.

1.3 Das Maligne Melanom

1.3.1 Epidemiologie

Das maligne Melanom macht 4 % der Krebsfälle in Deutschland aus (28). Im letzten Jahrzehnt erhöhten sich altersstandardisierte Inzidenzraten signifikant. Dies ist am ehesten auf die Einführung des Hautkrebsscreenings in 2008 zurückzuführen. Der Altersmedian bei Diagnose liegt bei Männern bei 67 Jahren, bei Frauen bei 59 Jahren (28). Vor dem 60. Lebensjahr ist die Inzidenz bei Frauen höher, danach sind Männer häufiger betroffen. In Europa besteht zudem ein Nord-Süd-Gefälle. Die höchsten Inzidenzen weltweit sind in Australien und Neuseeland zu finden (29).

Während im Stadium I nach UICC die 10-Jahres-Überlebensrate gegenüber der Normalbevölkerung nicht signifikant reduziert ist, beträgt sie im Stadium IV nach UICC jedoch nur 19,4 %. Da etwa 75 % der diagnostizierten Melanome im Stadium I nach UICC diagnostiziert werden, ist die Prognose, je nach histologischem Subtyp, meist sehr gut (30).

1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Risikofaktoren für die Entwicklung des malignen Melanoms lassen sich in kongenitale und erworbene Risikofaktoren unterteilen.

Zu den kongenitale Risikofaktoren gehören die Veranlagung eines hellen, zu Sonnenbrand neigenden Hauttyps (Hauttypen I-III) ((31) zitiert nach (32)), sowie kongenitale Nävi >20cm ((33) zitiert nach (32)). Die weniger pigmentierten Hauttypen in Nordeuropa erklären das o. g. Nord-Süd Gefälle.

Zu den erworbenen Risikofaktoren für die Entwicklung eines malignen Melanoms gehören schwere Sonnenbrände in der Kindheit und intermittierende erhöhte UV-Expositionen ((34, 35) zitiert nach (32)).

1.3.3 Diagnostik

Die primäre Diagnostik beim malignen Melanom besteht in der Inspektion der Haut der Patienten im Rahmen eines Hautkrebsscreenings, welches in Deutschland ab dem Alter von 35 Jahren, alle zwei Jahre, bei einem Hausarzt durchgeführt werden sollte (3). Die Inspektion eignet sich für die Früherkennung eines malignen Melanoms und seiner Vorstufen, was den größtmöglichen Überlebensvorteil bringt. Sie sollte mittels Dermatoskopie durch einen ausgebildeten Dermatologen erhärtet werden. Die sequentielle digitale Dermatoskopie eignet sich speziell zur Früherkennung von malignen Melanomen, die keine spezifischen Malignitätskriterien aufweisen (11). Die definitive Diagnosestellung erfolgt nach obligater histopathologische Untersuchung von exzidiertem Gewebe. Es sollte ein histologisches Staging nach der gültigen TMN-Klassifikation vorgenommen werden. Hierbei gehen wichtige

prognostische Faktoren wie z. B. die Tumordicke nach Breslow (Oberseite des Stratum granulosum bis zur tiefsten Tumorzelle) und die Ulzeration des Primärtumors ein. Eine Wächterlymphknotenbiopsie sollte, ohne das Vorliegen von Risikofaktoren, ab einer Tumordicke von einem Millimeter durchgeführt werden, da das maligne Melanom früh lymphogen metastasiert. Der Lymphknotenstatus ist daher essentiell für die Therapieplanung und Prognose. Des Weiteren sollte der ebenfalls prognoserelevante Typ des Melanoms nach WHO-Klassifikation und das Stadium nach AJCC (American Joint Committee on Cancer) bestimmt werden, um eine optimale Therapie der Erkrankung zu ermöglichen. Bei einer lokoregionären Ausbreitung sollten zum Auffinden von potentiell vorhandenen Fernmetastasen weitere Diagnostik, wie bildgebende Verfahren und die Bestimmung der Laborparameter S100B und LDH erfolgen. Die Therapie des malignen Melanoms richtet sich nach dem so bestimmten Tumorstadium.

1.3.4 Therapie

Die Therapie der Wahl bei klinischem Verdacht auf ein Melanom ist die radikale Primärexzision mit Sicherheitsabstand (36). Ab einer Tumordicke von zwei Millimeter wird der Sicherheitsabstand von einem auf zwei Zentimeter erhöht. Der Operateur kann gegebenenfalls den Sicherheitsabstand, zusammen mit dem informierten Patienten, bei bestimmten anatomischen Lokalisation (z. B. Gesicht, Finger oder Ohren) verringern. Bei mikro- oder makroskopisch nachgewiesenem Residualtumor, kurz R1 oder R2 Resektion, sollte eine Nachresektion erfolgen. Wenn dabei keine Aussicht auf Erfolg besteht, sollte eine andere Form der lokalen Tumorkontrolle, meist in Form einer Radiotherapie erfolgen. Andere Optionen sind die hypertherme Extremitätenperfusion oder kryochirurgische Verfahren (29). Bei lokoregionärer Metastasierung mit positiven Wächterlymphknoten und einem maximalem Metastasendurchmesser von über einem Millimeter sollte aufgrund hoher Rezidivrisiken eine systematische (radikale) Lymphknotendissektion durchgeführt werden (37). Bei Erfüllen bestimmter Kriterien sollte eine nachfolgende adjuvante Radiotherapie des Lymphabflussgebietes erfolgen (29, 38, 39).

Eine immunpharmakologische adjuvante Therapie kann Patienten ab Stadium II angeboten werden. Chemotherapeutika werden für die Behandlung des metastasierten Melanoms primär nicht empfohlen. Sie werden lediglich bei Therapieversagen von Checkpointinhibitoren beim metastasiertem malignen Melanom verwendet (40). Im Stadium IIA kann eine niedrigdosierte Interferontherapie angeboten werden. Ab Stadium IIB/C sollte sie in höherer Dosis erfolgen (29). Patienten ab Tumorstadium III sollten Behandler eine Therapie mit einem Anti PD-1 Antikörper anbieten (41). Je nach histopathologischer Analyse sollten Patienten bei Vorliegen einer BRAF-V600E- oder V600K-Mutation mit einem BRAF- und MEK-Inhibitor behandelt werden (29, 42).

1.4 Tumor microenvironment

1.4.1 Das Tumor microenvironment als zentraler Regulator der Tumorbilogie

Seit Jahrzehnten werden die Mechanismen der Interaktion unterschiedlicher Zellen in Tumorgewebe in Hoffnung auf neue Therapiemöglichkeiten intensiv erschlossen. Das Konzept des TME findet seinen Ursprung bereits im Jahre 1863, als Virchow die Hypothese aufstellte, dass zwischen Inflammation und Krebs ein Zusammenhang bestehe. Er stellte lymphoretikuläre Infiltrate bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen fest, die mit Krebs assoziiert waren (43). Dass chronische Entzündungen die Entstehung von Krebs begünstigen, ist heutzutage allgemein gültig. So erhöht beispielsweise die entzündliche Aktivität bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die Entstehung von Karzinomen ((44) zitiert nach (45)). Der zugrunde liegende Mechanismus wurde in Kapitel 1.2. bereits grob dargestellt.

Ein weiterer Ursprung des Konzeptes des TME findet sich in Pagets Theorie "seed and soil", die er im Jahre 1889 publizierte. Er führte 735 Autopsien bei tödlichen Brustkrebsfällen durch und stellte fest, dass sich Metastasen nur bilden können, wenn Tumorzellen und Zielort der Metastasen kompatibel sind ((46) zitiert nach (47)). Ein mit guten Daten belegtes Beispiel ist die Förderung von Metastasenbildung durch Expression von Chemokinrezeptoren auf Krebszellen. Tumore mit einer hohen Expression von Chemokinrezeptor CXCR4 metastasieren häufig zu Organen mit einer hohen Expression von CXCL12, einem Liganden von CXCR4 ((46) zitiert nach (48, 49)). Plerixafor (AMD3100), ein CXCR4 Antagonist, konnte *in vitro* eine Verringerung des metastatischen Potentials von einer, vom humanen Kolorektalkarzinom abgeleiteten Zelllinie (SW480), erreichen (50).

Seither wurden viele weitere Informationen über Interaktionen verschiedenster Zellen im Tumorgewebe erschlossen, sodass Hanahan und Weinberg 2011 schließlich das Konzept des TME in ihrer Publikation „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“ aufnahmen (1). Sie beschreiben darin folgende, im TME enthaltene, Zellarten: Endothelzellen, Perizyten, tumorassoziierte Fibroblasten und Stammzellen des Tumorstromas. Diese Zellarten bilden, neben den parenchymatösen Krebs- und Stammkrebszellen, sowie Immunzellen das Tumorstroma und das TME. Im Folgenden wird die Funktion einzelner Zellarten illustriert.

Endothelzellen bilden die Blut- und Lymphgefäße von Malignomen. Die Rolle der Angiogenese wurde bereits in Kapitel 1.2. beschrieben. Die Lymphgefäße in soliden Tumoren sind aufgrund des hohen interstitiellen Drucks, außer in der Peripherie des Tumors, meist kollabiert und vermutlich inaktiv. Sie spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der lymphogenen Metastasierung (1).

Perizyten gehören den fibroblastoiden Zellen an und interagieren eng mit Endothelzellen und Makrophagen (z.B. hepatische Sternzellen). Sie bilden sich um Blutgefäße herum und spielen

über parakrine Mediatoren eine physiologische Rolle in der angiologischen Homöostase und modulieren in Malignomen das TME, um das Wachstum von Tumorzellen zu fördern. Das Targetieren des auch auf Perizyten exprimierten PDGF-Rezeptors β und die Aktivierung seines nachfolgenden Signalwegs verdeutlichen die Rolle von Perizyten in der vaskulären Integrität von Tumoren. Allerdings brachte das Targetieren von Perizyten in der Tumorthapie bisher ernüchternde Resultate (1, 51).

Immunzellen im Tumorstroma lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: Tumorfördernde und -bekämpfende Immunzellen. Diese können allerdings auch derselben Zellart angehören. Beispielsweise finden sich im Tumorstroma sowohl Leukozyten, die das Tumorstromawachstum fördern, als auch Leukozyten, die das Tumorstromawachstum bekämpfen. Mit wenigen Ausnahmen finden sich Immunzellen in stark schwankender Häufigkeit in nahezu allen neoplastischen Geweben. Darüber hinaus sind hier Subklassen von B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten zu nennen, die auf verschiedenste Weise in das Tumorstromawachstum eingreifen können.

Auch krebsassoziierte Fibroblasten modulieren das Wachstum von Malignomen. Sie lassen sich grob in zwei Zellarten einordnen, die jeweils Zelltypen von Fibroblasten in gesundem Gewebe ähneln: Fibroblasten und Myofibroblasten.

Die sogenannten Stammzellen des Tumorstromas (Krebsstammzellen) bezeichnen verschiedene Knochenmarksstammzellen, die im Tumorgewebe ausdifferenzieren oder vorerst als Reservoir undifferenziert im Gewebe verbleiben können

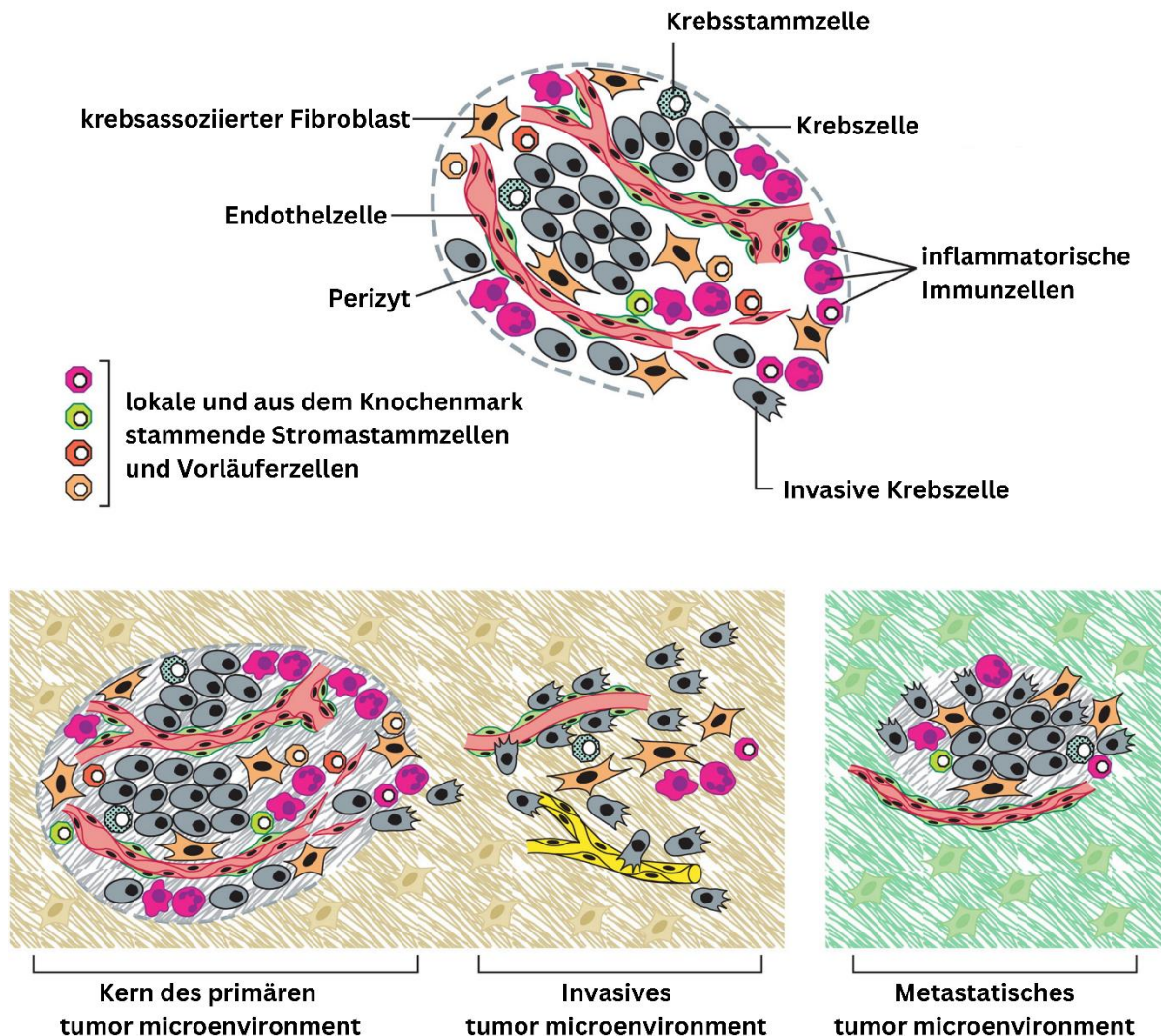


Abbildung 3: Zellen des TME und die charakteristischen Typen des TME

Oben: Zellen des TME: Die meisten soliden Tumoren bestehen aus einer Ansammlung verschiedener Zelltypen. Sowohl das Parenchym als auch das Stroma von Tumoren enthalten verschiedene Zelltypen und -subtypen, die gemeinsam das Wachstum und die Progression des Tumors ermöglichen. Insbesondere die in Tumoren vorhandenen Entzündungszellen des Immunsystems können sowohl tumorfördernde als auch tumorabtötende Unterklassen umfassen.

Unten: Die charakteristischen Typen des TME. Die verschiedenen Stromazelltypen schaffen eine Abfolge eines sich verändernden TMEs, wenn Tumore invasiv wachsen und anschließend metastasieren. Die histologische Organisation des TMEs und der extrazellulären Matrix (schraffierter Hintergrund) entwickeln sich und ermöglichen die Progression von Tumoren. Nicht dargestellt sind die prä-malignen Stadien der Tumorentstehung, die ebenfalls eine charakteristische Mikroumgebung aufweisen, die durch die Fülle und die Eigenschaften der angesiedelten Zellen entsteht (modifiziert nach (1)).

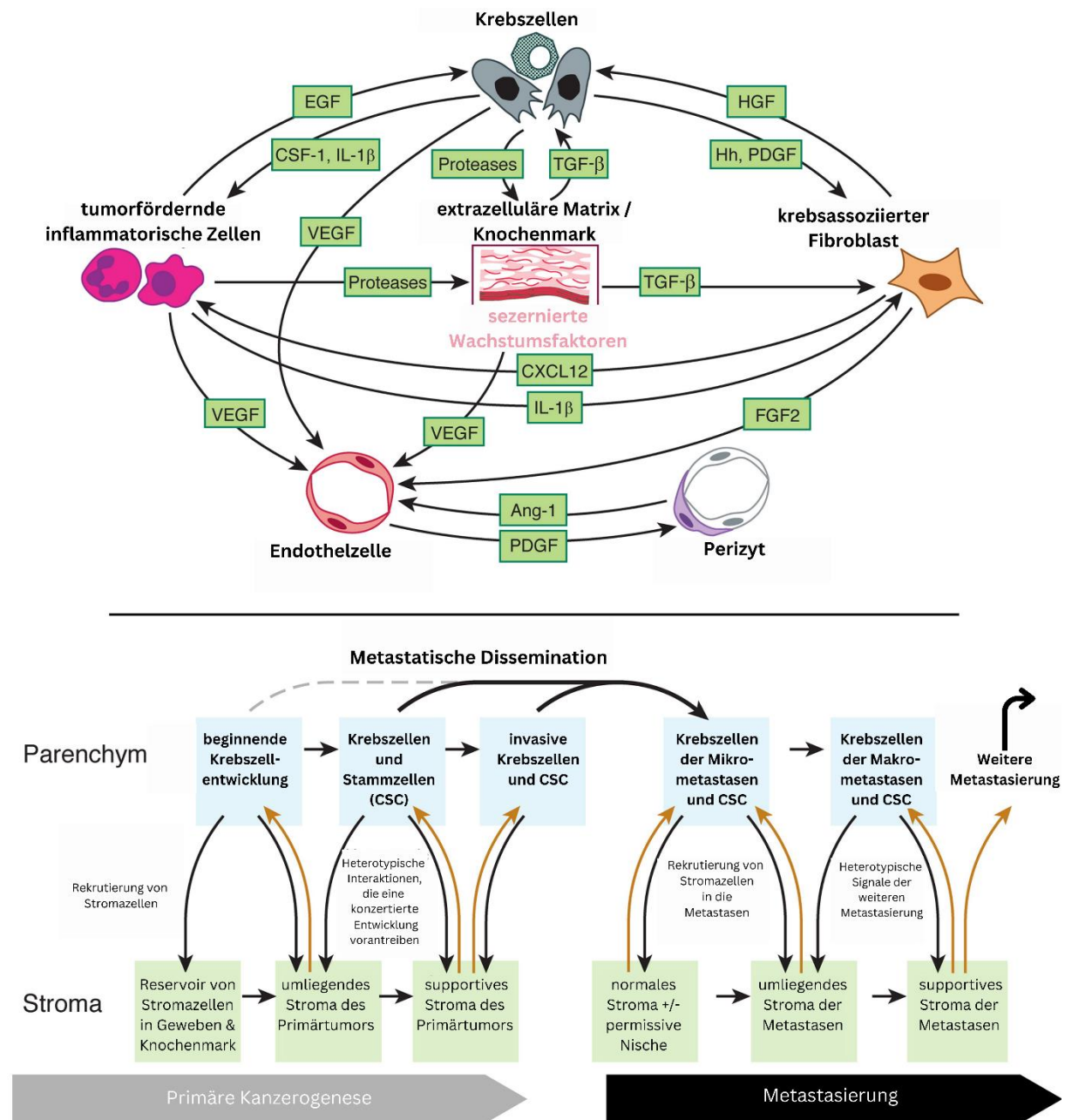


Abbildung 4: Zellinteraktionen im TME

Oben: Der kollektive Beitrag der verschiedenen Zelltypen im TME wird durch wechselseitige Signalinteraktionen hervorgerufen von denen einige beispielhaft dargestellt sind.

Unten: Die oben dargestellte Signalübertragung innerhalb des TME ist dynamisch und vermittelt einen zunehmend aggressiveren Phänotyp, der der Tumorprogression zugrunde liegt. Bestimmte Organstellen (manchmal auch als "fruchtbarer Boden" oder "metastatische Nischen" bezeichnet) können für die Metastasierung bestimmter Malignome, als Folge lokaler Eigenschaften, besonders günstig sein. Diese können gesundem Gewebe innewohnen oder systemisch von Primärtumoren induziert werden. Krebsstammzellen können in einigen oder allen Stadien der Primärtumorentstehung und Metastasierung in unterschiedlicher Weise beteiligt sein (modifiziert nach (1)).

1.5 Makrophagen

Makrophagen sind myeloide Zellen, die entweder ortsständig und organspezifisch sind oder sich aus Monozyten entwickeln. Sie werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Man unterscheidet drei primäre Klassen von Makrophagen: nicht aktivierte (M0), klassisch aktivierte (M1) und nicht klassisch (alternativ) aktivierte Makrophagen, begleitet von zahlreichen Unterformen. Die monozytär abgeleiteten Makrophagen wandern, wenn z.B. Entzündungen oder reparative Prozesse ablaufen, kontinuierlich in die betroffenen Gewebe ein und erneuern und ergänzen so Makrophagenpopulationen im ganzen Organismus. Des Weiteren werden Makrophagenpopulationen auch als Teil der dendritischen Zellreihen klassifiziert (engl.: monocyte-derived dendritic cells, MoDcs). Da sie somit u. a. von Zellen abstammen, die auf Umweltveränderungen und pathologische Zustände reagieren, stellen sie einen sehr heterogenen Zelltyp dar. Ihre Hauptfunktionen sind die Phagozytose, Endozytose und Sezernierung von Faktoren, die immunologische und reparative Prozesse modulieren. Die diesen Funktionen zugeordneten chemotaktischen Stimuli, u. a. Chemokine und Zytokine, induzieren in Homöostase und bei Immunantworten gewebs- und insbesondere situationsspezifische Makrophagen (52). Sie kommunizieren mit diversen anderen Zellarten über direkten Zellkontakt und das ihnen zugeordnete Sekretom, das die Gesamtheit der sezernierten Signalstoffe darstellt, welches auch niedermolekulare Mediatoren und extrazelluläre Vesikel beinhaltet (53).

1.5.1 Grundsätzliche Biologie

Makrophagen spielen eine kritische Rolle in der Koordination von Entzündungen und regenerativen Prozessen als Antwort auf Infektionen, Trauma, entartende Zellen sowie andere potentiell pathologische Stimuli und stellen damit u. a. eine der ersten Verteidigungslinien des Immunsystems dar (53). Sie interagieren zur Erfüllung dieser Funktionen im microenvironment stark mit anderen Immun- und Stromazellen. So sind sie beispielsweise für die Aktivierung und Entwicklung von T-Lymphozyten (54) und die Resolution von Inflammation, Gewebereparatur und Bildung von Narbengewebe, beispielsweise nach Traumata, essentiell (55).

1.5.2 Antigenpräsentation und Phagozytose

Makrophagen agieren u. a. als antigenpräsentierende Zellen. Sie identifizieren fremde Antigene, beispielsweise das Neoantigen einer Tumorzelle, und präsentieren T-Lymphozyten diese auf Klasse I und II MHC Molekülen (engl.: major histocompatibility complex). Die Aktivierung des passenden T-Zell-Rezeptors (engl.: TCR, T-cell receptor), zusammen mit kostimulatorischen Faktoren, führt dann zur Aktivierung der antigenspezifischen T-Lymphozyten (54).

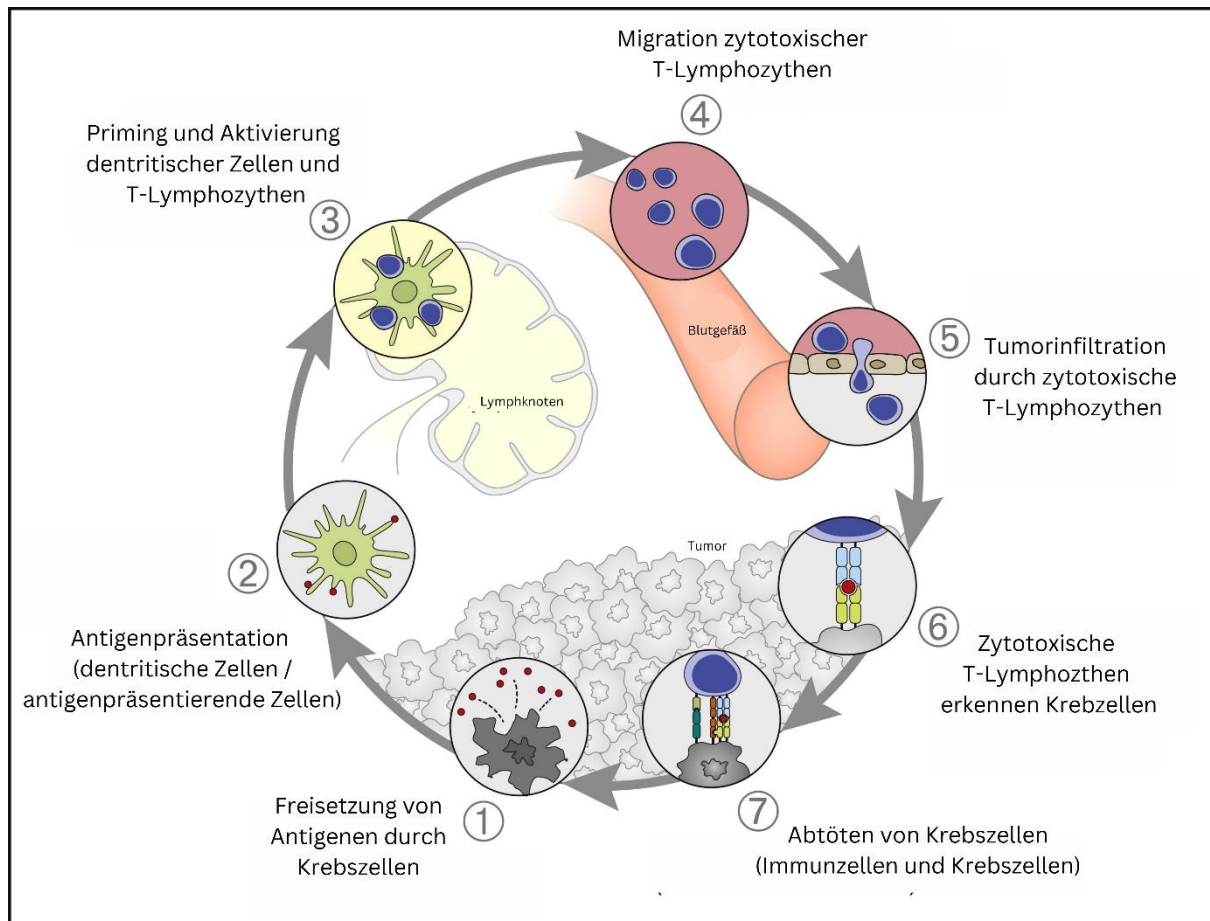


Abbildung 5: Zyklische Interaktion von Malignomen und dem Immunsystem

Die Entstehung von Immunität gegen Krebs ist ein zyklischer Prozess (engl.: Cancer-Immunity Cycle), der zu einer Anhäufung von immunstimulierenden Faktoren führt, welche die T-Zell-Antworten verstärken und ausweiten. Der Zyklus ist jedoch auch durch hemmende Faktoren gekennzeichnet, die zu immunregulatorischen Rückkopplungsmechanismen führen und zur Immunevasion der Krebszellen beitragen können. Der Zyklus lässt sich in sieben Hauptschritte unterteilen, die mit der Freisetzung von Antigenen aus der Krebszelle beginnen und optimalerweise mit der Abtötung der Krebszellen endet. Makrophagen, neben den verwandten dendritischen Zellen, übernehmen mit ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen, die direkt mit T-Zellen interagieren, eine wichtige Rolle ein ((modifiziert nach (56)).

1.5.3 Plastizität und Polarisierung von Makrophagen

Das Konzept der Polarisierung beschreibt, wie ein Makrophage in einem bestimmten Moment in einer speziellen Umgebung aktiviert ist. Die Polarisierung eines Makrophagen ist dabei keineswegs fixiert, da er kontinuierlich Umweltsignale empfängt und dadurch seine Genexpression verändern kann. Grob ist zu sagen, dass Makrophagen auf drei Arten ihre jeweilige Polarisierung erreichen (57).

1. Extrinsische Stimuli:

Makrophagen reagieren mittels Oberflächenrezeptoren auf Moleküle, die bei Traumata oder bei pathogenen Stimuli freigesetzt werden. Dies ist durch das Erkennen von molekularen Mustern möglich. Das Konzept von Gewebeschaden oder Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (DAMPs und PAMPs – engl.: damage/pathogen-associated molecular patterns) ist heutzutage gut untersucht und gilt als Grundlage für Immunreaktionen gegenüber pathogenen Stimuli. Die passenden Oberflächenrezeptoren werden PRR (engl.: pattern recognition receptors) genannt (58). Dieser lässt Makrophagen, je nach empfangenen Signalen, bestimmte Gencluster exprimieren. Die Kommunikation der Zellverbände findet jedoch auch interzellulär durch auto- und parakrine Mechanismen in hohem Maße statt. Auf die Vielfalt der teilhabenden Moleküle soll an dieser Stelle kurz eingegangen werden. Beispielsweise können hier Zytokine genannt werden, die im microenvironment wirken und auch zur Polarisierung von Makrophagen *in vitro* (Siehe Kapitel 1.5.4. Makrophagenrepolarisation – *in vitro* Modelle) genutzt werden können. Auch konnte eine Studie zeigen, dass bestimmte Exosome, die genregulatorische miRNAs (mikro RNAs) transportieren, Schlüsselfunktionen von dendritischen Zellen regulieren können (59). Darüber hinaus sind weitere extrinsische Einflüsse (z. B. Hypoxie oder eine erhöhte Laktatproduktion), insbesondere in Tumoren, von Bedeutung. Es werden definierte Signalkaskaden induziert, die u. a. zu einer Immunsuppression und einer vermehrten Angiogenese führen.

2. Intrinsische Faktoren:

Genauer über intrinsische Faktoren, die die Polarisierung von Makrophagen beeinflussen und auf die Entwicklung von Makrophagen aus embryonalen Vorläufern, sowie aus Knochenmarksstammzellen zurückgehen, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar. Hinzuzufügen ist hier, dass diese Einflüsse vermutlich weniger bedeutsam sind und daher der Fokus, im Hinblick auf die Therapie von Tumoren, stärker auf das Microenvironment gelegt werden sollte (57)

3. Epigenetische Faktoren:

Epigenetische und die Länge des Überlebens der Makrophagen entscheidende Signalwege beeinflussen ebenfalls ihre Entwicklung und Viabilität. Die Entwicklung von Monozyten im Knochenmark geschieht über große, dynamische und sich entwickelnde Areale des Genoms (engl.: genomic enhancer landscapes) und eine sequentielle und kooperative Bindung von koexprimierenden LDTF's (lineage-determining transcription factors). Sie spielen eine große Rolle in der Selektion von genetischen „enhancern“.

Diese vielen unterschiedlichen Einflüsse erschweren es, die Polarisierung der Makrophagen genau zu beschreiben und gezielt zu beeinflussen. Die Phänotypisierung von Makrophagen

gestaltet sich zudem, speziell *in vivo*, schwierig, da somit ein großes, bisher nicht genau charakterisiertes, Spektrum an Phänotypen existiert. Die Polarisierung in die im Folgenden beschriebenen Extremformen der M1 und M2 Phänotypen, die sich *in vitro* aus unpolarisierten Monozyten generieren lassen (60), resultiert in der veränderten Expression von Genexpressionsmarkern, die nur in einem Phänotyp prädominant sind, aber auch im anderen Phänotypen exprimiert werden können (61).

Die Plastizität von Immunzellen ist bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von größter Bedeutung. Sie ermöglicht u. a. das Anpassen an den jeweiligen Stimulus und hilft damit, z. B. eine überschießende Inflammation im Kontext adäquater Immunantworten zu vermeiden. So beschreiben beispielsweise Vergadi et al., dass die chronische Stimulation mit LPS, beispielsweise im Verlauf einer bakteriellen Infektion, zu einem M2 ähnlichen Phänotyp, einhergehend mit einer LPS-Toleranz, führt. Das Prinzip der LPS- bzw. Endotoxin-Toleranz beschreibt dabei eine Hyporesponsivität von myeloischen Zellen, bei der eine geringere Kapazität besteht auf inflammatorische Stimuli zu reagieren. Dies wird über ein hohes Maß an Reprogrammierung, auch Training angeborener Immunzellen genannt (engl.: innate immune training), erreicht. Es führt zur Modifizierung intrazellulärer Signalwege, beispielsweise der TLR-Signalwege. Speziell ncRNA (engl.: non-coding RNA, nicht kodierende RNA) und miRNA wird dabei eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Zusätzlich kommt es außerdem zur Alterierung der Zell-Zell-Kommunikation über extrazellulär lösliche Mediatoren (62).

1.5.3.1 Der klassisch aktivierte M1 Phänotyp

Vereinfacht fördern M1-ähnliche Makrophagen klassische entzündliche Reaktionen und damit z. B. die Elimination von Erregern oder Tumorzellen. Sie bilden den größten Teil der Makrophagenpopulation während des Beginns einer Entzündungsreaktion. Im Verlaufe verändern sie dann ihre Genexpressionsprofile und nehmen einen M2-ähnlichen Phänotyp an, um immunoregulatorische Effekte auszuüben (53). Sie werden typischerweise durch die Genexpressionsmarker CD86, CD68, TNF- α , iNOS (NOS2) sowie SOCS3 charakterisiert und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-12 und IL-23. Zudem generieren sie Sauerstoffradikale und reaktive Stickstoffspezies, um Pathogene zu bekämpfen. Letztere spielen beispielsweise eine Rolle in der T_H1-Zelldifferenzierung, die die ausgelöste Kaskade der Proinflammation potenziert und auftretende Pathogeninvasionen bekämpft. Ein Überschuss dieser Reaktion ist allerdings mit verschiedensten Krankheitsbildern, wie der rheumatoiden Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Diabetes, Hepatitiden oder dem metabolischen Syndrom assoziiert (53).

1.5.3.2 Der alternativ aktivierte M2 Phänotyp

Die immunregulatorischen Effekte der alternativ aktivierten M2-Makrophagen tragen dazu bei Entzündungen zu mildern sowie die Wundheilung zu fördern. Letzteres geschieht

beispielsweise über die Aktivierung mesenchymaler Zellen. So fördert der M2-Phänotyp z. B. die Leberfibrose, bis hin zur Ausbildung einer Zirrhose. Zudem sind M2-ähnliche Makrophagen der Phagozytose fähig und können dazu beitragen Gewebstoleranzen zu erzeugen, die beispielsweise das Tumorwachstum fördern. Sie werden basierend auf ihren Genexpressionsprofilen unterteilt in M2a, M2b, M2c und M2d Subtypen (53). M2-ähnliche Makrophagen werden typischerweise von T_H2 sezernierten Zytokinen induziert und typischerweise durch CD206, Arg1, IL-10, MHC II Moleküle, PPAR γ , Fizz1 und Mitglieder der YM1/2 Gruppe charakterisiert (53).

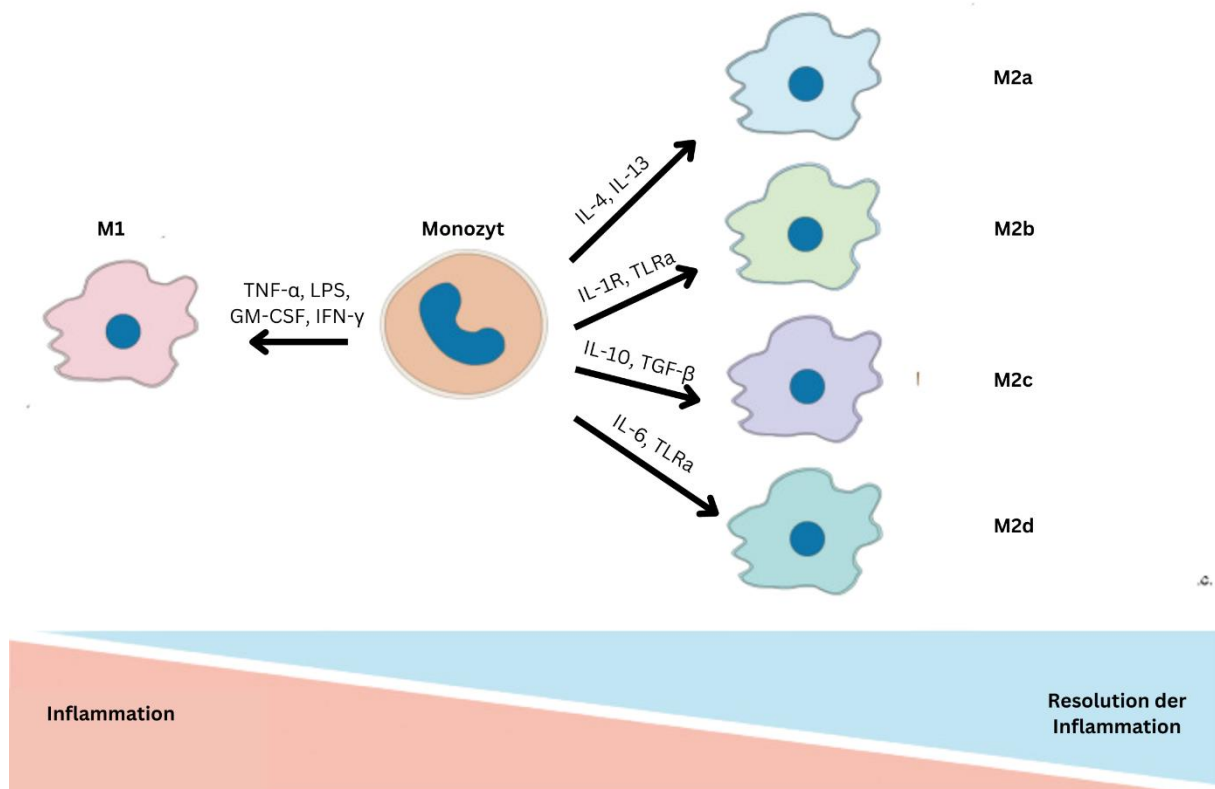


Abbildung 6: Die Heterogenität und Charakterisierung von Makrophagen

Alle dargestellten Subtypen exprimieren Zytokine, Chemokine und Rezeptoren unterschiedlich, um jeweils verschiedene Funktionen auszulösen. Im Allgemeinen lösen M1-Makrophagen hauptsächlich proinflammatorische Reaktionen aus und sind in der Regel mit einer T_H1 -Reaktion verbunden. Die verschiedenen Subtypen von M2-Makrophagen üben diverse Funktionen aus. M2a vermittelt hauptsächlich Gewebereparatur und -umbau sowie T_H2 -Reaktionen. M2b ist in der Regel für die Immunregulation verantwortlich. M2c fungiert hauptsächlich bei der Phagozytose. M2d ist mit der Angiogenese von Tumoren assoziiert (modifiziert nach (53)).

1.5.3.3 Tumorassoziierte Makrophagen (TAM)

Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) werden als Subtyp der M2-Makrophagen angesehen, kommen häufig in neoplastischem Gewebe vor und spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Malignomen (53). Sie tragen zur Immunsuppression, Angiogenese,

sowie Metastasierung von Tumoren und ihrem Wiederauftreten nach scheinbarem Therapieerfolg bei. Die Polarisierung der Makrophagen geschieht dabei im Tumor selbst, wobei sie sich sowohl aus Gewebsmakrophagen, als auch aus Monozyten polarisieren (63). Sie helfen ein immunsuppressives Milieu zu bilden, welches dem lokalen Tumorwachstum und der Metastasierung des Malignoms förderlich ist (55). TAM unterstützen das Wachstum von Malignomen beispielsweise durch die Suppression zytotoxischer T-Lymphozyten (64) oder durch die Verstärkung der Produktion von Zytokinen, die Krebsstammzeleigenschaften von Tumorzellen fördern (65). Des Weiteren stellte man fest, dass sie, u. a. über die Expression von PD-L1 die zytotoxische T-Zell Antwort inhibieren (63) und selbst unter der Therapie von Malignomen mit Immuncheckpoint-Inhibitoren in der Lage sind, die bindenden Antikörper, die die Tumorzellen für Immunzellen erkennbar machen, zu entfernen (66, 67). Auch wird postuliert, dass sie die Auswanderung von Tumorzellen in die Peripherie erhöhen und den Prozess der Metastasierung unterstützen (67). Darüber hinaus fördern TAM in der Leber den fibrotischen Prozess, der zur Zirrhose führt, da sie die Ausdifferenzierung der hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten und die Fibroblastenaktivität fördern (68). Die wichtige Rolle von Makrophagen in der zum hepatozellulären Karzinom führenden Fibrogenese der Leberzirrhose wird auch durch eine erhöhte Gesamtanzahl an Makrophagen im zirrhotischen Gewebe deutlich. Dabei ist jedoch die Anzahl parenchymaler, CD68-positiver Makrophagen reduziert und der Anteil aktivierter Makrophagen, sowohl klassisch als auch alternativ, erhöht. Eine Reduktion des Anteils M2-dominanter, fibroseassoziiertes Makrophagen wurde jedoch ebenfalls beobachtet (69). Daher ist die Aufhebung des M2-ähnlichen Phänotyps der TAM vermutlich fibrolytisch, d. h. antifibrotisch wirksam. In einer bereits publizierten Arbeit wurde bestätigt, dass durch eine Repolarisierung von TAM das Tumorwachstum von hepatozellulären Karzinomen verringert werden kann (70). Speziell die Interaktion von Tumorzellen und TAMs, die das Signalmolekül STAT3, mit seinen zugehörigen Signalwegen involviert, scheint in der Progression von Krebserkrankungen eine entscheidende Rolle einzunehmen (55).

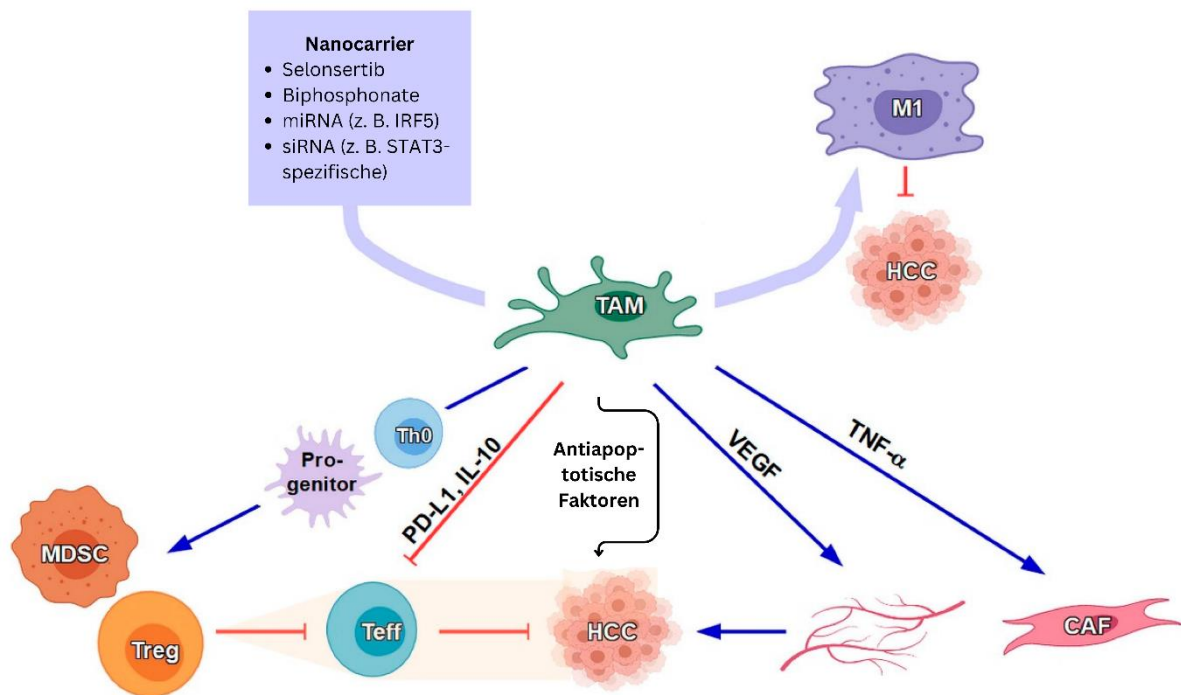


Abbildung 7: Immunonkologische Therapiehypothese zur Behandlung hepatozellulärer Karzinome

Hepatozelluläre Karzinome (HCC) erzeugen zahlreiche immunmodulatorisch wirksame, lösliche Faktoren, die die Differenzierung von infiltrierenden Makrophagen zu M2-ähnlichen TAM bedingen. TAM fördern die Induktion, bzw. Expansion von myeloiden Supressorzellen (engl.: myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)) und regulatorischen T-Zellen (Treg) und hemmen infiltrierende T-Effektorzellen (Teff). Sie unterstützen daher das Wachstum von Tumoren, indem sie die Antitumorreaktion hemmen. Weitere Mechanismen bestehen in der Produktion löslicher Mediatoren, die über die direkte und indirekte VEGF-abhängige Neoangiogenese und die Induktion von krebssassoziierten Fibroblasten (engl.: cancer associated fibroblasts (CAFs)) zur Tumorphyse beitragen. Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle könnte die Umprogrammierung von TAMs in M1-ähnliche Makrophagen mit tumorabtötender Wirkung Therapieerfolge nach sich ziehen. Die Verwendung von Nanocarriern, mit Nukleinsäure-basierten Therapeutika stellen weitere Therapieoptionen dar. Darüber hinaus eignen sich Medikamente wie Selonsertib und Bisphosphonate, die nachweislich TAM repolarisieren, als Wirkstoffe, mit denen TAM-targetierende Nanocarrier beladen werden könnten, wodurch die systemische Zytotoxizität der Substanzen minimiert würde (modifiziert nach (63)).

In der Literatur sind verschiedene Subtypen der TAM beschrieben. TAM befinden sich in einer komplexen Mikroumgebung unter dem Einfluss multipler Faktoren. Sie werden im Tumor u. a. von Tumorzellen zu einem dem M2-ähnlichen Phänotyp polarisiert. Damit zeigen TAM eine hohe Expression und Sekretion von IL-10 und TGF- β 1, sowie eine niedrige IL-12 Expression,

so eine Studie, bei der 4T1 Brustkrebszellen mit der murinen RAW264.7 Makrophagen-Zelllinie) für 48-72h gemeinsam kultiviert wurden (50).

Es werden grundsätzlich zwei unterschiedliche TAM-Phänotypen unterschieden: MHC-II^{lo} and MHC-II^{hi}. Sie befinden sich in unterschiedlichen Regionen des Tumors und differenzieren abhängig von Umweltstimuli. So ist der MHC-II^{lo}-Subtyp in stärker hypoxischen Regionen zu finden (55, 71, 72). Eine andere Subpopulation der TAMs sind mrc1 (CD206) exprimierende Makrophagen (MEM). Auf den potenziellen therapeutischen Nutzen von CD206 gehe ich im entsprechenden Kapitel (1.5.5.4.) weiter ein.

Aufgrund der bereits genannten Funktionen der TAM und der damit verbundenen, vielfältig nutzbaren therapeutischen Implikationen, wurde beispielsweise ein Peptid, CSPGAKVRC, entwickelt, welches *ex vivo* für das TAM-Targeting eine hohe Akkumulation in Mammakarzinomen und Sentinel-Lymphknoten vermittelt (73).

1.5.4 Makrophagenpolarisation - *In vitro* Modelle

Obwohl die vorgestellte Einteilung in die Subtypen, M1 und M2, von polarisierten Makrophagen in der Literatur etabliert ist, betont Murray in seinem 2017 veröffentlichten Review, dass selbst in eng kontrollierten *in vitro* Modellen der Polarisation von Makrophagen keine definierte wissenschaftliche Basis für den dualistischen Ansatz (M1 und M2) geschaffen werden konnte, da selbst *in vitro* substanzielle Variabilitäten in den Zell-Zell Interaktionen bestehen. Um diese fehlende wissenschaftliche Basis zu erfassen und die enormen Potentiale, die in unserer Arbeitsgruppe in einem Erkenntniszuwachs über die immunologische Funktion und Interaktion myeloischer Zellen, insbesondere der Makrophagen, im TME gesehen werden, planten wir unsere Experimente auf Basis der im Folgenden aufgeführten Erkenntnisse aus *in vitro* Modellen der Makrophagenpolarisation.

Makrophagen, die Phänotypmarker exprimieren, die dem M1 Phänotyp zugeordnet werden, können *in vitro* typischerweise, über extrinsische Signalwege, durch Zugabe von IFN- γ in Kombination mit einem TLR Agonisten wie LPS induziert werden (53). Zudem werden auch TNF- α oder GM-CSF genutzt. Für die M2 Polarisation wird in der Regel IL-4 und IL-13 verwendet. Dieser Ansatz folgt der Produktion von Zytokinen durch Subtypen CD4⁺ T-Zellen, die als T_H1 Phänotyp IFN- γ und als T_H2 Phänotyp IL-4 und IL-13 produzieren. Zelloberflächenveränderungen, Proteinmengen und Genexpressionen können dann beobachtet und quantifiziert, sowie modifiziert werden.

1.5.5 Hintergrund der evaluierten Genexpressionsmarker

Zur Evaluation der Makrophagenpolarisation wurde die Expression verschiedener Phänotypmarker untersucht. Diese sollen im Folgenden genauer beleuchtet werden.

1.5.5.1 iNos (NOS2)

Über das Enzym iNOS (engl.: inducible nitric oxide synthase) produzieren Makrophagen NO (Stickstoffmonoxid). Es gilt als Schlüsselenzym der antimikrobiellen Eigenschaften von Makrophagen, da es (neben diversen weiteren Funktionen) effektive antibakterielle sowie antifungale Effekte vermittelt (53). Allerdings spielt NO hierbei eine dualistische Rolle, da es gesundes Gewebe ebenso schädigen kann. Durch die Expression von iNOS sind Immunzellen in der Lage die Differenzierung und Funktion von anderen Immunzellen zu regulieren. Dies geschieht über die Nitrierung von Enzymen, die in die Transkription zentraler zellulärer Signalwegen involviert sind. Hervorzuheben sind hier besonders T-Zellen, reife dendritische Zellen und Makrophagen (74). Bei Letzteren gilt eine hohe Expression von iNOS als charakteristisch für den Signalweg der M1 Polarisierung (57). Eine hohe Expression kann jedoch auch die Dedifferenzierung aus dem M1 Phänotyp einleiten. Dies geschieht möglicherweise über eine Inhibition der Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF5. Makrophagen steuern die Expression von iNOS also sehr fein in einem dynamischen Prozess, der zur Kontrolle von Immunzellen beiträgt (74). Durch die negative Schlüsselregulation von iNOS durch Arginase 1 (Arg1), welche den NO-Donor Arginin abbaut und welche als klassischer M2 Polarisationsmarker beschrieben ist, lässt sich außerdem eine zentrale Charakterisierung des M1 Phänotyps über iNOS ableiten (57).

1.5.5.2 TNF- α

Das Zytokin TNF- α wurde initial im Zusammenhang mit seiner antitumoralen Aktivität entdeckt. Es trägt daher, die für sich sprechende Bezeichnung Tumor Nekrose Faktor. Heutzutage gilt es als eines der wichtigsten Mediatoren von Entzündungen und ist daher nicht zuletzt aus diesem Grund nötig für die korrekte Funktion des Immunsystems (75). Die Freisetzung von TNF- α geschieht durch verschiedene Stimuli bei und von unterschiedlichen Immunzellen des angeborenen (Makrophagen, NK-Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen) oder adaptiven Immunsystems (Helfer T-Lymphozyten, wie Th1, Th2, Th17) (76). Es induziert die Freisetzung anderer inflammatorischer Mediatoren und Proteasen, die eine Kaskade von biologischen Entzündungsmechanismen in Gang setzt. Die Dysregulation der Freisetzung von TNF- α spielt eine große Rolle in der Pathogenese vieler entzündlicher Krankheitsbilder (75). Dazu gehören beispielsweise akute Krankheitsbilder wie der septische Schock, aber auch chronische Erkrankungen wie CED. TNF- α bestreitet daher auch eine Rolle in der Karzinogenese (44). Weiterhin wurde beobachtet, dass maligne Tumore TNF- α produzieren, wobei es als endogener Promotor fungiert. Es trägt zur zellulären Transformation, zum Überleben von Tumorzellen, zu deren Metastasierung und Invasion in andere Gewebe, sowie zur Angiogenese innerhalb von Tumoren bei (75).

Aufgrund der eben beschriebenen Eigenschaften bietet die Einflussnahme auf die Expression und Wirkung von TNF- α therapeutische Möglichkeiten. Aktuell zugelassen sind TNF- α

Inhibitoren beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, dem Morbus Crohn oder der Plaque-Psoriasis. Andere Beispiele finden sich in der onkologischen Therapie bei der Behandlung des Multiplen Myeloms. Lenalidomid, eine besser wirksame und besser tolerierte Weiterentwicklung von Thalidomid, gilt als Inhibitor von TNF- α und Stimulator von CD4⁺, sowie CD8⁺ T-Lymphozyten (77, 78). Des Weiteren wurden viele verschiedene pflanzliche Extrakte identifiziert, die die Expression von TNF- α hemmen. Der Einfluss, der in dieser Arbeit getesteten Referenzsubstanzen Garcinol und Curcumin wurde ebenfalls untersucht und wird im Folgenden genauer beleuchtet (75, 79). Die Expression von TNF- α wird außerdem zur Charakterisierung von Makrophagenphänotypen genutzt. M1-polarisierte Makrophagen sezernieren inflammatorische Zytokine, unter anderem TNF- α . Es lässt sich daher eine erhöhte Expression nachweisen (80).

1.5.5.3 CCL-3

CCL3 gehört zu den CC-Chemokinen, auch genannt β -Chemokine. Sie spielen eine wichtige Rolle in Immunzellen und deren Interaktion mit Tumorgewebe. Speziell in Zusammenhang gebracht wird CCL3 mit NK-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen, Neutrophilen, sowie Eosinophilen. CCL3 ist ein Ligand für CCR1 und CCR5. Obwohl eine Studie CCL3 als einen potenten Agonisten an CCR3 aufzeigt, gibt es mehrere dies widerlegende Studien. Zusammen mit CCL4 gilt CCL3 als wichtiges Chemokin in der Bildung einer Immunantwort. Sie induzieren die Rekrutierung von T-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen, Neutrophilen und NK-Zellen zu inflammatorisch aktiven Geweben. CCL3 ist außerdem verantwortlich für die korrekte Funktion von CD8⁺ T-Lymphozyten. Diese Eigenschaften machen CCL3 zu einem Chemokin, das eine relevante Rolle in der Immuntherapie von Tumoren darstellt (81).

1.5.5.4 CD206

CD206 (mrc1) ist ein Mannose Rezeptor, der hauptsächlich auf der Oberfläche von alternativ aktivierten Makrophagen exprimiert wird. Er agiert als ein PRR für verschiedene Pathogene, beispielsweise Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae* oder *Streptococcus pneumoniae*, aber auch Viren und Pilze (82). Eine Studie zeigte, dass das Aktivieren von mrc1 (CD206) durch das CD206 bindende Dekapeptid RP-182 in TAM aus Tumorstroma den Makrophagenphänotyp reprogrammiert und die antitumorale Immunantworten verstärkt. RP-182 ist ein synthetisches amphipathisches Analogon von Wirtsabwehrpeptiden, das selektiv einen Konformationswechsel des Mannose-Rezeptors CD206 auslöst, der auf TAMs mit einem M2-ähnlichen Phänotyp exprimiert wird. Die RP-182-vermittelte Aktivierung dieses Rezeptors in humanen und murinen M2-ähnlichen Makrophagen löst ein Programm von Endozytose, Phagosomen-Lysosomen-Bildung und Autophagie aus und reprogrammiert M2-ähnliche TAMs zu einem antitumoral wirksamen M1-ähnlichen Phänotyp. Man beobachtete eine verstärkte Phagozytose von Tumorzellen und eine erhöhte CD8⁺ zytotoxische T-

lymphozytäre Infiltration und Funktion. Der Mannoserezeptor CD206 kann daher als potentiell Ziel in der onkologischen Immuntherapie bei Tumoren mit hoher TAM Population betrachtet werden (83). Die getestete Mausmelanomzelllinie B16F10 gilt als *in vivo* MEM (mrc1 (CD206) exprimierende Makrophage) im Tumor erzeugende Zelllinie (73). Dass die getesteten Wirkstoffe die Expression von CD206, und damit die Genexpression von TAM, antitumoral beeinflussen könnte, ist daher naheliegend. Wir testeten also die Expression von CD206 in unserem qPCR Readout der behandelten Makrophagentypen.

1.5.5.5 Ym-1

Ym-1 ist ein Polypeptid, das hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert und zur z. B. zur Charakterisierung von M2-Makrophagen in fibrotischem Lebergewebe genutzt wird. Es zeigte sich eine hohe Expression von Ym-1 in fibrotischem Lebergewebe, sowie eine fehlende Ym-1 Expression in der Resolution der Leberfibrose. Außerdem zeigte sich eine Koexpression von Ym-1 und CD206. Allerdings ist die Nutzung von Ym-1 als M2-Makrophagenmarker auf Mausgewebe begrenzt und kann nicht für die Analyse von humanem Gewebe verwendet werden (69).

1.5.5.6 IL-12

IL-12 ist ein proinflammatorisches, heterodimeres Zytokin der Interleukin 12 Familie, die neben IL-12 selbst auch IL-23, 27, und 35 einschließt. Durch die heterodimere Struktur der einzelnen Zytokine ist es Ihnen erlaubt, trotz starker Ähnlichkeit sehr heterogene, funktionelle und komplexe Interaktionen einzugehen. Aktivierte dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten exprimieren mehrere Zytokine der IL-12 Familie (84). Es wird von den genannten Zellen als Reaktion auf mikrobielle Stimuli sezerniert und setzt unter anderem eine positive Rückkopplungsschleife in Gang: Die IL-12 induzierte Produktion von IFN- γ durch T-Lymphozyten und NK-Lymphozyten führt zur vermehrten IL-12 Produktion durch Antigen präsentierende Zellen, was eine erneute IFN- γ Sezernierung zur Folge hat (84). IL-12 wird als bei der molekularen Analyse von Makrophagenphänotypen als M1-Marker genutzt (53, 85).

1.6 Antineoplastische Therapien

Chemotherapien rufen bei malignen Erkrankungen in aller Regel DNA Schäden hervor und sind daher oft mit starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) assoziiert. Chemotherapeutika schädigen nicht nur Tumorzellen, sondern auch andere Zelltypen, wie Epithelzellen oder myeloische Stammzellen. Die antineoplastische Therapie hat in der Vergangenheit allerdings immense Fortschritte gemacht. Beispielsweise stehen mit der Implementation von Immuntherapeutika zahlreiche neue Therapien zur Verfügung. Zudem hat sich das Nebenwirkungsspektrum, v. a. im Kontext der Immuntherapie, stark erweitert. Eine strikte Überwachung der Therapie und der Therapieerfolge ist essenziell. Viele Präparate, die in Tumortherapien verwendet werden, zählen zu den Medikamenten mit der geringsten therapeutischen Breite (86).

1.6.1 Onkologische Immuntherapie

Eine wünschenswerte Eigenschaft von antineoplastischen-Therapien ist die Schonung von zytotoxischen Immunzellen, um die Reaktion des gegen den Tumor arbeitenden Immunsystems nicht negativ zu beeinflussen (87). Die moderne Immuntherapie zielt darauf ab das Immunsystem selbst gegen Krebserkrankungen einzusetzen (8). Ein Beispiel ist die bereits erwähnte Immuncheckpointblockade, die auch i. R. von Kombinationstherapien eingesetzt werden kann.

Immunantworten können auf verschiedenste Arten mit diversen Zielsetzungen beeinflusst werden. Dabei kann eine ungewollte Immunantwort, bspw. in Form von Autoimmunität, Allergie oder Transplantationsabstoßung unterdrückt werden oder aber eine gewollte Immunantwort, wie die bei der Bekämpfung von Tumorwachstum, gefördert werden. Die ersten Ansätze immunpharmakologischer Therapien bildeten Impfungen, als man vor über 500 Jahren Impfungen durchführte, um Menschen vor den Pocken zu schützen. Differenziertere Ansätze zur Entwicklung von Impfstoffen und Antisera wurden daraufhin im späten 19. Jahrhundert entwickelt (88). Im 20. Jahrhundert fanden die heute alltäglich genutzten Glucocorticoide Einzug in medizinische Therapien. Eingesetzt werden sie heutzutage bspw. bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, Transplantationen, Tumoren oder der symptomorientierten Therapie von Erbrechen i. R. von Chemotherapien oder Operationen. Sie sind dabei enorm effektiv, wirken aber sehr unspezifisch und haben, speziell bei Dauertherapien mit höheren Dosierungen, ein enormes Nebenwirkungspotential. Dennoch sind sie eine unverzichtbare Klasse von Pharmaka. In den letzten Jahrzehnten sind jedoch spezifischer wirkende Präparate, sogenannte Biologika, hinzugekommen. Sie sind künstlich hergestellte Immunsuppressiva, die natürlichen Produkten des Organismus stark ähneln. Sie werden in diversen Formen hergestellt und umfassen bspw. Wachstumsfaktoren, Hormone, monoklonale Antikörper und Derivate von Antikörpern in

Fusionsproteinen. Die Herstellung von Biologika stellte einen methodischen Fortschritt dar, der in der Grundlagenforschung neue Möglichkeiten erschloss. Im Folgenden soll auf die wesentlichsten Entwicklungen, die seit den 1970er Jahren errungen wurden, eingegangen werden.

Obwohl Biologika sehr spezifisch wirken, stellte man fest, dass sie vielseitig einsetzbar sind. Dies begründet sich in der Tatsache, dass die Dysregulation der Funktion einer bestimmten Immunzellart als ursächlich für Krankheitsbilder unterschiedlichster Art zu betrachten ist. Es kommt daher zur fachgebietsübergreifenden Anwendung von Immunpharmaka (88), sowie zu variablen und dynamischen Indikations- und Zulassungsspektren von Immuntherapeutika. So wird beispielsweise Rituximab, ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen CD20, welches vorrangig auf B-Lymphozyten exprimiert wird, heutzutage nicht nur bei CD20⁺ B-Zell-Lymphomen (89), sondern auch bei entzündlichen Erkrankungsbildern, wie bspw. der Multiplen Sklerose, genutzt (90).

Die mittels Hybridomtechnologie hergestellten monoklonalen Antikörper, sowie die technologischen Voraussetzungen für die nahezu unbegrenzte Herstellung immunologischer Wachstumsfaktoren stellten Meilensteine im Feld der immunologischen Therapie und Forschung dar. Die hergestellten Wachstumsfaktoren ermöglichten bspw. das Klonieren von T-Zellen für Zelltherapien, wie der CART-Therapie (engl.: chimeric antigen receptor T cells). Zu nennen ist ebenfalls das Erschließen der Erkennungsmechanismen von T-Lymphozyten, die Peptide gekoppelt an HLA-Moleküle (engl.: human leucocyte antigen) detektieren. Auch die Bereitstellung von breit verfügbaren molekulargenetischen oder massenspektrometrischen Verfahren stellte einen großen Fortschritt dar. Dennoch ist man weit davon entfernt die komplexen Interaktionen von und zwischen Immunzellen gänzlich zu erfassen. Darüber hinaus existieren diverse, teils unbekannte, Unterarten und spezielle Phänotypen. Die enger werdende Zusammenarbeit von grundlagen- und anwendungsorientierten Forschungsgruppen schafft jedoch viele neue Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Therapeutika (8).

Die Therapie mit Proteinkinaseinhibitoren hat die onkologische Therapie ebenfalls revolutioniert. Proteinkinasen sind in Tumorzellen, häufig als Ergebnis von mutierten Protoonkogenen, dysreguliert und können den Hauptmechanismus für die Entwicklung einer Krebserkrankung bedeuten. Stellt die Mutation des Protoonkogens nicht die Treibermutation des Malignoms dar, ist der klinische Effekt des Proteinkinaseinhibitors entsprechend limitiert (91). Das Paradebeispiel für die mögliche hohe Effizienz von Proteinkinasen bei Malignomen ist z. B. in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zu finden. Imatinib (ein Tyrosinkinasehemmer, TKI) inhibiert die der CML zu Grunde liegende Bcr-Abl Kinaseaktivität und erzielte zu Beginn des 21. Jahrhunderts bahnbrechende klinische Ergebnisse (92).

Heutzutage wird es ebenfalls in der Therapie von c-kit mutierten gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eingesetzt. Generell ist zu sagen, dass die Proteinkinaseinhibitoren, richtig eingesetzt, weniger toxisch und potenter sind als konventionelle Chemotherapien. Allerdings ist die Therapie mit ihnen, ebenso wie die konventionelle Chemotherapie, durch Resistenzentwicklungen und unerwünschten Nebenwirkungen limitiert. Mit einem besseren Verständnis der Resistenzmechanismen kann, jedoch erneut gezielt therapiert werden (91). Beispielsweise konnte durch das Verständnis der Rolle von MEK bei der Reaktivierung des MAPK-Signalweges die Therapie und das Nebenwirkungsspektrum der BRAF-Inhibitionstherapie bei Stadium IV Melanomen verbessert werden. Die Kombinationstherapie von einem BRAF-Inhibitor mit einem MEK-Inhibitor zeigte bessere klinische Resultate als die Monotherapie. Der Mechanismus der unerwünschten Nebenwirkung von kutanen Sekundärmalignomen wurde ebenfalls durch diese Kombinationstherapie erschlossen und adressiert (91, 93).

Aktueller Forschungsgegenstand sind außerdem onkolytische Viren (94) und therapeutische Impfungen bei Krebs. Letztere sind durch die COVID-19 Pandemie i. R. der Forschung der Firma BioNTech medial beleuchtet worden. Die bisher veröffentlichten Studienergebnisse waren größtenteils ernüchternd. Allerdings führt die größer werdende Evidenz des immunsuppressiven Effekts maligner Zellen, speziell gegenüber T-Zellen, zu einem wachsenden Interesse in der Impfstoffentwicklung. Die Möglichkeit personalisierte Krebsimpfstoffe, die auf relevante Neoantigene abzielen, zu entwickeln scheint vielversprechend (95). Durch diese vielfältigen therapeutischen Möglichkeiten und das bessere Verständnis der Immunologie einzelner Krankheitsbilder wurden wegweisende klinische Erfolge gefeiert. Bspw. zeigte die „Checkpointblockade“ (engl. Immunologischer Kontrollpunkt) bei Subgruppen von Patienten das Potential der Nutzung der körpereigenen Immunantwort. Die immunologischen Kontrollpunkte aktivieren, bzw. hemmen, Immunantworten gegenüber Tumorantigenen und generieren u. a. eine immunologische Toleranz gegen Tumorzellen. Nutzt man diesen Mechanismus therapeutisch aus, ist keine Kenntnis von spezifischen Tumorantigenen notwendig, da damit eine präexistente, durch den Tumor unterdrückte antitumorale zelluläre Immunreaktion induziert wird. Somit ist im Gegenzug nicht klar, gegen welche Antigene sich die Immunreaktion richtet. Es ist bekannt, dass Tumore mit einer hohen Mutationslast im Vergleich zu Normalgewebe eine höhere Anzahl mutierter Neoantigene besitzen und damit besser auf eine Checkpointblockade ansprechen. Ob dieser Zusammenhang tatsächlich der Grund für das bessere Ansprechen solcher Tumoren ist, ist jedoch nicht gänzlich geklärt (8). Die breite, gegen verschiedene Antigene angelegte Immunantwort könnte ebenso für das gute klinische Ansprechen verantwortlich sein. So publizierten Kvistborg et al. bereits 2014 eine Studie bzgl. der anti CTLA-4 Therapie mittels des monoklonalen Antikörpers Ipilimumab bei metastasierten

Melanomen des Stadium IV: Sie zeigten, dass sich die Anzahl der CD8⁺ T-Zell Reaktivitäten nach der Gabe von Ipilimumab hochsignifikant erhöhte (96). Mittels Checkpointblockade lässt sich also der Heterogenität von Tumoren entgegenwirken. Es wird jedoch das Risiko der Aktivierung von Autoimmunreaktionen gesteigert, die als „Achillesferse“ effektiver onkologischer Immuntherapien gesehen werden. Sie können nahezu jedes Organ betreffen und werden in ihrer Inzidenz laut. June et al (2017) aus verschiedenen Gründen, wie bspw. unspezifischen Symptomen, unterschätzt und können auch noch Monate nach einer Gabe auftreten. Die enge Verbindung und geringe Trennbarkeit von Tumormunität und Autoimmunität zeigt sich außerdem am Beispiel paraneoplastischer Erkrankungen, bei denen ungerichtete Aktivierungen von Immunzellen ein großes Spektrum an Syndromen auslösen können. Es wird daher durch Kombination mit (antigen-) spezifischen Immuntherapien versucht autoimmune Nebenwirkungen von onkologischen Immuntherapien zu reduzieren (97). Verallgemeinernd lässt sich sagen, dass adäquate Kombinationstherapien von Malignomen Therapieresistenzen potenziell reduzieren und gleichzeitig die Effektivität von antineoplastischen Therapien verbessern. Die in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Wirkstoffe könnten als potenzielle Kandidaten für solche Kombinationstherapien fungieren.

Ein Beispiel für die Anwendung von Immuntherapeutika bei Malignomen finden sich, wie bereits erwähnt, bei der Therapie des metastasierten Melanoms (96, 98, 99). Das maligne Melanom gehörte zu den ersten Malignomen, bei denen erfolgreich Checkpointblockaden eingesetzt wurden. Zudem eignet es sich, aufgrund der mit dem Progress der Erkrankung assoziierten tolerogenen Mikroumgebung, gut für das Testen moderner Immuntherapeutika. Diese besteht aus regulatorischen T-Zellen (Tregs), myeloiden Supressorzellen (MDSC) und TAM (25). In unserem Labor ist die Mausmelanomzelllinie B16F10 im Tiermodell etabliert und eignet sich zur Evaluation der zu testenden Naturstoffe (25). Die experimentelle Arbeit erfolgte im Institut für Translationale Immunologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Eines der dort bearbeiteten Projekte ist das translationale Projekt 08 (TP08): „Charakterisierung und Modulation myeloider Zellen in hepatozellulären Karzinomen“, welches als Projekt des Sonderforschungsbereiches (SFB) 1292 geführt wird. Mein Betreuer war ein Postdoc des Projekts. Wir wählten die Mausmelanomzelllinie B16F10 für unser Projekt als eine erste *in vivo* Evaluation der Wirkstoffe aus, da im TME von Melanomen besonders tolerogene Effekte von TAM ausgeübt werden. Speziell ist im Rahmen des SFB allerdings eine Versuchsreihe zur Testung der Substanzen an einem, in unserem Labor etablierten, Mausmodell zur Testung neuer Therapiemöglichkeiten hepatozellulärer Karzinome, geplant. Mittels chemischer Induktion über die Injektion von Diethylnitrosamin wird dabei ein hepatozelluläres Karzinom induziert. Eine primäre Untersuchung der Wirkstoffe in diesem Modell wurde allerdings nicht vorgenommen, da die nötigen Injektionen eine deutlich längere Vorbereitungsperiode erfordert hätten. Im Tierversuchsantrag muss zudem ein erster

Test am B16F10-Tiermodell stattfinden, bevor am HCC-Modell getestet werden kann. Da wir im B16F10-Versuchsmodell die Arbeitshypothese der Makrophagenrepolarisierung bisher nicht bestätigen konnten, war ein Übergang ins HCC-Modell noch nicht möglich.

Im Kontrast zum immunogenen TME bei Melanomen unterliegt das Lebergewebe, auch in der Homöostase, einer stark tolerogenen Kontrolle. Diese wird insbesondere durch die in großer Menge vorhandenen Gewebemakrophagen der Leber, den sogenannten Kupferzellen, hervorgerufen. Sie stellen mit 80 % der Gewebemakrophagen im menschlichen Körper den größten Anteil von Gewebemakrophagen. Als zentral lokalisierte Zellen in Lebersinusoiden üben sie über einen direkten Kontakt mit Hepatozyten und hepatischen Sternzellen im Disse-Raum ihre Funktion aus. Man geht davon aus, dass sich TAM beim HCC von Kupferzellen, aber auch von aus dem Blut rekrutierten Monozyten-Makrophagen ableiten und eine Schlüsselfunktion in der Pathophysiologie spielen. Sie könnten die Entwicklung und den Progress des Tumors entscheidend fördern, da sie im TME häufig in großen Mengen bei Resektionen gefunden werden und die Anzahl der TAM in chirurgischen Resektaten mit einer schlechteren Prognose korreliert (63). Das Umkehren des tolerogenen Phänotyps der TAM zu einem proinflammatorischen Phänotyp, der stärkere und effektivere Immunreaktionen hervorruft, könnte also speziell beim HCC zu bedeutsamen Therapieerfolgen beitragen.

Im folgenden Kapitel sollen Informationen über den beim Melanom targetierbaren STAT3-Signalweg dargelegt werden. Zitiert wird dabei unter anderem eine Veröffentlichung, bei der mit dem von uns verwendeten B16F10 Mausmodell gearbeitet wurde (100, 101).

1.6.2 STAT3 als Ziel in der Immuntherapie

Da der STAT3 (engl. signal transducer and activator of transcription 3) Signalweg als zentraler Regulator in der antitumoralen Immunantwort einen Punkt der Konvergenz für einige onkogene Signalwege darstellt, ist er Gegenstand aktueller onkologischer Forschung. STAT3 ist auch in gesunden Zellen häufig hyperaktiviert und übt u. a. inhibitorische Funktionen auf die Expression von wichtigen Immunaktivatoren aus. So ist es in der Lage die Produktion von immunsuppressiven Faktoren im TME zu fördern. Eine Inhibition von STAT3 stellt daher einen vielversprechenden Ansatz für die Immuntherapie von Tumoren dar.

STAT3 unterstützt multiple Charakteristika in der Karzinogenese, indem es u. a. die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine IL-6, IL-10 erhöht, die zudem eine weitere auto- und parakrine Aktivierung von STAT3 zur Folge haben. Diese findet in Immunzellen und insbesondere in tumorassoziierten Fibroblasten statt. Über die erhöhte STAT3-Aktivität in Tumorgewebe entsteht ein einander förderndes Wechselspiel, das die Akkumulation von immunsuppressiv wirksamen, regulatorischen T-Zellen und B-Zellen, sowie die M2-Polarisation von TAM fördert und so zur Immunevasion von Tumorzellen beiträgt. Weiterhin

verringert STAT3 die antitumorale Aktivität von CD8⁺ T-Zellen, Neutrophilen und dendritischen Zellen. STAT3 Inhibitoren wurden bereits in zahlreichen präklinischen Studien erfolgreich getestet: Hierzu gehört bspw. die Testung der Substanz S3I-1757. Sie wurde in einem Xenograft Mausmodell, das ebenfalls die in dieser Arbeit für den Tierversuch verwendete Zelllinie B16F10 nutzte, getestet. Die Proliferation der Zellreihe wurde hierbei erfolgreich verringert (100, 101). Da STAT3 zudem die Expression von den Immuncheckpointmolekülen PD-L1, PD-L2 und CTLA-4 verstärkt, sind neue Medikamente zur Inhibition von STAT3 potenzielle Partner in Kombinationstherapien bei Immuncheckpointblockaden, um Resistenzmechanismen entgegenzuwirken. Daher werden in klinischen Studien an Melanompatienten bereits STAT3-Inhibitoren in Kombination mit Checkpointinhibitoren getestet. Hier kann zwischen indirekten und direkten STAT3-Inhibitoren unterschieden werden. Beispiele für indirekte STAT3-Inhibitoren sind die Kombination von Apatinib (TKI, VEGFR-2) mit SHR-1210 (anti-PD-1) bei Melanompatienten (NCT03955354) und die Kombination von Bevacizumab (monoklonaler Antikörper, VEGF-A) mit Atezolizumab (anti-PD-L1) bei Patienten mit inoperablem HCC (NCT03434379) (100, 102). Beispiele für Testung eines direkten STAT3 Inhibitors sind die Testung von Napabucasin (BBI608) mit Nivolumab (anti-PDL1, NCT03647839) oder Pembrolizumab (anti-PD-1, NCT02851004) bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom.

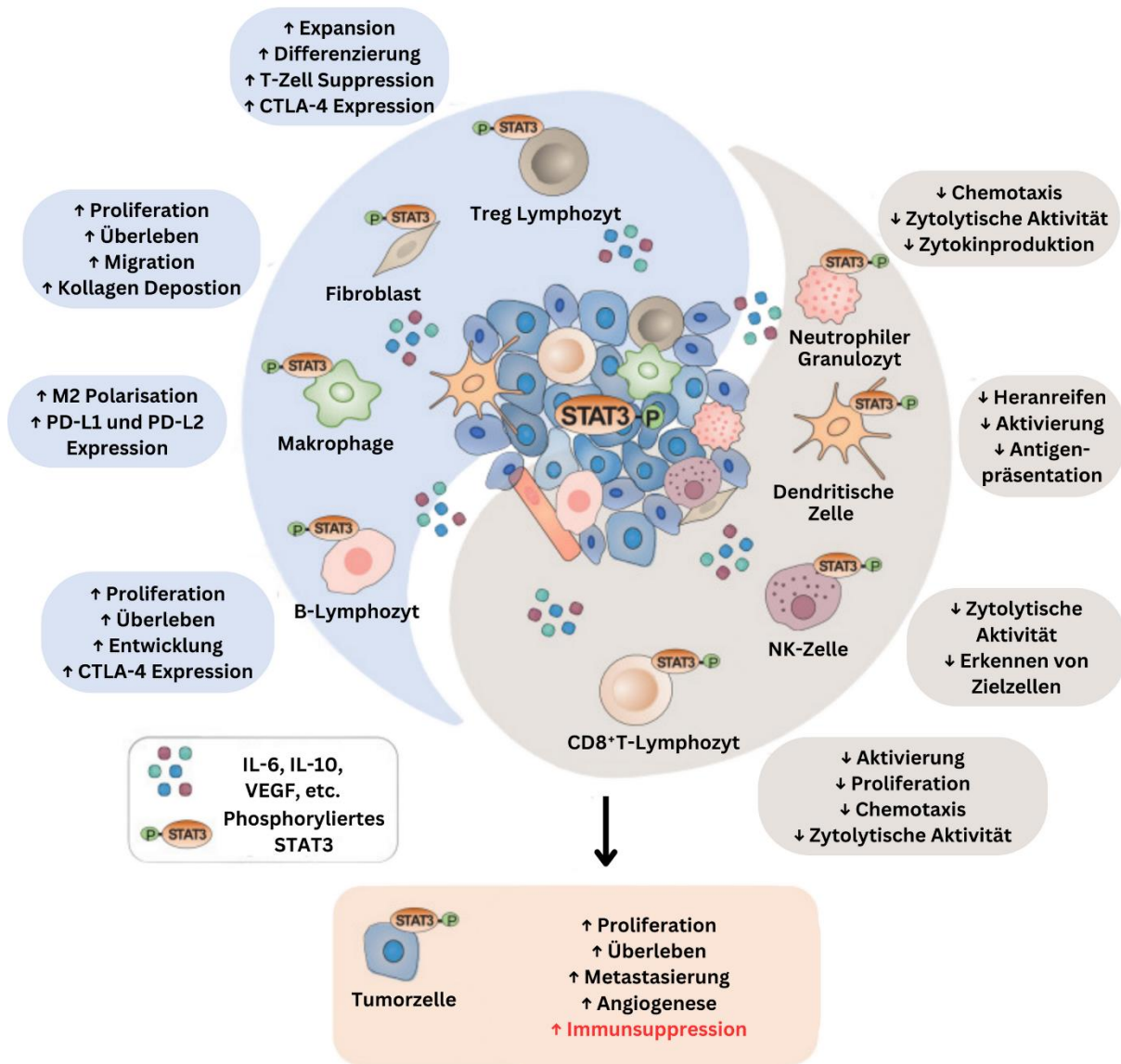


Abbildung 8: STAT3 und das TME

STAT3 induziert die Immunsuppression im TME und unterstützt mehrere Charakteristika von Krebszellen. Hierzu zählt die Steigerung der Sekretion von immunsuppressiven Faktoren wie IL-6, IL-10 und EGFR, die STAT3 wiederum in Immunzellen, sowie in CAF im TME aktivieren können. Ebenso können eben jene Zellen beispielsweise IL-6 freisetzen, um anschließend die STAT3-Signalübertragung in Tumorzellen zu verstärken. Es ergibt sich also ein einander förderndes Wechselspiel. Darüber hinaus begünstigt STAT3 die Anhäufung und Anreicherung von immunsuppressiven Zellen (z. B. Treg und B-Lymphozyten), sowie die Polarisierung von TAM, die eine Immunevasion begünstigen. Außerdem ist STAT3 ein Hauptfaktor für die verstärkte Expression von Immun-Checkpoint-Molekülen, wie PD-L1, PD-L2 und CTLA-4 in diesen Zellen. Andererseits bewirkt STAT3 in CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten eine eingeschränkte Aktivität gegen Tumorzellen. STAT3 kann zudem die antitumoralen Eigenschaften von dendritischen Zellen hemmen, indem es ihre Reifung, Aktivierung und Antigenpräsentation hemmt. Weiterhin kann STAT3 in CAF die Proliferation, das Überleben und die Migration fördern, um die Tumorprogression voranzutreiben. Insgesamt induziert STAT3 also die

Immunsuppression im TME und fördert so die Tumorprogression bei gleichzeitiger Verringerung der Anti-Tumor-Immunität (modifiziert nach (100)).

1.7 Antitumor-Naturstoffe und Referenzsubstanzen

Unsere Kooperationspartner der Universität Bayreuth (AG Biersack) haben verschiedene synthetische Verbindungen hergestellt, welche wirksamer und zugleich besser bioverfügbar sind. Sie sollen in dieser Arbeit untersucht werden. Für die neu synthetisierten Wirkstoffe wurden jeweils Referenzsubstanzen, zwecks Plausibilitätsprüfung, parallel getestet. Diese sind im Folgenden aufgeführt.

1.7.1 Curcumin

Curcumin ist ein einfaches natürliches Phenol, extrahiert vom Rhizom der Pflanze *Curcuma longa*, welches häufig als Gewürz verwendet wird (103). Das Potential der Substanz als Medikament ist durch einen schnellen metabolischen Abbau, eine niedrige Wasserlöslichkeit und eine ungenügende Bioverfügbarkeit limitiert (104). Daher suchte man nach Curcumin-Derivaten mit verbesserten pharmakokinetischen, sowie antitumoralen Eigenschaften (105, 106). Der Substanz werden eine Reihe weiterer Eigenschaften zugesprochen: antioxidative, antidiabetische, antidepressive, antiischämische analgetische, entzündungshemmende, immunmodulatorische, für Chemotherapie sensibilisierende, den Lipidstoffwechsel modifizierende, leber- und lungenprotektive Aktivitäten (55). Dies legen Pilotstudien in der Behandlung einiger Krankheiten nahe (55). Eine in Deutschland zugelassene Form der Substanz als Arzneimittel existiert jedoch nicht. Curcumin zeigt neben diesen vielen Wirkungsweisen außerdem eine effektive STAT3 Inhibition (107). Diese könnte die Population der TAM durch eine Repolarisierung vermindern. Curcumin konnte immunsuppressive TAM zu einem stärker antitumoral wirksamen M1-ähnlichen Phänotyp repolarisieren (108) und die Genexpression von iNOS in BV-2 Mikroglia (109) und RAW 264.7 Mausemakrophagen (103) verringern. Zudem könnte die T-Zell-Antwort, allen voran die der zytotoxischen T-Zellen, gefördert werden (vgl. Immuncheckpointblockade). Darüber hinaus zeigte eine Studie bereits 2008 *in vitro* einen Apoptose-induzierenden Effekt von Curcumin auf Tumorzellen, ohne gleichzeitig benigne Zellen, inklusive Immunzellen, zu beeinflussen (87). Auch ist Curcumin als COX-1 und COX-2 Inhibitor bekannt (103). Curcumin stellt in dieser Arbeit die Referenzsubstanz für das synthetische Derivat MePip dar.

1.7.2 MePip

Das synthetische Curcuminoid "MePip" ist ein Pentafluorothiophenyl-substituiertes N-methyl-Piperidone Curcuminoid. Es wurde basierend auf einem, in der zitierten Vorarbeit vorgestellten, Pentafluorothio-substituiertem 3,5-Bis (Benzylidene)-4-Piperidinone Curcuminoid synthetisiert. MePip induziert vielversprechende antineoplastische

Mechanismen, wie den Zellzyklusarrest, Apoptose und die Inhibition von HIF- α und NF- κ B (110).

1.7.3 Garcinol und Isogarcinol

Garcinol und Isogarcinol sind sekundäre Pflanzenmetabolite, meist isoliert aus dem indischen Butterbaum *Garcinia indica*. Sie stellen biologisch aktive Benzophenone, bzw. polyzyklische polyprenylierte Acylphloroglucinole (PPAPs) dar. Eine der für die Eignung als Arzneimittel vorteilhaften Eigenschaften ist die verhältnismäßig einfache Herstellung und Beschaffbarkeit der Wirkstoffe in großer Menge. Isogarcinol wird dabei durch die Behandlung von Garcinol mit verdünnter Salzsäure hergestellt. Die Wirksamkeitsspektren sind vielfältig und beinhalten antineoplastische und antiinfektive Aktivitäten, sowie antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften. Bspw. ist hier die Inhibition von NF- κ B, Histonacetyltransferasen und STATs zu nennen. Wie viele Naturstoffe wirken sie relativ unspezifisch. Eine Studie ordnet die antineoplastische Wirkung hauptsächlich der Inhibition von STAT3 (111) zu. Es gibt jedoch auch eine Veröffentlichung, die in der Inhibition der JAK/STAT-1 Aktivierung durch Hemmung des STAT-1-Kerntransfers und der DNA-Bindung einen Kernmechanismus sieht (112). Die Entwicklung neuer Derivate mit dem Ziel eines chemischen Feintunings, um biologische Eigenschaften zu verbessern, wird daher im Review von Biersack und Schobert empfohlen. Sie zeigen in der zitierten Arbeit die bereits nachgewiesenen antitumoralen Effekte von Isogarcinol und Garcinol und sehen in der spezifischen Wirksamkeit gegenüber Krebsstammzellen Potential für den Einsatz weiterer Tumormodelle (79).

1.8 Mausmodelle in der immunologischen Krebsforschung

Die Entwicklung von murinen Inzuchtmausstämmen ermöglichte der immunologischen Forschung den Einsatz von Mausmodellen mit Tumorzellen, die eine geringere Tumorantigenvariation als der ursprüngliche oder verwandte Tumor aufweisen (113). Demzufolge konnte zwar die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Modelle, häufig aber nicht die generelle Übertragbarkeit der murinen Tierexperimenten auf den Menschen verbessert werden.

Es existieren diverse Arten von Mausmodellen in der immunologischen Krebsforschung. Hierbei kann die Entstehung eines Tumors grundsätzlich auf die folgenden Arten ausgelöst werden. Der Tumor kann in der Maus durch chemische Karzinogene (engl.: chemically induced mouse models) oder genetische Mutationen (GEMMs, engl.: genetically engineered mouse models) spontan und orthotop entstehen oder durch Inokulation von Krebszellen induziert werden.

Dabei stellt die Entstehung des Tumors ausgelöst durch chemische Karzinogene die älteste Methode dar. Die ersten Experimente mit chemisch induzierten Mausmodellen wurden in der

Erforschung von Lungenkrebs angewandt. Hier wurde den Mäusen transdermal und intratracheal Benzol zugeführt. Die Studien hierzu ergaben jedoch nur eine geringe Reproduzierbarkeit.

Die Entwicklung von Mausmodellen, bei denen die Entstehung eines Tumors auf genetischen Defekten der Maus beruht, führten dagegen zu einer hohen Reproduzierbarkeit. So entwickeln z. B. Mäuse, denen das Tumorsuppressorgen PTEN fehlt, Hyperplasien in den Epithelien ihrer Atemwege. Wenn zusätzlich eine Mutation im Transkriptionsfaktor SMAD4 vorliegt, entstehen adenosquamöse Lungenkarzinome (114). Der Effekt der Deletion atemwegsspezifischer Tumorsuppressorgene korrelierte zudem zum Teil, u. a. in Fall von PTEN, mit der Prognose bei Lungenkarzinomen und verbesserte die Nutzung berechenbarer präklinischer Modelle. Die entstandenen robusten experimentellen Systeme stellen eine entscheidende Grundlage für die Erforschung immunonkologischer Mechanismen der Immunantwort gegenüber malignen Zellen dar. Sie haben daher bereits signifikant zur Weiterentwicklung bestehender Therapien, wie der Immuncheckpointblockade, beigetragen. Kritisch betrachtet und in Kauf genommen werden muss hierbei allerdings die fehlende antigenetische Variabilität, die mit der hohen Reproduzierbarkeit in direktem Zusammenhang steht (113).

Die Induktion von Tumorwachstum durch Inokulation kann syngen oder xenogen erfolgen. Syngene Krebsmodelle sind durch Inokulation von speziesspezifischen Krebszellen induziert. Bei xenogenen Krebsmodellen hingegen werden speziesspezifische Krebszellen verwendet. Es werden hierbei humane Krebszellen inokuliert, um eine, dem menschlichen Tumor möglichst ähnliche Tumorbilologie zu erzeugen. Verwendet werden genmodifizierte, immunsupprimierte Mäuse, um den Erfolg der Xenotransplantation zu ermöglichen. Dies führt zur leichteren Übertragbarkeit experimenteller Resultate aus präklinischen Modellen, hat aber den Nachteil, dass das Immunsystem und daher auch das TME defizient ist. Die verwendeten humanen Xenotransplantate erzeugen daher im Vergleich zu den genetisch induzierten Tumormodellen eine stärkere Heterogenität der entstehenden Tumore hinsichtlich ihres TME, ihrer zellulären Komposition, Motilität und Morphologie, sowie ihrer Proliferations- und Metastasierungseigenschaften. Die ersten Untersuchungen dieser Art verwendeten athymische Mäuse, denen aufgrund der Thymusagenese T-Lymphozyten fehlten. Heutzutage werden beispielsweise NOD/Scid (NSG) oder Rag2 (MISTRG) Mäuse verwendet, die eine stärkere Immundepletion aufweisen. Diese wird durch das zusätzliche Fehlen von B- und NK-Lymphozyten, sowie im Falle der Rag2 Mäuse, auch einiger relevanter Zytokine, erreicht. (113). Damit ist aber eine Evaluation der Rolle des TME im Wesentlichen unmöglich.

Syngene Mausmodelle, bei denen Krebszellen von Tumoren der eigenen Spezies inokuliert werden, sind dagegen wesentlich aussagekräftiger, jedoch auf das Immunsystem der Mäuse beschränkt. Hierfür müssen spezielle Tumorzellklone gezüchtet werden, die das syngene

Anwachsen ermöglichen. Sie eignen sich daher eher für die orientierende Evaluation neuer antitumoraler Stoffe, besonders aber für die Evaluation von das TME modulierenden Substanzen. Die Verwendung immunsupprimierter Empfängertiere ist nicht nötig, da der transplantierte Tumor genetisch passend zum Immunsystem und Stroma ist. Sogenannte Graft-versus-Host-Reaktionen, bei denen Immunzellen des Transplantats adverse Reaktionen im Wirt erzeugen, sind hier zwar möglich (115), aber kein führendes Problem. Die Tumorzellen werden typischerweise direkt in das betroffene Organ, intravenös oder subkutan, injiziert.

1.9 Ziel und Fragestellung

Vor dem in der Einleitung dargestellten Problemhintergrund hat die vorliegende Arbeit das folgende Ziel. Es sollte beantwortet werden, ob die getesteten Derivate der erwähnten Naturstoffe und insbesondere ihre synthetisch modifizierten Derivate neue potenzielle Kandidaten in der Krebstherapie sein können.

Hierzu sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Weisen die getesteten Wirkstoffe *in vitro* eine Spezifität für Krebszellen auf?
2. Eignet sich einer der Wirkstoffe für eine *in vivo* Evaluation in einem Krebsmodell?
3. Waren die ausgewählten Wirkstoffe im *in vivo* Krebsmodell wirksam?
4. Wenn ja, was sind die primären Wirkmechanismen?
5. Inwieweit lassen sich die Wirkmechanismen *in vitro* nachweisen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Nachfolgend werden verwendete Materialien, nach Untergruppen sortiert, tabellarisch aufgeführt.

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Table 1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well (fast thermal cycling)	Life technologies GmbH, Darmstadt, D
Arbeitshandschuhe	Starlab, Vereinigtes Königreich (UK)
Ausgießform zum Einmalgebrauch	VWR International, Darmstadt, D
BD Microlance needle, 26Gx1/2	BD Biosciences, Heidelberg, D
Beutel zum Einmalgebrauch	Carl Roth, Karlsruhe, D
Cell Scrapper, 28cm long-sterile	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
DAKO Pen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D

Deckgläser, 24x50mm	Diagonal, Münster, D
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen, D
Histosette tissue (processing/embedding cassettes)	Simport, Hague, The Netherlands
Inject-F (single use injection) 1ml	B.Braun, Melsungen, D
Injektionsnadel (22 G, 25 G, 30 G)	Braun, Kronberg, D; BD Franklin Lakes, USA; BD Franklin Lakes, USA
Injektionsspritzen	Braun, Kronberg, D
Insulinspritzen	BD bioscience, Franklin Lakes, USA
Klebefolie (Micro Amp)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Kryo-Einfrierröhrchen (Cryo.S PP)	Greiner, Frickenhausen, D
Kugeln aus rostfreiem Stahl	Qiagen GmbH, Hilden D
MicroAmp optical adhesive film	Life technologies GmbH, Darmstadt, D
Mikroreaktionsgefäß (1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Mikrotomklingen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Mikrotom-Klingen (MX 35 premier 34°/80mm)	Leica microsystem, Biberach, D Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Objektträger zur Bestimmung der Zellzahl	Bio-Rad, München, D
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, D
PCR tubes 0.2 ml Flat cap	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Petrischale, mikrobiologisch, 94x16mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen gestopft (0,1-20µl, 100µl, 200µl, 1ml)	Greiner, Frickenhausen, D
Polysine Objektträger	Neolab, Heidelberg, D
Reagenzreservoir	VWR, USA
Reagenzreservoir, steril 25ml	VWR International, Darmstadt, D
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) (Cellstar)	Greiner Bio One, Frickenhausen, D
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Sterilfilter 0,2 µM	Sartorius, Göttingen, D
Vakuumfiltrationseinheit 0,2 µM	VWR, Radnor, USA
Zählkammer (Neubauer)	Bio-Rad, München, D
Zellkulturflaschen (Cellstar) (T25, T75, T175)	Greiner, Frickenhausen, D
Suspensionszellkulturflaschen 25 cm ²	Greiner, Frickenhausen, D

Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well)	Greiner, Frickenhausen, D
Zellsammelbehälter (CellStar) (15ml,50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellsieb, 70 µM	Greiner Frickenhausen, D

2.1.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Hersteller
Dulbeccos modified eagles medium (DMEM) Low Glucose High Glucose RPMI 1640 DMEM / F-12 Ham	Sigma, Deisenhofen, D
Iscove Modified DMEM + Glutamin ohne Phenolrot 1X + Glutamax	Life technologies GmbH, Darmstadt, D

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklave	Systec V150	Systec, Wetzlar, D
CO ₂ -Inkubator	Hera cell 240i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Computer	Optiplex 7010	Dell, Round Rock, USA
Dampfkochtopf	Vita Cuisine	Tefal, Frankfurt am Main, D
Drucker	HL-4150CDN	Brother, Nagoya, Japan
Eismaschine	ZNE 125	Ziegra, Isernhagen, D
Fluoreszenzmikroskop-Kamera	AxioCam MRc	Zeiss, Oberkochen, D
Flüssigstickstofftank	Locator 6PLus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr Premium	Liebherr, Biberach, D
Gefrierschrank (-80 °C)	Hera Freeze HFU 586	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heißwasserbad (Paraffineinbettung)	Leica HI1210	Leica, Wetzlar, D

Heizblock (digital)	VWR digital heatblock	VWR, Darmstadt, D
Heizplatte	MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Ofen	Function Line B12	Heraeus, Hanau, D
Kühlschrank (4 °C)/ (4 °C/- 20 °C)	Profi Line	Liebherr, Biebrach, D
Laborwerkbank	Pumpe Lab Bench	KNF Lab Laboport
LightCycler	StepOnePlus™ Real-time PCR-System	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Magnetrührer	IKA® RCT basic IKAMAG™ Safety Control	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, D
Mikroskop	Axiovert40 CFL CK2 AX10 TL LED	Zeiss, Oberkochen, D Olympus, Center Valley, USA Carl Zeiss, München, D Leica, Microsystems, Wetzlar, D
Mikrotom	RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Mikrotomklingen	MX 35 premier 34°/80mm	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Mikrotom-Wasserbad	HI1210	Leica microsystem, Biberach, D
Mikrozentrifuge	Mikro 22R Ministar	Hettich, Tuttlingen, D VWR, USA
Multipipettierhilfe	Ergo One	Starlab UK
Netzteil Gelelektrophorese	E844	Consort, Mainz, D
pH-Meter	HI 9321	Windaus, Clausthal- Zellerfeld, D
Photometer	Infinite M 200 Pro Gene Quant pro	Tecan, Grödig, Österreich GE Healthcare, Solingen, D
Plattformschüttler (rotierend)	Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Schüttler	Vibrax VXR	IKA, Staufen, D
Serologische Pipettierhilfe	Pipetus Akku	Hirschmann, München, D
Sicherheitswerkbank	Hera Safe KS	Thermo Scientific, Waltham, USA

Thermocycler	Mastercycler Mastercycler Gradient T 100 Thermal cycler	Eppendorf, Hamburg, D Eppendorf, Hamburg, D BioRad, München, D
Thermoschüttler	Thermo mixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific industries, Bohemia, USA
Waage	M-Pact AX2202	Sartorius, Göttingen
Wasseraufbereitungssystem	Purelab Ultra	ELGA Veolia, Celle, D
Wasserbad	JB4 Aqualine 2 Aqualine 12	Grant, Shepreth, UK Lauda, Lauda-Königshofen, D
Zellzähler (Hämozytometer), automatisch	TC20	BioRad, München, D
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X3R, 400R 5804 R 95810R 5415R Heraeus Fresco 21 TL LED	Heraeus, Hanau, D Eppendorf, Hamburg, D Eppendorf, Hamburg, D Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D- Leica, Wetzlar, D

2.1.4 Kits

Tabelle 4: Kits

Kits	Hersteller
cDNA Super Mix reverse transcription kit	Quanta, Gaithersburg, USA
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Bio Vision, Waltham, USA
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Gibco Life technologies GmbH, Darmstadt, D, Thermo Fischer Scientific

2.1.5 Primer

Tabelle 5: Primer für die rt-qPCR (quantitative real time PCR)

Zielgen	Forward Primer (5'-3')	Antisense Primer (3'-5')
GAPDH (murin)	CCTGCCAAGTATGATGACATCAAGA	GTAGCCCAGGATGCCCTTTAGT
TNF- α (murin)	CCTGTAGCCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
iNOS (murin)	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTAC

Ym-1 (murin)	AGAAGGGAGTTTCAAACCTGGT	GTCTTGCTCATGTGTGTAAGTGA
CCL3 (murin)	TTCTCTGTACCATGACACTCTGC	CGTGGAATCTTCCGGCTGTAG
CD206 (murin)	AAGGCTATCCTGGTGGAAGAA	AGGGAAGGGTCAGTCTGTGTT
TNF- α (human)	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
CD206 (human)	GGGTTGCTATCACTCTCTATGC	TTTCTTGTCTGTTGCCGTAGTT
CCL3 (human)	AGTTCTCTGCATCACTTGCTG	CGGCTTCGCTTGGTTAGGAA
iNOS (human)	TTCAGTATCACAAACCTCAGCAAG	TGGACCTGCAAGTTAAAATCCC

2.1.6 Reagenzien

Tabelle 6: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
2-Propanol	Sigma, Deisenhofen, D
Ammoniaklösung (32%ig)	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Beta-Mercaptoethanol	Gibco Life technologies GmbH, Darmstadt, D (Thermo Fischer Scientific)
Bovine serum albumin(BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Chloroform	Applichem, Darmstadt, D
Citric acid	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DEPC treated water	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Dulbecco PBS	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Eisessig	Roth, Karlsruhe, D
Eosin	Sigma, Deisenhofen, D
Ethanol (70%ig)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol Absolute	VWR International, Darmstadt, D,

Ethidiumbromidlösung (0,025%ig)	Roth, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen, D
Fetal calf serum (FCS)	Invitrogen, San Diego, USA
in-Blau-Lösung	Sigma, Deisenhofen, D
Insulin Transferrin Selenium	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, D
L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumethylendiamintetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen, D
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden, D
Paraffin	Merck, Darmstadt, D
Pen-Strep	Life Technologies, Carlsbad, USA
Plasmocin	Invitrogen, San Diego, USA
Proteinase K	Appllichem GmbH, Darmstadt, D
Reinigungsmittel RNase Away	Thermofisher scientific, Schwerte
Resazurin	Sigma, Deisenhofen, D
RNA – Solv Reagent	Omega Bio-tek, Georgia, USA
Salzsäure	VWR International, Darmstadt, D
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Roth, Karlsruhe, D
Thiazolyl blau (MTT)	Biomol, Hamburg, D
Tri-Natrium-Citrat Dihydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe, D
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe, D
Trizma base	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypan blue solution	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Tween 20	VWR International, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid (30%ig)	Roth, Karlsruhe, D
Xylen	AppliChem, Darmstadt, D

2.1.7 Rezepte

Tabelle 7: Rezepte

Produkt	Rezept
Methanol-Eisessig Lösung	90% Methanol 10% Eisessig
Angesäuertes Wasser	Essigsäure (wasserfrei) 5ml dH ₂ O 1000 ml
Antigen- Rückgewinnungspuffer (Zitratpuffer)	2,94 g Trinatriumzitat In 1 L dH ₂ O lösen pH auf 6.0
PBS-EDTA	PBS EDTA 5mmol/l
Phosphate buffered saline (PBS) 10X Stammlösung	137 mM NaCl (80 g) 2.0 mM KCl (2 g) 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 14.4 g) 1.8 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ 2.4 g) In 1 L dH ₂ O lösen pH auf 7.4
RBC Lysepuffer	174 mM Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl 9.3 g) 10 mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃ 1 g) 0.1 mM Natriummethylen-diamintetraessigsäure (EDTA-Na 0.2 ml) In 1 L dH ₂ O lösen pH auf 7.3
PBST 1X	100 ml der 10X PBS Stammlösung 900 ml d H ₂ O, 1 ml Tween 20
TBST 1X	100 ml der 10X TBS Stammlösung 900 ml d H ₂ O, 1 ml Tween 20
PEB Puffer	2mM EDTA (4ml aus der 0.5M Stammlösung) EDTA) 0.5 % bovine serum albumin (BSA) Auf ein Volumen von 1L mit 1xPBS auffüllen
Tail Buffer	100 mM Tris-HCl pH 8,5 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl In 500 ml dH ₂ O

	(Steril filtern)
PBS (ohne Magnesium, ohne Calcium, für Zellkultur)	1l autoklaviertes, destilliertes Wasser 8g NaCl 0,2g KCl 1,44g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 0,24g KH ₂ PO ₄
DAPI Färbelösung	10 µl DAPI- Lösung (1 mg/ml) auf 10 ml Methanol
Blockserum	2,5 ml Ziegen Serum 47,5 ml TBS
DAB-Entwickler-Lösung	5 ml destilliertes Wasser 2 Tropfen DAB Reagenz 1 (Puffer) 4 Tropfen DAB Reagenz 2 (DAB-Substrat) 2 Tropfen DAB Reagenz 3 (Meerrettichperoxidase-Substrat) DAB Substrat Kit
TBS (trisgepufferte Salzlösung) 1x	100 ml 10X TBS-Stammlösung 900 ml destilliertes Wasser 1 ml Tween 20
TBS Stammlösung 10x	24.2g Trizma Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 80g NaCl 1 l destilliertes Wasser (entmineral.) pH auf 7,6
Wasserstoffperoxid (3%ig)	1 ml 30%iges Wasserstoffperoxid 99 ml TBS

2.1.8 Zytokine

Tabelle 8: Zytokine, verwendet für die rt-qPCR

Zytokine	Hersteller
M-CSF	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D
IL-4	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D
IL-13	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D
IFN-γ	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D
LPS	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D

2.1.9 Antikörper

Tabelle 9: Antikörper, verwendet für die immunhistochemischen Färbeversuche

Antikörper	Hersteller	Katalognummer/ Chargennummer (LOT)

Rekombinanter monoklonaler Kaninchen Anti-Ki67-Antikörper [SP6] (Primärantikörper)	Abcam, Cambridge	ab16667/ GR3313195-14
Ziege Anti-Kaninchen Antikörper IgG H&L (HRP) (Sekundärantikörper)	Abcam, Cambridge	ab205718

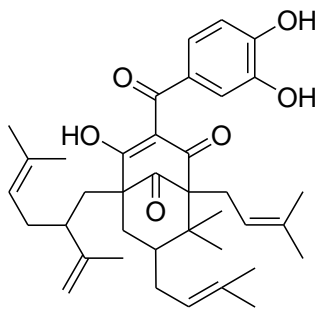
2.1.9.1 Zelllinien

Tabelle 10: Zelllinien, verwendet für Zytotoxizitätsassays, rt-qPCR und Tierversuch

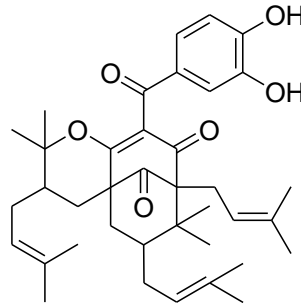
Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Raw Makrophagen	Murine Mausmakrophagen, aus Aszites in BALB/c Maus mit Leukämie isoliert	AG Schuppan
THP-1 Makrophagen	Humane Mausmakrophagen Akronym: Tohoku Hospital Pediatrics-1 Aus 1-jährigem Jungen mit akuter monoblastischer/monozytärer Leukämie isoliert	AG Schuppan
AML 12 Hepatozyten	Murine Hepatomzellen (spontan immortalisiert) Akronym: Alpha Mouse Liver 12 Produziert in einer transgenen Maus, die menschliches TGFA Gen exprimiert	AG Schuppan
3T3 Fibroblasten	Murine embryonische Fibroblasten (spontan immortalisiert) Aus einem Mausembryo isoliert	AG Schuppan
DPT 1 Hepatomzellen	Laboreigene maligne Leberzellen	AG Schuppan
DPT 2 Hepatomzellen	Laboreigene maligne Leberzellen	AG Schuppan
B16F10 Mausmelanomzellen	Mausmelanomzellen mit hohem Metastasierungspotenzial, die für den in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuch genutzt wurden. Gewonnen aus dem Lungenmelanom-Modul der 10. Passage der B16-F0-Elternzelllinie in C57BL/6-Mäusen.	AG Schuppan
BMDM	Aus murinem Knochenmark isolierte Monozyten	AG Schuppan

2.1.10 Wirkstoffe

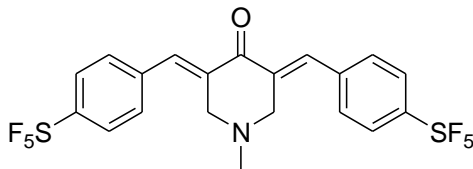
Die Wirkstoffe wurden über Dr. Bernhard Biersack von der AG Nuhn der Universität Bayreuth bezogen. Die Wirkstoffe wurden in sterilem, für die Zellkultur geeignetem DMSO gelöst und auf 5 - 50 mM verdünnt.



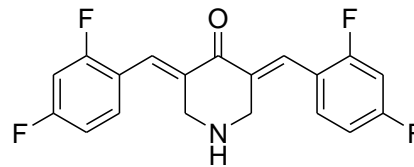
Garcinol
 $C_{38}H_{50}O_6$
 Mol. Wt.: 602,8
 m = 3.97 mg



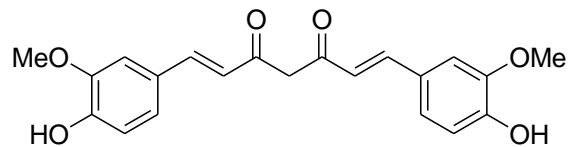
Isogarcinol
 $C_{38}H_{50}O_6$
 Mol. Wt.: 602,8
 m = 26 mg



MePip-SF5
 $C_{20}H_{17}F_{10}NOS_2$
 Mol. Wt.: 541,47
 m = 47 mg



DiFiD
 $C_{19}H_{13}F_4NO$
 Mol. Wt.: 347,31
 m = 52 mg



Curcumin (Referenz)
 $C_{21}H_{20}O_6$
 Mol. Wt.: 368,38
 m = 24 mg

Abbildung 9: Biochemische Daten und Strukturformeln der zu testenden Wirkstoffe

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden an einer sterilen Sicherheitswerkbank unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Einzubringende Materialien wurden autoklaviert, desinfiziert oder steril filtriert. Die Zellen wurden stets in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle Nährmedien wurden mit 10 % FBS, 5 ml Pen/Strep (Finale Konz.: 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin), sowie 5 ml Glutamin (Finale Konz. 2 mM) versetzt. Das Auftauen der Zellen, die in Kryoröhrchen in einem Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert waren, wurde mittels eines Wasserbades bei 37 °C durchgeführt. Die eingefrorenen Zellen wurden für vier bis maximal fünf Minuten im Wasserbad erwärmt. Im Idealfall befand sich noch etwas restliches Eis im Zentrum des Kryoröhrchens. Die Kryoröhrchen wurden dann sofort aus dem Wasserbad an die sterile Sicherheitswerkbank gebracht und mit 10 ml Medium in eine 10 ml-Pipette aufgezogen. Dann wurden die Zellen zügig in ein 15 ml Falcon gegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 1000 rpm (THP-1 nur fünf Minuten bei 800 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche mit 15 ml Medium überführt. Die verwendeten Zellen wuchsen mehrheitlich adhärent. Eine Ausnahme bildete die THP-1 Zelllinie. Sie wurden, je nach benötigter Zellmenge in 25, 75 oder 175 cm² Zellkulturflaschen mit 5 – 30 ml Nährmedium kultiviert. Die verwendeten Zellen wurden alle 2 - 4 Tage nach Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % passagiert. Für das Passagieren der kultivierten Zellen wurden die adhärent gewachsenen Zelllinien dreimal mit PBS gewaschen. Bei der Zelllinie AML12 wurde zum letzten Waschschrift 1:4 Trypsin/TrypLE hinzugegeben. Die nachfolgende Tabelle zeigt Besonderheiten der Kultivierung der einzelnen Zelllinien.

Tabelle 11: Zellkulturmethoden der für Zytotoxizitätsassays, rt qPCR und Tierversuch verwendeten Zelllinien

	Zelltyp	Medium	Supplemente	Splitten/Medium um wechseln	Verhältnis	Detachment
RAW-Makrophagen	Makrophagen, murin	DMEM - Low glucose	10 % FBS 5 ml Pen/Strep (Finale Konz.: 100 U/ml Penicillin, 100	3 x / Woche	1:6 bis 1:8	2 - 3min. TrypLE Oder Scraper

			µg/ml Streptomycin). 5 ml Glutamin (Finale Konz. 2 mM)			
B16F10	Melanom, murin	DMEM	Siehe RAW Makrophagen	2 – 3 x / Woche	1:10	5 min. TrypLE
3T3 Fibroblasten	Fibroblasten, murin	DMEM - Low glucose	Siehe RAW Makrophagen	2 – 3 x / Woche	1:4 bis 1:6	5 min. TrypLE
HepG2	Hepatom, human	Minimum essentials eagle's medium	Siehe RAW Makrophagen	2 – 3 x / Woche	1:4 bis 1:6	5 - 10 min. TrypLE
AML12	Hepatozyten, murin	DMEM/F- 12	Siehe RAW Makrophagen + 10 µg/ml insulin 5.5 µg/ml transferrin 5 ng/ml selenium 40 ng/ml Dexamethason	2 – 3 x / Woche	1:4 bis 1:6	8 - 20min. TrypLE/Accutase
THP1	AML, human	RPMI	Siehe RAW Makrophagen + 50 pM β- Mercaptoethanol	1 – 2 x / Woche	100.000 - 200.000/ ml	Nicht adhären
HCC (DPT1+2)	HCC, murin	DMEM- High glucose	Siehe RAW Makrophagen	3 x / Woche	1:6 bis 1:12	20 min. DPT1 10 - 15min. DPT2 TrypLE oder Accutase
BMDM	Makrophagen, murin, frisch extrahiert, aus primären Monozyten mit M-CSF differenziert,	Iscove Modified DMEM ohne Phenolrot	Siehe RAW Makrophagen + 25 ng/ml murines M-CSF	Siehe Abschnitt 2.2.1.2. Extraktion von BMDM		TrypLE, Accutase, oder Zellschaber

2.2.1.1.1 Zellzählung

Für die Zellzählung wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit dem anionischen Vitalfarbstoff Trypanblau versetzt. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf, wohingegen das Zytoplasma geschädigter Zellen den Farbstoff retiniert und so die automatische Zellzählung ermöglicht wird. Die Auszählung wurde automatisiert, oder im Zweifel zur Bestätigung manuell mit einer Neubauer- Zählkammer vorgenommen.

Dazu wurden 5 µl der für die Zellzählung angefertigten Suspension, die mit Trypan Blau im Verhältnis 1:1 versetzt wurde, auf ein Deckglas, beziehungsweise auf eine Neubauer-Zählkammer, pipettiert und mit einem weiteren Deckglas abgedeckt. Das manuelle Auszählen wurde mittels der Zählung gefärbter und ungefärbter Zellen in den vier Eckquadranten der Zählkammer vorgenommen. Der Mittelwert pro Eckquadrant wurde bestimmt, mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Zellzahl geschädigter und lebender Zellen zu bestimmen. In Stichproben war ein prozentualer Anteil lebender Zellen von mindestens 90 % Voraussetzung für die Durchführung eines Experiments.

2.2.1.1.2 Einfrieren von Zellen

Die kurzfristige Aufbewahrung der verwendeten Zellen erfolgte durch Einfrieren in Wachstumsmedium und DMSO (Einfriermedium). Die Lagerung wurde in einem Tiefkühlschrank bei - 80 °C vorgenommen. Vor der Endlagerung in flüssigem Stickstoff wurden die verwendeten Zellen mit Einfriermedium versetzt. Der genutzte DMSO-Gehalt zum Einfrieren der Zellen betrug mehrheitlich 10 %. Die Zelllinie der AML Hepatozyten wurde mit einem DMSO-Gehalt von 5 % eingefroren.

2.2.1.1.3 Detektion einer Mykoplasmen-Kontamination in der Zellkultur

Eine Kontamination mit Mykoplasmen ist bei der Arbeit mit Zellen in der Zellkultur problematisch, da diese nicht bei visuellen, lichtmikroskopischen Kontrollen auffällt und experimentelle Ergebnisse verfälschen kann. Daher wurden die genutzten Zellen vor Einlagerung sowie vor der Durchführung von Experimenten auf Mykoplasmen getestet. Mykoplasmen können durch kleine Öffnungen im Verschluss der Kryoröhrchen und den flüssigen Stickstoff in weitere, im selben Stickstofftank gelagerte, Kryoröhrchen gelangen. Zur Detektion der möglichen Kontamination durch Mykoplasmen wurde eine DAPI-Färbung verwendet. DAPI ist ein an DNA bindender fluoreszierender Farbstoff. Die Signalamplifikation, die durch die Bindung erzeugt wird, kann im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Bei Kontamination lassen sich wolkenartige DNA-Schleier („Sternenhimmel“) um die zu testenden Zellen feststellen. Dazu werden die trypsinierten Zellen auf Deckgläser ausgesät, für 2-3 Tage kultiviert, dann zweimal mit PBS gewaschen und für fünf Minuten mit einer Methanol-Eisessig-Lösung fixiert und für 15 min lichtgeschützt mit 100 µl einer DAPI enthaltenden Färbelösung inkubiert. Zum Schluss werden die Zellen jeweils zweimal mit Methanol, dann zweimal mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Für die Behandlung einer bestätigten Kontamination mit Mykoplasmen wurde Plasmocin nach Herstellerangaben verwendet. Plasmocin ist der Handelsname einer hocheffektiven antiinfektiven Mischung, die effektiv Kontaminationen mit Mykoplasmen bekämpft.

2.2.1.1.4 Zytotoxizitätsbestimmung mittels Resazurin-Reduktions-Assay

Für die Untersuchung der Substanzen auf ihre Toxizität gegenüber Zellen wurde ein Resazurin-Reduktions-Assay verwendet. Er bietet eine Methode zur Überwachung der Lebensfähigkeit von Zellen. Er verwendet den Indikatorfarbstoff Resazurin zur Messung der Stoffwechsellkapazität von Zellen, der einen Indikator für die Lebensfähigkeit von Zellen darstellt. Lebensfähige Zellen behalten die Fähigkeit, Resazurin über das Coenzym NADH/NAD⁺ zu Resorufin zu reduzieren, das stark fluoresziert. Nicht lebensfähige Zellen verlieren schnell ihre Stoffwechsellkapazität, reduzieren den Indikatorfarbstoff nicht und erzeugen daher auch kein Fluoreszenzsignal.

Die Inkubationszeiten der Färbeverfahren für das Zellmodell (in meinem Fall Resazurin) wurden in unserem Labor bereits etabliert. Ich habe mich daher stets an das bereits vorliegenden Protokoll, und insbesondere an die getestete Inkubationszeit von Resazurin, gehalten.

Es wurden für jeden Wirkstoff, je 1000 Zellen pro Well in 100 µl ihres Wachstumsmedium auf 96-Well Platten ausgesät. Nach einer 24-stündigen Ruhezeit wurden die zu testenden Substanzen in einer Konzentration von 0,5 - 64 µM pipettiert und für 48 Stunden inkubiert. Zur Evaluation wurde Resazurin in einer Endkonzentration von 0,025 mg/ml zugegeben und zweieinhalb bis drei Stunden inkubiert, bevor die Absorption spektrophotometrisch gemessen wurde. Für die Zelllinie THP-1 wurden folgende Anpassungen vorgenommen: Es wurden 5000 bis 10000 THP-1 Zellen pro Well ausgesät und die Ruhezeit auf 72 Stunden ausgedehnt um eine Ausdifferenzierung mit dem Zusatz von PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) in einer Endkonzentration von 150 nM zu ermöglichen. Das PMA wurde nach der Ruhezeit mit PBS ausgewaschen. Für alle Zellreihen wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, wobei je sechs Wells pro Konzentration genutzt wurden. Lediglich der Wirkstoff Curcumin wurde für die Zelllinie AML 12 in lediglich einer Versuchsreihe getestet.

2.2.1.2 Extraktion von BMDM (Bone marrow derived Macrophages)

Die getöteten Mäuse wurden auf einer Styroporunterlage mit Kanülen aufgespannt und mit Alkohol übergossen. Danach wurde die Haut der Extremitäten, vom Abdomen ausgehend, abgezogen. Darauf folgend wurde das Hüftgelenk, eventuell unter Zunahme einer Schere, luxiert und das Bein abgetrennt. Die Füße wurden abgetrennt und die Beine ohne Haut in 70%igem Alkohol gelagert. Die Mausekadaver wurden verworfen und später entsorgt. Die Beine in der Alkohollösung wurden in eine sterile Werkbank gebracht. Hier wurden Muskeln und Sehnen entfernt und die Epiphysen abgetrennt, sodass die Diaphysen der langen Röhrenknochen (Tibia und Femur) vereinzelt übrigblieben. Die Knochen wurden erneut mit 70%iger Alkohollösung und danach mit sterilem PBS abgespült. Mit einer Schere wurden nun die Enden der so gereinigten und desinfizierten Knochen abgetrennt. Danach wurden mit Hilfe

von Kanülen, Spritzen und Wachstumsmedium (IMDM ohne Phenol Rot) die Knochen ausgespült und in eine Petrischale mit Wachstumsmedium überführt. Um die Zellen in der kompakten Knochenmarksmasse zu vereinzeln, wurde die Suspension kräftig resuspendiert. Die Lösung wurde daraufhin durch ein 70 µM Zellsieb geführt, um restliche Verunreinigungen durch z. B. Haare oder Knochen zu beseitigen. Die Lösung wurde danach zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Um Zellen aus der Suspension zu entfernen, die nicht aus der myeloischen Reihe stammen, wurden die Zellen fünf Minuten lang mit einem RBC Zellysepuffer inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Lösung erneut mit 20 – 40 ml Wachstumsmedium verdünnt und mit 300G für acht Minuten (pro Zentrifugationsschritt) abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, kontrollierte ich, ob das Zellpellet völlig weiß war oder noch rötliche Anteile vorhanden waren. Falls ja wurde die Inkubation mit dem RBC Zellysepuffer wiederholt. Waren keine Farbreste mehr vorhanden, wurden die Zellen in 2 - 10 ml Wachstumsmedium verdünnt und eine Zellzählung vorgenommen. Dann wurden die Zellen mit 25 ng / ml murinem M-CSF in Petrischalen für mikrobiologische Zwecke (nicht Zellkultur behandelt) in Wachstumsmedium ausplattiert (3×10^6 Zellen pro Petrischale). Die so gewonnenen myeloischen Stammzellen kamen für die nächsten Tage so wenig wie möglich, außer für Kontrollen in Bezug auf eine bakterielle Kontamination, in Bewegung. Die ursprünglich nicht adhärenen Zellen myeloischer Vorläuferzellen differenzieren sich nun unter dem Einfluss des M-CSF langsam aus, setzen sich ab und heften sich an der Platte an. Nach vier Tagen wurde die Hälfte des Mediums abpipettiert und mit frischem Medium mit 25 ng / ml murinem M-CSF aufgefüllt. Nach insgesamt sieben Tagen waren die Zellen fertig ausdifferenziert.

2.2.1.3 Makrophagenpolarisation

Für die Polarisation und anschließende Repolarisation von THP-1 Makrophagen wurden 750000 Zellen pro Well wurden auf 6-Well Platten mit 150nM PMA (Phorbolmyristataacetat) kultiviert. Dabei waren jeweils zwei Wells als eine RNA-Probe definiert, da ein zuvor durchgeführter Etablierungsversuch unzureichende Mengen der extrahierten RNA ergab. Nach einer Ruhezeit von 24 Stunden wurden die Zellen zu einem M1/M2-Phänotyp mit INF- γ und LPS, oder respektive IL-4 und IL-13, polarisiert. Dabei planten wir die M0-Makrophagen weiter nach Standard zu kultivieren. Die M1-Makrophagen wurden mit 1µg/ml LPS und 20ng/ml INF- γ inkubiert. Die M2-Makrophagen hingegen wurden mit je 20ng/ml IL-4 und IL-13 inkubiert.

Nach 48 Stunden wurde die geplante Extraktion der RNA der M1-Makrophagen durchgeführt. Die M0 und M2 Makrophagen kultivierte ich über eine weitere Periode von 24 Stunden mit den an RAW-Makrophagen bestimmten IC₅₀ der Wirkstoffe. Nach 86 Stunden wurden die RNA der M0 sowie der mit den Wirkstoffen inkubierten (repolarisierten) M2-Makrophagen, sowie deren Kontrollgruppe, extrahiert.

2.2.1.3.1 BMDM (Knochenmarks-Makrophagen)

Um eine Maturierung der BMDM zu erreichen wurden die Zellen zur Maturierung für sieben Tage mit 25 ng / ml M-CSF inkubiert. Die als M0-Makrophagen deklarierten BMDM wurden weiter mit 25 ng / ml M-CSF inkubiert. Nach erfolgter Maturierung wurde eine 24-stündige Inkubation zur Polarisierung der BMDM, analog zu der oben für die THP-1 Zellen beschriebenen Polarisierung, durchgeführt. Die als M1-Makrophagen deklarierten BMDM wurden mit 1 µg/ml LPS und 20 ng / ml INF-γ inkubiert. Die als M2-Makrophagen polarisierten BMDM wurden mit IL-4 und IL-13, je 20 ng / ml, inkubiert. Zur Repolarisierung wurden die M2-Makrophagen nach acht Tagen für weitere 24 h mit Hilfe der Wirkstoffe anhand ihrer an RAW Makrophagen bestimmten IC₅₀ repolarisiert. Darauf folgend wurde am neunten Tag die RNA-Extraktion und im weiteren Verlauf eine Evaluation via rt-qPCR durchgeführt.

2.2.2 qPCR Analyse

Die rt-qPCR (engl.: reverse transcription quantitative-PCR, qPCR oder RT-qPCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Sie basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR). Durch die Quantifizierung von RNA-Abschnitten kann auf eine erhöhte oder erniedrigte Genexpression in den zu analysierenden Proben rückgeschlossen werden. Der erste Schritt der Durchführung der RNA-Extraktion bestand in der Hinzugabe von einem Milliliter Ribozol pro Well. Nach ca. einminütiger Inkubation wurden die Zellen vorsichtig durch Abspülen der Böden der Wells abgelöst. Nach Homogenisierung wurde das Zellgemisch in vorbereitete Eppendorf Röhren gegeben, die jeweils 200 µl Chloroform enthielten. Diese Lösung wurde erneut für mindestens 10 s mittels Vortexmischer homogenisiert. Dann wurde das Gemisch für weitere 15 min inkubiert. Wenn sich nun die Phasen gut separiert hatten (wässrige Phase mit Nukleinsäuren nach oben), wurde das Gemisch bei 4°C und 12 000 U/min für 15 min zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase, wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, da Sie den Großteil der zu extrahierenden RNA enthält. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde das Gemisch wiederum mit dem Vortexmischer homogenisiert und bei -4 °C und 12 000 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig, ohne das RNA-Pellet zu beschädigen, abpipettiert. Es wurde mit einem Milliliter einer 70 %igen Ethanollösung gewaschen, anschließend gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand entfernt und das Pellet unter einer sterilen Werkbank zum Trocknen aufgestellt. Anschließend wurden 50 µl, mit DEPC behandeltes (RNase freies), Wasser hinzugegeben und die Probe mit dem Vortexmischer homogenisiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde, bei einem standardisierten Volumen, mit dem Mikroplattenreader gemessen. Aus geeigneten Proben wurde schließlich durch reverse Transkription die cDNA (komplementäre DNA) synthetisiert. Hierfür wurde das „cDNA super mix reverse transcription kit“ verwendet. Enthalten sind eine reverse Transkriptase und dNTPs, zum Aufbau der

cDNA. Zudem ist ein Reaktionsgemisch mit Reaktionspuffer, RNase H+, das zur Degradierung der RNA nach Synthese der cDNA verwendet wird, enthalten. Darüber hinaus wird ein Oligo-dT-Primer, der zur Hybridisierung mit dem Poly-A-Ende der RNA genutzt wird, sowie ein Hexamer-Primer, der die Sensitivität der cDNA-Synthese erhöht, verwendet.

Daraufhin wurden pro Probe vier Mikroliter des Reaktionsgemisches mit Reaktionspuffer, ein Mikroliter des Enzyms reverse Transkriptase mit der RNA (1000 ng) angesetzt. Der Rest des Volumens wurde bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 20 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Dann wurden die Reaktionsgefäße in einen vorprogrammierten Thermocycler gestellt. Die Primerhybridisierung, die den ersten Schritt darstellt, wird für fünf Minuten bei 25 °C durchgeführt. Dabei lagern sich die Primer aus dem Reaktionsgemisch an die einsträngige RNA-Vorlage an. Die Elongation, in diesem Fall eine reverse Transkription, erfolgte bei 46 °C für 20 min. Durch die Enzyminaktivierung bei 95 °C für eine Minute beendete den Prozess.

Mit dem Mikroplattenreader wurde anschließend die Quantifizierung der cDNA-Menge durchgeführt. Im Anschluss wurde die cDNA mit DEPC-Wasser zu einer Konzentration von 200 ng / µl verdünnt.

Danach folgte die Durchführung rt-qPCR, bei der die Akkumulation der amplifizierten Genprodukte während des Reaktionsprozesses in Echtzeit verfolgt werden kann. Das gewünschte Genprodukt kann durch die Zugabe des interkalierenden fluoreszierenden Moleküls SYBR Green identifiziert werden. Das Fluorophor kann nur zwischen der durch die Primer und die cDNA gebildete Doppelstrang-DNA interkalieren, weshalb das Fluoreszenzsignal maßgeblich von der Menge an doppelsträngiger DNA und der Anzahl der Reaktionszyklen abhängt. Bei den ersten Zyklen werden daher in der Regel kaum Änderungen im Fluoreszenz-Signal registriert.

Zur Differenzierung von Hintergrundsignalen und relevanter Amplifikation des cDNA-Abschnittes wird ein Schwellenwert (engl.: threshold) markiert. Der Schwellenwert-Zyklus, oder threshold cycle (C_t), ist der Zyklus, in dem das Fluoreszenz-Signal den definierten Schwellenwert überschreitet. Je weniger Replikationszyklen benötigt werden das Hintergrundsignal der Fluorophore deutlich zu überschreiten, desto größer ist die Menge des zu amplifizierenden Genprodukts. Man setzt den ermittelten C_t -Wert in Verhältnis zu der Quantifizierung eines Referenzgens (engl.: housekeeping gene), in meinem Fall GAPDH für murine Proben und 18S-rRNA für humane Proben.

Bei der in unserem Labor genutzten PCR-Maschine (Step One Plus, Applied Biosystems, Thermo Fisher) wurden Temperaturen für die drei Grundschritte der rt-qPCR (a) - c)) wie folgt eingestellt. Zuerst wurde die qPCR-Platte für zehn Minuten zur Denaturierung (a)), auf 95 °C

erhitzt. Danach wurde die Platte für 20 s auf die für den Primer errechnete oder individuell bestimmte Temperatur, die in der Regel ca. 60 °C zur Primerhybridisierung (engl.: annealing) (b)) beträgt abgekühlt. Im Anschluss wurde sie wieder, zur Elongation (c)), für 10 s auf 72 °C erhitzt. Die Punkte b) und c) (Primerhybridisierung und Elongation) werden jeweils bis zum Auftreten eines Signals, maximal für 45 Zyklen, wiederholt.

Für jede rt-qPCR wurde, vor dem Experiment, ein Mastermix frisch angesetzt. Es wurde je Probe insgesamt ein Volumen von 12,5 µl in ein Well pipettiert: 0,25 µl 5' Primer, 0,25 µl 3' Primer, 2 µl cDNA (= 100 ng), 3,75 µl DEPC und 6,25 µl des Power SYBR Green PCR Master Mix, der den Puffer, die Polymerase, dNTPs und den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green enthält.

Zur Qualitäts- und Plausibilitätsüberprüfung wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und Kontrollgruppen geplant. Es wurden interne und externe Kontrollen, sowie Positiv- und Negativkontrollen analysiert. Diese sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

Eine Positivkontrolle beschreibt einen Kontrolltest, der sicher ein positives Ergebnis liefern soll. Sie wird verwendet, um sicherzustellen, dass ein Experiment funktioniert. Die positiven Kontrollen sind also amplifizierbar und werden zusammen mit der eigentlichen Versuchsprobe amplifiziert. Man kann also schlussfolgern, ob bei der reversen Transkription korrekt amplifiziert wurde.

Im Gegensatz dazu ist eine Negativkontrolle ein Kontrolltest, der sicher ein negatives Ergebnis liefern soll. Sie wird verwendet, um sicherzustellen, dass das Ergebnis des Experiments nicht auf Störfaktoren zurückzuführen ist. Die negativen Kontrollen zeigen, ob die Probe durch Verunreinigungen verfälscht wurde.

Interne Kontrollen werden verwendet, um sicherzustellen, dass die Reaktion korrekt abläuft und um falsch-negative Ergebnisse aufgrund von Inhibitoren in der Probe zu vermeiden. Häufig wird dafür, wie in meinem Fall, eine Referenzgenamplifikation verwendet. Sie überprüft die Funktion der Verstärkung des Zielgens und die Effizienz der Reaktion. In meinem Fall war die Positivkontrolle eine interne Kontrolle, festgestellt durch die Amplifikation des Referenzgens.

Externe Kontrollen werden im Gegensatz zu internen Kontrollen getrennt von den eigentlichen Testsamples angesetzt. Ich verwendete zwei verschiedene externe Kontrollen. Eine enthielt nicht umgeschriebene RNA, Mastermix und destilliertes Wasser, um auszuschließen, dass eine Kontamination während der Extraktion der RNA stattgefunden hat oder die Ergebnisse durch ein falsches Produkt verfälscht werden. Beispiele für falsche Produkte sind längere Primerdimer, bei denen sich die Primer selbst replizieren, oder Pseudogene, die Abschnitte auf der genomischen DNA darstellen, die dieselbe Sequenz erzeugen. Diese hätten während

der Zugabe der DNAse verdaut werden sollen. Die zweite externe Kontrolle enthielt lediglich Mastermix und destilliertes Wasser, um eine Kontamination während des aktuellen Experiments auszuschließen.

In der Schmelzkurvenanalyse zeigt das Übereinanderliegen der Peaks, dass nur ein Genprodukt amplifiziert wurde. Zusätzliche Informationen zur Qualitätskontrolle und zur Primer Evaluierung sind unter Abschnitt 2.2.5.3. zu finden.

2.2.3 Tierversuch

Der Tierversuch wurde von einem weiteren Doktoranden der Arbeitsgruppe, durchgeführt. Er war verantwortlich für die Injektion der Wirkstoffe, sowie die Überwachung der *in vivo* Toxizität der Substanzen. Mein Anteil an der *in vivo* Testung der Substanzen bestand in der Planung der *in vivo* Testung und der Parameter des Tierversuchs, dem Vorbereiten der Injektionen, sowie dem Prozessieren der geopferten Versuchstiere.

2.2.3.1 In-vivo Toxizität

Pro Versuchsgruppe wurden zwei C57 BL/6 Mäuse mit sich verdoppelnden Konzentrationen von Isogarcinol und MePip zweimal wöchentlich über mehrere Wochen intraperitoneal injiziert. Die Anfangsdosis betrug dabei 15mg/kg Körpergewicht. Zur Überwachung des Körpergewichts wurden die Mäuse vor den Injektionen gewogen. Die toxische Dosis definierte sich als eine Gewichtsabnahme von > 10 % Körpergewicht innerhalb einer Woche oder ein relevanter Gewichtsverlust, dem ein kontinuierlicher Gewichtsverlust folgt.

2.2.3.2 Parameter des Tierversuchs

Je 500.000 B16F10 Zellen wurden mittels Schwanzveneninjektion in 31 C57 BL/6 Mäuse injiziert. Elf dieser Mäuse bildeten die Kontrollgruppe des Versuchs. Von den restlichen 20 Mäusen wurden je zehn mit den Wirkstoffen MePiP, respektive Isogarcinol behandelt. Eine Woche nach der Schwanzveneninjektion wurden die intraperitonealen Injektionen mit Isogarcinol (15 mg / kg) und MePip (60 mg / kg) dreimal wöchentlich begonnen. Die Versuchstiere wurden jeweils vor der Injektion gewogen und untersucht. Sie wurden 16 Tage nach der Schwanzveneninjektion der Melanomzellen geopfert.

2.2.4 Auswertung des Tierversuchs

2.2.4.1 Biometrische Daten

Die Mäuse wurden anästhesiert, gewogen und es wurde Vollblut abgenommen. Zudem erhob ich zusätzliche biometrische Daten mittels Gewichtsquantifizierung der Organe.

2.2.4.2 Histopathologie

Die Histopathologie beschreibt die Analyse von krankhaftem Gewebe. Für die Analyse wurden ganze Lungen, Lungenbereiche und Gewebeschnitte von Lungen verwendet. Nach der

Opferung der Versuchstiere wurden die Organe fixiert, um die Autolyse der Gewebe zu stoppen.

2.2.4.2.1 Oberflächliche Metastasenzählung



Abbildung 10: Beispielhafte Fotografie der äußeren (links) und inneren Oberfläche (rechts) der linken Lunge eines Versuchstiers

Die linke Lunge wurde in einem Stück geborgen, die innere und äußere Oberfläche wurde fotografiert. Die oberflächlich sichtbaren Metastasen wurden mittels Image J gezählt und ausgemessen. Dabei wurde bis zu einem Maximalwert von 100 Metastasen pro Bild gezählt.

2.2.4.2.2 Gewebeparaffinisierung

Die Gewebeparaffinisierung erlaubte die Anfertigung von Paraffin-Schnitten für die lichtmikroskopische Untersuchung des Lungengewebes. Nach Fixierung der Lungen erfolgte das Einbetten von je einer Lungenhälfte in Paraffin sowie die Herstellung von Gewebeschnitten am Mikrotom, die zur Färbung einzelner Schnitte genutzt werden konnten.

2.2.4.2.3 Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die Gewebestrukturen durch die Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin darstellt. Mittels dieser beiden Einzelfärbungen wird zuerst der Zellkern mit der darin enthaltenden DNA durch das Hämatoxylin blau angefärbt. Die Färbung mit Eosin ist eine Gegenfärbung, die das Zytoplasma durch den Farbstoff Eosin rötlich kontrastiert.

Die Schnitte wurden zunächst (zur Deparaffinisierung) für 30 - 60 min auf 65 °C erhitzt bis sich das Paraffin komplett verflüssigt hatte und im Anschluss zweimal 10 min Xylol gewaschen. Anschließend erfolgte die Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe. Diese bestand aus Waschschritten von jeweils 10 min (zweimal in 100, einmal in 90 und einmal in 70%igem Isopropanol). Die Schnitte wurden anschließend zweimal für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und für 30 s in einer Hämalaun-Lösung (Hämatoxylin-Derivat) gefärbt. Das Bläuen der Färbung erfolgte ein zehnmütiges Spülen mit Leitungswasser. Daraufhin wurden die Objektträger zweimal 5 min in destilliertem Wasser gewaschen, bevor eine zwei - bis dreiminütige Inkubation mit einer Eosin-Färbelösung erfolgte. Zur Differenzierung wurden die Schnitte in 70%igem Isopropanol getaucht. In

Abhängigkeit des Entfärbungsgrades des Eosins erfolgte die Inkubationszeit in 70%igem Isopropanol für etwa 30 - 120 s. Anschließend wurden die Schnitte in 100%igem Isopropanol und Xylol gewaschen. Für die Konservierung der Schnitte wurden sie mit dem Eindeckmedium Roti Histokit II versetzt sowie mit Deckgläsern abgedeckt.

2.2.4.2.4 Zählmethode der gewebefreien Fläche

Die Quantifizierung der Metastasenmenge in den entnommenen Lungen wurde indirekt über die gewebefreie Fläche vorgenommen. Hier besteht die grundlegende Annahme, dass die alveoläre Fläche einer Lunge durch den Metastasierungsprozess reduziert wird. Dazu wurde jeweils eine Fotografie von mindestens vier Schnitten pro Lungenflügel, die sich in jeweils 100 µM Distanz voneinander befanden, angefertigt. Die Fotografie wurde mittels ImageJ verarbeitet. Dabei wurde jeder Pixel in jedem Bild gleichbehandelt. Die HE-Bilder wurden über die Binarisierungsfunktion von ImageJ zu einem schwarz-weißen Bild konvertiert. Die Bronchiolen, Bronchien und Blutgefäße, die bei der schwarz-weißen Konvertierung als gewebefreier Raum (weiß) erfasst wurden, wurden manuell geschwärzt, um nur die eigentliche alveoläre Fläche darzustellen. Für jeden Lungenflügel wurden Durchschnittswerte anhand aller gewonnenen HE-Schnitte errechnet. Die Metastasen der Kontrollgruppe wurden von einer kooperierenden Arbeitsgruppe mit Imaging-Spezialisierung zur Referenzierung automatisiert ausgezählt (Daten werden hier nicht gezeigt). Hier zeigte sich eine gute Korrelation mit der Zählmethode der gewebefreien Fläche.

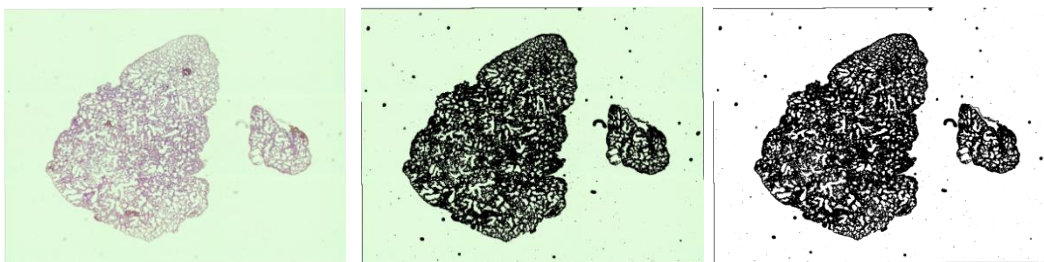


Abbildung 11 *Bearbeitung der H&E Schnitte mittels ImageJ*

Die Bronchiolen, Bronchien und Blutgefäße, die bei der schwarz-weißen Konvertierung als gewebefreier Raum (weiß) erfasst wurden, wurden manuell geschwärzt, um nur die eigentliche alveoläre Fläche darzustellen. Die Abbildung wurde videomikroskopisch erstellt (TL LED Leica, Microsystems) und mittels Image J konvertiert und digital bearbeitet.

2.2.4.3 Methodisches Fazit

Der Ansatz der Auswertung der gewebefreien Fläche wurde gewählt, da bei den evaluierten Lungen nicht nur solide Metastasen (s. Abb. 17) vorhanden waren, sondern die malignen Zellen das alveoläre Lungengewebe zudem diffus infiltrierten (s. Abb. 17 und 18). Hier ist eine Abgrenzung zu entzündlich verdicktem Gewebe visuell nicht möglich. Ein simples Auszählen (Standardmethode) stellte daher keine verlässliche Auswertungsmethode dar. Zudem war ein, nach Melaningehalt automatisiertes, Auszählen der Metastasenmenge nicht möglich, da nicht

alle Tumorzellen sicher Melanin sichtbar zeigten. In Abb. 34 ist der wechselhafte Melaningehalt der Metastasen hervorgehoben. Die meisten soliden Metastasen zeigten Melanin – jedoch nur stellenweise. Besonders bei größeren Metastasen zeigten sich zentral keine Melaninablagerungen. Die diffus infiltrierenden Metastasen zeigten nur selten Melaninablagerungen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Wirksamkeit von MePip im Tiermodell aus den vorliegenden Ergebnissen nicht sicher festgestellt werden konnte, da lediglich indirekte Analysemethoden durchgeführt werden konnten.

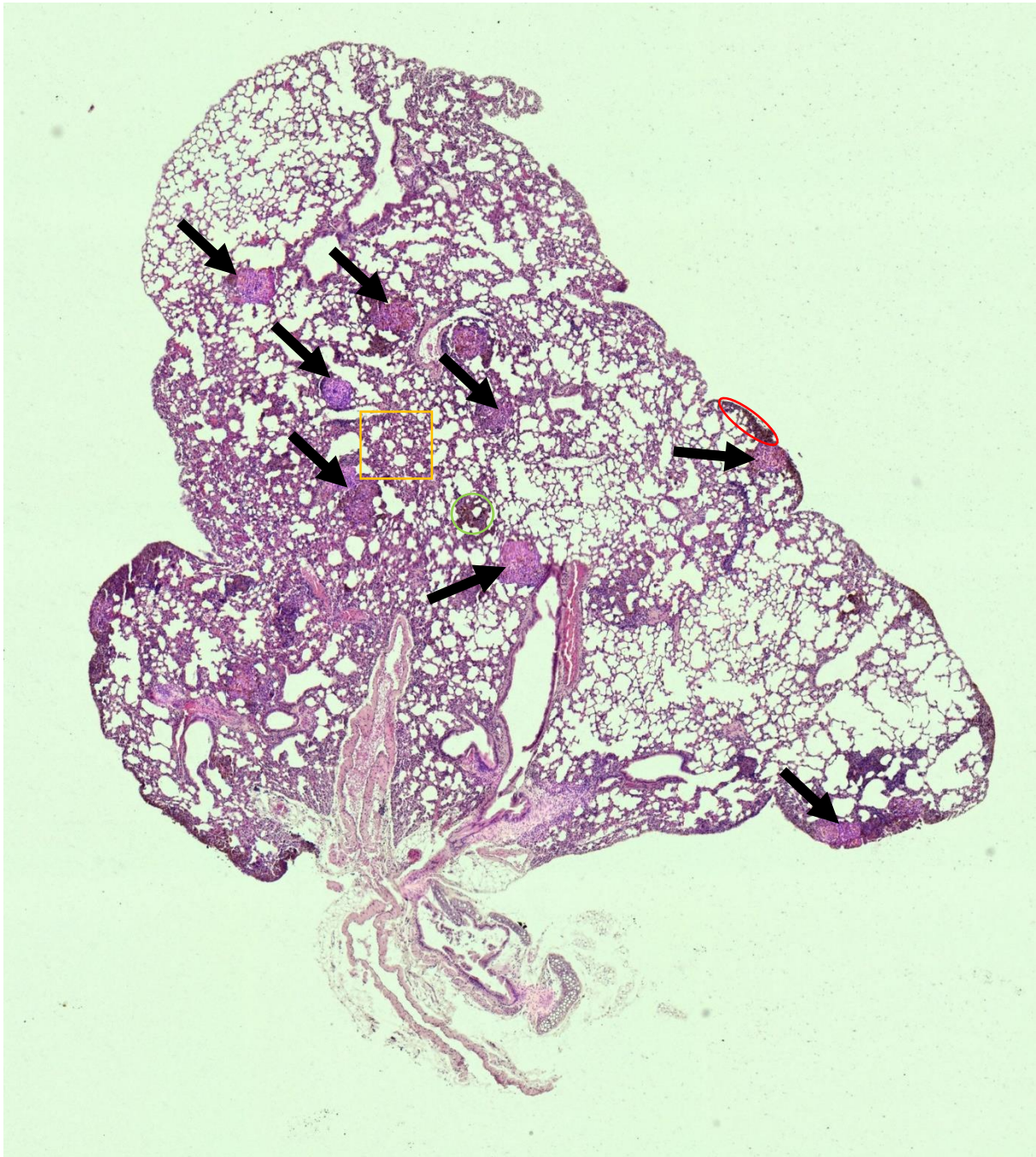


Abbildung 12: Beispiel der nur stellenweise vorhandenen Melaninablagerungen bei vornehmlich solider lokoregionärer Infiltration von Lungenmetastasen in einer HE-Färbung

Dieses Beispiel der nur stellenweise vorhandenen Melaninablagerungen bei vornehmlich solider lokoregionärer Infiltration von Lungenmetastasen (vgl. diffuse lokoregionäre Infiltration in Abb. 18) zeigt einige solide Metastasen (beispielhaft mit schwarzen Pfeilen markiert) in einer HE-Färbung zur Illustration der soliden lokoregionären Infiltration. Zudem sind an einer soliden Metastase randständige Melaninablagerungen sichtbar (z. B. rotes Oval rechts). Darüber hinaus sind auch Melaninablagerungen bei diffuser Gewebeeinfiltration zu sehen (z. B. grüner Kreis). Die Abbildung wurde videomikroskopisch erstellt (TL LED Leica, Microsystems).

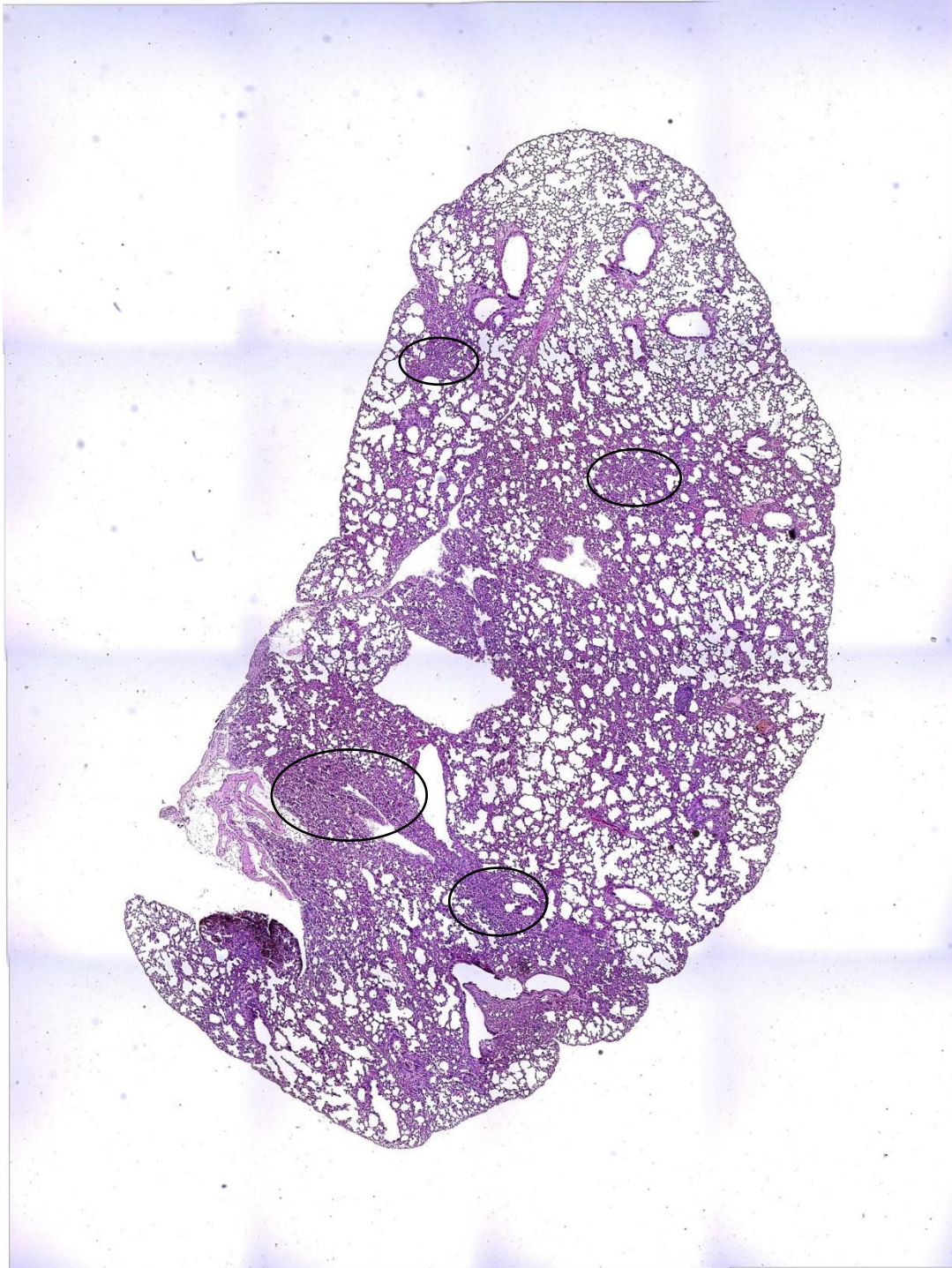


Abbildung 13: Beispiel einer diffusen lokoregionären Infiltration von Lungenmetastasen in einer HE-Färbung

Dieses Beispiel einer diffusen lokoregionären Infiltration zum Vergleich der unterschiedlichen Tumordinfiltrationen der Lungenmetastasen (solide und diffuse lokoregionäre Infiltration, Vgl Abb. 17) zeigt eine diffuse Metastasierung (beispielhaft mit schwarzen Kreisen markiert) in einer HE-Färbung zur Illustration der diffusen lokoregionären Infiltration. Die Abbildung wurde videomikroskopisch erstellt (TL LED Leica, Microsystems).

2.2.5 Qualitätskontrolle und Versuchsetablierung

2.2.5.1 Mikroskopische Kontrolle beim Resazurin-Reduktions-Assay

Jedes Well wurde vor und nach Inkubation der Wirkstoffe lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei einem Wirkstoff, Difid (3,5-Bis(2,4-difluorbenzyliden)-4-piperidon), kam es zum Ausfall des Wirkstoffs schon bei niedrigen Konzentrationen.

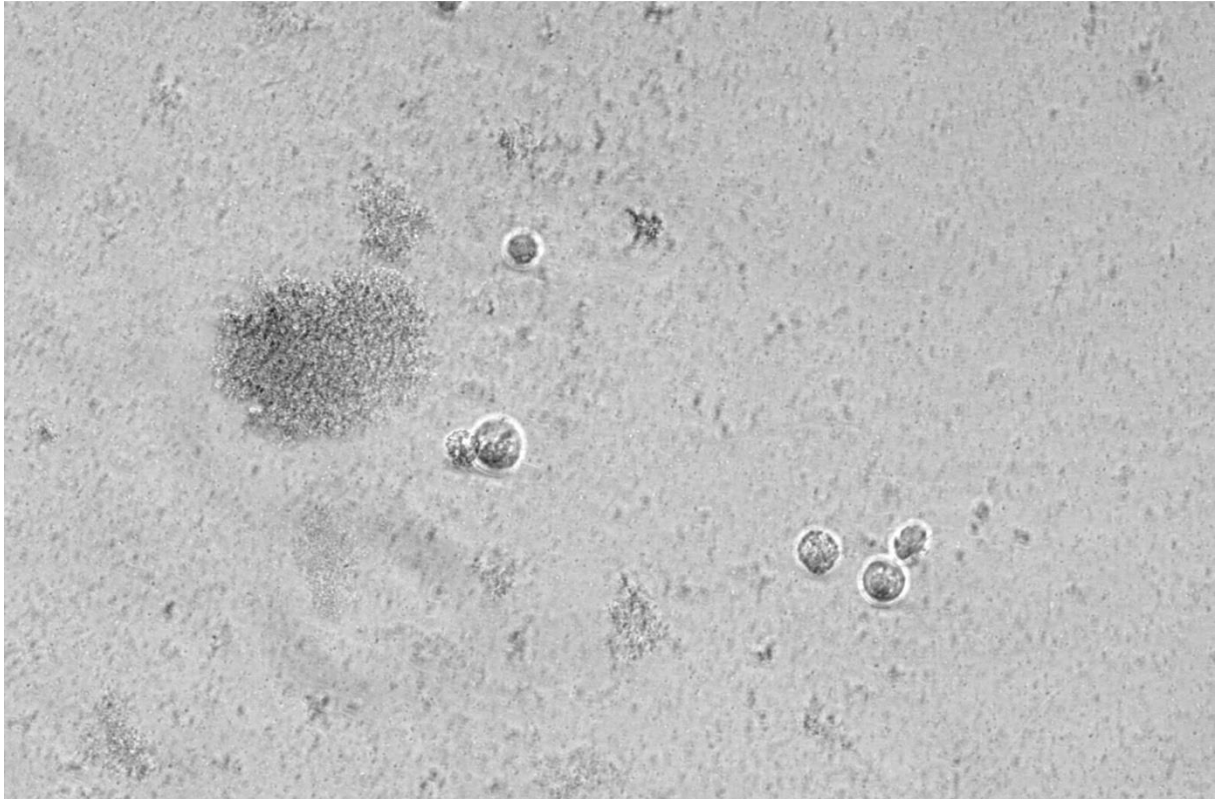


Abbildung 14: Ausfall des Wirkstoffs Difid bei niedrigen Konzentrationen

Dargestellt ist ein beispielhafter Ausfall des Wirkstoffs Difid bei niedrigen Konzentrationen im Resazurin-Reduktions-Assay, der bei der routinemaßigen lichtmikroskopischen Kontrolle der Wells auffiel.

Daher wurde der Wirkstoff von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen und wird daher in der Einleitung nicht näher behandelt.

2.2.5.2 LPS Zytotoxizitätsassay

Im Rahmen der Qualitätskontrolle und rt-qPCR-Versuchsetablierung wurde die Stärke des zytotoxischen Effekts von LPS mittels Resazurin-Reduktions-Assay an THP-1 Makrophagen überprüft. Die Zellviabilität wurde jeweils nach 24, 48 und 72 h erhoben (n = 3).

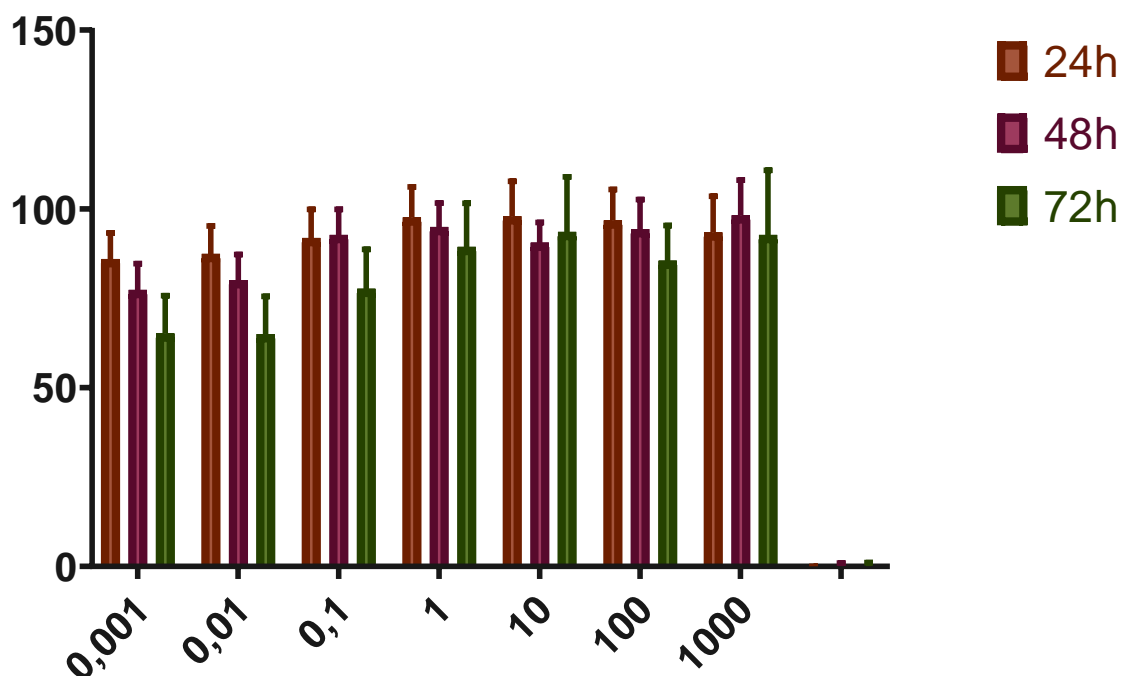


Abbildung 15: Zytotoxizität von LPS in an THP-1 Makrophagen

Die Zellviabilität der THP-1 Makrophagen ist in % auf der y-Achse angegeben. Die Konzentration von LPS in ist in ng / ml auf der x-Achse angegeben. Die Fehlerbalken zeigen das KI₉₅ (bei n = 3). Die Daten wurden mittels Resazurinassay erhoben. Die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch (TECAN infinite M 200Pro). Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Es zeigte sich keine dosisabhängige Toxizität.

2.2.5.3 Primer-Evaluierung

2.2.5.3.1 Grundlagen der Primer Evaluierung

Die Bestimmung der Amplifikationseffizienz gehört bei der Evaluierung von Primern zu den ersten Schritten bei der Einrichtung eines rt-qPCR-Tests. Das Verständnis der Effizienz und ihrer Berechnung ist entscheidend für die genaue Interpretation der Daten und den späteren Versuchsaufbau. Die Effizienz hängt vom Primer, der Länge des zu replizierenden Abschnitts, der Zusammensetzung des Mastermixes und zum Teil von der Probenqualität ab. Im Idealfall sollte sich die Anzahl der Moleküle der Zielsequenz (Template) bei jedem Replikationszyklus verdoppeln, was einer Amplifikationseffizienz von 100 % entspricht. Wenn sich die Anzahl der replizierten Moleküle weniger als verdoppelt, ist dies meist auf eine schlecht gewählte Annealing Temperatur zurückzuführen, was zu einer Effizienz kleiner 100 % führt. Wenn die Effizienz umgekehrt über 100 % liegt erhöht sich die Anzahl der Moleküle um mehr als das Doppelte. Normalerweise liegt die gewünschten Amplifikationseffizienz zwischen 90 und 110 %. Da die Evaluation und der eigentliche Versuchsassay getrennt voneinander ablaufen,

haben wir für die Effizienz einen engeren Rahmen (zwischen 96 und 104 %) gewählt. Ein Wert von 100 % bedeutet, dass das Polymeraseenzym mit maximaler Kapazität arbeitet.

Die häufigsten Gründe für eine geringere Effizienz sind ein schlechtes Primerdesign und nicht optimale Reagenzienkonzentrationen oder Reaktionsbedingungen. Sekundärstrukturen wie Primerdimere und Hairpins oder ungeeignete Schmelztemperaturen (T_m) können das Primer-Template-Annealing zusätzlich beeinträchtigen und zu einer schlechten Amplifikation führen. Da jede weitere Verdünnung entsprechend geringere DNA-Ausgangsmengen enthält, treten Unterschiede zwischen den C_t -Werten in seriell verdünnten Proben auf.

Eine Effizienz über 100 % würde aussagen, dass mehr als eine Kopie der Sequenz erzeugt würde. Wenn dem Sample mehr Template zugesetzt wird, verschieben sich die C_t -Werte überproportional zu früheren Zyklen. Folglich sind die Unterschiede zwischen den C_t -Werten im Vergleich der einzelnen Verdünnungsstufen der Standardkurve größer als vorhergesagt, was zu einer Amplifikationseffizienz von über 100 % führt. Dies führt zu einer Abflachung der Effizienzkurve mit geringerer Steigung.

Zu den häufigsten Inhibitoren des Polymerase-Enzyms gehört Verschleppungsmaterial aus der Probe. Außerdem kann ein zu hoher Anteil an Nukleinsäuren zu zufälligen Basenpaarbindungen führen. Dies wiederum führt zu einem erhöhten Hintergrundsignal, was zu einer Schwellenwerterhöhung für den C_t -Wert führt. Zu den üblichen Verunreinigungen gehören Heparin, Hämoglobin, Polysaccharide, Chlorophylle, Proteinase K, Natriumacetat und Andere. Verschiedene andere Verunreinigungen können auch von der DNA/RNA-Isolierung übertragen werden, wie Ethanol, Phenol und SDS. Wenn Inhibitoren in den konzentrierten Proben vorhanden sind, sind mehr Zyklen erforderlich, um die Nachweisgrenze zu überschreiten, als bei Proben ohne Inhibitoren. Bei konzentrierteren Proben ist eine Hemmung wahrscheinlicher. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Kurvensteigung besteht daher in der Verdünnung der Probe. Dies ist ein guter Weg, um zu testen, ob tatsächlich Inhibitoren der Grund für die erhöhte Effizienz sind. Da die Inhibitoren zusammen mit der DNA/RNA verdünnt werden, können höhere Verdünnungen niedrigere Konzentrationen enthalten, bei denen keine hemmende Wirkung mehr vorhanden ist.

Eine Hemmung kann leicht vermieden werden, indem die Reinheit der DNA/RNA-Proben vor der qPCR, wie in unserem Fall, mit einer spektrophotometrischen Messung kontrolliert wird. Die Reinheit wird als Verhältnis der Absorptionwerte bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) gemessen, die dem Verhältnis der Nukleinsäuren zu Proteinen entsprechen. Wenn der Reinheitswert nicht über 1,8 für DNA oder 2,0 für RNA liegt, sollten die Proben gereinigt werden. In ähnlicher Weise können Sie auch eine andere Probenvorbereitungsmethode verwenden. Wenn zusätzliche Aufreinigungsschritte das Problem nicht lösen, ist die Probe

möglicherweise von Natur aus schwierig zu bearbeiten. Oft wird deshalb ein Mastermix verwendet, der toleranter gegenüber Inhibitoren ist.

Andere Gründe für eine Effizienz von über 100 % können Pipettierfehler, Polymerase-Enzymaktivatoren, Hemmungen durch reverse Transkriptase, ungenaue Verdünnungsreihen, unspezifische Produkte und Primerdimere bei der Verwendung von Interkalationsfarbstoffen sein. Letztere sollten für jede Reaktion einzeln kontrolliert werden.

Eine Möglichkeit die Amplifikationseffizienz zu berechnen, besteht darin, serielle Verdünnungen der Probe herzustellen. Sobald man die C_t -Werte erhält, trägt man diese zusammen mit den entsprechenden Konzentrationen auf einer logarithmischen Skala auf. Anschließend erstellt man eine lineare Regressionskurve durch die Datenpunkte und berechnet die Steigung der Trendlinie. Schließlich wird die Effizienz anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$y = -1 + 10(-1/\text{Steigung})$$

Ein weiterer entscheidender Parameter zur Beurteilung der Effizienz ist R^2 . R^2 ist ein statistischer Begriff, der angibt, wie gut ein Wert einen anderen Wert vorhersagen kann. Wenn $R^2 = 1$ ist, kann der C_t -Wert verwendet werden, um die Menge der Zielsequenz genau vorherzusagen. Dies bedeutet am Beispiel der qPCR-Reaktion, dass mit jeder Verdopplung vom Probenmaterial der C_t -Wert zuverlässig um 1 sinkt. Wenn $R^2 = 0$ ist, ist das Gegenteil der Fall. Ein R^2 -Wert $> 0,99$ bietet große Sicherheit bei der Korrelation der beiden Werte. R^2 gibt daher an wie genau die Punkte auf der berechneten Geraden liegen (siehe unten).

2.2.5.3.2 Beispielhafte Primer-Evaluierung

Die Assay Anpassung der rt-qPCR wurde mittels Optimierung der Annealing Temperatur durchgeführt.

Die Temperaturen wurden in 5 °C-Schritten (von 50 bis 70 °C) sowie mit der errechneten optimalen Annealingtemperatur nach der folgenden Gleichung getestet:

$$T_a \text{ Opt} = 0,3 \times (T_m \text{ of primer}) + 0,7 \times (T_m \text{ of product}) - 14,9$$

Wenn eine Effizienz der Replikation zwischen 96 und 104 % nicht erreicht wurde, wiederholte ich den Vorgang in 1 °C-Schritten um den besten Wert.

Das Ziel der Assay Anpassung war eine Effizienz von nahezu 100 % zu generieren, um ein möglichst exaktes Verdoppeln des Templates zu ermöglichen.

Es wurden Verdünnungsstufen, angefangen bei 200 ng pro Well, angesetzt. Pro Verdünnungsstufe wurde die Konzentration bis zur zweiten Verdünnungsstufe halbiert, danach geviertelt.

(200 ng = x → 1/2 x = 100 ng cDNA, 1/4 x = 50 ng cDNA, 1/16 x = 12,5 ng cDNA,

1/64 x = 3,125 ng cDNA, 1/256 x = 0,78125 ng cDNA

Mittels einer logarithmischen Auftragung der C_t -Werte wurde die Effizienz der Replikation mathematisch bestimmt. Bei der letzten Stufe haben wenige Primer noch Werte produziert.

Im Folgenden soll nun die beispielhafte Etablierung einer unserer GAPDH Primer gezeigt werden.

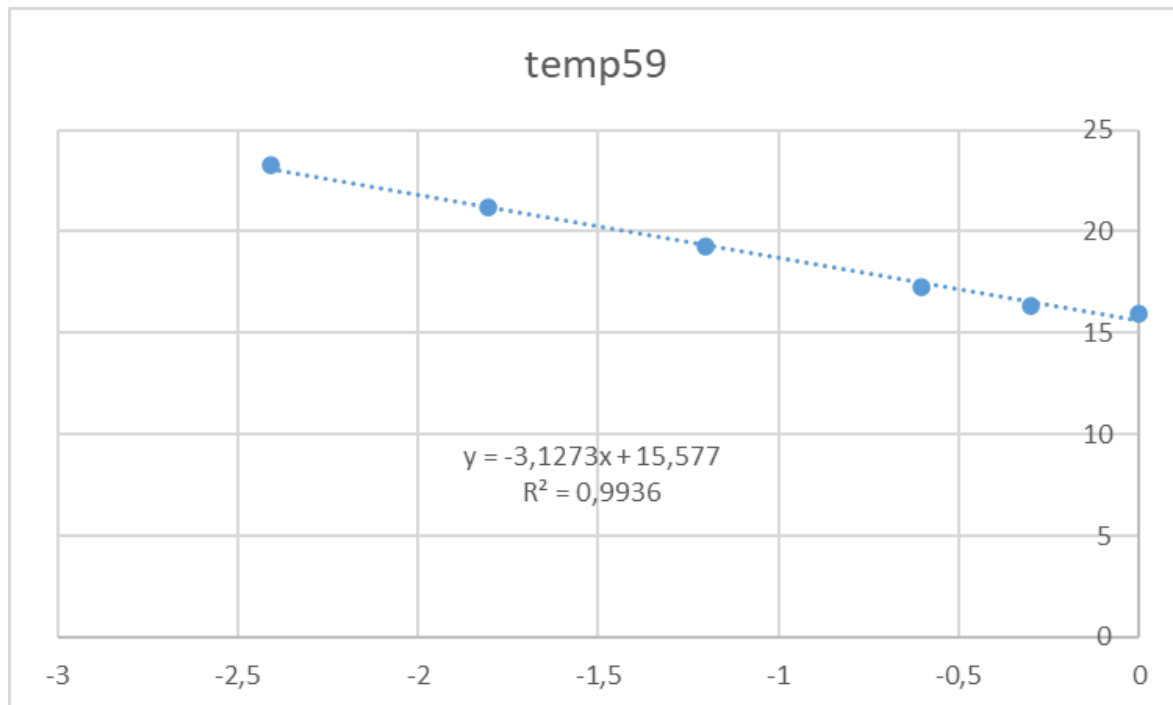


Abbildung 16: Lineare Regressionskurve zur Berechnung der Steigung der Trendlinie bei 59 °C Annealing Temperatur am Beispiel eines GAPDH Primers

Die x-Achse zeigt den negativen dekadischer Logarithmus (relative Konzentration der Zielsequenz). Die y-Achse zeigt den C_t -Wert. y gibt die Formel der Ausgleichsgeraden an. R2 gibt die Korrelation von C_t -Wert und relativer Konzentration der Zielsequenz an. Der Graph wurde mittels Microsoft Excel erstellt.

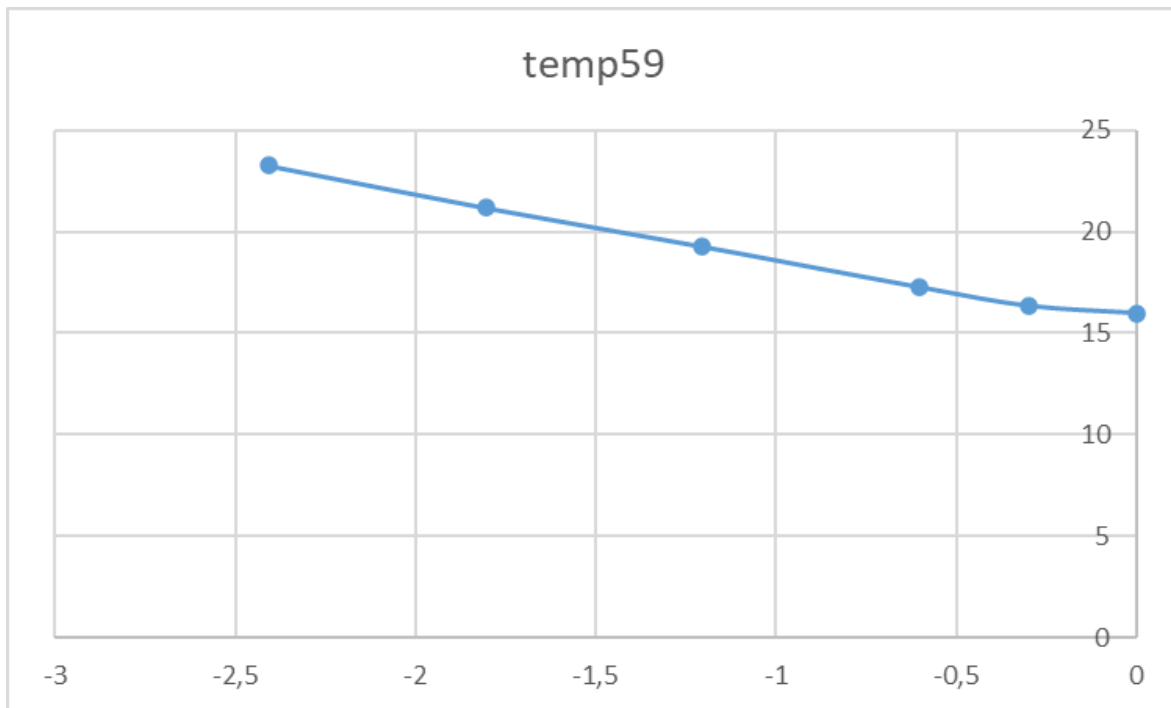


Abbildung 17: Graph zur Visualisierung der Effizienzänderung in der Verdünnungsreihe. Test bei 59 °C Annealing Temperatur am Beispiel eines GAPDH Primers

Die x-Achse zeigt den negativen dekadischen Logarithmus (relative Konzentration der Zielsequenz). Die y-Achse zeigt den C_t -Wert. Der Graph wurde mittels Microsoft Excel erstellt.

Es zeigte sich eine Effizienz von 108 % und ein deutlicher Knick zwischen 200 und 100 ng. Es wurden die ersten beiden Verdünnungsstufen halbiert, um zu sehen, ob bei hohen cDNA-Konzentration durch hohe überführte Inhibitormengen die PCR-Reaktion gehemmt wurde.

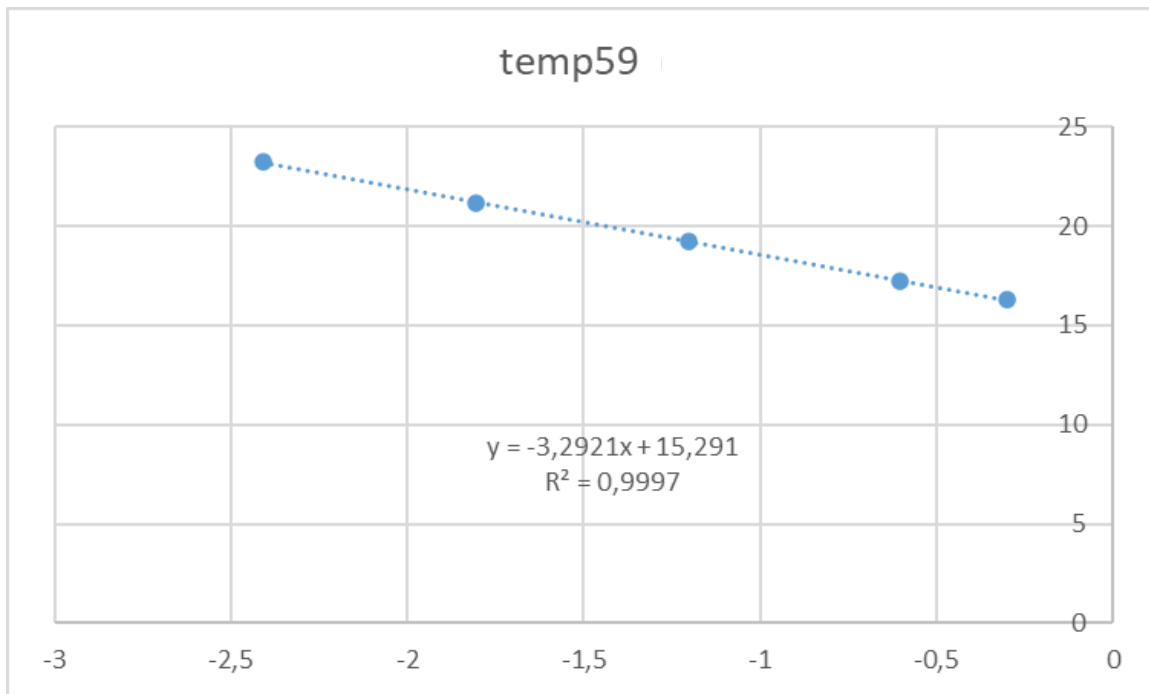


Abbildung 18: Lineare Regressionskurve zur Berechnung der Steigung der Trendlinie bei 59 °C Annealing Temperatur am Beispiel eines GAPDH Primers

Die x-Achse zeigt den negativen dekadischen Logarithmus (relative Konzentration der Zielsequenz). Die y-Achse zeigt den C_t -Wert. y gibt die Formel der Ausgleichsgeraden an. R^2 gibt die Korrelation von C_t -Wert und relativer Konzentration der Zielsequenz an. Die erste Verdünnungsstufe (200 ng) wurde bei der Berechnung entfernt, da der Graph zur Effizienzänderung (Abb. 19) eine deutlich sichtbare Änderung der Steigung zwischen dieser und der nächsten Verdünnungsstufe gezeigt hat. Der Graph wurde mittels Microsoft Excel erstellt.

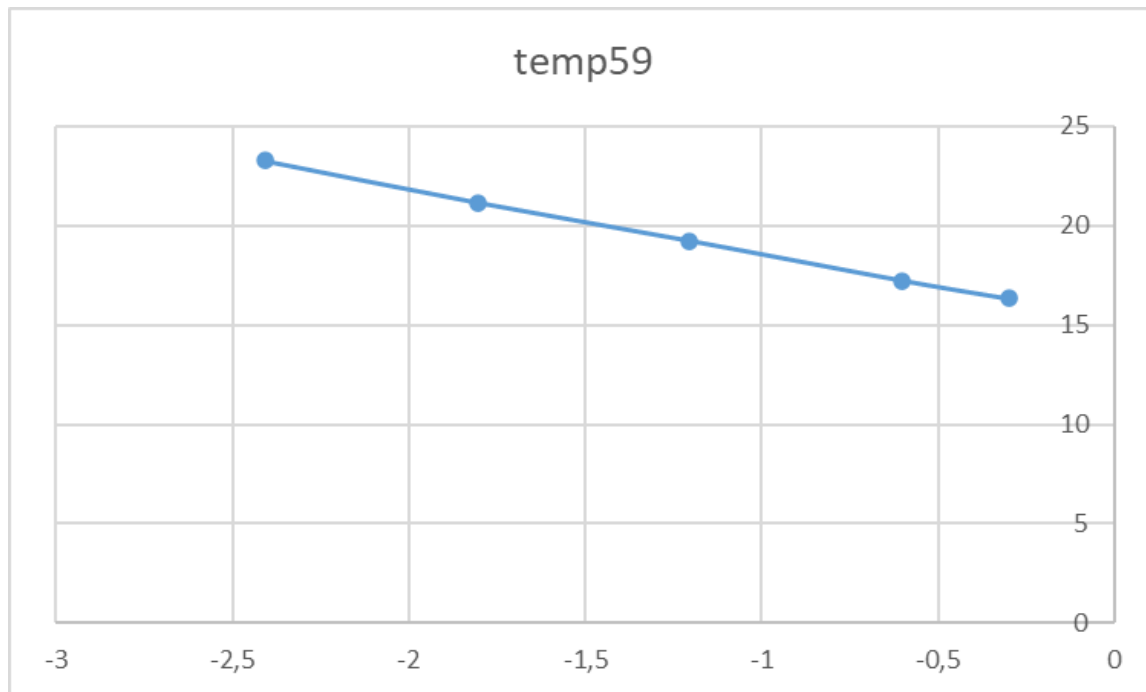


Abbildung 19: Graph zur Visualisierung der Effizienzänderung in der Verdünnungsreihe

Die erste Verdünnungsstufe (200 ng) wurde bei der Berechnung entfernt, da der Graph zur Effizienzänderung (Abb. 19) eine deutlich sichtbare Änderung der Steigung zwischen dieser und der nächsten Verdünnungsstufe gezeigt hat. Test bei 59 °C Annealing Temperatur am Beispiel eines GAPDH Primers. Die x-Achse zeigt den negativen dekadischen Logarithmus (relative Konzentration der Zielsequenz). Die y-Achse zeigt den C_t -Wert. Der Graph wurde mittels Microsoft Excel erstellt.

Sobald die Verdünnungsstufe 200 ng aus dem Graphen entfernt wird, ergibt sich eine Effizienz von 101 %.

Bei humanem iNOS musste, da die Temperaturanpassung nicht ausgereicht hat, die Primerkonzentrationen angepasst werden. Der Vorgang hierzu wird hier nicht weiter illustriert.

2.2.5.4 Polarisationsüberprüfung

Die Polarisation der Makrophagen wurde anhand der gewählten Makrophagenphänotypmarker überprüft.

2.2.5.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung wurde an PFA-fixierten, in Paraffin eingebetteten histologischen Schnitten der Lungengewebe der Versuchstiere durchgeführt. Das Protokoll für die immunhistochemische Färbung beinhaltete aufgrund der schwarzen Pigmentierung der Melanometastasen das Bleichen der Schnitte vor der Antigenrückgewinnung, was eine bisher nicht etablierte Technik in unserem Labor darstellt. Unglücklicherweise konnte innerhalb der fünf vorgenommenen Färbeversuche kein funktionierendes Protokoll erarbeitet werden. Im Folgenden soll zuerst das verwendete Ausgangsprotokoll und danach die nach den

Misserfolgen vorgenommenen Änderungen dargestellt werden. Die Schnitte wurden, wie in Abschnitt 2.2.4.2.3. beschrieben, deparaffinisiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in einen Bleichpuffer mit 0,5%ig verdünntem Wasserstoffperoxid mit Tris-HCl Puffer (pH 10) für 15 Minuten bei 80 °C auf einer Heizplatte mit Rührfisch inkubiert. Die Antigen-Rückgewinnung erfolgte durch Aufkochen der Schnitte in 0,01 M Natriumcitratpuffer (pH 6,0) in einem Dampfkochtopf. Nach Erreichen des Siedepunktes wurde der Dampfkochtopf ausgeschaltet und die Schnitte für eine Gesamtdauer von einer Stunde im Dampfkochtopf belassen. Danach folgte ein anschließendes 30-minütiges Abkühlen auf einer Werkbank. Anschließend wurden die Schnitte zweimal, jeweils 5 min, mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden dann für ein bis drei Tage in frischem, destilliertem Wasser stehen gelassen. Anschließend wurde ein Quenching der Lungenschnitte mit 3%igem Wasserstoffperoxid für 15 min durchgeführt, um die endogene Peroxidaseaktivität der Gewebe zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte erneut zweimal, jeweils 5 min, mit destilliertem Wasser gewaschen. Mit einem hydrophoben Barrierestift (DAKO) zog ich einen Kreis um das Gewebe. Um das Gewebe zu permeabilisieren, wurden die Schnitte zweimal 10 Minuten lang mit 1%igem Ziegen Serum in TBS mit 0,4%igem Triton X-100 (TBS-T) inkubiert. Anschließend wurde der in 1%igem TBS-T-Ziegen Serum verdünnte primäre Antikörper, Anti-Ki67 hinzugegeben und für ca. 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal mit 1%igem Serum (BSA, verdünnt und gefiltert) TBS-T für jeweils 10 min gewaschen. Darauffolgend wurde der in 1%igem Serum TBS-T verdünnte Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für ca. 90 min inkubiert. Es wurden hierbei jeweils die auf dem Datenblatt der Antikörper angegebenen empfohlenen Verdünnungen des Antikörpers verwendet (1:100 für Anti Ki67 und 1:1000 für den Sekundärantikörper). Nachfolgend wurden die Schnitte zweimal mit 1%igem Serum TBS-T für jeweils 10 min gewaschen. Währenddessen wurde das DAB-Reagenz (IMPACT DAB Kit, Vector Laboratories, SIC_4105) 30 min vor der Verwendung, gemäß den Anweisungen des Herstellers, zubereitet und 30 µl Reagenz auf einen Milliliter Verdünnungspuffer verwendet. Anschließend wurden 100 - 400 µl DAB auf jeden Abschnitt gegeben und die Färbung genau beobachtet. Die Schnitte wurden unterschiedlich lange gefärbt (8, 10 und 12 min). Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen. Darauffolgend wurde eine Gegenfärbung der Schnitte in Hämalaun-Lösung für 5, 10 und 20 s vorgenommen und danach wieder mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte, wie folgt, dehydriert: Sie wurden zweimal für jeweils 10 s in 95%igem Ethanol, zweimal für jeweils 10 s in 100%igem Ethanol, sowie zweimal für jeweils 10 s in Xylol inkubiert. Die Schnitte wurde hierauf für ca. 30 s der Raumluft exponiert, sodass das restliche Xylol verdampfen konnte und darauffolgend Deckgläser mit Roti Histokit II montiert werden konnten. Zum Schluss wurden jeweils 10 - 15 repräsentative Zufallsaufnahmen von fast allen Gewebeschnitten gemacht, die keine verwertbaren Färbungen aufwiesen.

Im ersten Versuchsdurchlauf zeigten sich eine zu starke Gegenfärbung mit der Hämalaun-Lösung, sowie eine unspezifische Färbung mit dem Farbstoff DAB, weswegen die Antigen-Rückgewinnung mit dem Zitratpuffer ausgelassen wurde. Verändert wurde außerdem die Einwirkzeit des DAB und die der Hämalaun Lösung.

Weiterhin wurde ein Färbeversuch mit einem Kit von Bio Vision („Ready-to-use IHC/ICC kit (Biotin free), One-Step HRP Polymer anti-Mouse, Rat & Rabbit IgG with DAB“), wie folgend beschrieben, nach Herstellerangaben durchgeführt. Nachdem die Schnitte, wie oben beschrieben, permeabilisiert wurden, wurde die Proteinblockierungslösung des Kits (blaue Kappe) 5 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem primärem Antikörper 20 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Objektträger fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem HRP-Polymer (braune Kappe) 20 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte fünfmal mit 0,05%igem TBS Triton X-100 und danach zweifach mit destilliertem Wasser gewaschen. Parallel wurde in einem Reaktionsgefäß 1 ml des Reagenz BS und 50 µl des Reagenz C (DAB-Chromogen) gegeben und mit dem Vortexmischer gemischt. Im folgenden Schritt wurden einige Tropfen des gebrauchsfertigen und DAB-Reagenz auf die Objektträger gegeben und 8, 10 und 12 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurden die Schnitte fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Die Gegenfärbung mit der Hämalaun Lösung und weitere Schritte bis zur Aufnahme am Mikroskop wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.2.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Berechnung wurde Microsoft Excel und Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet. Signifikanzen wurden anhand der errechneten P-Werte dargestellt (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001).

2.2.6.1 Balkendiagramme

Um die Zellviabilität der Zelllinien, bzw die Genexpression der Makrophagen, nach Behandlung der Zellen mit dem jeweiligen Wirkstoff darzustellen, wurden Balkendiagramme erstellt.

2.2.6.1.1 Zytotoxizitätsassay

Zu Beginn wurden die spektrophotometrisch erhobenen Daten normalisiert. Anschließend wurden die Daten logarithmisch transformiert ($x = \text{Log}(x)$). Daraufhin wurde eine nonlineare Regressionsanalyse durchgeführt. (Funktion: nonlinear regression (curve fit), bzw.: $\log(\text{inhibitor})$ vs. normalized response). Die Fehlerbalken geben das KI_{95} wieder. Die gemittelten Werte jeder Konzentration wurden im Verhältnis zum jeweiligen gemittelten Kontrollwert dargestellt. Ab einer Wirkstoffkonzentration von 32 µM wurden die gemittelten

Werte mittels einer 1%igen DMSO-Kontrolle separiert normalisiert. Die Balken wurden mit steigender Konzentration des Wirkstoffes dargestellt. So sollte die Beziehung zwischen der zytotoxischen Wirkung der Wirkstoffe und der Wirkstoffkonzentration graphisch dargestellt werden.

2.2.6.1.2 Makrophagenrepolarisation

Aus den mittels rt-qPCR erhobenen C_t -Werten wurde mittels Microsoft Excel der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert errechnet. Die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte wurden in Graph Pad Prism 8 übertragen und mittels eines Two-way ANOVA Tests nach Bonferroni ausgewertet. Die Fehlerbalken geben die SEM wieder.

2.2.6.2 Dosis-Wirkungs-Kurven und IC_{50} Werte

Um die Wirkung der getesteten Stoffe auf Zelllinien graphisch darzustellen, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Auf der x-Achse wurden dabei logarithmisch die getesteten Konzentrationen aufgetragen, die y-Achse wurde zur Darstellung der Zellviabilität in % genutzt. Der IC_{50} Wert beschreibt die mittlere inhibitorische Konzentration und zeigt die Konzentration des Wirkstoffs, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Die IC_{50} Werte wurden mittels Graph Pad Prism berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Screening der Wirkstoffe

3.1.1 Zytotoxizität (Resazurin-Reduktions-Assay)

Um weitere Eigenschaften und Wirkmechanismen zu erschließen ist eine erste Einschätzung der Toxizität der Wirkstoffe notwendig. Dazu wurden Zytotoxizitätsbestimmungen zur Bestimmung der IC_{50} mittels eines Resazurin-Reduktions-Assays durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängig abnehmende Zellviabilität bei zwei verschiedenen Makrophagenzelllinien (Abb. 17), sowie bei zwei benignen (Abb. 18) und drei malignen Zelllinien (Abb. 19). Die mittels TECAN infinite M 200Pro spektrophotometrisch erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet. Die bei der Auswertung berechnete IC_{50} wird in Tabelle 12 dargestellt. Sowohl Isogarcinol, als auch MePiP zeigten sich bei allen Zelllinien potenter als ihre jeweiligen Referenzsubstanzen Garcinol und Curcumin (siehe Tabelle 12). Speziell gegenüber malignen Zelllinien zeigte sich im Vergleich zur Referenzsubstanz eine z. T. wesentliche stärkere Potenzsteigerung bei niedriger Konzentration als gegenüber benignen Zelllinien. Beim Vergleich der Wirkung bei Hepatozyten-Zelllinien (AML 12 und DPT1/2) lässt sich exemplarisch eine deutlich niedrigere Toxizität bei benignen als bei malignen Leberzellen zeigen (siehe Tabelle 12). Es ist anzunehmen, dass die Wirkung der Substanzen nicht rein zytotoxisch ist, da die Wirkstoffe

unterschiedlich potent gegenüber verschiedenen Zellreihen sind. Beispielsweise lässt sich bei MePiP anhand der relativ niedrigen IC_{50} bei Immunzellen und der biochemischen Ähnlichkeit des Wirkstoffes zu Curcumin (ein bekannter STAT3 Inhibitor) vermuten, dass eine Modulation der Genexpression vorliegt.

Tabelle 12: IC_{50} Curcuminoide und Garcinoide

Die Werte wurden mittels Graph Pad Prism 7 aus den Ergebnissen der Resazurinassays errechnet. Das KI_{95} wird in Klammern angegeben, Daten wurden mittels Resazurinassay erhoben. Die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch (TECAN infinite M 200Pro). Die erhobenen Daten wurden anschließend mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet.

Wirkstoff	Raw Makrophagen	THP-1 Makrophagen	AML 12 Hepatozyten	3T3 Fibroblasten	DPT 1 Hepatomzellen	DPT 2 Hepatomzellen	B16F10 Mausemelanomzellen
Curcumin (Referenzsubstanz)	5.516 μM (5.017 – 6,065 μ M)	6,108 μM (4,402 – 8,464 μ M)	10,83 μM (9,421 – 12,46 μ M)	6.81 μM (6.246 – 7,423 μ M)	17.42 μM (14.49 – 21 μ M)	7.915 μM (7.055 – 8,882 μ M)	13,82 μM (12,31 – 15,5 μ M)
MePiP	1.247 μM (1,024 – 1.517 μ M)	1,061 μM (0,8393 – 1,332 μ M)	2.282 μM (1,506 – 3,51 μ M)	0.7544 μM (0.711 – 0,8042 μ M)	0.7209 μM (0.5624 – 0,9143 μ M)	0.4879 μM (0.3950 – 0,5954 μ M)	2.775 μM (2.087 – 3,661 μ M)
Garcinol (Referenzsubstanz)	3.810 μM (3.275 – 4,368 μ M)	8,707 μM (7,336 – 10,33 μ M)	10,19 μM (9,023 – 11,51 μ M)	8.72 μM (7.112 – 10,79 μ M)	6.972 μM (6.333 – 7,676 μ M)	6.594 μM (5.770 – 7,538 μ M)	3.142 μM (2.664 – 3,694 μ M)
Iso-garcinol	2,264 μM (2,058 – 2,489 μ M)	5,313 μM (4,387 – 6,431 μ M)	4,306 μM (3,326 – 5,572 μ M)	3.242 μM (2.959 – 3,555 μ M)	2.815 μM (2,512 – 3.153 μ M)	2.229 μM (1.954 – 2,541 μ M)	2,084 μM (1,824 – 2,369 μ M)

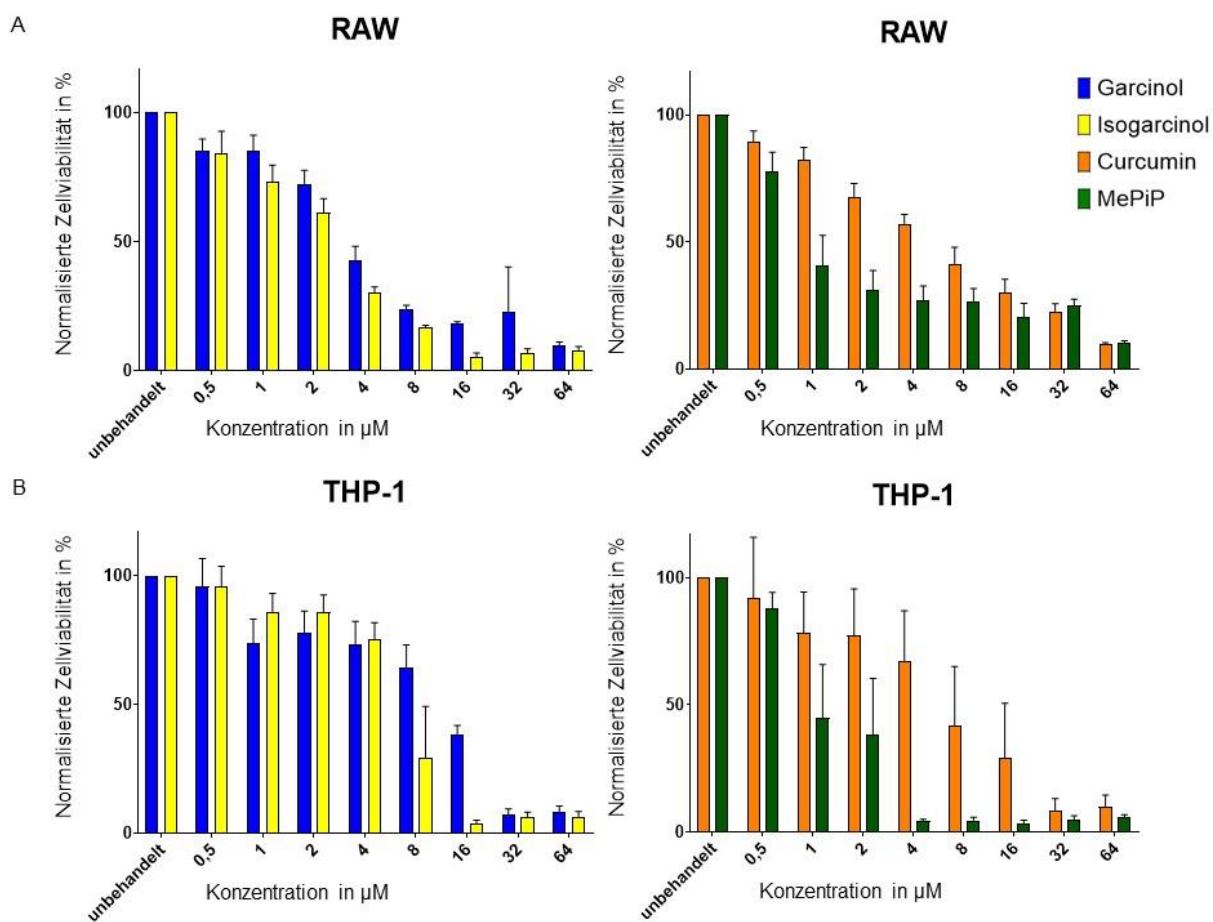


Abbildung 20: Zytotoxizität von Garcinoiden und Curcuminoiden an Makrophagen

A) RAW Makrophagen (murin), B) THP-1 Makrophagen (human). Die Fehlerbalken zeigen das KI_{95} (bei $n=2$). Die Daten wurden mittels Resazurinassay erhoben. Die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch (TECAN infinite M 200Pro). Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

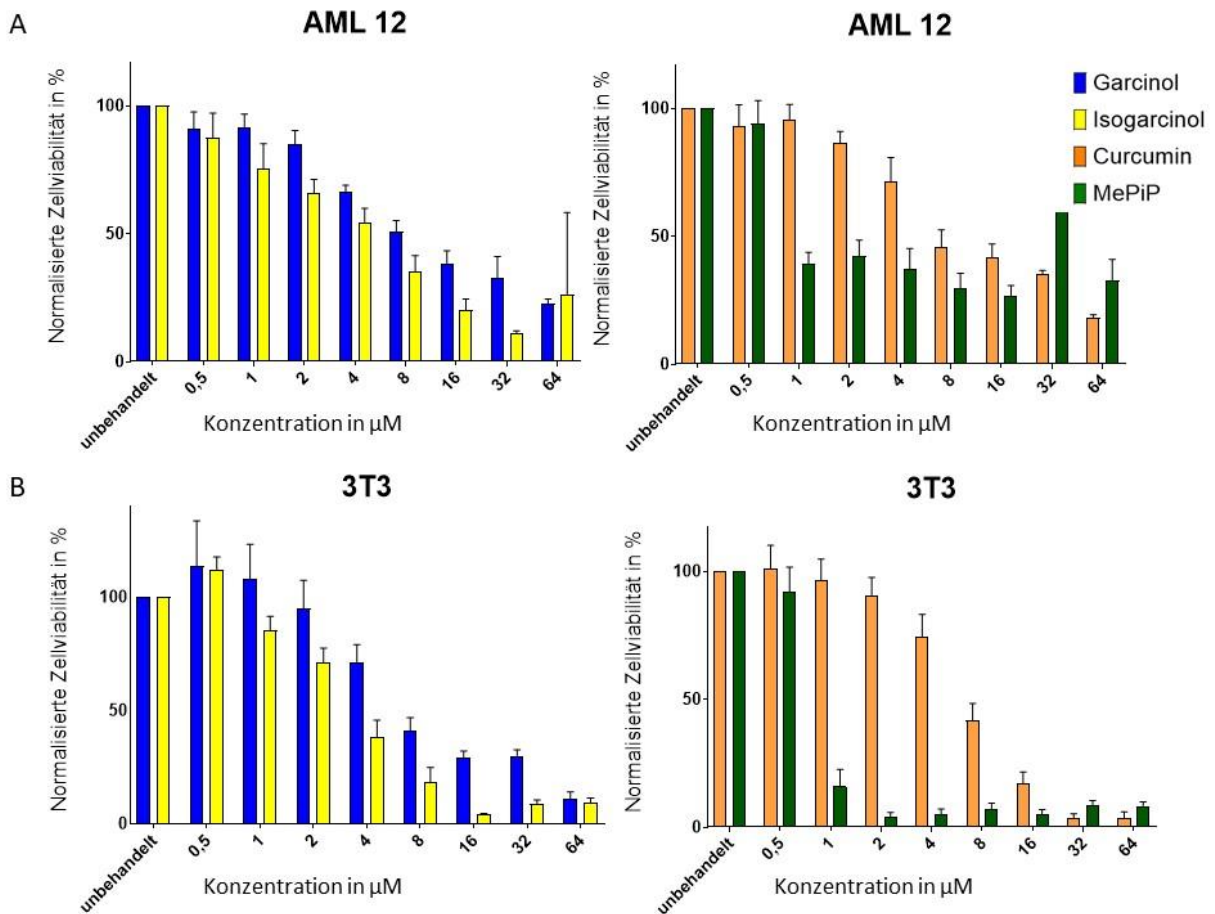


Abbildung 21: Zytotoxizität von Garcinoiden und Curcuminoiden an benignen Zellen

A) AML 12 Hepatozyten, B) 3T3 Fibroblasten. Die Fehlerbalken zeigen das KI_{95} (bei $n=2$ (AML 12 Testung mit Curcumin $n=1$)). Die Daten wurden mittels Resazurinassay erhoben. Die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch (TECAN infinite M 200Pro). Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

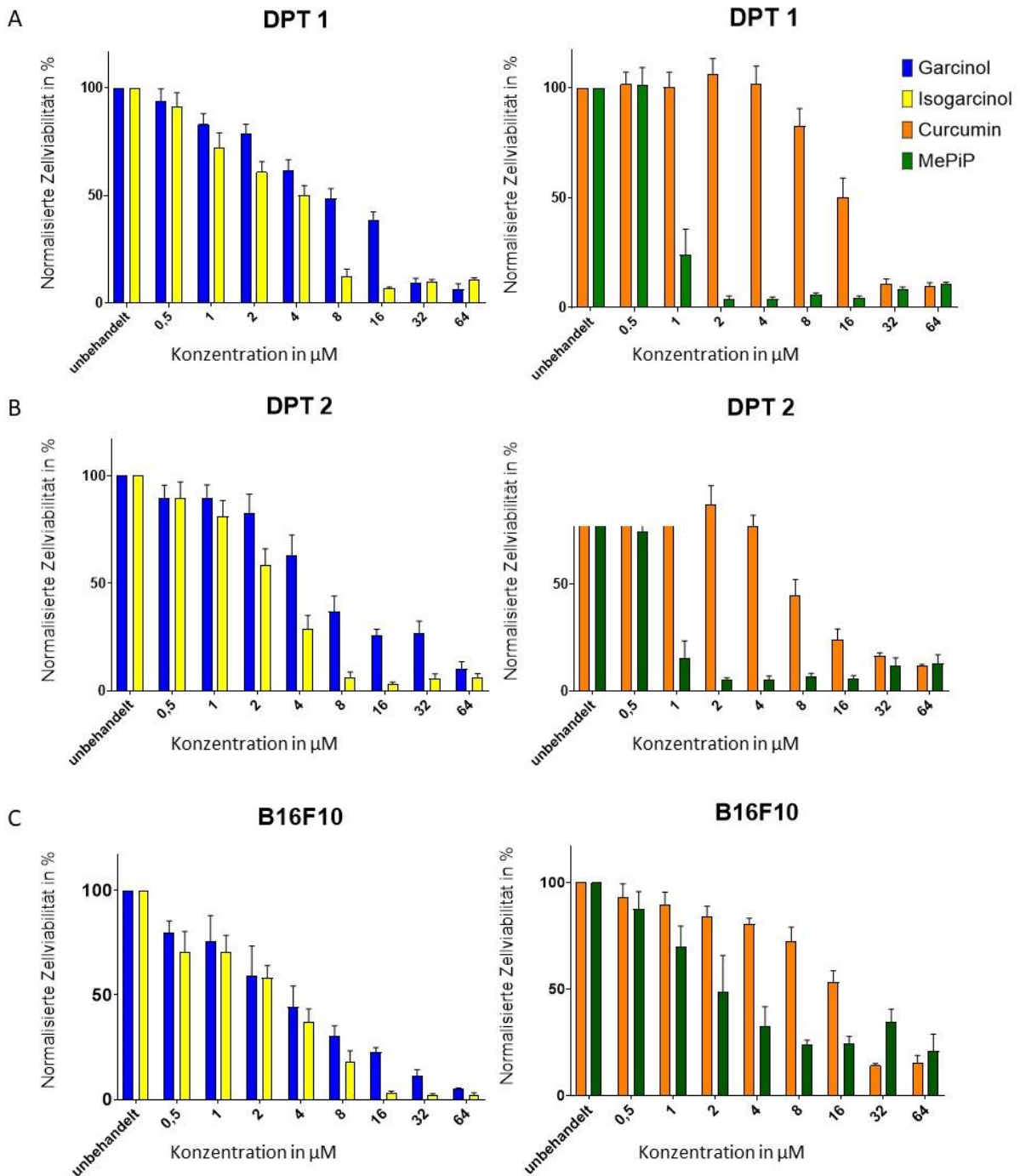


Abbildung 22: Zytotoxizität von Garcinoiden und Curcuminoiden an malignen Zellen

A) DPT1 Hepatomzellen, B) DPT1 Hepatomzellen C) B16F10 Mausemelanomzellen. Die Fehlerbalken zeigen das KI_{95} (bei $n=2$). Die Daten wurden mittels Resazurinassay erhoben. Die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch (TECAN infinite M 200Pro). Die erhobenen Daten wurden anschließend mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

3.1.1.1 Evaluation der Arbeitslösungen

Bei der Evaluierung der Wirkstoffe mittels Zytotoxizitätsassay traten unerwartete Dosis-Wirkungskurven bei den ersten Versuchsreihen auf. Wie bereits erwähnt wurden regelmäßige mikroskopische Kontrollen durchgeführt, um die Plausibilität der Messwerte durch optische Eindrücke zu bestätigen. Da Löslichkeitsprobleme der Wirkstoffe eine mögliche Fehlerquelle darstellten, nahmen wir eine Anpassung der Verdünnungsstufen vor, welche allerdings keine ausreichende Veränderung herbeiführte. Um einen weiteren Störfaktor anzugehen, wurde im nächsten Schritt der Versuchsetablierung der DMSO-Anteil der Wells mit 32 μM und 64 μM angepasst und nach DMSO-Kontrolle normalisiert. Da weiterhin keine Veränderung der Resultate auftrat, wurde ein Resazurin-Reduktions-Assay, anstatt des MTT-Zytotoxizitätsassay verwendet. Die Versuchsreihen mit Verwendung des Resazurin-Reduktions-erbrachten eine größtenteils plausible Dosis-Wirkungskurven und zeigte lediglich eine unerwartet niedrige Zellviabilität im Bereich von 0,5 μM . Um weitere Störfaktoren auszuschließen und damit die vorliegende Unregelmäßigkeit zu bestätigen oder zu beseitigen, wurde ein Vergleich der Zellviabilität bei Verwendung der unten aufgeführten Arbeitslösungen angestrebt.

- Platte 1: normale DMSO-Konzentration, ein bereits gelagertes (altes) Aliquot und ein frisch angesetztes (neues) Aliquot
- Platte 2: normale DMSO-Konzentration, ein frisches Aliquot mit Serum, ein bereits gelagertes Aliquot ohne Serum
- Platte 3: zwei frische Aliquotierungen mit 3% DMSO, einmal mit und einmal ohne Serum
- Platte 4: normale DMSO-Konzentration mit Serum und ohne, nach neuem Schema ohne Verdünnungsstufe 4 (V4) pipettiert

Folgende Fragen sollten durch den Versuch beantwortet werden:

1. Ist ein höherer DMSO-Anteil notwendig um die Löslichkeit der Wirkstoffe bei niedrigen Konzentrationen zu erhalten?
2. Besteht eine Interaktion der Wirkstoffe mit dem verwendeten Serum während Lagerung?

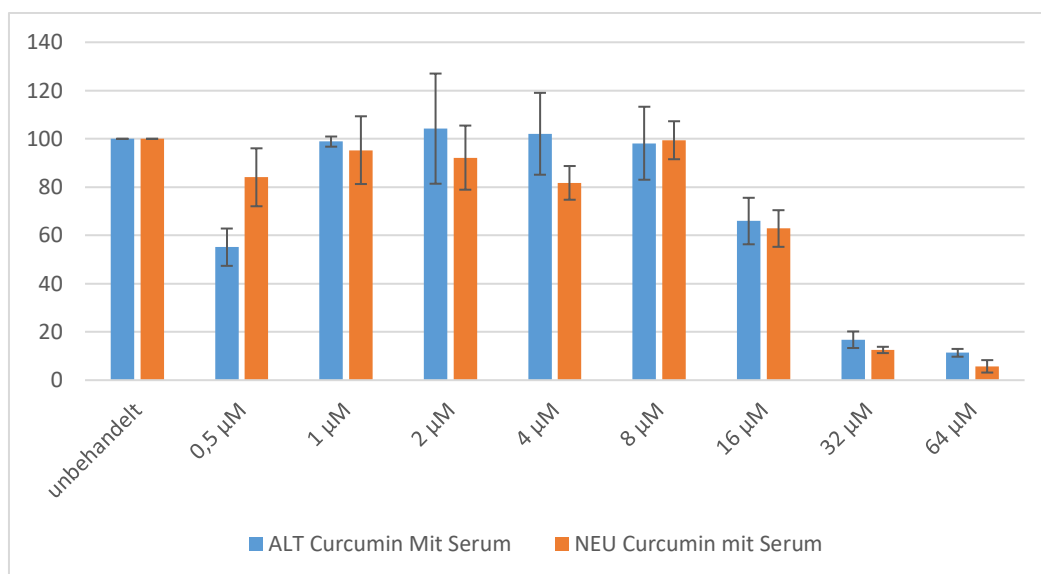


Abbildung 23: Evaluation der Arbeitslösungen, Platte 1

Normale DMSO-Konzentration, bereits gelagertes Aliquot (blau) und frisch angesetztes Aliquot (orange). Die y-Achse zeigt die Zellviabilität in %. Die x-Achse zeigt die angewendete Konzentration der Referenzsubstanz Curcumin in μM. Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und ausgearbeitet.

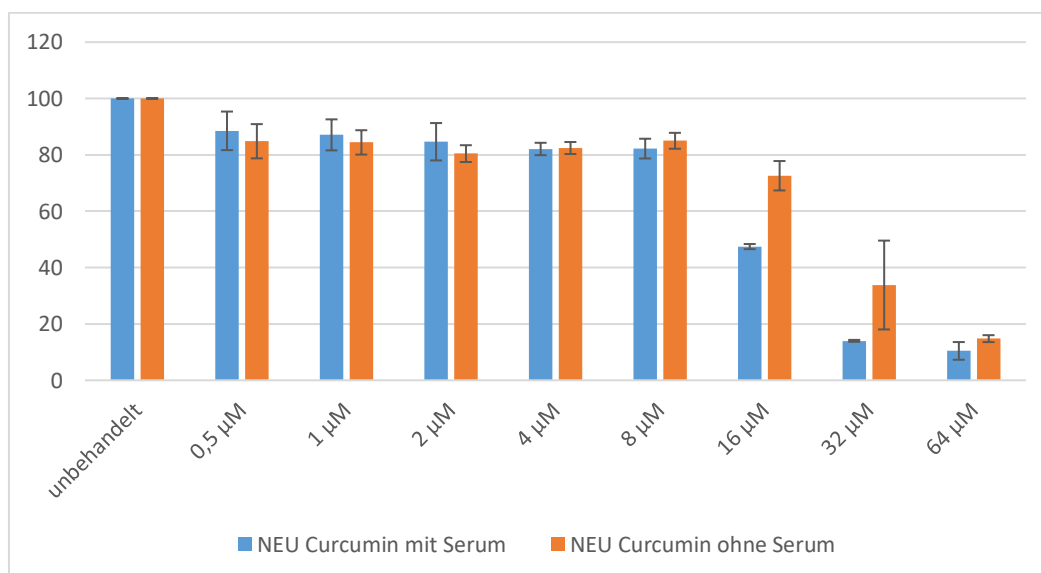


Abbildung 24: Evaluation der Arbeitslösungen, Platte 2

Normale DMSO-Konzentration, frisches Aliquot mit Serum, bereits gelagertes Aliquot ohne Serum. Die y-Achse zeigt die Zellviabilität in %. Die x-Achse zeigt die angewendete Konzentration der Referenzsubstanz Curcumin in μM. Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und ausgearbeitet.

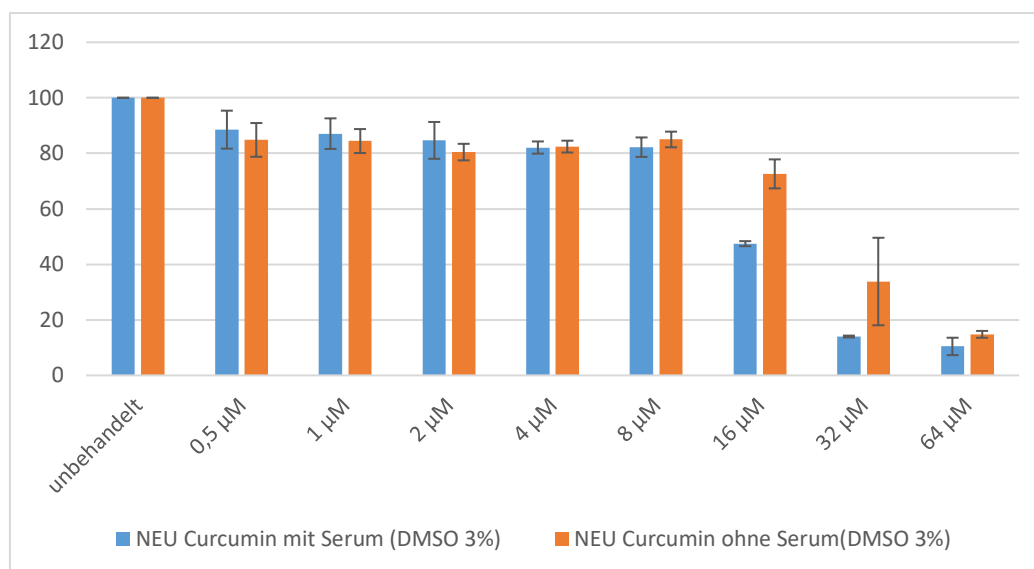


Abbildung 25: Evaluation der Arbeitslösungen, Platte 3

Zwei frische Aliquotierungen mit 3 % DMSO, einmal mit und einmal ohne Serum. Die y-Achse zeigt die Zellviabilität in %. Die x-Achse zeigt die angewendete Konzentration der Referenzsubstanz Curcumin in µM. Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und ausgearbeitet.

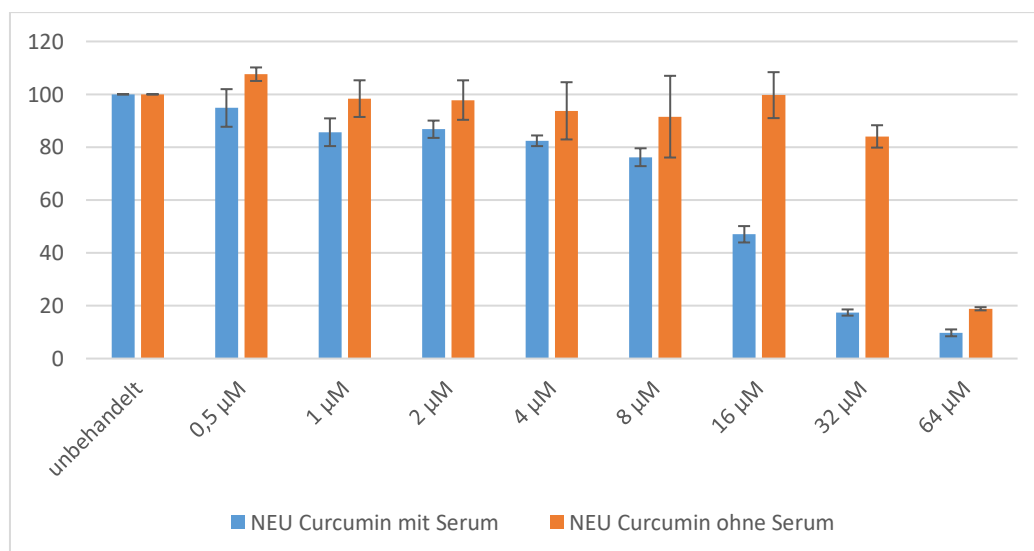


Abbildung 26: Evaluation der Arbeitslösungen, Platte 4

Normale DMSO-Konzentration mit Serum und ohne, nach neuem Schema ohne Verdünnungsstufe 4 (V4) pipettiert. Die y-Achse zeigt die Zellviabilität in %. Die x-Achse zeigt die angewendete Konzentration der Referenzsubstanz Curcumin in µM. Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und ausgearbeitet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,5μM	1μM	2μM	4μM	8μM	16μM	32μM	64μM	untrea- ted	Medium	PBS
C												
D		0,5μM	1μM	2μM	4μM	8μM	16μM	32μM	64μM	untrea- ted	Medium	PBS
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		5μl	1μl	2μl	4μl	8μl	16μl	32μl	8μl	untrea- ted	Medium	PBS
C												
D		5μl	1μl	2μl	4μl	8μl	16μl	32μl	8μl	untrea- ted	Medium	PBS
E												
F												
G												
H												

Ohne V4

Abbildung 27: Assay Methode für die Evaluation der Arbeitslösungen

Die obere Abbildung zeigt das Pipettierschema nach dem alle Resazurin-Reduktions-Assays pipettiert wurden. Die untere Abbildung zeigt den das Verdünnungsschema, das für Platte 4 genutzt wurde. Oben rechts werden die nach Farben kodierte Verdünnungsstufen gezeigt. Die dargestellte Grafik wurde mit Microsoft Excel ausgearbeitet.

Durch das frische Ansetzen der Arbeitslösungen aus den Lagerungslösungen zeigte sich eine normale Dosis-Wirkungskurve. Es wurde keine Notwendigkeit zur Erhöhung des DMSO-Anteils gesehen.

3.2 *In vivo* Testung

3.2.1 *In vivo* Toxizität der Wirkstoffe Isogarcinol und MePip

Aufgrund der guten Wirksamkeit in den Zellkulturversuchen sollten das Garcinoid Isogarcinol und das Curcuminoid MePiP *in vivo* getestet werden. Wie auch bei den *in-vitro* Versuchen, ist dafür zunächst eine Bestimmung der Toxizität notwendig, um schädliche Effekte der Wirkstoffe an den Versuchstieren weitgehend auszuschließen.

Zur Bestimmung der *in vivo* Toxizität wurden die Wirkstoffe einer kleinen Kohorte von C57BL/6-Mäusen ($n = 2$ pro Gruppe) über mehreren Wochen (zweimal pro Woche) verabreicht. Dabei wurden die für die Versuchstiere toxischen Dosen anhand des Verlustes von Körpergewicht (KGW) bestimmt. Für Isogarcinol ergaben sich 15 mg / kg KGW, für MePip 60 mg / kg KGW.

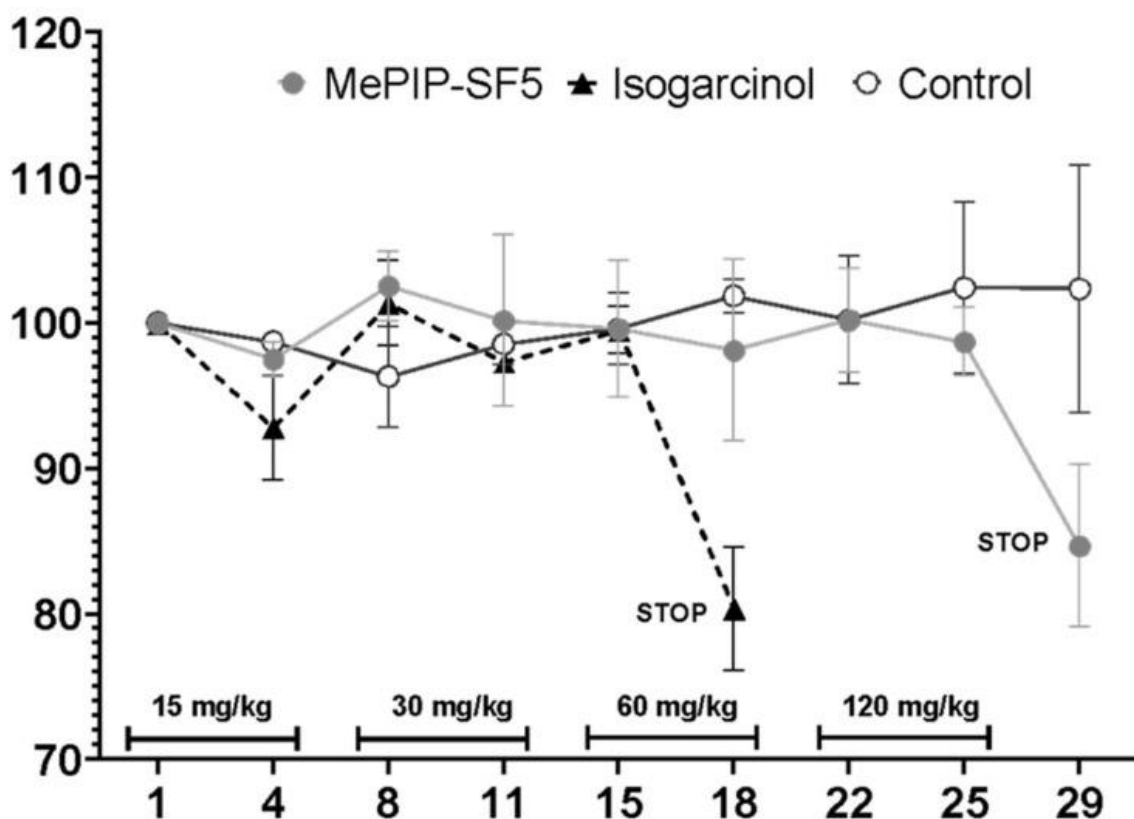


Abbildung 28: *In vivo* Toxizität der Wirkstoffe Isogarcinol und MePip

Das normalisierte Körpergewicht der C57BL/6-Mäuse ($n = 2$ pro Gruppe) ist prozentual angegeben (y-Achse). Die Dosierung und der Zeitverlauf in Tagen ist auf der x-Achse angegeben. Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Die wesentlich niedrigere Dosis bei Isogarcinol ergab sich aus dem starken Gewichtsverlust zu Beginn des Versuches und daraus, dass danach weiter kontinuierlicher Gewichtsverlust zu

beobachten war, auch wenn die Marke für gefährliche Toxizität, ein Verlust von 10 % des Körpergewichts, noch nicht erreicht war (siehe Abb. 28).

3.2.2 *In vivo* Testung von Isogarcinol und MePip

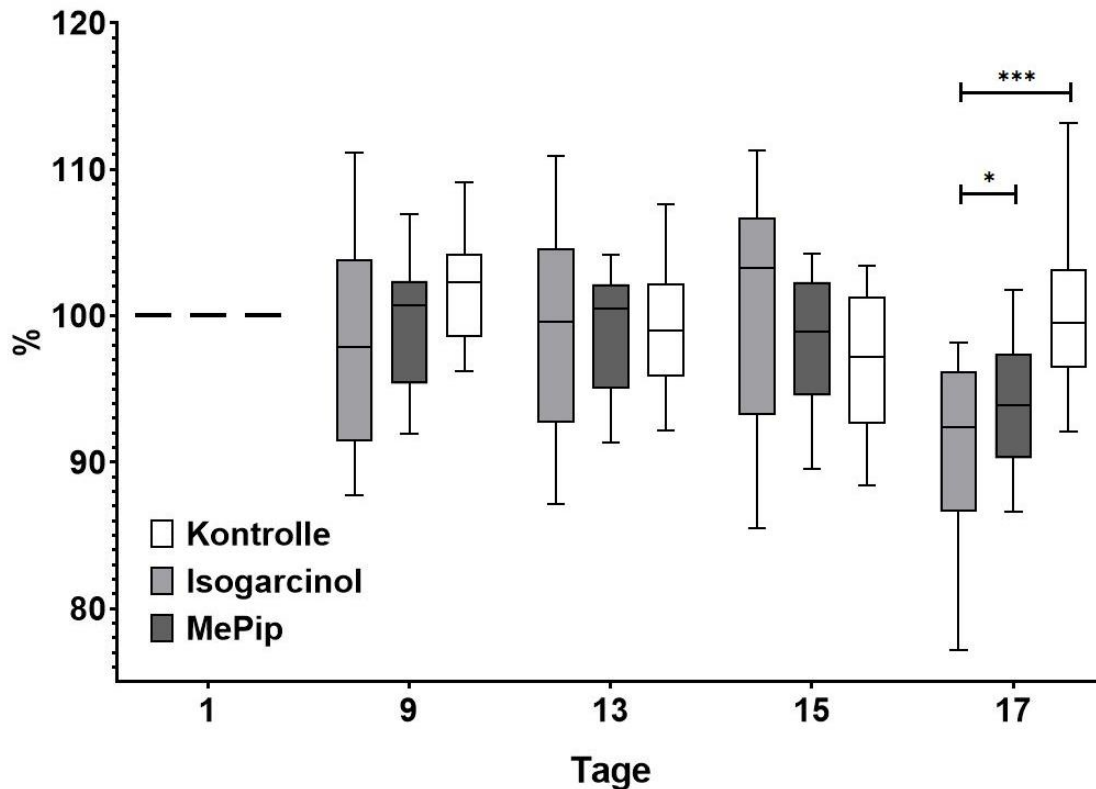


Abbildung 29: Körpergewicht der Versuchstiere im Zeitverlauf

Das Körpergewicht der C57BL/6-Mäuse wird in % in Relation zum Startgewicht angegeben (y-Achse). Der Zeitverlauf wird in Tagen auf x-Achse angegeben ($n = 10$ Tiere pro Wirkstoffgruppe, $n = 11$ in der Kontrollgruppe). Die Fehlerbalken zeigen das KI_{95} . Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Am 17. Versuchstag, an dem die Tiere geopfert wurden, zeigten sich signifikante Unterschiede im Körpergewicht ($p < 0,05$) zwischen der mit MePiP und der mit Isogarcinol behandelten Gruppe. Es zeigte sich außerdem ein stark signifikanter Unterschied der mit Isogarcinol behandelten Testgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0005$).

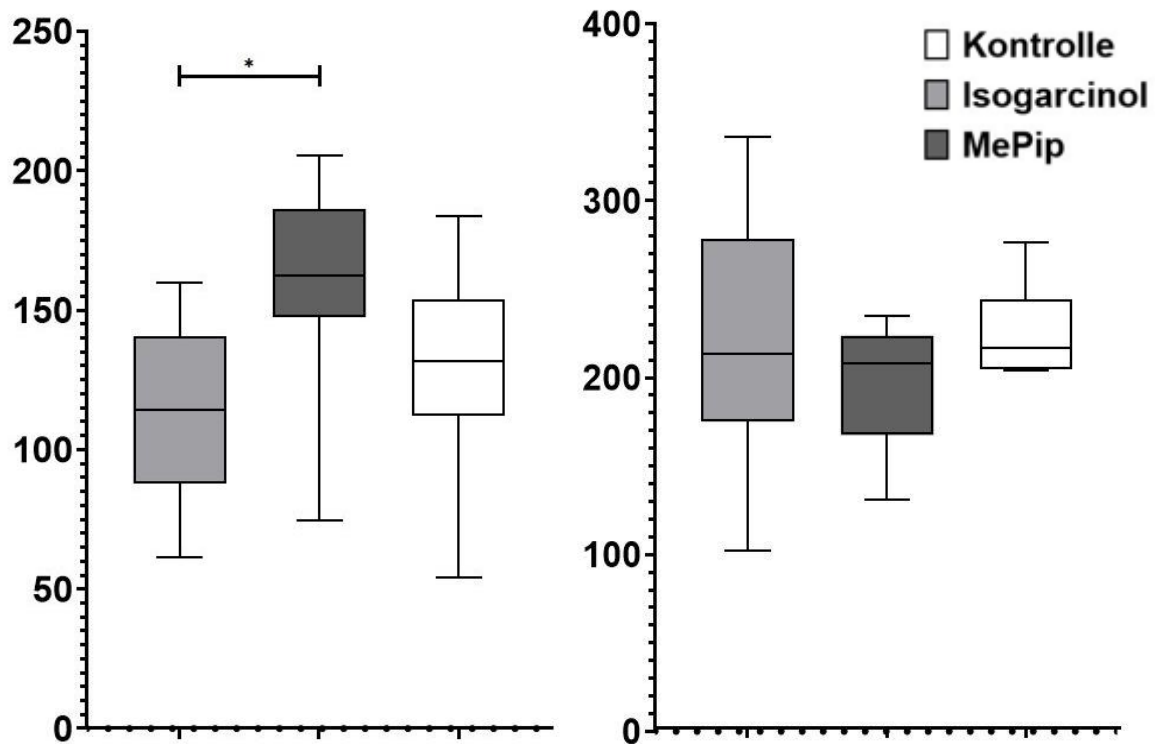


Abbildung 30: Milzgewicht und Lungengewicht der Versuchstiere im Vergleich

Das Milzgewicht der C57BL/6-Mäuse ist in der linken Grafik aufgetragen. Das Lungengewicht der Versuchstiere ist in der rechten Grafik aufgetragen (bei $n = 10$ Tiere pro Wirkstoffgruppe und $n = 11$ in der Kontrollgruppe). Die y-Achse zeigt das Organgewicht in mg. Die x-Achse zeigt die Wirkstoffgruppen. Die Fehlerbalken zeigen das KI_{95} . Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich beim Milzgewicht der mit MePiP behandelten Gruppe gegenüber der mit Isogarcinol behandelten Gruppe.

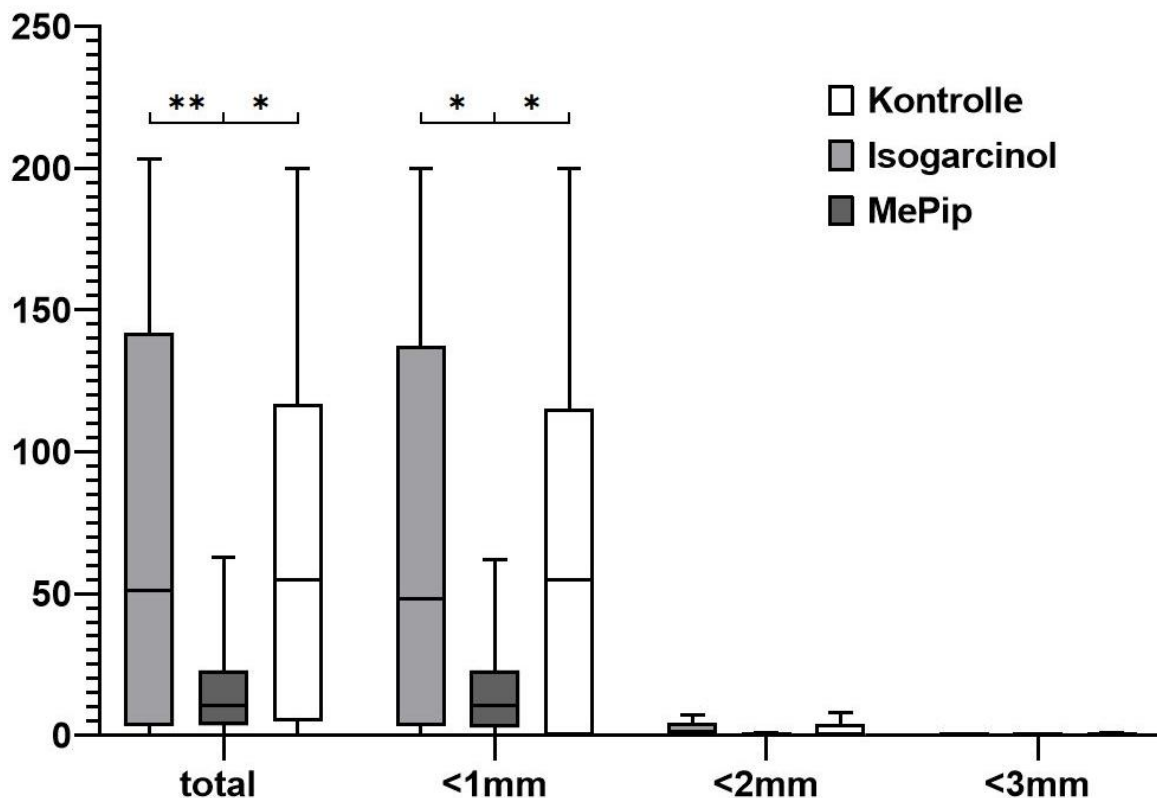


Abbildung 31: Makroskopische Metastasenzählung nach Größe im Vergleich

Die Abbildung zeigt die Auswertung der oberflächlichen Metastasenzählung. Die y-Achse zeigt die ausgezählte Anzahl der Gesamtmastasen numerisch. Die x-Achse zeigt eine Unterteilung nach Größe der ausgezählten Metastasen (bei $n = 10$ C57BL/6-Mäuse pro Wirkstoffgruppe und $n = 11$ in der Kontrollgruppe). Die Fehlerbalken zeigen das KI_{95} . Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Die Anzahl der oberflächlichen Metastasen pro Lunge nach ihrer Größe ergab deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Die Unterschiede treten im Vergleich zwischen der mit MePiP behandelten Gruppe und den beiden anderen Gruppen (Kontrollgruppe und die mit Isogarcinol behandelte Gruppe) am deutlichsten hervor. Bei der Zahl der Metastasen unter 1 mm waren die Unterschiede mit $p < 0,05$ zu beiden Gruppen signifikant, beim Vergleich der Gesamtmastasenzahl waren die Unterschiede zwischen der MePiP- und der Isogarcinol-Gruppe mit $p < 0,01$ sogar wesentlich signifikanter.

Weiterhin korrelierten das Lungengewicht ($p = 0,0275$) und das prozentuale Lungengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht ($p = 0,0157$) mit der Auszählung der Metastasen.

3.3 Hämatoxylin und Eosin (HE)- Färbung

Eine erste Auswertung der HE gefärbten Präparate wurde durchgeführt, indem die gewebefreie Fläche innerhalb der Alveolen im Vergleich zur Gewebsmasse ausgemessen wurde. Die Ergebnisse decken sich mit der oberflächlichen Metastasenzählung.

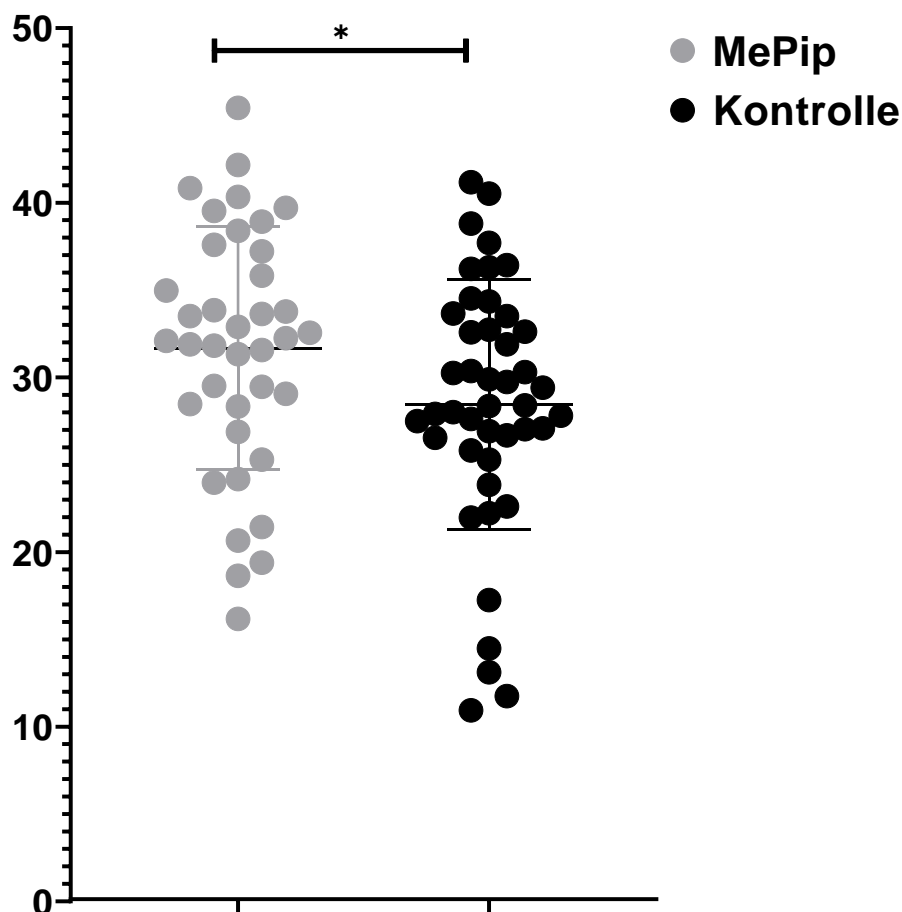


Abbildung 32: Messung der gewebefreien Fläche der HE-Präparate

Der Anteil der gewebefreien Fläche der ausgewerteten HE-Präparate in % zum Gesamtpräparat ist aus der y-Achse angegeben. Die x-Achse zeigt die Einteilung nach Wirkstoffgruppen (bei $n = 10$ C57BL/6-Mäuse pro Wirkstoffgruppe und $n = 11$ in der Kontrollgruppe). Die Fehlerbalken zeigen das KI_{95} . Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Die Metastasenmenge der mit MePip behandelten Tiere war signifikant geringer, als die der Kontrollgruppe. Die Metastasenmenge wurde indirekt anhand der gewebefreien (alveolären) Fläche der histologischen Schnitte bemessen.

3.4 Makrophagenrepolarisation

Als Wirkungsmechanismus von MePip wurde unter anderem ein Einfluss der Wirkstoffe auf das TME vermutet. Speziell ließ sich vermuten, dass zumindest ein Teil der antitumoralen Wirksamkeit im *in vivo* Versuch durch eine Repolarisation von Makrophagenphänotypen

zustande kommt. Deshalb wurde der Effekt der Wirkstoffe auf die Expression von Markern, die verschiedenen Makrophagenphänotypen zugeordnet werden, getestet.

Um den Einfluss der Wirkstoffe auf den Phänotyp von tumorfördernden M2-Makrophagen zu untersuchen, wurden M2-polarisierte Mausmakrophagen (BMDM) mit den Wirkstoffen in Dosen behandelt, die der Hälfte ihrer IC_{50} entsprach. Diese Dosis wurde gewählt, da nur eine geringe Toxizität zu erwarten war (siehe Abb. 17), und die tragenden Wirkungsmechanismen der Wirkstoffe jedoch unterhalb einer relevanten Toxizität eintreten sollten. Um die Vergleichbarkeit der Reaktivität der BMDM gegenüber humanen Makrophagen zu testen, wurde das Experiment auch an THP-1 Makrophagen durchgeführt. Die bereits aufgeführte IC_{50} der THP-1 Makrophagen wurde zu diesem Zweck mittels Resazurin-Reduktions-Assay bestimmt.

3.4.1.1 Anpassung der Erntezeitpunkte für die RNA-Extraktion der M1-Makrophagen

Der optimale Erntezeitpunkt wurde über das Ernten der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Eine hohe Expression der Makrophagenphänotypmarker wurde dabei als Hinweis auf einen guten Erntezeitpunkt gewertet.

3.4.1.1.1 M1-Makrophagen

Es wurde eine Evaluation des optimalen Zeitpunkts für die RNA-Extraktion der M1 Makrophagen vorgenommen.

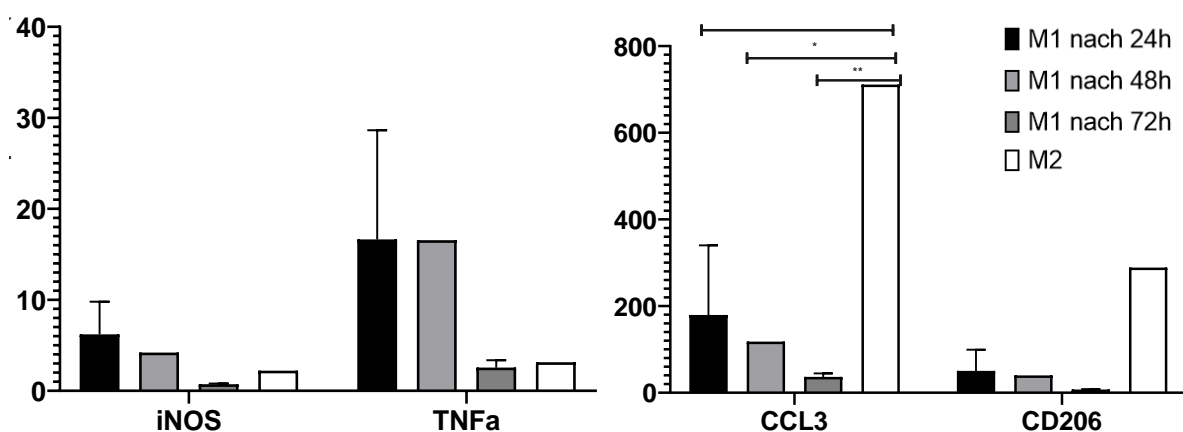


Abbildung 33: Evaluation und Vergleich der Polarisation von humanen THP-1 Makrophagen nach Erntezeitpunkt

Die relative Expression der Makrophagenphänotypmarker iNOS und TNF α , sowie CCL3 und CD206 ist anhand der gemessenen mRNA dargestellt (y-Achse). Die Balken der Grafiken zeigen Durchschnittswerte der in Microsoft Excel kalkulierten $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte. Die Fehlerbalken zeigen die SEM. Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Als optimaler Erntezeitpunkt der M1-Makrophagen wurde 24 h nach Polarisation bestimmt.

3.4.1.1.2 M0 und M2-Makrophagen

Es wurde eine Verlängerung der Inkubationszeit für M0 und M2-Makrophagen von 72 auf 96 h getestet.

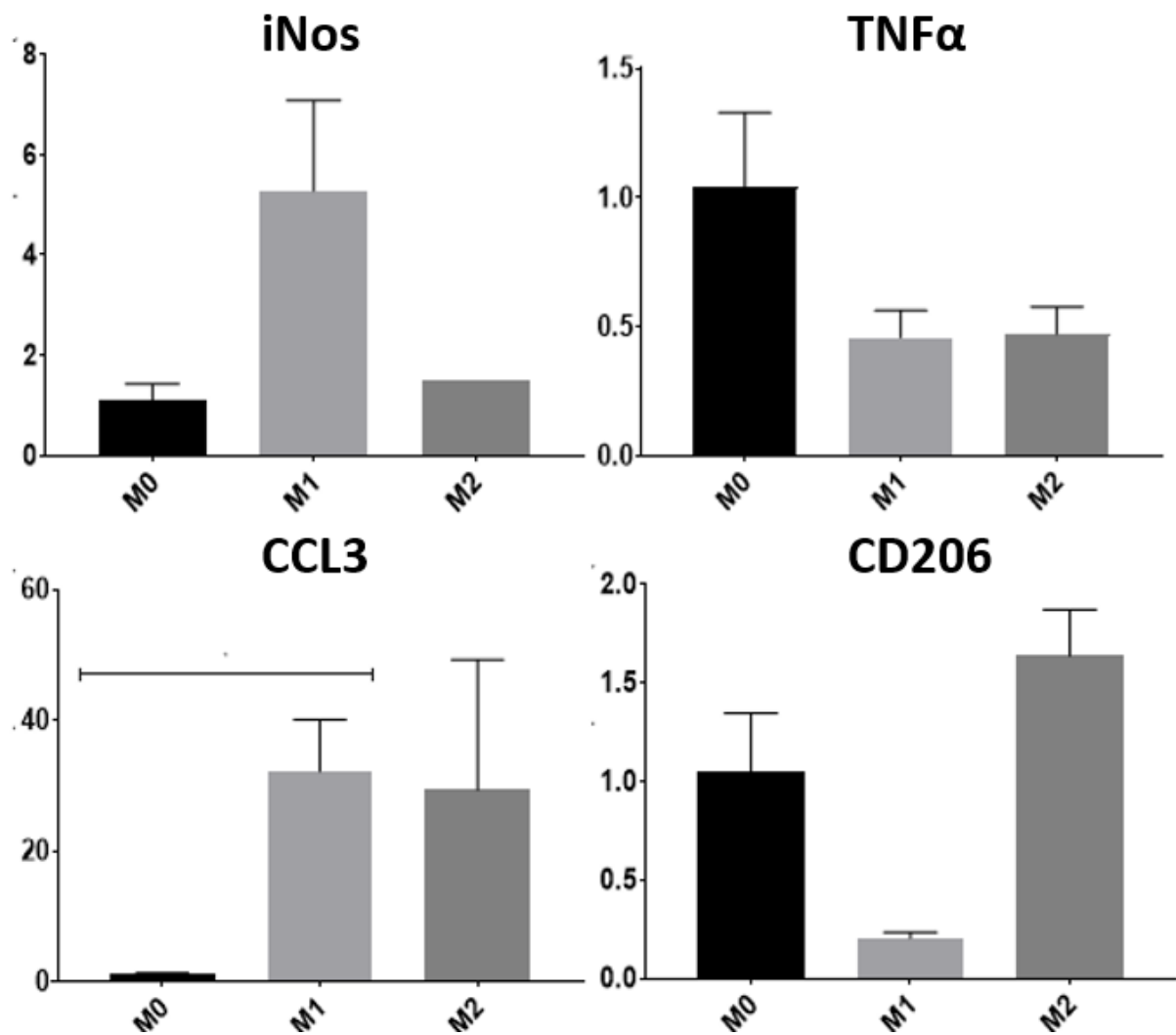


Abbildung 34: Evaluation der verlängerten Polarisation von *humanen THP-1* Makrophagen nach Erntezeitpunkt

Die relative Expression der Makrophagenphänotypmarker *iNOS* (oben links), *TNFα* (oben rechts), *CCL3* (unten links) und *CD206* (unten rechts) anhand der gemessenen mRNA ist auf der y-Achse dargestellt. Die Balken der Grafiken zeigen Durchschnittswerte der in Microsoft Excel kalkulierten $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte. Die Fehlerbalken zeigen die SEM. Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Das Protokoll wurde im Zuge der dargestellten Ergebnisse nicht verändert.

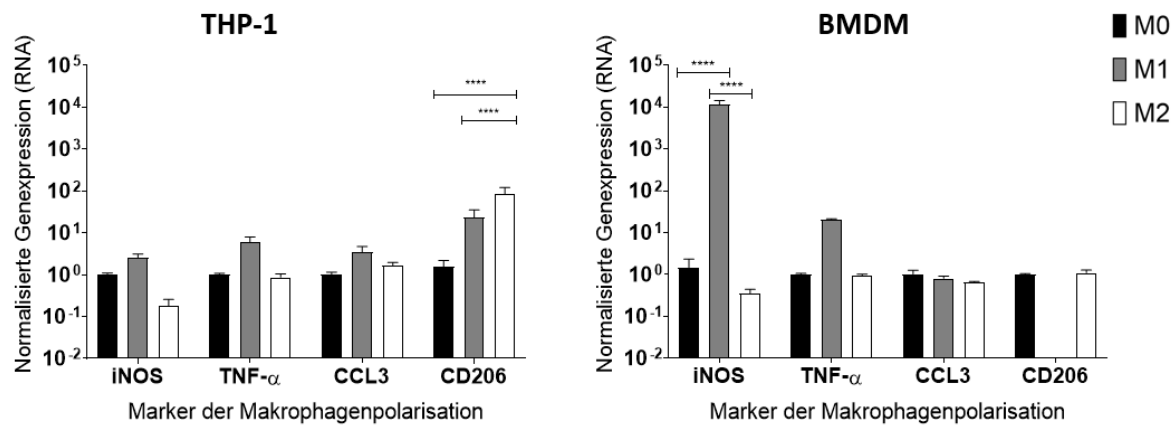


Abbildung 35: Relative Expression der Makrophagenphänotypmarker nach indizierter Polarisation

Gezeigt ist die Evaluation und der Vergleich der Polarisation von humanen THP-1 Makrophagen sowie von murinen BMDM (Bone Marrow Derived Macrophages) als Kontrollgruppe. Die Balken der Grafiken zeigen Durchschnittswerte der in Microsoft Excel kalkulierten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte. Die Fehlerbalken zeigen die SEM. Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Bei den THP-1 Makrophagen zeigte sich eine hochsignifikante Steigerung ($p < 0,0001$) des M2-Phänotypmarkers CD206 gegenüber dem unpolarisierten M0-Phänotyp, sowie gegenüber des klassisch polarisierten M1-Phänotyps. Diese konnte bei den BMDM nicht bestätigt werden. Hier stellte sich eine hochsignifikante Steigerung der relativen Expression des M1-Phänotypmarkers iNOS gegenüber der M0 Kontrollgruppe und der M2 Gruppe dar.

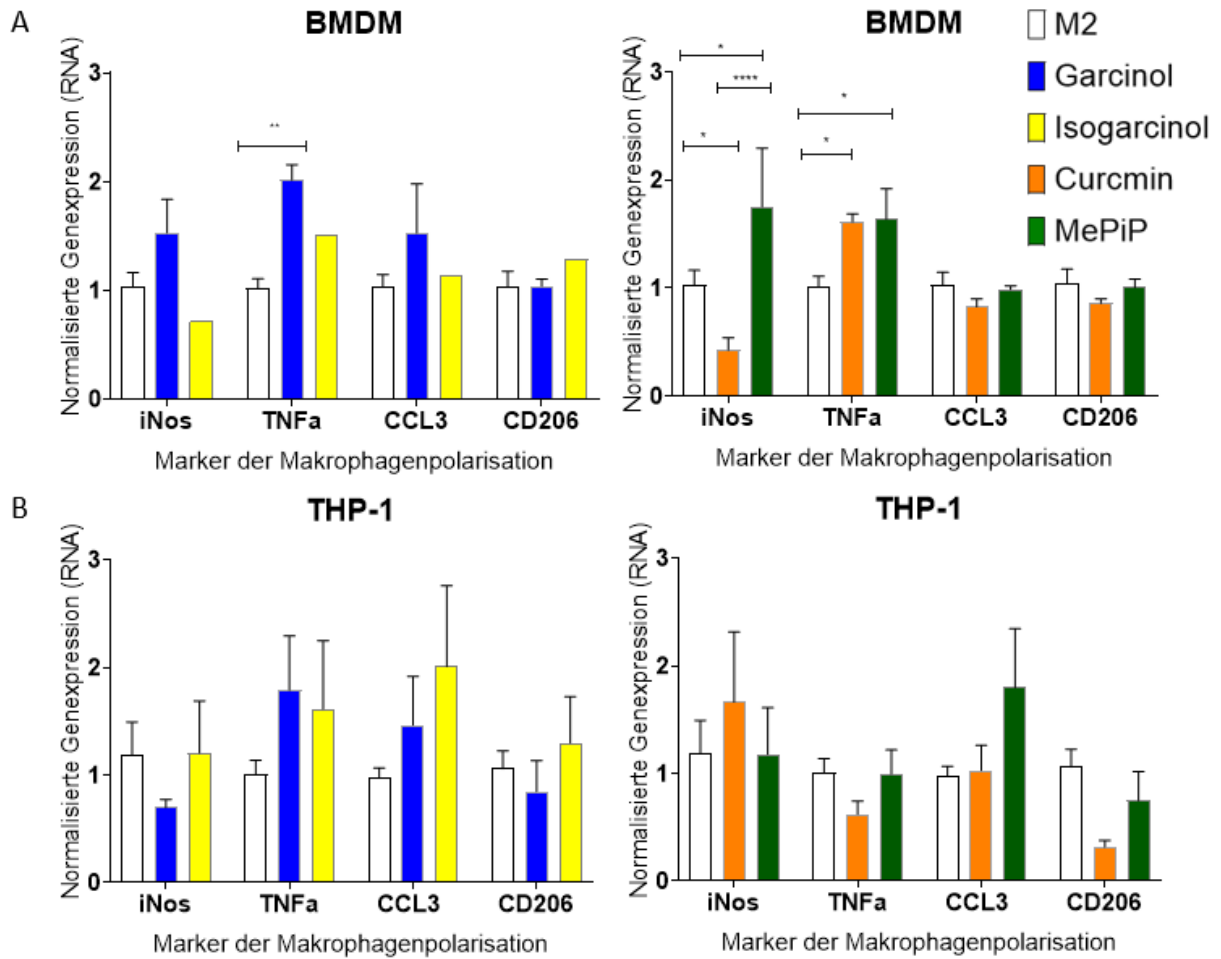


Abbildung 36: Evaluation und Vergleich des Polarisationseffekts an murinen BMDM und humanen THP-1 Makrophagen

Gezeigt ist die relative Expression der Makrophagenphänotypmarker. Die Balken der Grafiken zeigen Durchschnittswerte der in Microsoft Excel kalkulierten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte. Die Fehlerbalken zeigen die SEM. Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

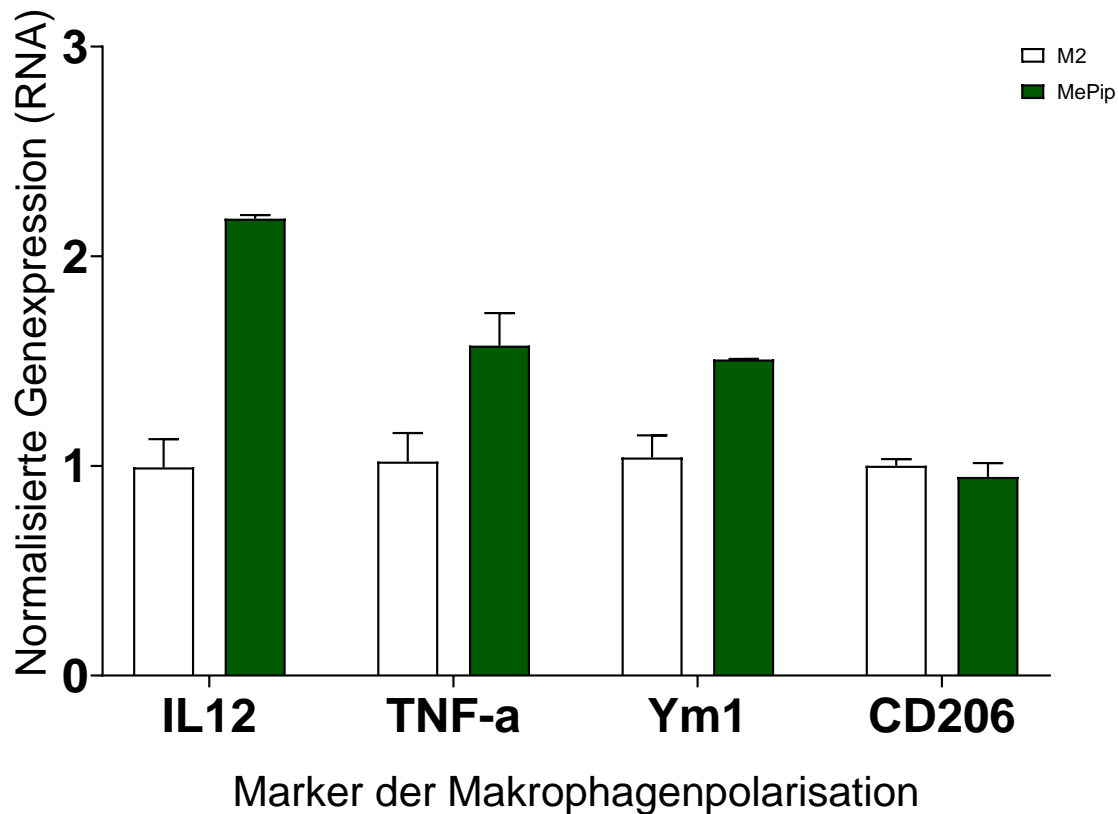


Abbildung 37: Evaluation und Vergleich des Polarisierungseffekts bei murinen BMDM

Gezeigt ist die relative Expression der Makrophagenphänotypmarker. Die Balken der Grafiken zeigen Durchschnittswerte der in Microsoft Excel kalkulierten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte. Die Fehlerbalken zeigen die SEM. Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 7 ausgewertet und ausgearbeitet.

Die Unterschiede in der relativen Expression der Makrophagenphänotypmarker durch die Behandlung der M2-Makrophagen war variabel. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) zwischen der Wirkung von Curcumin und MePip auf iNOS bei alternativ aktivierten BMDM (M2). Curcumin verringerte die relative Expression von iNOS ($p < 0,05$), MePip erhöhte die relative Expression von iNOS ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten M2-Makrophagen. MePip erhöhte die relative Expression von TNF α ($p < 0,05$), einem weiteren M1-Phänotypmarker. Curcumin erhöhte die relative Expression von TNF α ($p < 0,05$). Weiterhin erhöhte Isogarcinol deutlich signifikant ($p < 0,01$) die Expression von TNF α .

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt einen ersten Ansatz, bisher nicht an M2-Makrophagen und im Mausmodell getestete niedermolekulare synthetische Garcinoide und Curcuminoide zu evaluieren. Das Ziel bestand in der Erschließung potenzieller Kandidaten für die Krebstherapie. In der folgenden Diskussion soll vorerst der Kontext der ausgewählten Versuchsmethoden in Bezug zu den einleitenden Kapiteln hergestellt werden.

Trotz der Fortschritte in der Tumorthherapie bleiben Therapieresistenzen, die von Malignomen entwickelt werden, ein führendes Problem in der Therapie von Tumoren in fortgeschrittenen Tumorstadien. TAM und andere Immunzellen im TME sind dabei maßgeblich beteiligt. Daher befinden sich zahlreiche TAM targetierende Medikamente in Entwicklung. Es bleibt häufig unklar, wie genau aggressive Malignome Immunzellen modifizieren, um eine tolerogene Umgebung für ihr Wachstum zu schaffen (116). Das Entschlüsseln der zahlreichen Mechanismen birgt entscheidende Vorteile bei der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten. Die Bedeutung neuer prädiktiver und auch nichtinvasiver Aktivitäts-Biomarker ist zudem von zentraler Bedeutung, um herauszufiltern, welcher Therapieansatz dem Patienten im Individualfall a. e. zugutekommt (117). Beim Melanom und auch den meisten anderen soliden Tumoren gibt es zahlreiche Hinweise, dass TAM für den Resistenzmechanismus, auch gegenüber Immuncheckpointblockaden, einen entscheidenden Beitrag leisten können. Cerezo-Wallis et. al. konnten z.B. das Chemokin Midkine (MDK) identifizieren, das von immunevasiven Melanomen sezerniert wird. Es moduliert Melanomzellen autokrin über eine koordinierte Aktivierung von NF κ B und eine Inhibierung von Interferon-assoziierten Signalwegen. Das resultierende Sekretom der Melanomzellen polarisiert TAM parakrin und führt so zu einer CD8⁺ T-Zell Dysfunktion, sowie zu einer Resistenz gegenüber einer Immuncheckpointblockade mittels Anti-PD1 Antikörpern. Zudem war es den Autoren möglich mit MDK Inhibitoren die entwickelte Resistenz aufzuheben (116).

Die Untersuchung von polyphenolischen Pflanzenextrakten wurde bereits 1995 an B16F10 Melanomzellen *in vivo* und *in vitro* durchgeführt (118). Besonders interessant ist im immuntherapeutischen Ansatz der hohe Anteil an M2-TAM bei Melanomen, da er sich prognoserelevant auswirkt (117). Da Curcumin bereits als TAM repolarisierende Substanz eingeordnet wurde (119), lag es nahe, dass ein pharmakologisch ähnlicher, aber optimierter Wirkstoff wie MePip, über eine ähnliche Wirkungsweise das Wachstum von Malignomen hemmen könnte. Die Inhibition von STAT3 durch Curcumin ist ein potenziell vielversprechender Wirkmechanismus, da STAT3 und zugehörige Signalwege entscheidend für das Zusammenspiel von Tumorzellen und TAM sind (55). Der Effekt der STAT3 Inhibition geht dabei über die Repolarisation von Makrophagen hinaus, da die Inhibition von STAT3

unter anderem den immunsuppressiven Effekt von MDSCs beinahe komplett beseitigt (120). Es befinden sich daher einige STAT3 Inhibitoren bereits in klinischer Testung (117).

4.1 Allgemeine Schwächen der Modelle

4.1.1 Zytotoxizitätsassay

Bei der Evaluation von Naturstoffen wird häufig vorerst die antitumorale Aktivität von Naturstoffen in Zytotoxizitätsassays gemessen. Dafür ist es wichtig, lebende, tote und geschädigte Zellen voneinander zu unterscheiden. Viele der möglichen Methoden haben bestimmte Nachteile, wie die Produktion von toxischem oder radioaktivem Abfall, zeitaufwendiges Handling oder ökonomische Nachteile, was die Nutzung vieler Methoden limitiert. Es sollte also immer eine Kosten-Nutzen Überlegung angestrebt werden, um die beste Untersuchungsmethode für den bestimmten Zweck zu finden (121).

Bzgl. alternativer Verfahren möchte ich zwei Beispiele anführen:

Ein einfacher Farbstoff-Ausschlusstest mit Trypanblau stellt eine Alternative dar. Der Farbstoff wird von viablen Zellen nicht aufgenommen. Tote Zellen sind wiederum durchlässig für den Farbstoff. Er ist durch die mikroskopische Kontrolle schnell durchzuführen und kostengünstig, weist aber eine hohe Variabilität auf (122). Hingegen ist ein XTT-Assay eine weniger kostengünstige, aber sehr sensitive Alternative. Durch aktiv atmende Zellen wird XTT in ein wasserlösliches, orangefarbenes Formazanprodukt umgewandelt, das spektrophotometrisch quantifiziert werden kann (122). Initial war der Versuch mittels MTT-Assay geplant, der mit XTT vergleichbar ist. Dieser hatte jedoch, wie bereits erwähnt, keine verlässlichen und reproduzierbaren Ergebnisse geliefert, weshalb ich den Resazurin-Assay nutzte.

Zu dem von mir genutzten Resazurin-Assay ist zu sagen, dass die metabolische Aktivität der Zellen im Sinne des Umsatzes von NADH / NADPH, wie im Methodenteil beschrieben, genutzt werden kann, um die Zellviabilität zu quantifizieren. Jedoch ist es wichtig zu erwähnen, dass dieser Umsatz lediglich die allgemeine metabolische Aktivität widerspiegelt, die sich verändert, wenn Zellen toxisch geschädigt werden. Das Ergebnis ist jedoch nicht vollständig eindeutig, da die Zellen nicht zwingend tot sein müssen, wenn sie ihre metabolische Aktivität heruntergefahren haben. Um dies genauer zu quantifizieren, existieren verschiedene Einzellanalysen. Sie quantifizieren neben der metabolischen Toxizität von Substanzen auf Zellen auch den Zelltod (Apoptose) genauer (123, 124). Dabei können bspw. apoptotische Kaskaden untersucht werden, um festzustellen, wie lebensfähig eine Zelle nach der Applikation einer Substanz noch ist (125). Fest steht, dass unabhängig von der gewählten Methode die Ergebnisse bei jedem Zelltyp über eine Kontrolle mit weiteren Verfahren zu bestätigen sind. So können auch selektive Toxizitäten von Reagenzien ausgeschlossen oder gezeigt werden. Auch ist es empfehlenswert, die Verträglichkeit der hierfür eingesetzten

Färbeverfahren für jedes Zellkultursystem für die gewählte Inkubationsdauer zu überprüfen. Deshalb sollten mehrere Verfahren auf dieselbe Probe angewendet werden, um eine korrekte Interpretation der Ergebnisse zu erlauben (121). Dies wurde in Vorarbeiten in unserem Labor bereits durchgeführt (siehe S. 58).

4.1.2 Makrophagenpolarisation

Ein zentrales Konzept besagt, dass über den Phänotyp eines aktivierten Makrophagen zu einem spezifischen Zeitpunkt nicht unbedingt Aussagen über seine Funktion gemacht werden können (57). Dies scheint naheliegend, wenn man sich vor Augen führt, dass die Dynamik inflammatorischer, aber auch immunonkologischer Prozesse sich häufig als komplexer darstellt als zuvor angenommen.

An BMDM konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, die zunächst zu M1 oder M2 polarisiert und dann repolarisiert werden, wenig bis gar keine Erinnerung an ihre Polarisierungsgeschichte zeigen. Transkriptionsphänotypen von Makrophagen werden also durch die aktuelle Zellmikroumgebung definiert und nicht durch eine Verschmelzung vergangener und gegenwärtiger Zustände (126).

Beobachten lässt sich die Komplexität der Bildung eines spezifischen Zellphänotyps auch an epigenetischen Einflüssen der Genexpression. Zudem wirken variable extrinsische und intrinsische Faktoren auf sich damit kontinuierlich verändernde Zellen (vgl. Kapitel Plastizität und Polarisation von Makrophagen, S. 24).

Die Beobachtung zu einem spezifischen Zeitpunkt stellt jedoch eine gute Grundlage für eine fortgeschrittene Beobachtung der Wirkung von Naturstoffen auf diese Dynamik dar.

Auch weil die funktionelle Polarisation von Makrophagen sowohl mit der Resolution von Inflammation, als auch mit entzündungsfördernden oder diversen Prozessen verbunden sein kann, scheint diese Schlussfolgerung naheliegend (57). Zu bedenken ist, dass Naturstoffe, wie die zu evaluierenden Wirkstoffe, in aller Regel pleiotrope Effekte ausüben.

Im Rahmen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass eine abschließende Klärung der Fragestellung nach dem wesentlichen Wirkmechanismus der Substanzen nicht im Detail möglich war. Insofern sind die Ergebnisse in diesem Stadium vorläufig und erfordern bei durchaus vielversprechenden *in vivo* Daten zum antitumoralen Effekt von MePip weitere Studien, auf die ich im nächsten Abschnitt genauer eingehe.

Generell birgt die *in vitro* Methode der Untersuchung einer indizierten Polarisation von Makrophagen den Vorteil einer schnellen Orientierung über möglicherweise relevante antitumorale Mechanismen bei relativ einfacher Reproduzierbarkeit, kleinen Zeitfenstern und guter Kosteneffizienz. Allerdings kann die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen

Laboren auch hier im Ringversuch relativ gering sein. Es liegen teils erhebliche Unterschiede im Versuchsaufbau und eine Inkonsistenz bei der Verwendung der Marker zur Erfassung des Polarisationsstatus vor (57). Nachteilig ist außerdem die bisweilen geringe Übertragbarkeit der *in vitro* Untersuchungen auf den lebenden Organismus und umgekehrt.

Daher ist die auch in dieser Arbeit eingesetzte und optimierte Methodik der *in vitro* Makrophagenpolarisation nur als adjunktives Hilfsmittel und Erklärungsmodell einer antitumoralen Aktivität der vergleichend untersuchten Verbindungen zu werten.

4.1.3 Tiermodell

Allgemein birgt eine intravenöse Injektion von Tumorzellen in die Schwanzvene einer Maus die Gefahr der Bildung von Paravasaten. Daher ist ein präzises Arbeiten erforderlich, um zufällige Fehler zu vermeiden und die Reliabilität der Ergebnisse zu erhöhen. Bei kleiner Versuchsgröße wirken sich etwaige Fehlinjektionen besonders stark auf das Ergebnis ein. Natürlich ist im speziell im Tiermodell auch die ethische Überlegung von Bedeutung, was die Versuchsgruppengröße limitiert. Von einem statistischen Standpunkt aus ist jedoch eine größere Versuchsgröße wünschenswert.

Zudem besteht bei immunologischen Tiermodellen oft ein Problem der Übertragbarkeit auf den Menschen. Vergleicht man die Anzahl von Tiermodellen mit positiven Ergebnissen mit der Anzahl von Versuchsreihen, die schlussendlich in einer klinischen Anwendung enden, ist das Ergebnis teils ernüchternd. Eine Studie zeigt, dass die Rate an Tiermodellen, die rückblickend die Translatierbarkeit auf den Menschen gezeigt haben, variabel ist (127).

Die Gründe hierfür sind vielseitig. Z. B. sind Tumore in Mausmodellen meist monoklonal, während sie beim Menschen in aller Regel polyklonal sind. Folglich entsteht eine bedeutende Heterogenität zwischen Patienten mit Malignomen gleicher Tumorentität. Weiterhin ist von einer bedeutenden Heterogenität bei verschiedenen Mausmodellen auszugehen. Die Verwendung von Inzuchtstämmen, die weiterhin die breite Basis für die biomedizinische Forschung bilden, führt Nachteile mit sich. Diese standardisierten Modelle zeigen, dass sich Faktoren wie die Raumtemperatur, das Mikrobiom und die Ernährung der Tiere als signifikante Einflussfaktoren auf die wissenschaftliche Resultate erweisen (25). Abgesehen davon bestehen auch innerhalb einer Spezies Unterschiede in der Reaktion auf immunologische Stressoren wie Malignome oder Infektionen. Wie Foerster et al. zeigen konnten, sind Balb/c Mäuse, im Vergleich zu C57 BL/6 Mäusen, ungefähr dreimal so anfällig für Metastasen von B16F10 Zellen nach intrasplenischer Injektion, u. a. wegen einer genetisch determinierten M2-typischen Immunpolarisation (25).

Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass Tierversuche nicht nur zur direkten Vorhersage der Reaktion des Menschen, sondern auch auf andere Weise zu einer erfolgreichen Umsetzung

beitragen können. So können sie beispielsweise bei der Entwicklung von Hypothesen über die Entstehungen von Krankheitsbildern (127) oder bei der Aufklärung von Wirkmechanismen von Medikamenten aufschlussreich sein.

Es stellt sich außerdem die Frage wie eine effektive Immunantwort definiert wird. Dabei stößt man auf eine Diskrepanz in der Interpretation von Tiermodellen und klinischen Studien. Diese begründet sich vor allem im Beobachtungszeitraum. Präklinische Modelle werden zu einem definierten Zeitpunkt durch Opferung der Versuchstiere beendet. Der primäre Endpunkt definiert sich dann in einem verringerten Tumolvolumen, welches das entscheidende Zielkriterium des jeweiligen Modells ist. Dabei kann durch eine Tumorprogression stattgefunden haben, die durch die Behandlung lediglich verzögert eintritt oder durch das definierte Beenden des Modells gar nicht erst beobachtet werden kann. Bei klinischen Studien hingegen ist der Betrachtungszeitraum deutlich länger. So treten durch den langen Beobachtungszeitraum häufiger Resistenzmechanismen auf. Bei Malignomen steigt mit der Länge des Beobachtungszeitraums also die Wahrscheinlichkeit, dass ein Progress der Erkrankung stattfindet. Beispielhaft lässt sich dies an einer klinischen Studie von Carlomagno et al. beobachten. Sie untersuchten Mehrlinientherapien bei Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen und stellten fest, dass bei dem regelhaft auftretenden Progress der Erkrankung die Viertlinientherapie nur bei 20 % der Patienten durchgeführt werden konnte, da die Schwere der Erkrankung weitere Therapien nicht mehr zuließ (128).

Die Betrachtungsweise bei klinischen Studien unterscheidet sich also immens von der Betrachtungsweise bei den meist rasch progredienten Mausmodellen. Dies erschwert die Übertragbarkeit der Ergebnisse, was sich allerdings in den erwähnten ethischen Überlegungen begründet. Beachtet werden sollte allerdings, dass bei erhaltener Lebensqualität das Verzögern des Progresses der Tumorerkrankung bereits eine erfolgreiche Therapie darstellen kann. Dies lässt sich dann gegebenenfalls bereits im Mausmodell abbilden.

4.1.3.1 Auswertungsmethoden der Lungengewebe

Bei der gewählten Auswertungsmethode der oberflächlichen Metastasenzählung gilt es zu bedenken, dass auch der makroskopisch nicht sichtbar infiltrierte Lungenanteil Metastasen enthalten kann. Aufgrund der kosteneffizienten und schnellen Durchführung kann mit der oberflächlichen Metastasenzählung jedoch eine Basis für weitere Untersuchungen gelegt werden.

Die gewählte Auswertungsmethode durch die Zählmethode der gewebefreien Fläche innerhalb der Alveolen im Vergleich zur Gewebsmasse hat den Vorteil, dass auch die diffuse Infiltration des Lungengewebes erfasst wird. Allerdings werden auch Blutgefäße und Bronchiolen geschwärzt, sodass eine in etwa gleichmäßige Verteilung dieses Störfaktors auf Kontroll- und

behandelte Kohorte zu erwarten ist. Dennoch bleibt der Effekt des potenziellen Störfaktors bestehen.

4.2 Evaluation der Wirkstoffe

Die vorliegende Arbeit hat primär das Ziel, zu beantworten, ob die getesteten Derivate der Referenzsubstanzen neue potenzielle Kandidaten in der Krebstherapie sein können. Die in der Einleitung gestellten Fragen sollen nun im Folgenden beantwortet werden.

4.2.1 *In vitro* Evaluation der Wirkstoffe

Insgesamt möchte ich an dieser Stelle noch einmal darauf hinweisen, dass *in vitro* Untersuchungen einzelner Zelllinien meist wenig Aufschluss über die tatsächliche Verträglichkeit der Wirkstoffe innerhalb des physiologischen Zellverbands geben. Trotzdem ist die zytotoxische Evaluation der Wirkstoffe mit der Bestimmung der IC_{50} nötig, um einen Anhaltspunkt für die *in vivo* Toxizität zu erhalten. Darüber hinaus wurde mittels mikroskopischer Kontrollen bestätigt, dass die Löslichkeit der Naturstoffe für die Applikation ausreichend ist und keine Aggregation und Ausfällung mit Serumproteinen zu erwarten ist.

Bei der zytotoxischen Evaluation der Wirkstoffe und insb. von MePip zeigte sich *in vitro* gegenüber malignen Zelllinien im Vergleich zur Referenzsubstanz eine stärkere Potenzsteigerung bei niedriger Konzentration als gegenüber benignen Zelllinien. Daher ist von einer gewissen Spezifität der Wirkstoffe gegenüber Krebszellen auszugehen. Verglichen werden kann hier u. a. die Wirkung bei benignen und malignen Zellen aus Lebergewebe (AML 12 und DPT1/2), bei denen sich eine niedrigere Toxizität bei benignen als bei malignen Leberzellen zeigte.

Nach der Umstellung des Evaluationsverfahrens (siehe Abschnitt über die Evaluation der Arbeitslösungen) zeigte sich eine gute bis sehr Wiederholbarkeit der Ergebnisse, sodass die IC_{50} berechnet werden konnte.

Schlussfolgernd lässt sich also sagen, dass die getesteten Wirkstoffe eine Spezifität für Krebszellen aufweisen und sich für eine Evaluation im murinen Krebsmodell eignen.

4.2.2 Makrophagenrepolarisation

Generell sind die Genexpressionsmarker und Makrophagenphänotypen derart vielfältig und komplex, dass Inkongruenzen, die sich in einem spezifischen Moment darstellen, durchaus als plausibel erachtet werden können. Makrophagen verändern sich kontinuierlich, sodass sich die Veränderung des Phänotyps in einem gewissen Spektrum bewegt und das Anpassen der Genexpression an die Mikroumgebung einen gewissen Zeitrahmen erfordert (126). Ein Beispiel hierfür: Die in Abschnitt 1.7.1. beschriebene Repolarisation von TAM durch Curcumin

steht in Kontrast zur gezeigten Verringerung der Genexpression von iNOS bei der Repolarisation der untersuchten BMDM.

Zudem ist zu beachten, dass die im Rahmen dieser Arbeit vorhandene relativ kleine Versuchgröße mit relativ wenigen Versuchswiederholungen mögliche Gründe für fehlende statistische Signifikanzen darstellen (Typ 2 Fehler trotz eigentlich vorhandener statistischer Signifikanz).

Auch ist eine Übertragbarkeit der Evaluation des Wirkmechanismus in *in vitro* Modellen auf das *in vivo* Modell nur begrenzt möglich (126). Es existieren, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, viele verschiedene Ansätze zur Phänotypisierung von Makrophagenpopulationen. *In vivo* ist je nach zu analysierendem Gewebe darüber hinaus eine Anpassung der Protokolle zur Ergebnisevaluation nötig. Ein verhältnismäßig kostengünstiger und viel betriebener Ansatz ist die Phänotypisierung der Makrophagen mittels qPCR, wie auch hier eingesetzt.

Zusätzlich unterscheiden sich Makrophagentypen, wie bspw. die in dieser Arbeit verwendeten, stark in ihrem Phänotyp und damit auch in ihrer Reaktion auf externe Stimuli. Humane THP-1, murine RAW und BMDM reagieren daher i. R. der etwaigen Polarisierungsprotokolle a. e. sehr unterschiedlich (126). Daher möchte ich betonen, dass die Veränderung des Phänotyps eines Makrophagen je nach Microenvironment und Länge der Einwirkungsdauer der Substanzen in diesem Umfeld unterschiedlich sein kann. Der Phänotyp kann sich daher lediglich in bestimmten Zeitfenstern verändern (126). Kleinste Konzentrationsunterschiede in *in vitro* Modellen bei der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und Kulturmedien haben einen Einfluss auf die Veränderung des Makrophagenphänotyps. Eine präzise, sehr genaue Arbeitsweise und das exakte Einhalten von Einwirkungszeiten anhand standardisierter Protokolle ist daher Grundvoraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Experimente. Daher wurde bei der Evaluation der Makrophagenpolarisation hierauf besonderem Wert gelegt.

Wichtig ist auch die Definition des Phänotyps über die ausgewählten Marker. Es soll angemerkt werden, dass die Bezeichnung M1 und M2-Makrophage von den heutigen Autoren durch das Fehlen von eng definierten Kriterien für die Einstufung des Phänotyps teils nicht mehr akzeptiert wird (57, 129). Nichtsdestotrotz schreiten Bemühungen, die funktionelle Polarisierung von Makrophagen besser zu definieren, weiter fort. Die vielen verwendeten Makrophagenmarker und in Frage kommenden Analysemethoden tragen zu einer exakteren Charakterisierung bei, erschweren diese Bemühungen aber auch erheblich (57). Zusätzlich ist die Ausprägung vieler Genexpressionsmarker bei Makrophagen *in vitro* je nach Zelllinie und ursprünglichem Organismus variabel. Beispielsweise bestehen Unterschiede in der Expression derselben Marker als Reaktion auf den selben Stimulus zwischen humanen und murinen Makrophagen (126). Es ist daher klar, dass verwendete Genexpressionsmarker in verschiedenen Spezies teilweise nicht gleich zu bewerten sind. Es werden also

unterschiedliche Genexpressionsmarker für die Charakterisierung von humanen und murinen Makrophagen verwendet. Zusätzlich finden sich auch innerhalb einer Spezies Unterschiede in der Reaktivität von Makrophagen. Gewebeansässige Makrophagen reagieren anders auf eine Stimulation mit Zytokinen als BMDM (126). Konsekutiv stellten wir fest, dass sich bei der Nutzung identischer Protokolle RAW Makrophagen *in vitro* deutlich schlechter polarisieren ließen als frisch extrahierte BMDM (Daten wurden nicht aufgeführt).

Darüber hinaus stellt sich die Frage, inwiefern die genaue Phänotypisierung mittels der Expression gut validierter Marker von TAM, die für eine Polarisierung zu einem bestimmten Phänotyp sprechen, für ein Therapieansprechen bei der Behandlung von Malignomen relevant ist. Daher sollte die Evaluation von Genexpressionsmarkern von Makrophagen und TAM sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* stärker auf Genexpressionsmarker eingeeengt werden, bei denen eine Veränderung in der Expression direkt mit einem Therapieansprechen assoziiert ist.

Ein möglicher Wirkmechanismus des Effekts durch MePip besteht in der Beeinflussung des TME. Insbesondere könnte für einen Teil der hohen Wirksamkeit im *in vivo* Versuch eine Repolarisation von TAM verantwortlich sein. Passend hierzu zeigte sich die (partielle) Repolarisierung der M2 BMDM durch MePip vergleichsweise besonders potent, da eine statistisch signifikante Erhöhung für iNOS und TNF- α gezeigt werden konnte. Zudem könnte die bei der Repolarisierung von M2-polarisierten BMDM gezeigte, statistisch signifikante Erhöhung der iNOS-Expression durch Garcinol ebenfalls auf TAM repolarisierende Eigenschaften dieses Wirkstoffs hinweisen. Gestützt wird dies durch die erhöhte TNF- α Expression nach der Behandlung der M2-polarisierten BMDM. Hierbei konnten statistisch signifikante Datensätze für Curcumin, MePip und Isogarcinol gewonnen werden. Die Behandlung mit Garcinol zeigte ebenfalls eine TNF- α Erhöhung, jedoch nicht statistisch signifikant zur Kontrollgruppe (Abb. 35). Gegensächlich dazu zeigten Sharma et. al eine dosisabhängige und in der höchsten angewandten Konzentration (20 μ M) auch statistisch signifikante Verringerung der TNF- α Expression bei peritonealen Makrophagen, die sie aus BALB/c Mäusen extrahierten (130). Hier muss allerdings erwähnt werden, dass die Makrophagen mit LPS M1-typisch polarisiert wurden, sodass die Ergebnisse kaum mit den eigenen vergleichbar sind (130). In beiden Fällen wird aber die TNF- α Expression durch Curcumin deutlich moduliert. Darüber hinaus zeigte die *in vitro* Repolarisation der THP-1 Zellen eine Erhöhung der iNOS-Expression durch Curcumin (Abb. 35), die im Einklang mit der von Jiang et. al beschriebenen Erhöhung von iNOS bei der Repolarisierung von TAM durch Curcumin ist (119).

Schlussfolgernd lässt sich also sagen, dass bisher keiner der möglichen Wirkmechanismen an Makrophagen *in vitro* eindeutig nachgewiesen werden konnte, da sich die Unterschiede in

der relativen Expression der Makrophagenphänotypmarker durch die Behandlung der M2-Makrophagen teils variabel darstellte und nur wenig statistisch signifikante Ergebnisse herausgearbeitet werden konnten. Jedoch ließen sich einige vielversprechende Tendenzen festhalten, die auf eine M2 Repolarisierung zu einem immunogenen Phänotyp schließen lassen. Insbesondere ist hier die statistisch signifikante Steigerung von iNOS und TNF- α durch das *in vivo* deutlich potentere MePip zu nennen. Möglich ist auch, dass relevante Marker einer wirksamen antitumorösen Polarisation der Makrophagen nicht optimal erfasst wurden, da es hierfür keine eindeutig validierten *in vitro* Marker gibt.

4.2.3 *In vivo* Evaluation der Wirkstoffe

Generell stellt die Versuchsgruppengröße von zwei Tieren für die *in vivo* Toxizitätsbestimmung anhand von drei bis fünf eingesetzten Konzentrationen eine belastbare Stichprobengröße dar, da sich trotz der kleinen Gruppen eindeutig mit zunehmender Wirkstoffkonzentration die Toxizität zunehmend und mit einem zu erwarteten Kurvenverlauf erhöht.

Die beiden *in vivo* getesteten Wirkstoffe, Isogarcinol und MePip, eignen sich für eine weitere *in vivo* Evaluation in Krebsmodellen, da bei der Verwendung einer höchstmöglichen, nicht toxischen Dosis (15 mg / kg bei Isogarcinol und 60 mg / kg bei MePip) keine offensichtlichen, relevanten Nebenwirkungen beobachtet wurden.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Ergebnisse trotz kleiner Versuchsgröße einen guten Anhalt für eine wirksame antitumorale Anfangsdosis geben und eine plausible höchstmögliche, nicht toxische Dosis bestimmt werden konnte.

Die Frage nach Wirksamkeit der Wirkstoffe als Monotherapie in einem *in vivo* Krebsmodell kann a. e. nur für MePip bejaht werden. Es zeigte sich bei der oberflächlichen Metastasenzählung eine signifikante Reduktion der Anzahl makroskopisch sichtbarer Melanommetastasen. Der makroskopisch nicht sichtbar infiltrierte innere Lungenanteil wurde jedoch methodisch nicht erfasst. Bei der Auswertung der gewebefreien Fläche innerhalb der Alveolen im Vergleich zur Gewebsmasse zeigte sich eine Wirksamkeit auf die Gesamtzahl der Metastasen.

4.2.4 Ausblick

Um die Ergebnisse des Resazurin-Reduktions-Assays weiter zu festigen, könnte ein Zellzahl basierter Assay genutzt werden. Wie zu Beginn der Diskussion angedeutet, könnte so die Aussagekraft der Ergebnisse verbessert werden, da auch Zellen erfasst werden können, die zwar noch leben, ihre metabolische Aktivität jedoch eingestellt haben. Für genaue Analysen könnten Einzelzelluntersuchungen genutzt werden, diese sind aber sehr kosten- sowie zeitintensiv. Daher werden sie eher zur Aufklärung von Wirkmechanismen verwendet (123–125, 131).

Im Hinblick auf die Untersuchungen zur Makrophagenrepolarisation im Humansystem kann neben einer genaueren Ausarbeitung des THP-1 Polarisationsmodells die Evaluation weiterer vergleichender Modelle in Betracht gezogen werden. Möglich wäre hier die Untersuchung an anderen humanen Zelllinien wie der pro-monozytären, histiozytären Lymphom-Zelllinie U937 oder an aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten (engl.: peripheral blood derived monocytes).

Zur Phänotypisierung der repolarisierten Makrophagen könnten weitere Phänotypmarker in größerer Stichprobe evaluiert werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen.

Zum Vergleich: Helleberg Madsen et al. (132) untersuchten für die Evaluation ihrer multizellulären Tumorsphäre die Expression einer größeren Menge von Makrophagenphänotypmarkern, die sich klassischen M1 und M2-Markern zuordnen lassen. Die Tumorsphäre beinhaltete je 5000 Tumorzellen und Fibroblasten, die für das Formen einer Sphäre zentrifugiert, und für sieben Tage kultiviert wurden. Hiernach wurden 10 000 CD14⁺ Monozyten (und Wirkstoffe) für weitere sieben Tage hinzugegeben.

Zusätzlich untersuchten sie auch den Reifestatus der Makrophagen sowie Marker, die mit TAM assoziiert sind. Zu nennen sind hier CD206, CD163, CD86, MHC II, CD40, CD14 und 43 weitere lösliche Faktoren, die mittels Luminex multiplex Technologie gemessen wurden. TAM-Phänotypmarker waren hier CCL2, CCL22 und IL1-Ra (132).

Die Autoren verweisen zusätzlich auf eine starke physiologische Relevanz von Makrophagenphänotypen, die durch monozelluläre *in vitro* Modelle nicht spezifiziert werden können. Darüber hinaus stellten sie stärker repolarisierende Effekte fest, wenn die getesteten Wirkstoffe vor Zytokinstimulation hinzugegeben wurden. Auch schien der Zeitpunkt der Behandlung der Tumorsphären einen Einfluss zu haben. Weiterhin wurde postuliert, dass die Inhibition der Polarisierung von neu rekrutierten Monozyten einen wichtigen Einfluss hat. Zusätzlich konnte derselbe Wirkstoff einen Phänotypmarker bei einer bestimmten Tumorzellart verringern und bei einer anderen erhöhen, was die Plausibilität von Inkongruenzen meiner Ergebnisse erklären könnte.

Es wäre also plausibel das von uns angewendete Protokoll zu modifizieren und zusätzlich um die Untersuchungen an Kokulturmodellen, wie der von Helleberg Madsen et al. genutzten multizelluläre Tumorsphäre (132), zu erweitern.

Die Kokulturmodelle könnten verwendet werden, um die eventuell vorhandene Tumoreduktion der Makrophagen durch Tumorzellen besser abzubilden. Interessant wäre hier auch die Evaluation von PD-L1, da seine Expression bei Zell-Zell Interaktionen durch Zytokine stimuliert wird und für Anti-PD-1 / PD-L1 Antikörper in Kombination mit Curcumin im Mausmodell bereits eine gute Wirkung demonstriert werden konnte (133).

Curcumin wird wohl wegen seiner geringen Bioverfügbarkeit in der onkologischen Therapie eine adjuvante Therapieoption bleiben. Möglichkeiten die Bioverfügbarkeit zu erhöhen sind zwar vielfältig, aber bisher nicht erfolgreich an Malignomen beim Menschen getestet. Trotzdem gibt es Studienergebnisse, die einen Einsatz der Substanz, auch aufgrund fehlender unerwünschter Nebenwirkungen, weiter rechtfertigen. So beschreiben beispielsweise Dhillon et al. in einer klinischen Studie eine biologische Aktivität von oralem Curcumin bei einigen Patienten mit Pankreaskarzinomen (134). Die Sicherheit der Therapie mit oralem Curcumin wurde beispielsweise auch in einer klinischen Studie für die Therapie prämaligener Adenome bei familiärer adenomatöser Polyposis bestätigt. Eine Verringerung des Adenomauftritts konnte allerdings nicht beobachtet werden (135).

Mit einem Blick auf die weitere Evaluation der Wirkstoffe, allen voran der von MePip, sollte eine genauere Quantifizierung der Metastasenmenge in der Interventionsgruppe des Tierversuchs vorgenommen werden.

Auch sollte vor der Durchführung weiterer *in vivo* Testreihen der Wirkmechanismus genauer evaluiert werden. Die bisher fehlgeschlagene Etablierung einer immunhistochemischen Färbung, bspw. mit CD206, könnte weitere Hinweise auf die Wirkweise der Substanz ergeben. Ein Hindernis stellt hier die Etablierung eines entsprechenden Protokolls für den Bleichvorgang dar, um die die starke Hintergrundfärbung durch die Melanomzellen zu reduzieren und die Färbung damit zu ermöglichen. Alternativ könnten immunfluoreszente (IF) Färbungen der angefertigten Schnitte hergestellt werden.

Für eine weitere *in vivo* Evaluation ist eine zusätzliche Testung von MePip in anderen syngenem Tumormodellen sinnvoll. Zu Beginn sollten Malignome getestet werden, bei denen im TME besonders tolerogene Effekte von TAM ausgeübt werden. Speziell wären hier Versuchsreihen an den in unserem Labor mittlerweile gut etablierte syngenem Mausmodellen des HCC vielversprechend. Neben splenischer und orthotopischer Injektion von HCC-Zellen in syngene Mäusen ist insb. die chemische Induktion über die Injektion von Diethylnitrosamin im Modell der Mdr2 knockout Maus besonders aussagekräftig, da hier reproduzierbar polyklonale HCCs entstehen. Eine primäre Untersuchung der Wirkstoffe in diesem Modell konnte allerdings nicht vorgenommen werden, da die nötigen Injektionen und die lange Versuchsdauer über sechs Monate eine deutlich längere Vorbereitungsperiode erfordert hätte. Im Gegensatz zum teilweise immunogenen TME bei Melanomen herrscht im Lebergewebe, auch in der Homöostase, ein meist stark tolerogenes TME, das u. a. durch die in großer Menge vorhandenen Gewebsmakrophagen der Leber (Kupferzellen) hervorgerufen wird. Sie stellen mit 80 % der Gewebsmakrophagen im menschlichen Körper den größten Anteil von Gewebsmakrophagen dar. Sie üben, als gut positionierte Zellen in Lebersinusoiden, die über direkten Kontakt mit Hepatozyten und Sternzellen im Disse-Raum interagieren,

immunologische Schlüsselfunktionen aus. TAM spielen deshalb eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des HCC. Entsprechend sind sie im HCC-TME häufig in großen Mengen bei Resektionen zu finden, sodass die Menge an TAM in den Resektaten mit einer schlechteren Prognose korreliert (63). Das Umkehren des tolerogenen Phänotyps der TAM zu einem proinflammatorischen Phänotyp, der stärkere und effektivere Immunreaktionen hervorruft, könnte also speziell beim HCC zu entscheidenden Therapieerfolgen beitragen.

Aufgrund der höheren Polarität von MePip kann im Vergleich zu Curcumin von einer höheren Bioverfügbarkeit ausgegangen werden. Allerdings beobachtete ich bei 64 μM Verdünnungen von MePiP mikroskopisch Ausfälle. Daher könnte mit Hilfe spezieller Nanopartikel, mit denen in unserer Arbeitsgruppe bereits gearbeitet wurde, die Bioverfügbarkeit und die Ansteuerbarkeit spezifischer Zellen, wie etwa TAM oder andere Gewebsmakrophagen, erhöht werden. Ebenfalls würden hierbei ggf. unspezifische oder unerwünschte systemische Wirkungen und damit die Toxizität der Substanz reduziert werden. Dies ist aufgrund der phagozytischen Aktivität der Makrophagen im Sinne einer passiven Targetierung der Leber mit biodegradierbaren Nanopartikeln besonders gut möglich, wie u. a. für den Wirkstoff Alendronat von unserer AG gezeigt (136). Zudem exprimieren TAM häufig, das in dieser Arbeit untersuchte CD206, welches von Mannose-Nanopartikeln aktiv angesteuert werden könnte (63).

Insbesondere wäre eine Kombination mit anderen Substanzen, die synergistische Effekte erzeugen und komplementär zum Wirkmechanismus einsetzbar sind, vielversprechend. Hier kommen u. a. sonst weniger wirksame klassisch zytotoxische Chemotherapeutika infrage. Möglich wären auch bereits effektive monoklonale Antikörper gegen CTLA-4 oder PD-(L)1, die auf die immunsuppressive Komponente des Tumors abzielen und der Immuncheckpointblockade entgegenwirken. Auch die Kombination mit CAR-T Lymphozyten stellt eine, zugegebenermaßen sehr teure, Möglichkeit zur komplementären Kombination von MePip dar (97), die daher erst nach Komplettierung großer klinischer Studien erfolgen kann. Eine weitere, ebenfalls kostenintensive Option, um den Wirkmechanismus genauer aufzuklären, stellt eine komplette Aufarbeitung der Beeinflussung der Genexpression der behandelten Makrophagen *in vitro*, sowie der behandelten Gewebe *in vivo*, mittels NGS dar. In unserer Publikation konnte ich gemeinsam mit meiner Arbeitsgruppe ausführen, dass MePip eine überzeugende antimetastatische Wirkung und fehlende systemische Toxizität in einem relevanten präklinischen Modell des metastasierten Melanoms zeigte. Unterstützt wird dies durch die weiterführend dargestellte signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der pulmonalen RNA-Spiegel des Mitosemarkers Bub1 und der Entzündungsmarker $\text{TNF}\alpha$ und CCL3 in den mit MePip behandelten Mäusen (137).

5 Zusammenfassung

Das zentrale Thema meiner Promotionsarbeit ist die Erschließung neuer Behandlungsmöglichkeiten und -mechanismen zur Krebstherapie anhand der Evaluierung synthetischer Derivate von Naturstoffen. Die experimentelle Arbeit erfolgte im Institut für Translationale Immunologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Eines der dort bearbeiteten Projekte ist das translationale Projekt 08 (TP08): „Charakterisierung und Modulation myeloider Zellen in hepatozellulären Karzinomen“, welches als Projekt des Sonderforschungsbereiches 1292 geführt wird. Mein Betreuer war ein Postdoc des Projekts.

Das Polyphenol Curcumin zeigt neben vielen anderen Wirkungsweisen eine effektive STAT3-Inhibition (107). Diese könnte die Population von tumorassoziierten Makrophagen durch eine Repolarisierung vermindern. Zudem könnte die T-Zell-Antwort, allen voran die der zytotoxischen T-Zellen, entscheidend gefördert werden (vgl. Immuncheckpointblockade). Es wurde bereits gezeigt, dass Curcumin immunsuppressive TAM zu einem stärker antitumoral wirksamen, M1-ähnlichen, Phänotyp repolarisiert (108).

Über meine Evaluation der Wirkstoffe lässt sich Folgendes zusammenfassen. Es ist von einer Spezifität der Wirkstoffe gegenüber malignen Zellen auszugehen, da sich im Vergleich zur Referenzsubstanz eine stärkere Potenzsteigerung bei niedriger Konzentration als gegenüber benignen Zelllinien zeigte. Zudem eigneten sich die Wirkstoffe für eine *in vivo* Evaluation, da sich *in vivo* bei der Verwendung einer höchstmöglichen, nicht toxischen Dosis keine offensichtlichen, relevanten Nebenwirkungen zeigten. Des Weiteren lässt sich mit Vorbehalt sagen, dass sich MePip im *in vivo* Krebsmodell wirksam zeigte, da sich bei der oberflächlichen Metastasenzählung und bei der Auswertung der gewebefreien Fläche innerhalb der Alveolen im Vergleich zur Gewebsmasse eine Wirksamkeit auf die Metastasenmenge zeigte. In meinen Untersuchungsmodellen konnte keiner der möglichen Wirkmechanismen an Makrophagen *in vitro* eindeutig nachgewiesen werden. Die relative Expression der Makrophagenphänotypmarker durch die Behandlung von M2-Makrophagen stellte sich teils variabel dar. Es ließen sich daher nur wenig statistisch signifikante Ergebnisse herausarbeiten. Jedoch ließen sich einige Tendenzen festhalten, die auf eine M2-Repolarisierung zu einem immunogenen Phänotyp schließen lassen. Möglich ist auch, dass relevante Marker einer wirksamen antitumorösen Polarisation der Makrophagen nicht optimal erfasst wurden, da es hierfür keine eindeutig validierten *in vitro* Marker gibt.

6 Literatur

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice* 2017; 4(4):127–9. doi: 10.1016/j.jcrpr.2017.07.001.
3. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J et al. Krebs in Deutschland für 2017/2018; 2021.
4. Fisher R, Puztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *British Journal of Cancer* 2013; 108(3):479–85. doi: 10.1038/bjc.2012.581.
5. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013; 501(7467):328–37. doi: 10.1038/nature12624.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2016; 66(1):7–30. doi: 10.3322/caac.21332.
7. Dew K, Stubbe M, Signal L, Stairmand J, Dennett E, Koea J et al. Cancer care decision making in multidisciplinary meetings. *Qual Health Res* 2015; 25(3):397–407. doi: 10.1177/1049732314553010.
8. Wölfel T. Grundlagen der Krebsimmuntherapie. *Der Onkologe* 2017; 23(10):807–14. doi: 10.1007/s00761-017-0270-2.
9. Antonio Russo, Lorena Incorvaia, Ettore Capoluongo, Pierosandro Tagliaferri, Antonio Galvano, Marzia Del Re et al. The challenge of the Molecular Tumor Board empowerment in clinical oncology practice: A Position Paper on behalf of the AIOM-SIAPEC/IAP-SIBioC-SIC-SIF-SIGU-SIRM Italian Scientific Societies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2022; 169:103567. doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103567.
10. Balducci L. Management of cancer in the elderly. *Oncology (Williston Park)* 2006; 20(2):135-43; discussion 144, 146, 151-2.
11. OLD LJ, BOYSE EA. IMMUNOLOGY OF EXPERIMENTAL TUMORS. *Annu Rev Med* 1964; 15:167–86. doi: 10.1146/annurev.me.15.020164.001123.
12. PREHN RT, MAIN JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957; 18(6):769–78.
13. Mishra AP, Salehi B, Sharifi-Rad M, Pezzani R, Kobarfard F, Sharifi-Rad J et al. Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. *Molecular Diagnosis & Therapy* 2018; 22(3):281–95. doi: 10.1007/s40291-018-0329-9.

14. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(9):671–82. doi: 10.1038/nrc2399.
15. Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* 2011; 21(6):349–53. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.10.001.
16. Keating GM. Bevacizumab: A Review of Its Use in Advanced Cancer. *Drugs* 2014; 74(16):1891–925. doi: 10.1007/s40265-014-0302-9.
17. Gründker C, Läsche M, Hellinger JW, Emons G. Mechanisms of Metastasis and Cell Mobility - The Role of Metabolism. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2019; 79(2):184–8. doi: 10.1055/a-0805-9113.
18. Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor Biology* 2014; 35(9):8483–523. doi: 10.1007/s13277-014-2421-z.
19. Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO rep* 2014; 15(3):244–53. doi: 10.1002/embr.201338254.
20. Reuben A, Spencer CN, Prieto PA, Gopalakrishnan V, Reddy SM, Miller JP et al. Genomic and immune heterogeneity are associated with differential responses to therapy in melanoma. *npj Genomic Medicine* 2017; 2(1):10. doi: 10.1038/s41525-017-0013-8.
21. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020; 10(3):727–42.
22. Pon JR, Marra MA. Driver and Passenger Mutations in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2015; 10(1):25–50. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040312.
23. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121(11):2373–80. doi: 10.1002/ijc.23173.
24. Samadi AK, Bilisland A, Georgakilas AG, Amedei A, Amin A, Bishayee A et al. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. *Semin Cancer Biol* 2015; 35:S151-S184. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.006.
25. Foerster F, Boegel S, Heck R, Pickert G, Rüssel N, Rosigkeit S et al. Enhanced protection of C57 BL/6 vs Balb/c mice to melanoma liver metastasis is mediated by NK cells. *Oncoimmunology* 2018; 7(4):e1409929.
26. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; 19(11):1423–37. doi: 10.1038/nm.3394.

27. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:329–60. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
28. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2011/2012. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 10. Ausg. 2015; 2015.
29. Prof Dr. Thomas Eigentler et al. S3-Leitlinie Melanom; 2020.
30. Friedrich S, Kraywinkel K. Faktenblatt: Epidemiologie des malignen Melanoms in Deutschland. *Der Onkologe* 2018; 24(6):447–52. doi: 10.1007/s00761-018-0384-1.
31. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005; 41(14):2040–59. doi: 10.1016/j.ejca.2005.03.034.
32. Breitbart et al. S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs; 2014.
33. Kinsler VA, Birley J, Atherton DJ. Great Ormond Street Hospital for Children Registry for congenital melanocytic naevi: prospective study 1988-2007. Part 1-epidemiology, phenotype and outcomes. *Br J Dermatol* 2009; 160(1):143–50. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08849.x.
34. Armstrong BK, Kricker A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 2001; 63(1-3):8–18. doi: 10.1016/s1011-1344(01)00198-1.
35. Dulon M, Weichenthal M, Blettner M, Breitbart M, Hetzer M, Greinert R et al. Sun exposure and number of nevi in 5- to 6-year-old European children. *Journal of Clinical Epidemiology* 2002; 55(11):1075–81. doi: 10.1016/s0895-4356(02)00484-5.
36. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, Berg D, Freiman A, Handiside T et al. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (4):CD004835. doi: 10.1002/14651858.CD004835.pub2.
37. Satzger I, Meier A, Zapf A, Niebuhr M, Kapp A, Gutzmer R. Is there a therapeutic benefit of complete lymph node dissection in melanoma patients with low tumor burden in the sentinel node? *Melanoma Res* 2014; 24(5):454–61. doi: 10.1097/CMR.0000000000000081.
38. Henderson MA, Burmeister BH, Ainslie J, Fisher R, Di Iulio J, Smithers BM et al. Adjuvant lymph-node field radiotherapy versus observation only in patients with melanoma at high risk of further lymph-node field relapse after lymphadenectomy (ANZMTG 01.02/TROG 02.01): 6-year follow-up of a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(9):1049–60. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00187-4.
39. Danish HH, Patel KR, Switchenko JM, Gillespie TW, Jhaveri J, Chowdhary M et al. The influence of postoperative lymph node radiation therapy on overall survival of patients

- with stage III melanoma, a National Cancer Database analysis. *Melanoma Res* 2016; 26(6):595–603. doi: 10.1097/CMR.0000000000000292.
40. Simone M, Goldinger K, Buder-Bakhaya K, Serigne N, Lo A, Forschner A, McKean M, Zimmer L et al. Chemotherapy after immune checkpoint inhibitor failure in metastatic melanoma: a retrospective multicentre analysis. *Eur J Cancer* 2022; 162:22–33. doi: 10.1016/j.ejca.2021.11.022.
 41. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2017; 377(19):1824–35. doi: 10.1056/NEJMoa1709030.
 42. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2017; 377(19):1813–23. doi: 10.1056/NEJMoa1708539.
 43. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 2001; 357(9255):539–45. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
 44. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 2:1–5. doi: 10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x.
 45. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992; 103(5):1444–51. doi: 10.1016/0016-5085(92)91163-x.
 46. Akhtar M, Haider A, Rashid S, Al-Nabet ADMH. Paget's "Seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv Anat Pathol* 2019; 26(1):69–74. doi: 10.1097/PAP.0000000000000219.
 47. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989; 8(2):98–101.
 48. Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* 2013; 4(12):2171–85. doi: 10.18632/oncotarget.1426.
 49. Mukherjee D, Zhao J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res* 2013; 3(1):46–57.
 50. Li J-K, Yu L, Shen Y, Zhou L-S, Wang Y-C, Zhang J-H. Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2008; 14(15):2308–13. doi: 10.3748/wjg.14.2308.

51. Sun R, Kong X, Qiu X, Huang C, Wong P-P. The Emerging Roles of Pericytes in Modulating Tumor Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021; 9.
52. Robinson A, Han CZ, Glass CK, Pollard JW. Monocyte Regulation in Homeostasis and Malignancy. *Trends in Immunology* 2021; 42(2):104–19. doi: 10.1016/j.it.2020.12.001.
53. Wang Y, Zhao M, Liu S, Guo J, Lu Y, Cheng J et al. Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death & Disease* 2020; 11(10):924. doi: 10.1038/s41419-020-03127-z.
54. Guerriero JL. Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. *Int Rev Cell Mol Biol* 2019; 342:73–93. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.07.001.
55. Mohammadi A, Blesso CN, Barreto GE, Banach M, Majeed M, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent. *J Nutr Biochem* 2019; 66:1–16.
56. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013; 39(1):1–10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
57. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology* 2017; 79(1):541–66. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
58. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 2012; 249(1):158–75. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.
59. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, Karlsson JM et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012; 119(3):756–66. doi: 10.1182/blood-2011-02-338004.
60. Kashfi K, Kannikal J, Nath N. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells* 2021; 10(11). doi: 10.3390/cells10113194.
61. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado JdD, Popovich PG, Partida-Sanchez S et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* 2015; 10(12):e0145342. doi: 10.1371/journal.pone.0145342.
62. Vergadi E, Vaporidi K, Tsatsanis C. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. *Front Immunol* 2018; 9.
63. Cacicedo ML, Medina-Montano C, Kaps L, Kappel C, Gehring S, Bros M. Role of Liver-Mediated Tolerance in Nanoparticle-Based Tumor Therapy. *Cells* 2020; 9(9):1985. doi: 10.3390/cells9091985.

64. Quaranta V, Schmid MC. Macrophage-Mediated Subversion of Anti-Tumour Immunity. *Cells* 2019; 8(7). doi: 10.3390/cells8070747.
65. Chen Y, Tan W, Wang C. Tumor-associated macrophage-derived cytokines enhance cancer stem-like characteristics through epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther* 2018; 11:3817–26. doi: 10.2147/OTT.S168317.
66. Arlauckas Sean P., Garris Christopher S., Kohler Rainer H., Kitaoka Maya, Cuccarese Michael F., Yang Katherine S. et al. In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Science Translational Medicine* 2017; 9(389):eaal3604. doi: 10.1126/scitranslmed.aal3604.
67. Singh S, Mehta N, Lilan J, Budhthoki MB, Chao F, Yong L. Initiative action of tumor-associated macrophage during tumor metastasis. *Biochimie Open* 2017; 4:8–18. doi: 10.1016/j.biopen.2016.11.002.
68. Yang Q, Yan C, Gong Z. Interaction of hepatic stellate cells with neutrophils and macrophages in the liver following oncogenic kras activation in transgenic zebrafish. *Sci Rep* 2018; 8(1):8495. doi: 10.1038/s41598-018-26612-0.
69. Beljaars L, Schippers M, Reker-Smit C, Martinez FO, Helming L, Poelstra K et al. Hepatic Localization of Macrophage Phenotypes during Fibrogenesis and Resolution of Fibrosis in Mice and Humans. *Front Immunol* 2014; 5:430. doi: 10.3389/fimmu.2014.00430.
70. Ao J-Y, Zhu X-D, Chai Z-T, Cai H, Zhang Y-Y, Zhang K-Z et al. Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Blockade Inhibits Tumor Growth by Altering the Polarization of Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2017; 16(8):1544–54. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0866.
71. Laoui D, van Overmeire E, Di Conza G, Aldeni C, Keirsse J, Morias Y et al. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res* 2014; 74(1):24–30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1196.
72. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 99(Pt B):180–5. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.009.
73. Scodeller P, Simón-Gracia L, Kopanchuk S, Tobi A, Kilk K, Säälk P et al. Precision Targeting of Tumor Macrophages with a CD206 Binding Peptide. *Sci Rep* 2017; 7(1):14655. doi: 10.1038/s41598-017-14709-x.

74. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12). doi: 10.3390/ijms19123805.
75. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front biosci* 2008; 13(2):5094–107.
76. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA* 2020; 323(19):1945–60. doi: 10.1001/jama.2020.4006.
77. Maier SK, Hammond JM. Role of lenalidomide in the treatment of multiple myeloma and myelodysplastic syndrome. *Ann Pharmacother* 2006; 40(2):286–9. doi: 10.1345/aph.1G170.
78. Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2013; 54(4):683–7. doi: 10.3109/10428194.2012.728597.
79. Schobert R, Biersack B. Chemical and Biological Aspects of Garcinol and Isogarcinol: Recent Developments. *Chem Biodivers* 2019; 16(9):e1900366. doi: 10.1002/cbdv.201900366.
80. Brian M. Sicari, Jenna L. Dziki, Bernard F. Siu, Christopher J. Medberry, Christopher L. Dearth, Stephen F. Badylak. The promotion of a constructive macrophage phenotype by solubilized extracellular matrix. *Biomaterials* 2014; 35(30):8605–12. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.060.
81. Korbecki J, Grochans S, Gutowska I, Barczak K, Baranowska-Bosiacka I. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands. *Int J Mol Sci* 2020; 21(20). doi: 10.3390/ijms21207619.
82. Tsuchiya K, Suzuki Y, Yoshimura K, Yasui H, Karayama M, Hozumi H et al. Macrophage Mannose Receptor CD206 Predicts Prognosis in Community-acquired Pneumonia. *Sci Rep* 2019; 9(1):18750. doi: 10.1038/s41598-019-55289-2.
83. Jesse M. Jaynes, Rushikesh Sable, Michael Ronzetti, Wendy Bautista, Zachary Knotts, Abisola Abisoye-Ogunniyan et al. Mannose receptor (CD206) activation in tumor-associated macrophages enhances adaptive and innate antitumor immune responses. *Science Translational Medicine* 2020; 12(530):eaax6337. doi: 10.1126/scitranslmed.aax6337.
84. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology* 2012; 13(8):722–8. doi: 10.1038/ni.2366.

85. Han C, Yang Y, Sheng Y, Wang J, Zhou X, Li W et al. Glucocalyxin B inhibits cartilage inflammatory injury in rheumatoid arthritis by regulating M1 polarization of synovial macrophages through NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY)* 2021; 13(18):22544–55. doi: 10.18632/aging.203567.
86. Prof. Dr. med. Mathias Freund, Dr. med. Michael Rottmann, Prof. Dr. med. Martin Wilhelm. *Medikamentöse Tumortherapie: Anordnung, Durchführung und Nachsorge*; 2012.
87. Varalakshmi C, Ali AM, Pardhasaradhi BVV, Srivastava RM, Singh S, Khar A. Immunomodulatory effects of curcumin: in-vivo. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(5):688–700. doi: 10.1016/j.intimp.2008.01.008.
88. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9th ed. 2018. Berlin, Heidelberg; 2018.
89. Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N et al. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Advances in Therapy* 2017; 34(10):2232–73. doi: 10.1007/s12325-017-0612-x.
90. Ineichen BV, Moridi T, Granberg T, Piehl F. Rituximab treatment for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 2019; 26(2):137–52. doi: 10.1177/1352458519858604.
91. Kannaiyan R, Mahadevan D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2018; 18(12):1249–70. doi: 10.1080/14737140.2018.1527688.
92. Wong S, Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:247–306. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104753.
93. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, Braud F de, Larkin J et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet* 2015; 386(9992):444–51. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60898-4.
94. Hoos A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 15(4):235–47. doi: 10.1038/nrd.2015.35.
95. Patel A, Kaufman HL, Disis ML. Next generation approaches for tumor vaccination. *Chin Clin Oncol* 2017; 6(2):19. doi: 10.21037/cco.2017.02.04.
96. Kvistborg P, Philips D, Kelderman S, Hageman L, Ottensmeier C, Joseph-Pietras D et al. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Science Translational Medicine* 2014; 6(254):254ra128. doi: 10.1126/scitranslmed.3008918.
97. June CH, Warshauer JT, Bluestone JA. Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy? *Nat Med* 2017; 23(5):540–7. doi: 10.1038/nm.4321.

98. Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 2013; 122(6):863–71. doi: 10.1182/blood-2013-03-490565.
99. Lurquin C, Lethé B, Plaen E de, Corbière V, Théate I, van Baren N et al. Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J Exp Med* 2005; 201(2):249–57. doi: 10.1084/jem.20041378.
100. Zou S, Tong Q, Liu B, Huang W, Tian Y, Fu X. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer* 2020; 19(1):145. doi: 10.1186/s12943-020-01258-7.
101. Soleimani AH, Garg SM, Paiva IM, Vakili MR, Alshareef A, Huang Y-H et al. Micellar nano-carriers for the delivery of STAT3 dimerization inhibitors to melanoma. *Drug Deliv Transl Res* 2017; 7(4):571–81. doi: 10.1007/s13346-017-0369-4.
102. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 2020; 382(20):1894–905. doi: 10.1056/NEJMoa1915745.
103. Gafner S, Lee S-K, Cuendet M, Barthélémy S, Vergnes L, Labidalle S et al. Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems. *Phytochemistry* 2004; 65(21):2849–59. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.08.008.
104. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 2007; 4(6):807–18. doi: 10.1021/mp700113r.
105. Pan M-H, huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab. Dispos.* 1999; (27):486–94.
106. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM et al. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Study of Oral **Curcuma** Extract in Patients with Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 2001; 7(7):1894–900.
107. Mukherjee S, Baidoo J, Fried A, Atwi D, Dolai S, Boockvar J et al. Curcumin changes the polarity of tumor-associated microglia and eliminates glioblastoma. *Int J Cancer* 2016; 139(12):2838–49. doi: 10.1002/ijc.30398.
108. Shiri S, Alizadeh AM, Baradaran B, Farhanghi B, Shanehbandi D, Khodayari S et al. Dendrosomal curcumin suppresses metastatic breast cancer in mice by changing m1/m2 macrophage balance in the tumor microenvironment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(9):3917–22. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.9.3917.

109. Karlstetter M, Lippe E, Walczak Y, Moehle C, Aslanidis A, Mirza M et al. Curcumin is a potent modulator of microglial gene expression and migration. *J Neuroinflammation* 2011; 8:125. doi: 10.1186/1742-2094-8-125.
110. Linder B, Köhler LHF, Reisbeck L, Menger D, Subramaniam D, Herold-Mende C et al. A New Pentafluorothio-Substituted Curcuminoid with Superior Antitumor Activity. *Biomolecules* 2021; 11(7). doi: 10.3390/biom11070947.
111. Ahmad A, Sarkar SH, Aboukameel A, Ali S, Biersack B, Seibt S et al. Anticancer action of garcinol in vitro and in vivo is in part mediated through inhibition of STAT-3 signaling. *Carcinogenesis* 2012; 33(12):2450–6. doi: 10.1093/carcin/bgs290.
112. Masullo M, Menegazzi M, Di Micco S, Befy P, Bifulco G, Dal Bosco M et al. Direct Interaction of Garcinol and Related Polyisoprenylated Benzophenones of *Garcinia cambogia* Fruits with the Transcription Factor STAT-1 as a Likely Mechanism of Their Inhibitory Effect on Cytokine Signaling Pathways. *Journal of Natural Products* 2014; 77(3):543–9. doi: 10.1021/np400804y.
113. Decker WK, Da Silva RF, Sanabria MH, Angelo LS, Guimarães F, Burt BM et al. Cancer Immunotherapy: Historical Perspective of a Clinical Revolution and Emerging Preclinical Animal Models. *Front Immunol* 2017; 8:829. doi: 10.3389/fimmu.2017.00829.
114. Xu C, Fillmore CM, Koyama S, Wu H, Zhao Y, Chen Z et al. Loss of Lkb1 and Pten leads to lung squamous cell carcinoma with elevated PD-L1 expression. *Cancer Cell* 2014; 25(5):590–604. doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.033.
115. Bryson JS, Jennings CD, Caywood BE, Kaplan AM. Induction of a syngeneic graft-versus-host disease-like syndrome in DBA/2 mice. *Transplantation* 1989; 48(6):1042–7. doi: 10.1097/00007890-198912000-00030.
116. Cerezo-Wallis D, Contreras-Alcalde M, Trolé K, Catena X, Mucientes C, Calvo TG et al. Midkine rewires the melanoma microenvironment toward a tolerogenic and immune-resistant state. *Nat Med* 2020; 26(12):1865–77. doi: 10.1038/s41591-020-1073-3.
117. Chatziioannou E, Aydin SA, Forchhammer S, Sinnberg T, Eigentler T. Makrophagen im Melanom – von molekularen Signalen zur therapeutischen Anwendung. *Die Dermatologie* 2022; 73(12):915–28. doi: 10.1007/s00105-022-05077-3.
118. Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett* 1995; 95(1-2):221–5. doi: 10.1016/0304-3835(95)03887-3.

119. Jiang M, Qi Y, Huang W, Lin Y, Li B. Curcumin Reprograms TAMs from a Protumor Phenotype towards an Antitumor Phenotype via Inhibiting MAO-A/STAT6 Pathway. *Cells* 2022; 11(21). doi: 10.3390/cells11213473.
120. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res* 2010; 70(11):4335–45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3767.
121. Riss T, Niles A, Moravec R, Karassina N, Vidugiriene J. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C et al., Hrsg. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD); 2004.
122. Mani S, Singh M, Kumar A. *Animal cell culture: principles and practice*. Cham: Springer; 2023. (Techniques in life science and biomedicine for the non-expert).
123. Guldevall K, Brandt L, Forslund E, Olofsson K, Frisk TW, Olofsson PE et al. Microchip Screening Platform for Single Cell Assessment of NK Cell Cytotoxicity. *Front Immunol* 2016; 7.
124. Hsiao SC, Liu H, Holstlaw TA, Liu C, Francis CY, Francis MB. Real Time Assays for Quantifying Cytotoxicity with Single Cell Resolution. *PLoS One* 2013; 8(6):e66739. doi: 10.1371/journal.pone.0066739.
125. Liang Y, Xu Q, Liu S, Li J, Wang F, Li Z et al. Single-Cell Transcriptomics Reveals Killing Mechanisms of Antitumor Cytotoxic CD4(+) TCR-T Cells. *Front Immunol* 2022; 13:939940. doi: 10.3389/fimmu.2022.939940.
126. Liu SX, Gustafson HH, Jackson DL, Pun SH, Trapnell C. Trajectory analysis quantifies transcriptional plasticity during macrophage polarization. *Sci Rep* 2020; 10(1):12273. doi: 10.1038/s41598-020-68766-w.
127. Leenaars CHC, Kouwenaar C, Stafleu FR, Bleich A, Ritskes-Hoitinga M, Vries RBM de et al. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *Journal of Translational Medicine* 2019; 17(1):223. doi: 10.1186/s12967-019-1976-2.
128. Carlomagno C, Stefano A de, Rosanova M, Falco S de, Attademo L, Fiore G et al. Multiple treatment lines and prognosis in metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 2019; 38(1-2):307–13. doi: 10.1007/s10555-018-9748-7.
129. Casari M, Siegl D, Deppermann C, Schuppan D. Macrophages and platelets in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Front Immunol* 2023; 14:1277808. doi: 10.3389/fimmu.2023.1277808.

130. Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Agrewala JN. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin Exp Immunol* 2007; 147(1):155–63. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03257.x.
131. Ruggeri FS, Mahul-Mellier A-L, Kasas S, Lashuel HA, Longo G, Dietler G. Amyloid single-cell cytotoxicity assays by nanomotion detection. *Cell Death Discovery* 2017; 3(1):17053. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.53.
132. Helleberg Madsen N, Schnack Nielsen B, Larsen J, Gad M. In vitro 2D and 3D cancer models to evaluate compounds that modulate macrophage polarization. *Cellular Immunology* 2022; 378:104574. doi: 10.1016/j.cellimm.2022.104574.
133. Hayakawa T, Yaguchi T, Kawakami Y. Enhanced anti-tumor effects of the PD-1 blockade combined with a highly absorptive form of curcumin targeting STAT3. *Cancer Sci* 2020; 111(12):4326–35. doi: 10.1111/cas.14675.
134. Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(14):4491–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0024.
135. Cruz-Correa M, Hyland LM, Marrero JH, Zahurak ML, Murray-Stewart T, Casero RA et al. Efficacy and Safety of Curcumin in Treatment of Intestinal Adenomas in Patients With Familial Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology* 2018; 155(3):668–73. doi: 10.1053/j.gastro.2018.05.031.
136. Kaps L, Huppertsberg A, Choteschovsky N, Klefenz A, Durak F, Schrörs B et al. pH-degradable, bisphosphonate-loaded nanogels attenuate liver fibrosis by repolarization of M2-type macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(12):e2122310119. doi: 10.1073/pnas.2122310119.
137. Kaps L, Klefenz A, Traenckner H, Schneider P, Andronache I, Schobert R et al. A New Synthetic Curcuminoid Displays Antitumor Activities in Metastasized Melanoma. *Cells* 2023; 12(22). doi: 10.3390/cells12222619.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben:

Primär möchte ich meinem Doktorvater für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Translationale Immunologie anfertigen zu dürfen, die geschaffenen Rahmenbedingungen und für die geduldige Betreuung dieser Arbeit danken.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer für die stetige Motivation, die vielen Diskussionen und Hilfestellungen beim Entstehen dieser Arbeit und das stets offene Ohr für Probleme aller Art danken.

Ganz besonders danken möchte ich außerdem einem neu gewonnenen Freund, der mich, bei Problemen aller Art, sowohl fachlich als auch privat stets unterstützt hat. Durch die gemeinsame Arbeit im Forschungsbereich entstand eine Freundschaft, die wie ich hoffe, ewig andauern wird. Insbesondere ist auch seine Vorarbeit beim *in vivo* Teil des Tierversuchs zu betonen. Die Arbeit am Versuchstier wurde ausschließlich durch ihn durchgeführt. Ich war hierbei lediglich in unterstützender Funktion tätig.

Ebenso sei an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Instituts für Translationale Immunologie für die Integration in das Laborteam und die Einführung und Unterstützung bei sämtlichen Labortätigkeiten gedankt.

Nicht zuletzt danke ich natürlich meiner Familie, welche mir während der Anfertigung dieser Arbeit eine große mentale und auch finanzielle Unterstützung geboten hat.

Auch möchte ich an dieser Stelle der Mainz Research School of Translational Biomedicine (TransMed) und der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) für die Stipendien danken, die mir gewährt wurde.

Ebenso danke ich meinen Freunden und meiner Lebensgefährtin für die stetige Motivation, die ich aus den großartigen Beziehungen zu diesen wunderbaren Menschen schöpfen kann.

Zum Schluss möchte ich allen Menschen danken, die hier nicht erwähnt wurden, jedoch auf Ihre Art ebenfalls zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

8 Tabellarischer Lebenslauf

HENRY TRAENCKNER



BILDUNGSWEG

07/2018 – 05/2022

Studium der Humanmedizin,

Abschluss: 3. Staatsexamen: Note 1,0

Abschluss: 2. Staatsexamen: Note 3,0

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

04/2018 – 07/2018

Studium der Humanmedizin

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen

09/2015 – 04/2018

Studium der Humanmedizin

Medical Faculty of the Comenius University Bratislava (Slowakei)

11/2014 – 02/2015

Vorsemester für Biologie & Medizin

Rheinisches Bildungszentrum Köln GmbH, Köln-Ehrenfeld

08/2001 – 08/2014

Schulischer Bildungsweg

Abitur: Note 2,4

Pestalozzischule, Idstein

BERUFSERFAHRUNG

07/2023 – heute

Assistenzarzt

Klinik für Kardiologie, Angiologie und Intensivmedizin

ViDia Kliniken Karlsruhe

01/2023 – 06/2023

Assistenzarzt

Hausärztliche Praxis Dr. Nienhaus, geb. Wiedenbrück

Minfeld, Gem. Kandel

07/2022 – 12/2022

Assistenzarzt

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Marienhausklinikum Mainz

07/2022 – heute

Tutorentätigkeit für Abdomensonographie und Echokardiographie

SonoForKlinik Mainz

11/2021 – 06/2022

BLS Instruktor des ERC
Universitätsmedizin Mainz

05/2022 – 11/2022

Landesimpfzentrum Wörth/Germersheim
Impfarzt

07/2019 – heute

PROMOTION

Institut für Translationale Immunologie (TIM), Universitätsmedizin Mainz

Dissertationsthema: „Synthetische Curcuminoide und Garcinoide als niedermolekulare Medikamente zur Modulation von Krebszellen und des Immunmicroenvironment beim malignen Melanom“

05/2021 – 05/2022

Praktisches Jahr

Innere Medizin

Internistische Intensivmedizin, Rhythmologie, Angiologie, Hämatonkologie
Universitätsmedizin Mainz

Chirurgie

Thorax-, Allgemein und Viszeral-, Gefäß-, Unfallchirurgie
HSK Wiesbaden

Wahlfach

Anästhesiologie und Intensivmedizin
Klinikum Worms

04/2021 – 05/2022

Landesimpfzentrum Wörth/Germersheim

Impfhelfer und Mitglied des rettungsdienstlichen Teams

02/2020 – 08/2020

Praxis am Museum, Wiesbaden (Hausärztliche Versorgung)

Mitarbeiter

03/2019 – 08/2020

Famulaturen & Hospitationen

Neurologie (08/2020)

Universitätsmedizin Mainz

1-Wöchige Hospitation Nephrologie, SLE und Transplantationsambulanz (03/2020)

Universitätsmedizin Mainz

Diagnostische und Interventionelle Radiologie (08/2019)

Universitätsmedizin Mainz

Hepatology (03/2019)

Universitätsmedizin Mainz

Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Nothof (08/2018)

Waldems

07/2019 – 08/2020

Tutor für Physiologie (S2S – Students to Students),

Medical Faculty of the Comenius University Bratislava (Slowakei)

07/2019 – 08/2020

Pflegepraktika

Orthopädische Kliniken Braunfelds

FÖRDERUNGEN

05/2022 – 11/2022

Peter-Scriba Promotionsstipendium

Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e.V.

02/2020 – 07/2020

IRTG Scholarship

*Mainz Research School of Translational Medicine (TransMed),
Integrated Research Training Group, Collaborative Research Center 1292*

09/2015 – 04/2018

Motivational Scholarships For Outstanding Academic Achievement

Medical Faculty of the Comenius University Bratislava (Slowakei) (09/2016, 05/2017 und 08/2017)

WEITERE KENNTNISSE

Sprachen

Deutsch

Muttersprache

Englisch

fließend in Wort und Schrift

Französisch, Spanisch, Slowakisch

Grundkenntnisse

Software

MS Powerpoint, MS Word

sehr gute Kenntnisse

MS Excel

gute Kenntnisse

Sonstige

Führerschein Klasse B

Freizeitaktivitäten

Aktives Mitglied bei Foodsharing e.V.

Fußball, Kraftsport, Schwimmen, Skifahren, Lesen