

Der Einfluss von HMGB1 aus unterschiedlichen Zelltypen auf Entzündungs- und Karzinogeneseprozesse im murinen Darm

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katharina Josephine Fölsch

aus Hamburg

Hamburg 2021

Die vorliegende Dissertation ist im Zeitraum April 2017 bis Oktober 2020 im Zentrum für Innere Medizin (I. Medizinische Klinik und Poliklinik) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter Anleitung von Dr. Peter Hübener experimentell durchgeführt und von Prof. Dr. rer. nat. Johannes Herkel betreut worden.

Erster Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Johannes Herkel
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Stefan Hoth
Universität Hamburg – Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie
Molekulare Pflanzenphysiologie

Datum der Disputation: 11.05.2022

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Prof. Dr. rer. nat. Christian Lohr
Universität Hamburg – Institut für Zell- und Systembiologie der Tiere
Neurophysiologie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 AUFBAU UND FUNKTION DES DARMS.....	5
1.2 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM IM DARM.....	7
1.3 IMMUNREGULATION DURCH EXOGENE UND ENDOGENE MEDIATOREN	8
1.4 CHRONISCH-ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN.....	10
1.5 DIE TUMORPATHOGENESE IM DARM UND DIE VERBINDUNG ZUR CHRONISCHEN ENTZÜNDUNG	12
1.5.1 <i>Die Tumorbilogie und Tumor-Immunantwort im Darm.....</i>	<i>13</i>
1.6 HIGH-MOBILITY GROUP BOX 1	14
1.6.1 <i>Struktur und Lokalisation von HMGB1.....</i>	<i>14</i>
1.6.2 <i>Regulation der biologischen Aktivität von HMGB1.....</i>	<i>16</i>
1.6.3 <i>Die Funktion von HMGB1 in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen</i>	<i>18</i>
1.6.4 <i>Die Rolle von HMGB1 in der Tumorphogenese.....</i>	<i>19</i>
1.7 ZIELSETZUNG UND UMSETZUNG.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 SELBST ANGESETZTE PUFFER UND LÖSUNGEN	25
2.2 <i>IN VIVO</i> VERSUCHE	27
2.2.1 <i>Mauslinien</i>	<i>28</i>
2.2.2 <i>DSS-Colitis</i>	<i>29</i>
2.2.3 <i>Citrobacter rodentium Infektion</i>	<i>30</i>
2.2.4 <i>Cd45RB^{high}-vermittelte Colitis</i>	<i>31</i>
2.2.5 <i>Apc^{Min} – spontane Karzinogenese</i>	<i>32</i>
2.2.6 <i>AOM/DSS – Colitis-assoziierte Karzinogenese</i>	<i>33</i>
2.3 MAUS-KOLONOSKOPIE	33
2.4 ORGANENTNAHME.....	34
2.5 TUMOR SCORE	35
2.6 ISOLATION DER IMMUNZELLEN AUS DEM KOLON	35
2.6.1 <i>FACS - Durchflusszytometrie Färbung.....</i>	<i>36</i>
2.6.2 <i>FACS - Analyse.....</i>	<i>37</i>
2.7 PARAFFIN-BASIERTE HISTOLOGIE UND MIKROSKOPIE	38

2.7.1	<i>Probenverarbeitung, Anfertigung und Prozession der Schnitte</i>	38
2.7.2	<i>Hämatoxylin & Eosin Färbung</i>	39
2.7.3	<i>Immunhistochemie</i>	39
2.7.4	<i>TUNEL Fluoreszenzfärbung</i>	40
2.7.5	<i>Mikroskopie</i>	41
2.8	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	41
2.8.1	<i>HMGB1 enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA</i>	41
2.8.2	<i>Proteinisolation und BCA-Messung</i>	42
2.8.3	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	42
2.8.4	<i>SemiDry-Blot</i>	42
2.8.5	<i>RNA-Isolation und cDNA-Synthese</i>	43
2.8.6	<i>Real-time qPCR – Quantitative Polymerase-Kettenreaktion</i>	43
2.9	RNA SEQUENZIERUNG	44
2.10	STATISTISCHE ANALYSEN.....	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	HMGB1 IST MIT DER HUMANEN UND MURINEN COLITIS ASSOZIIERT	46
3.2	DIE HMGB1-DEFIZIENZ IN INTESTINALEN EPITHELZELLEN FÜHRT ZU EINEM SCHWEREREN KRANKHEITSVERLAUF DER MURINEN DSS-COLITIS	50
3.2.1	<i>HMGB1 aus Epithelzellen hat weder Einfluss auf den apoptotischen Prozess im DSS-geschädigten Epithel noch auf die Autophagie-Aktivität</i>	55
3.3	HMGB1 MYELOIDEN URSPRUNGS IST FÜR DIE ENTSTEHUNG UND DEN VERLAUF DER DSS-INDUZIERTEN COLITIS NICHT ESSENTIELL	58
3.4	DIE HMGB1-DEFIZIENZ IN INTESTINALEN EPITHELZELLEN HAT KEINEN EINFLUSS AUF DEN VERLAUF DER MILDENEN <i>C. RODENTIUM</i> -INDUZIERTEN COLITIS	60
3.5	HMGB1 HAT KEINEN EFFEKT AUF DIE CHRONISCHE CD45RB ^{HIGH} -INDUZIERTE COLITIS.	64
3.6	HMGB1 BEEINFLUSST DEN ZELLYKLUS IN DER MUKOSA IN DER FRÜHEN DSS-VERMITTELTEN COLITIS.	67
3.7	HMGB1 ALS TUMORMARKER IM GASTROINTESTINALTRAKT DES MENSCHEN.....	72
3.8	EFFEKTIVE HMGB1-DELETION IN <i>APC</i> ^{MIN} MÄUSEN.....	73
3.9	DIE EPITHELIALE HMGB1-DELETION BEGÜNSTIGT DIE KOLOREKTALE TUMORPROGRESSION IM <i>APC</i> ^{MIN} MODELL. .	74
3.10	DIE EPITHELIALE HMGB1-DELETION HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE COLITIS-ASSOZIIERTE KARZINOGENESE IM MURINEN AOM/DSS MODELL.....	80
3.11	DIE MYELOIDE HMGB1-DELETION HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE SPONTANE <i>APC</i> ^{MIN} -BEDINGTE KARZINOGENESE.	82
3.12	DIE MYELOIDE HMGB1-DELETION REDUZIERT DIE COLITIS-ASSOZIIERTE KARZINOGENESE IM KOLONGEWEBE.	83
4	DISKUSSION	87
4.1	HMGB1 WIRD WÄHREND DER HUMANEN CU UND DER MURINEN DSS-COLITIS FREIGESETZT	87

4.2	HMGB1 AUS INTESTINALEN EPITHELZELLEN IST RELEVANT FÜR DIE AUFRECHTERHALTUNG DER DARMBARRIERE WÄHREND DER MURINEN DSS-COLITIS.....	88
4.3	DIE HMGB1-DELETION IN INTESTINALEN EPITHELZELLEN FÜHRT ZU EINER VERSTÄRKTEN TUMORPROGRESSION IN DER SPONTANEN KOLOREKTALKARZINOGENESE IN <i>APC^{MIN}</i> MÄUSEN.....	94
4.4	DIE MYELOIDE HMGB1-DELETION FÜHRT ZU EINER GERINGEREN TUMORBELASTUNG WÄHREND DER CAC	101
APPENDIX		A
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	A
	TABELLENVERZEICHNIS	B
	LITERATURVERZEICHNIS	C
	CURRICULUM VITAE	U
	DANKSAGUNG	W
	EIDESSTÄTTICHE ERKLÄRUNG	Y

Abkürzungsverzeichnis

AOM	Azoxymethan
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APCs	<i>Antigen presenting cells</i>
Arg	Arginase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophage</i>
CAC	<i>Colitis-associated carcinogenesis</i>
CAF	<i>Cancer associated fibroblast</i>
CCL	C-C Motiv Chemokinligand
Cd	<i>Cluster of differentiation</i>
Cd11b	Integrin alpha M (ITGAM)
Cd11c	Integrin alpha X (ITGAX)
Cd45RB	<i>Cluster of differentiation 45, RB splicing variant</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CFU	<i>Colony forming units</i>
Ctrl	<i>Control</i>
CU	<i>Colitis ulcerosa</i>
CXCL	C-X-C Motiv Chemokinligand
CXCR	C-X-C Motiv Chemokinrezeptor
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSS	<i>dextran sulfate sodium salt</i>
DTE	Dithioerythritol
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FACS	<i>fluorescence-activated cell scan</i>
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GPCR	<i>G Protein-coupled receptor</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1 protein</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
<i>i.p.</i>	<i>Intraperitoneal, innerhalb des Bauchfellraumes erfolgend</i>

IEC	<i>Intestinal epithelial cell</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Ly-6C	<i>Lymphocyte antigen 6 complex locus C</i>
Ly-6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G</i>
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC	<i>Morbus Crohn</i>
Min	<i>multiple intestinal neoplasia</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLS	<i>nuclear localization sequences</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
SSC	<i>Side scatter, deutsch: Seitwärtsstreuung</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T _H 17	IL-17 produzierende T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TME	<i>Tumor-microenvironment</i>
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling</i>
VE-H ₂ O	Voll entsalztes Wasser
Wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Entzündliche Prozesse sind elementare Bestandteile der Wirtsantwort auf sterile oder infektiöse Schädigung vaskularisierter Gewebe. Während akute Immunantworten zur Pathogenelimination und Initiierung regenerativer Prozesse und somit der Wiederherstellung der Homöostase beitragen, können sich chronisch-maladaptive Entzündungen nachteilig auf die Wirtsgesundheit auswirken. So sind chronisch-entzündliche Prozesse in vielen Geweben mit einem erhöhten Entartungsrisiko verbunden, etwa dem hepatozellulären Karzinom bei chronischen Viruserkrankungen der Leber oder dem Lungenkrebs bei chronischer Exposition des Bronchialsystems mit inhalativen Schäden. Je nach Pathomechanismus und An- bzw. Abwesenheit von exogenen Krankheitserregern können exogene (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) und endogene (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) Moleküle in unterschiedlichem Maße die Immunantwort beeinflussen, teilweise unter Verwendung von gemeinsamen Zelloberflächenrezeptoren und assoziierten Signalkaskaden. Im Darm findet wie in keinem anderen Organsystem eine immunologische und metabolische Auseinandersetzung mit potenziell pathogenen Mikroorganismen statt. Die intestinale Barriere unterliegt dabei einer strengen und vielschichtigen Regulation; gleichzeitig gilt die Colitis-assoziierte Karzinogenese als paradigmatisches Beispiel für maladaptive Wundheilungsprozesse mit hoher klinischer Relevanz beim Menschen. Für viele chronisch-entzündliche Prozesse im Darm bestehen gegenwärtig nur unzureichende Therapieoptionen. Ziel dieses Vorhabens war daher die Charakterisierung der immunregulatorischen Funktionen des ubiquitär exprimierten DAMPs **High-mobility group box 1** (HMGB1) in der immunologischen Regulation der intestinalen Barriere. Zu diesem Zweck wurden relevante zelluläre Quellen von HMGB1 und ihre Rollen als HMGB1-Ursprungszellen in der akuten Colitis, in der spontanen sowie der Colitis-assoziierten Karzinogenese (*colitis-associated carcinogenesis*, CAC) analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die genetische HMGB1-Defizienz in intestinalen Epithelzellen den Krankheitsverlauf einer murinen chemisch-induzierten Colitis verschärft. Der Phänotyp äußerte sich in stärkerem Gewichtsverlust, in vermehrtem Gewebeschaden der intestinalen Mukosa sowie einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen und inflammatorischen Monozyten in HMGB1-defizienten Mäusen. Des Weiteren war die Expression pro-inflammatorischer Gene im Darmgewebe erhöht. RNA-Expressionsanalysen vom Darmgewebe deuteten außerdem darauf hin, dass die Regulation der Zellzyklusaktivität in HMGB1-defizienten Mäusen verändert war. Im Gegensatz dazu konnten in diesem Modell keine Auswirkungen einer HMGB1-Defizienz aus myeloiden Zellen auf den Krankheitsverlauf der Tiere bzw. auf die Zellinfiltration und die Expression immunregulatorischer Gene festgestellt werden. Interessanterweise hatte die HMGB1-Deletion aus

beiden zuvor genannten Zelltypen weder einen nennenswerten Effekt auf die *C. rodentium*- noch auf die chronische T-Zell-induzierte Colitis. Im Fall der spontanen Karzinogenese im *Apc^{Min}* Modell führte die HMGB1-Defizienz aus Epithelzellen zu einer erhöhten kolorektalen Tumorbelastung der Versuchstiere. Im nicht-tumorösen Gewebe dieser HMGB1-defizienten Mäuse war eine erhöhte Genexpression pro-inflammatorisch relevanter Proteine zu verzeichnen. Dies könnte die erhöhte Tumorprogression und somit die ausgeprägtere Tumorbelastung in den HMGB1-deletierten Mäusen in Teilen erklären. Im Modell der CAC konnte gezeigt werden, dass HMGB1 aus myeloiden Zellen im chronisch-entzündeten Darm einen verstärkenden Einfluss auf die Tumorgenese hat, da durch die HMGB1-Deletion aus myeloiden Zellen die Tumorbelastung reduziert war.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die HMGB1-Defizienz in unterschiedlichen Zelltypen profunde Effekte auf phänotypische Endpunkte akuter sowie chronisch-maladaptiver Modelle hat. Diese Resultate erfordern weitere mechanistische Untersuchungen, um die Kontext-abhängigen immunregulatorischen Rollen von HMGB1 erklären zu können.

Abstract

Inflammatory processes are essential components of the host's response to sterile or infectious damage to vascularized tissues. While acute immune responses contribute to the elimination of pathogens and initiation of regenerative processes and thus the restoration of homeostasis, chronic maladaptive inflammations can have a detrimental effect on the health of the host. Chronic inflammatory processes in many tissues are associated with an increased risk of carcinogenesis, for example hepatocellular carcinoma in chronic viral diseases of the liver or lung cancer in the case of chronic exposure of the bronchial system with inhalation damage. Depending on the pathological mechanism and the presence or absence of exogenous pathogens, exogenous (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) and endogenous (damage-associated molecular patterns, DAMPs) molecules can influence the immune response to different degrees, in some cases using common cell surface receptors and associated signaling cascades. Like no other organ, the intestine is confronted both immunologically and metabolically with potentially pathogenic microorganisms. The intestinal barrier is subject to strict and complex regulation. At the same time, colitis-associated carcinogenesis (CAC) is a paradigmatic model for maladaptive wound healing processes highly relevant in a clinical context. For many chronic inflammatory processes in the intestine, there are currently only inadequate treatment options. The aim of this project was therefore to characterize the immunoregulatory functions of the ubiquitously expressed DAMP **High-mobility group box 1** (HMGB1) in the immunological regulation of the intestinal barrier. For this purpose, we characterized effects of cell-type specific HMGB1 deletion in the contexts of acute colitis, in spontaneous as well as colitis-associated carcinogenesis.

In the context of this work, it could be shown that the genetic HMGB1 deficiency in intestinal epithelial cells aggravates the course of a murine chemically induced colitis. The phenotype was manifested in greater weight loss, increased tissue damage to the intestinal mucosa and increased infiltration of neutrophils and inflammatory monocytes in HMGB1-deficient mice. Furthermore, the expression of pro-inflammatory genes in the intestinal tissue was increased. RNA expression analyzes from intestinal tissue also indicated that the regulation of cell cycle activity was altered in HMGB1-deficient mice. In contrast, the HMGB1 deficiency from myeloid cells had no effects on disease progression, cell infiltration into intestinal tissue or expression of immunoregulatory genes in the same model. Interestingly, the HMGB1 deletion from both of the aforementioned cell types had no effect on *C. rodentium* induced or chronic T-cell-induced colitis. However, in the *Apc*^{Min} mice, the HMGB1 deficiency from epithelial cells led to an increased colorectal tumor burden during spontaneous carcinogenesis. In the non-tumorous tissue of these HMGB1-deficient mice,

an increased gene expression of pro-inflammatory relevant proteins was recorded. This could partly explain the increased tumor progression and thus the more pronounced tumor burden in the HMGB1-deleted mice. For CAC it could be shown that HMGB1 from myeloid cells has a tumor-progressive effect in the chronically inflamed intestine, since the tumor burden was reduced by the HMGB1 deletion.

In summary, the results of this work indicate that the HMGB1 deficiency in different cell types has profound effects on phenotypic endpoints of acute and chronic maladaptive models. These results require further mechanistic studies to explain the context-dependent immunoregulatory roles of HMGB1.

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des Darms

Der Dickdarm (Kolon) ist von proximal nach distal wie folgt aufgebaut: *Caecum* (Blinddarm, Zäkum) mit *Appendix* (Wurmfortsatz), *Colon ascendens* (aufsteigendes Kolon), *Colon transversum* (querverlaufendes Kolon), *Colon descendens* (absteigendes Kolon) sowie *Colon sigmoideum* (S-förmiger Teil) und *Rectum* (Mastdarm, Rektum) (Abbildung 1 A) [1]. Die Funktionen dieses Verdauungsabschnittes bestehen darin, dem gespeicherten Darminhalt Wasser und nach dem Passieren des Dünndarms weiterhin Elektrolyte zu entziehen. Diese Resorption führt zur Verfestigung der Fäzes, die durch die peristaltischen Wellenbewegungen durch das Kolon bewegt werden, bis sie über Rektum und Anus ausgeschieden werden. Störungen der Darmschleimhaut können dazu führen, dass weniger Wasser resorbiert wird, wodurch u.a. Diarrhoen zustande kommen können. Die Darmschleimhaut (Mukosa) ist durch für den Dickdarm charakteristische Einbuchtungen (Krypten) gekennzeichnet, wodurch sich die Resorptionsoberfläche stark vergrößert (Abbildung 1 B). Überdies baut sich vom Magen bis zum Rektum eine Art bakterieller Gradient auf, was bedeutet, dass das Kolon mit mehr als 10^{12} Darmbakterien am stärksten besiedelt ist. Dabei bilden Kolon und Mikrobiom eine Symbiose, da die Bakterien sich von Bestandteilen des Fäzes ernähren und dabei Stoffwechselprodukte freisetzen, die wichtig für den Menschen sind. Zudem handelt es sich bei der physiologischen Darmflora um einen wichtigen Bestandteil der Immunabwehr, da die kommensalen Darmbakterien zum einen pathogene Erreger verdrängen und zum anderen durch die stetige Auseinandersetzung mit dem Immunsystem zu dessen Spezifizierung beitragen [2]. Trotz der wichtigen Eigenschaften der Bakterien im Kolon ist es von essentieller Bedeutung, dass diese im Lumen des Kolons verbleiben und nicht in den Blutkreislauf und somit in andere Organe gelangen. Das einschichtige Darmepithel sowie die Basalmembran und die intestinalen Immunzellen funktionieren als mechanische Barriere, die den Organismus vor dem Eindringen dieser Darmbakterien schützt. Zusätzlich ist die Epithelschicht vom Mukus (Schleim) beschichtet, welcher eine gewisse Pufferzone zwischen den Darmbakterien und den Epithelzellen darstellt [3]. Um die Barrierefunktion des Darmepithels zu gewährleisten, sind die Zellen über den *junctional complex* (integrale Membranproteine wie Claudin, Occludin, E-Cadherin, Adapterproteine) miteinander verbunden [4]. Dabei übernehmen diese Zellen im Verbund verschiedene Aufgaben. Zunächst liegen in der Basis einer Krypte multipotente intestinale epitheliale *Lgr5*⁺ Stammzellen [5]. Die älteren Zellen werden durch Zellmigration von neueren weiter in Richtung Lumen verdrängt, woraufhin sich die ältesten durch das sogenannte *cell shedding* im apoptotischen Prozess ins Lumen absondern und ausgeschieden

werden [6]. Durch die Stammzellreifung entstehen zum einen die Mukus-produzierenden Becherzellen und zum anderen die absorbierenden Enterozyten (prismatische Saumzellen), die apikal mit Mikrovilli bestückt sind, um die Resorptionsfläche weiter zu vergrößern. Die gesamte Oberfläche dieser Enterozyten wird auch als Bürstensaum bezeichnet [2]. Im Dickdarm sind in enger Nachbarschaft zu den Stammzellen ebenfalls sezernierende Paneth-Körnerzellen zu finden, die antimikrobielle Proteine (AMPs), Lektine und Reg3 Proteine produzieren und ausschütten, um die Stammzellen während einer Entzündung zu schützen [2], [7]. Unterhalb der Basalmembran der Epithelschicht erstreckt sich eine von Blut- und Lymphgefäßen durchzogene, dünne Bindegewebsschicht, die *Lamina propria*. Hier befinden sich auch die gewebeständigen und einwandernden Immunzellen. Nach außen hin folgen auf die *Lamina propria* zwei Muskelschichten, die für die Darmperistaltik verantwortlich sind [2].

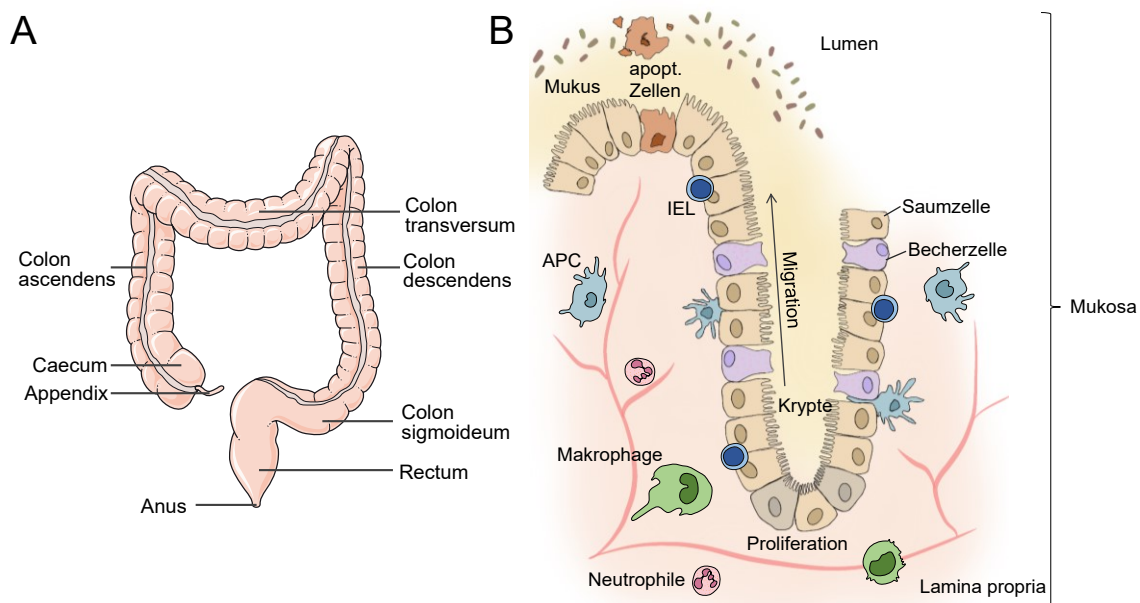


Abbildung 1 | Einteilung des Kolons und die Darmschleimhaut.

A) Das Kolon ist von proximal nach distal eingeteilt in *Caecum* mit *Appendix*, *Colon ascendens*, *Colon transversum* und *Colon descendens*, *Colon sigmoideum*, *Rectum* und *Anus*. B) Die Darmschleimhaut (Mukosa) umfasst die *Lamina propria*, die prismatischen intestinalen Epithelzellen im einschichtigen Darmepithel sowie den Mukus im Lumen. In der Basis einer Krypte befinden sich multipotente Gewebestammzellen, die für Zellnachschub und Geweberegeneration sorgen (Proliferation). Der Pfeil indiziert die Migrationsrichtung der Epithelzellen. In der *Lamina propria* befinden sich u.a. intraepitheliale T-Lymphozyten (IELs), Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) sowie Makrophagen und Neutrophile. Angepasst nach Abreu (2010) [8].

1.2 Das angeborene Immunsystem im Darm

Die in der *Lamina propria* befindlichen Immunzellen dienen als weiterer Pathogenschutzmechanismus neben der physikalischen Barriere gegenüber dem Darmlumen. Intraepitheliale Lymphozyten befinden sich teilweise direkt zwischen den Epithelzellen [9]. Einige Epithelzellen nehmen Antigene aus dem Darmlumen auf, welche sie den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), nämlich hauptsächlich den Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen, direkt weitergeben können, wodurch eine ständige immunologische Überwachung der Barriere und des Mukus gewährleistet werden soll. Diese leiten durch die Antigenpräsentation Informationen über die im Lumen befindlichen Mikroorganismen und Nährstoffbestandteile an T-Zellen weiter, um die intestinale Immunantwort spezifisch auszubilden und zu aktivieren, wenn z.B. Bakterien oder deren Bestandteile durch den Mukus an die Darmbarriere gelangen oder diese sogar überwinden [10]. Makrophagen stellen unter den APCs eine gewebeständige Zellpopulation der *Lamina propria* dar, die durch die Ausdifferenzierung von Monozyten entstehen. Für die Differenzierung in diesen Zelltypen müssen verschiedene Moleküle, wie Interleukin (IL)-3, -4, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und *colony stimulating factors* (CSFs) vorliegen. Während einer Immunreaktion, die bspw. durch eine Infektion hervorgerufen werden kann, nehmen Monozyten und Makrophagen eingedrungene Pathogene über verschiedene Phagozytose-Systeme auf und schütten daraufhin hauptsächlich die Zytokine IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α aus, die weitere immunologisch relevante Prozesse induzieren. Aktiviert werden sie zuvor durch Interferon (IFN)- γ , das u.a. von T-Lymphozyten stammt. Es kommt im Rahmen einer Immunreaktion zu einer Reaktionskette, in der weitere immunreaktive Moleküle produziert sowie freigesetzt und weitere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten (Neutrophile) mobilisiert werden. Außerdem wird die Permeabilität der Gefäße, vermittelt durch im Rahmen der Immunantwort freigesetzte Botenstoffe, erweitert, wodurch die Infiltration der rekrutierten Zellen zusätzlich gefördert wird. Für die effektive Eliminierung der Pathogene sind außerdem Derivate von Stickstoffmonoxid (z.B. die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)) verantwortlich, die von Makrophagen produziert und ausgeschüttet werden können. Durch IL-10 und IL-12, die ebenfalls von Makrophagen produziert werden, wird dabei unter anderem die T-Zell-Antwort reguliert, die auf die primär aktive, angeborene Immunantwort folgt [9]. Die zur Phagozytose notwendige Erkennung und Bindung der Pathogene durch phagozytotische Zellen erfolgt durch ein Repertoire an unterschiedlichen Rezeptoren. Ein einfaches Beispiel stellt der Lipopolysaccharid (LPS)-bindende Rezeptor *Cluster of differentiation* (Cd)14 dar [11]. Er wird charakteristischerweise auf Monozyten und Makrophagen exprimiert und bindet an das Oberflächenprotein LPS, das größtenteils auf gramnegativen Bakterien exponiert ist [12]. Neben den Makrophagen sind auch die erwähnten Neutrophilen phagozytotisch aktiv und dienen somit direkt der Pathogenabwehr. Neben

der Phagozytose sind Neutrophile in der Lage, große Mengen an reaktiven Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS) und anderen Molekülen (z.B. antimikrobielle Peptide, Myeloperoxidase, Protease, etc.) aus ihren Granula freizusetzen, die zytotoxisch auf Eindringlinge wirken und tragen somit wesentlich zur Immunantwort bei. Bei übermäßiger Infiltration und/oder Aktivität jedoch, können Neutrophile ebenfalls schädlich auf den eigenen Organismus wirken [13]. Ob es zu einer Immunantwort kommt oder nicht ist u.a. abhängig von der Erkennung der „gescannten“ Antigene durch die APCs. Dabei spielen sowohl exogene als auch endogene Molekülstrukturen eine Rolle.

1.3 Immunregulation durch exogene und endogene Mediatoren

Die *danger model*-Theorie basiert darauf, dass das angeborene Immunsystem auf exogene und endogene konservierte Molekülstrukturen reagiert, die sogenannten PAMPs und DAMPs. Die Anwesenheit von DAMPs und/oder PAMPs zeigt eine Störung der Gewebeintegrität an und muss von einer zunächst weitgehend unspezifischen Entzündungsreaktion beantwortet werden. Dabei ist es irrelevant, ob eine Infektion oder eine sterile Gewebeschädigung vorliegt. Zuvor hatte man angenommen, das Immunsystem würde vor allem zwischen fremd und körpereigen unterscheiden [14]–[16]. Zu den PAMPs zählen neben verschiedenen bakteriellen Oberflächenmolekülen, wie Peptidoglykan, Flagelline oder LPS ebenfalls freie virale und bakterielle Nukleinsäuren sowie oberflächliche Strukturen von Pilzen und Parasiten. DAMPs hingegen sind endogene Moleküle, die sich während der Homöostase innerhalb der Zellen befinden und nur bei Zellschädigung (*danger model*) oder bei aktiver Freisetzung aus Immunzellen in den extrazellulären Raum gelangen [17]. Nachdem sie im Zellinneren ihre individuelle Funktion erfüllten, spielen sie im extrazellulären Raum eine immunregulatorische Rolle, die Effekte auf den Verlauf einer Erkrankung haben kann [18]. Exogene sowie endogene Signalmoleküle interagieren mit Muster-Erkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) und können diese entweder allein oder im Komplex aktivieren, wodurch wiederum unterschiedliche Signalwege wie z.B. der *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B)- oder der *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)-Signalweg aktiviert werden [11], [19]. Zu den PRRs gehören u.a. die Oberflächen-Rezeptoren *toll-like receptor* (TLR)2, 4 und 9 oder *nucleotide oligomerization domain* (NOD)-*like receptors* (NLRs) [20]–[22]. PRRs binden PAMPs und DAMPs und interagieren dabei mit verschiedenen Co-Rezeptoren, wie im Fall der gemeinsamen Bindung von LPS durch TLR4 und Cd14. Dies führt zur weiteren Aktivierung von Effektoren und der Einleitung nächster Schritte der Immunantwort [16], [23]–[26]. Einige DAMPs, die bei einer Pathogen-unabhängigen Zellschädigung bspw. durch mechanisches oder thermisches Trauma, Strahleneinwirkung oder chemisch-induziert freigesetzt werden, scheinen eigenständige regulatorische Funktionen in

sterilen Entzündungsprozessen zu übernehmen. Sie werden außerdem als endogene „Anreiber“ von Karzinogeneseprozessen im Rahmen chronisch-entzündlicher Erkrankungen vermutet [24], [27], [28]. Im Vergleich zu der seit langem identifizierten und gut charakterisierten Gruppe von PAMPs, sind die DAMPs weniger gut erforscht. Erst seit den 1990er Jahren wurde das erwähnte *danger model* aufgestellt und weiterentwickelt, woraufhin die DAMPs erst detaillierter klassifiziert wurden. Neben Adenosintriphosphat (ATP) [29], S-100 Proteinen [30], Interleukin [31], Harnsäure [32], Hitzeschockproteinen [33]–[36] und Hyaluron [37] ist das Protein *High-mobility-group box 1* das erste, und damit als Prototyp beschriebene DAMP, welches 2002 von Scaffidi et al. als solches erkannt und charakterisiert wurde [38]–[40]. Die Retention von DAMPs wird für alle apoptotischen Zelltodprozesse angenommen und gilt als Erklärung, warum diese Zelltodmodalität im Allgemeinen keine Entzündungsantwort auslöst (Abbildung 2, links). Bei nicht-apoptotischem Zelltod (bspw. durch Nekrose) im Darmgewebe, wie es während chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs) vorkommt, werden jedoch verschiedene DAMPs freigesetzt, die ein inflammatorisches Milieu erzeugen. In der Theorie kommt es zur Aktivierung der gewebeständigen Immunzellen, weiterer Immunzellinfiltration und letztendlich zu weiterem Zellschaden durch diese pro-inflammatorisch aktiven Immunzellen. Wird diese Immunantwort nicht korrekt reguliert, kann der Gewebeschaden nicht ausheilen und es entsteht ein Entzündungszyklus, der sich selbstständig weiter antreibt (Abbildung 2, rechts). Dieses Szenario wird für eine CED unter Berücksichtigung komplexer, multifaktorieller und pathophysiologischer Zusammenhänge, die noch nicht gut verstanden sind, angenommen [41].

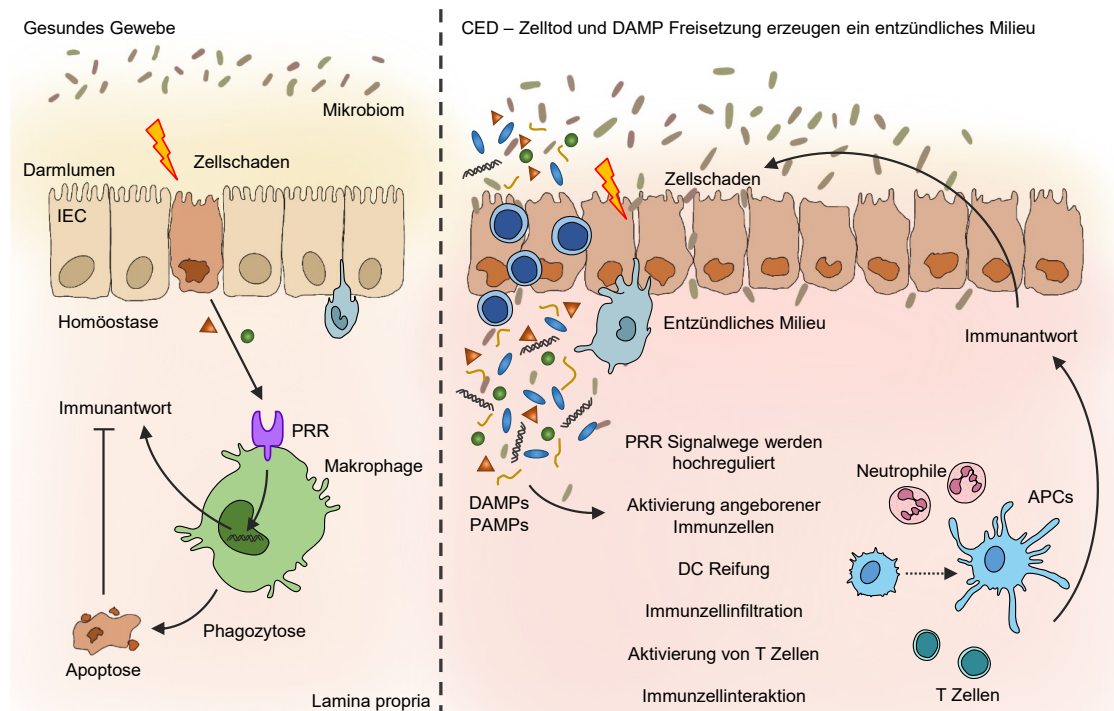


Abbildung 2 | Rolle der PAMPs und DAMPs während einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED).

In gesundem Darmgewebe werden apoptotische intestinale Epithelzellen (IECs) durch das reguläre *cell shedding* abgestoßen. Währenddessen überwachen gewebeständige Immunzellen wie Makrophagen die epitheliale Barriere. In der Homöostase wird eine Immunantwort durch den programmierten Zelltod und Zellabbau unterdrückt. Gleichzeitig hält der Mukus die Darmbakterien fern vom Darmepithel. Sterben IECs durch Nekrose/Nekroptose während einer Infektion bspw., werden DAMPs aus Epithelzellen und Immunzellen freigesetzt, Darmpathogene können eindringen. Die APCs erkennen DAMPs und PAMPs über die PRRs, woraufhin entsprechende Signalwege aktiviert werden. Eine unkontrollierte Immunantwort, kann im dauerhaft entzündlichen Milieu zu weiterem Zellschaden führen. Es entsteht eine positive Rückkopplung. Die überschießende Immunreaktion kann durch bereits vorhandene Defekte der IECs, welche die Aufrechterhaltung der Homöostase negativ beeinflussen, begünstigt werden. Angepasst nach Boyapati *et al.* (2016) [41].

1.4 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Die zuvor beschriebene Integrität der Darmbarriere ist von entscheidender Bedeutung für die Gesundheit eines Organismus. So stellen entzündliche Darmerkrankungen (CEDs) weltweit ein großes Problem dar. Die koordinierte Aktivierung von zellulären und molekularen Effektoren des Immunsystems ist daher wesentlich, um diese Barriere aufrechtzuerhalten, den Wirt vor Krankheitserregern zu schützen, verletztes Gewebe von abgestorbenen Zellen zu befreien und regenerative Wege zur Wiederherstellung der Homöostase zu initiieren [42]. Gestresste oder desintegrierte Zellen können DAMPs freisetzen, die ebenfalls wie PAMPs mit Oberflächenrezeptoren interagieren und Entzündungen auslösen können [38], [42]. Ist die Aktivierung der Abwehrsysteme gestört, kann eine zunächst lebensnotwendige Entzündungsreaktion zur Basis einer chronischen Entzündungserkrankung werden, die dem Organismus selbst schadet. Unter solche fallen mit steigender Prävalenz

bspw. auch Allergien und Asthma [43], Arthritis [44] oder Herz-Kreislaufkrankungen [45], bei denen eine langanhaltende Entzündung charakteristisch ist.

CEDs sind vor allem durch die zwei häufigsten Vertreter *Morbus Crohn* (MC) und *Colitis ulcerosa* (CU) bekannt, die sich symptomatisch zumindest teilweise ähneln. Zu den gemeinsamen Symptomen zählen wiederkehrende Diarrhoen, Schmerzen im Abdomen, Übelkeit und Krämpfe sowie Fieber und Abgeschlagenheit. Bei MC kann im Zuge der Erkrankung der gesamte Verdauungstrakt diffus befallen sein, und es finden sich oft transmurale Defekte mit Fistelbildungen und narbigen Strikturen/Engstellen. Dahingegen ist die CU auf Rektum und Kolon beschränkt und betrifft nur das intestinale Epithel, ohne darunterliegende Gewebeschichten zu befallen [46]. Nachdem sich die Inzidenzraten in den Industrienationen mit hohen Prävalenzwerten (z.B. Norwegen, Deutschland, USA, Canada) zuletzt stabilisiert haben, steigen die Raten in den neuen Industrieländern wie in Teilen Süd-Amerikas oder Süd-Ostasiens [47], [48]. CEDs werden i.d.R. anti-inflammatorisch (je nach Schweregrad mit Aminosalicylat, Kortison und Immunmodulatoren) und somit, wenn auch nicht besonders gezielt, therapiert. Durch die Koloskopie können die Entstehung bzw. der Verlauf der Krankheit gut überwacht und Komplikationen wie bspw. die Bildung von Dysplasien frühzeitig erkannt werden, was eine frühzeitige Behandlung ermöglicht. Neben der medikamentösen Behandlung und der Kontrollkoloskopien wird bei Komplikationen und bei unkontrollierbaren Schüben einer CU auf eine Proktokolektomie (chirurgische Entfernung von Kolon und Rektum) zurückgegriffen, wodurch die CU als grundsätzlich heilbar gilt [49], [50]. MC kann hingegen aufgrund des häufig diffusen und ubiquitären Ausbreitungsmusters durch chirurgische Maßnahmen nicht kuriert werden. Dies verdeutlicht die Relevanz der Entwicklung eines breitgefächerten Therapiespektrums, das möglichst gezielt wirken und weltweit einsetzbar sein sollte [42], [51]. CU und MC können durch unterschiedlichste Faktoren und durch deren Kombination ausgelöst bzw. beeinflusst werden, wobei die Frage der Ursache [52] ungeklärt bleibt. Diese Faktoren umfassen Gendefekte bzw. die Veranlagung (z.B. NOD2 Mutation) [52]–[56], Fehlfunktionen des Immunsystems (z.B. übermäßige Zellaktivierung oder Zytokinproduktion) [52], [53], [55], ein potentiell pathogenes Mikrobiom [52], [55], [57] sowie verschiedene Umweltfaktoren (z.B. Rauchen, Ernährung, Infektionen) [52], [54], [56].

Ferner führen die andauernden Wundheilungsprozesse während einer CED wie bei anderen chronischen Entzündungen epithelialer Organe (z.B. Ösophagus, Magen, Darm, Lunge, Pankreas, Leber, Haut) in einigen Fällen zur Bildung maladaptiver neoplastischer Veränderungen im Gewebe [58]–[60]. So ist bekannt, dass bspw. ein Patient mit Virusbedingter chronischer Leberentzündung mit höherer Wahrscheinlichkeit ein hepatozelluläres Karzinom entwickelt, als ein Mensch ohne Vorerkrankung [61]. Ein anderes Beispiel wäre eine chronische Darmentzündung als Prädisposition für die Entstehung eines

kolorektalen Karzinoms (*colorectal cancer*, CRC). Dabei ist das Risiko an CRC zu erkranken für CU Patienten, vor allem abhängig vom Alter und vom genetischen Hintergrund, etwa 1,5-mal höher als für gesunde Menschen [62], [63]. Die Tumorpathogenese und der immunologische Hintergrund der CRC-Erkrankung werden im nächsten Abschnitt näher erläutert.

1.5 Die Tumorpathogenese im Darm und die Verbindung zur chronischen Entzündung

CRC gehört weltweit neben Lungen-, Brust- und Prostatakrebs zu den häufigsten Tumorerkrankungen (auf den Inzidenzwert bezogen) und hat den zweithöchsten Mortalitätswert nach Lungenkrebs, wobei Inzidenzwerte und Mortalität je nach Kontinent und Land variieren. In der europäischen Region sind die Inzidenzraten bspw. etwa 5-fach höher als in Afrika [64], [65]. In Deutschland lagen die Inzidenzwerte im Jahr 2016 bei 32,9 (Frauen) bzw. 50,3 (Männer) pro 100.000. Gleichzeitig lag die Mortalität bei 11,3 (Frauen) bzw. 18,8 (Männer) je 100.000. Dabei erhöht sich das Risiko an CRC zu erkranken mit steigendem Alter enorm. Mehr als die Hälfte der in Deutschland diagnostizierten Fälle treten bei über 70-jährigen auf [64]. Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören eine ballaststoffarme Ernährung, erhöhtes Körpergewicht sowie Tabak- und Alkoholkonsum. Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist außerdem eine chronisch entzündliche Vorerkrankung. Demnach wird angenommen, dass das Risiko für eine CRC-Erkrankung in chronisch erkrankten Colitis-Patienten erhöht ist [63]. Ebenso ist die Mortalität für CRC durch eine Colitis deutlich erhöht. Je früher der Patient an der Colitis erkrankt, desto höher ist das CRC-Risiko sowie die Mortalität. So wird das CRC-Risiko auf 2 % nach 10 Jahren, 8 % nach 20 Jahren und 18 % nach 30 Jahren geschätzt [66].

Unklar ist dabei, welche Rolle das gastrointestinale Mikrobiom, oxidativer Stress, mögliche genetische Mutationen oder die pro-inflammatorischen Faktoren des angeborenen bzw. des adaptiven Immunsystems genau spielen [62]. Die Früherkennung von Vorläuferläsionen bzw. lokalisierten und somit kurativ behandelbaren Stadien der Darmkrebsentstehung durch regelmäßige endoskopische Überwachung und operative Eingriffe führen dabei bereits zu einer verbesserten Prognose für die Patienten [64], [67]. Dennoch stellen andauernde Entzündungen auch nach operationeller Entfernung der Dysplasien weiterhin eine Problematik dar [67]. Daher sind die Erforschung des immunologischen Hintergrunds von CRC bzw. CAC sowie die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien nach wie vor von entscheidender Bedeutung.

1.5.1 Die Tumorbilogie und Tumor-Immunantwort im Darm

Die CRC-Entstehung ist sehr komplex und kann in sehr unterschiedlichem Maß von genetischen Faktoren beeinflusst werden. *Adenomatous polyposis coli* (APC) [68], [69] oder der Immunsuppressor *p53* [70], [71] sind z.B. als Protoonkogene bei CRC bekannt. APC ist in den WNT/ β -Catenin Signalweg involviert, *p53* hingegen in Zellzyklus, DNA-Reparaturmechanismen und Apoptose. Im Gegensatz zu den sporadisch auftretenden CRCs, kann die Tumorgenese auch mit einer chronischen Entzündung assoziiert sein, wie bei der CAC [72]. Dabei können sowohl die spontanen CRCs als auch die CAC selbst Entzündungsreaktionen hervorrufen. Die infiltrierenden Immunzellen können den gesamten Verlauf der Krebserkrankung durch die Freisetzung von immunregulatorischen Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Molekülen beeinflussen [58]. In der Tumorgenese verändern sich Zellen hinsichtlich ihrer biologischen Potenz und proliferieren unkontrolliert [73]. Mechanismen, die veränderte Zellen beseitigen sollten (Apoptose, DNA-Reparatur), werden von Tumorzellen umgangen [74], [75]. Ebenso verändert sich ihr Metabolismus, denn verglichen zu gesunden Zellen nutzen Tumorzellen verstärkt die aerobe Glykolyse (Warburg-Effekt) und oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung. Fettsäuren werden nicht verstoffwechselt, sondern im Gegenteil für die Lipidbiosynthese produziert. Dabei bleibt der metabolische Status immer unbestimmt und anpassungsfähig vor allem bezogen auf die Nährstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit, die in verschiedenen Bereichen eines Tumors unterschiedlich gegeben sind. Zusätzlich werden verstärkt Zwischenprodukte synthetisiert, die wiederum das Zellwachstum und die Proliferation fördern [76]. Tumorzellen beeinflussen ebenfalls ihre direkte Umgebung bzw. gesunde Zellnachbarn. Denn, wie zuvor erwähnt, können Tumorzellen eine Immunantwort auslösen, die entweder gegen den Tumor gerichtet ist und das veränderte Gewebe abbaut (Anti-Tumorantwort) oder sie fördert bei Fehlregulation sogar die Tumorprogression [58], [60], [72]. So können Makrophagen, Dendritische Zellen und *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) über die Antigenpräsentation und Produktion der Zytokine IL-12 und IFN γ dem Tumorwachstum entgegenwirken und wirken somit tumorsuppressiv. Jedoch können diese Immunzellen je nach Phänotyp ebenso immunsuppressiv gegen die Anti-Tumorantwort wirken und durch die Produktion entsprechender immunregulatorischer Effektoren das Tumorwachstum fördern [58]. Neutrophile haben dabei anscheinend gegensätzliche Wirkungen auf die Tumorentwicklung, jedoch setzen sie während einer Immunantwort überwiegend Zytokine, Proteasen sowie NO-Derivate und ROS ins *tumor microenvironment* (TME) frei, welche sich größtenteils tumorfördernd auswirken [77]. Von den Zellen des angeborenen Immunsystems sind vor allem die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) hervorzuheben, die das Tumorwachstum insbesondere im M2-Phänotyp, aufgrund der pro-angiogenen und gewebebildenden Aktivitäten, fördern und mit einer

schlechten Prognose sowie Metastasierung korrelieren. Dies steht besonders im Zusammenhang mit der Produktion und Freisetzung von C-C Motiv Chemokinligand 2 (CCL2) und IL-13 aus Tumorzellen, die somit die Polarisation der Makrophagen hinsichtlich eines M2-Phänotyps beeinflussen können [77]–[79]. Zellen des adaptiven Immunsystems weisen ebenfalls tumor-supprimierende und -fördernde Eigenschaften auf, wobei speziell die natürlichen Killerzellen (NK T-Zellen) [80] sowie Cd8 T-Zellen [81] ausschließlich bzw. zumindest überwiegend zytotoxisch, also supprimierend gegenüber den Tumorzellen wirken. Regulatorische T-Zellen (T_{regs}) wiederum hemmen die Aktivität anderer Immunzellen und somit die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wodurch zwar einerseits eine Autoimmunität bzw. eine überschießende Immunreaktion verhindert wird, andererseits supprimieren sie somit auch die Anti-Tumorimmunantwort und können daher Tumorstromafördernd sein [82]. Insbesondere die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in Immunzellen durch u.a. TNF in der nahen Tumorumgebung scheint die Tumorstromaförderung ebenfalls zu verstärken [83]. Durch die Aktivierung von NF- κ B werden weitere pro-inflammatorische Mediatoren wie z.B. IL-1 β , *cyclooxygenase type 2* (COX-2), iNOS oder *matrix metalloproteinases* (MMPs) in angeborenen Immunzellen exprimiert und freigesetzt, die eine weitere Inflammation vorantreiben können [84]. IL-6, welches vor allem aus Neutrophilen und Makrophagen freigesetzt wird, aktiviert den STAT3-Signalweg in Tumorzellen, was ebenfalls wesentlich zur Tumorstromaförderung beitragen kann [85]. So stehen gerade diese beiden Signalwege in Zusammenhang mit Entzündungs- und Karzinogenesevorgängen, da sie eine direkte Verbindung zwischen Immun- und Tumorzellen schaffen. Insgesamt verhält sich die Immunantwort eines Organismus auf verändertes Gewebe bzw. Tumore sehr komplex und ist noch nicht ausreichend gut erforscht. Es scheint in jedem Fall so zu sein, dass der Effekt der Immunzellen stark abhängig von der Tumorart und dem individuellen Entstehungshintergrund (abhängig der Wirtsgenetik und teilweise vom intestinalen Mikrobiom) ist.

1.6 High-mobility group box 1

1.6.1 Struktur und Lokalisation von HMGB1

HMGB1 ist ein evolutionär hochgradig konserviertes Nukleoprotein, das ubiquitär in nahezu allen Zellen der Klasse *Mammalia* exprimiert wird. So ist z.B. das HMGB1 in Nagetieren zu 99 % homolog zum humanen HMGB1. Im Gegensatz zu Histon bindet es reversibel an Chromatin und spielt, auf den Nukleus begrenzt, während der Homöostase eine DNA-stabilisierende Rolle [86], [87]. Darüber hinaus werden ihm intrazelluläre Funktionen zugeschrieben, die z.B. in DNA-Reparaturmechanismen und Gentranskription involviert sind [88], [89]. 1999 zeigten Calogero *et al.* durch dessen globale Deletion, dass HMGB1

essentiell für die Mobilisierung von in der Leber gespeichertem Glykogen in der unmittelbaren postnatalen Entwicklungsphase zu sein scheint. Neugeborene HMGB1-defiziente Mäuse sind demnach nicht überlebensfähig und sterben kurz nach der Geburt an *Hypoglykämie*. Die Ergebnisse dieser Studie weisen außerdem auf eine mögliche transkriptionelle Funktion des Proteins hin [90]. Für die Interaktion mit der DNA und die Funktion in Transkriptionsprozessen sind die beiden DNA-bindenden Domänen (*A* und *B box*) sowie das C-terminale saure Ende (*acidic tail*) zu nennen, welche in Abbildung 3 dargestellt sind [86], [91]. Durch eine der wichtigsten post-translationalen Modifikationen, die Acetylierung der *nuclear localization sequences* (NLSs) kann HMGB1 binnen kürzester Zeit vom Nukleus ins Zytosol translozieren und ist dadurch extrem mobil. Unter physiologischen Bedingungen lokalisiert das Protein jedoch vorwiegend im Zellkern [39], [92], [93]. Neben den drei Hauptdomänen und den NLSs sind einige Sequenzen identifiziert worden, die für die Bindung an Rezeptoren (z.B. *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) [94] und *Toll-like receptor* (TLR)4 [95]) oder an intra- und extrazellulären Interaktionspartner (z.B. p53 [96] bzw. LPS [97]) notwendig sind (Abbildung 3). Studien zur strukturabhängigen funktionalen Charakterisierung von HMGB1 wiesen auf mögliche inflammatorisch relevante Aktivitäten hin. Ihrer Struktur entsprechend könnte demnach die *A box* anti-inflammatorisch [98], die *B box* pro-inflammatorisch [99] und der *acidic tail* antibakteriell [100] aktiv sein. Dies lässt sich vor allem auch auf die Lage der Bindestellen für die jeweils pro- oder anti-inflammatorisch eingebundenen Rezeptoren und Interaktionspartner zurückführen [91]. Darüber hinaus sind die drei Cysteine, zwei in der *A box* und eins in der *B box*, von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität von HMGB1. Denn abhängig von den situationsbedingten Parametern des Milieus in der Umgebung (pH, freie Radikale, PAMPs, usw.), können sich verschiedene Isoformen bilden, die wiederum bestimmte Bindeeigenschaften zu den Interaktionspartnern aufweisen.

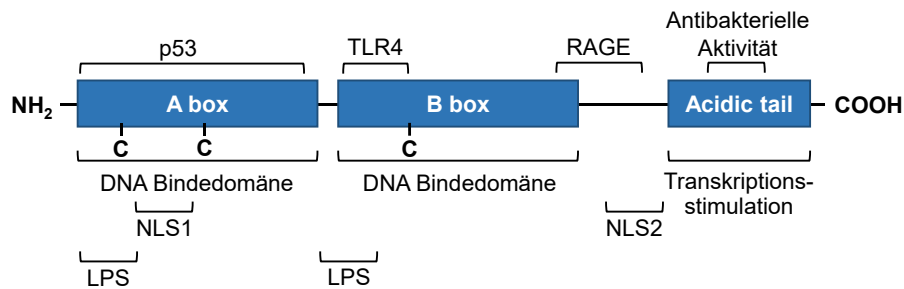


Abbildung 3 | Die Struktur und Funktion von HMGB1.

HMGB1 ist in drei Hauptdomänen eingeteilt. Die A und B *box* Domänen werden auch als DNA-Bindedomänen bezeichnet. Diese beinhalten auch die drei Cysteine (C), die für den Redox-Status des Proteins verantwortlich sind. Die A *box* trägt außerdem die Interaktionssequenz für p53 und jeweils eine für Lipopolysaccharid (LPS) und eine *nuclear localization sequence* (NLS). Die B *box* beinhaltet ebenfalls eine Bindestelle für LPS und außerdem die Interaktionssequenz für *toll-like receptor 4* (TLR4). Zwischen der B *box* und der dritten Domäne, dem *acidic tail* (sauers Ende), liegt die Bindestelle für den Hauptrezeptor *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) sowie die NLS2. Das saure Ende von HMGB1 wird auch als Transkriptionsstimulationsdomäne bezeichnet, welcher eine antibakterielle Aktivität zugesprochen wird. Angepasst nach [86], [91].

1.6.2 Regulation der biologischen Aktivität von HMGB1

Neben der erwähnten Acetylierung können die NLSs für die nukleozytoplasmatische Translokation als Antwort auf unterschiedliche Stimuli phosphoryliert werden, sodass die Lokalisation im Zytosol stärker gefördert wird [101], [102]. Weitere post-translationale Modifikationen führen ebenso dazu, dass HMGB1 seine Affinität zur DNA verliert und seine Lokalisation aus dem Nukleus heraus weiter ins Zytosol bis hin zum Extrazellulärraum verlagert. Doch die wichtigste Art, vor allem bezüglich der Funktion des Proteins, ist die Oxidation als kovalente Modifikation. Diese führt zur Isoform Bildung von HMGB1 in unterschiedliche Redoxzustände [103]. Solange sich HMGB1 im Inneren der Zelle befindet, sind die besagten Cysteine in der A und B *box* reduziert. HMGB1 liegt also in seiner reduzierten Form vor (bekannt als *fully reduced* oder *all-thiol* HMGB1) und weist eine Chemokin-Aktivität auf, indem es bspw. mit C-X-C Motiv Chemokinligand 12 (CXCL12) im Heterokomplex über den C-X-C Motiv Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) für die Rekrutierung von Immunzellen sorgt [103]–[105]. Bei einem leichten Anstieg von „oxidativem Stress“, steigt der Anteil an ROS im Milieu. Da die Cysteine Redox-sensitiv sind, bildet sich in einem solchen Fall schnell eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen der A *box* [106]. Dieses *disulfide* HMGB1 kann nicht mehr mit CXCL12 interagieren und nicht als Chemokin aktiv werden. Stattdessen löst es mit einer Zytokin-Aktivität z.B. eine TLR4-vermittelte Immunantwort aus. Die dritte zu erwähnende Isoform ist die voll-oxidierte Form von HMGB1, das *sulfonyl* HMGB1. Diese Form liegt in stark oxidativem Milieu, nach der Exposition gegenüber ROS vor und weist keine Immunaktivität auf [103], [107]. Die verschiedenen post-translationalen Modifikationen bestimmen demnach ganz entscheidend die Lokalisation des Proteins und dessen Funktion als Immunregulator [86], [108].

Neben seinen DNA-bezogenen Funktionen im Zellkern, wird HMGB1 von einigen Zelltypen, wie z.B. Monozyten und Makrophagen aktiv lysosomal freigesetzt, sodass es unterschiedlich modifiziert als Zytokin oder Chemokin mit diversen Rezeptoren interagieren kann (Abbildung 4). Kommt es zu einem Gewebeschaden bspw. durch Nekrose oder Pyroptose, wird HMGB1 aus diesen geschädigten Zellen passiv freigesetzt, jedoch weniger von apoptotischen Zellen, weshalb durch Apoptose i.d.R. auch keine Immunantwort induziert wird [109], [110]. Auf welche Weise das Protein mit seinen Interaktionspartnern interagiert, hängt dabei stark von den situationsbedingten Eigenschaften des extrazellulären Milieus und der post-translationalen Modifikation ab. Sind entsprechende Faktoren gegeben, wird über NF- κ B sowie *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Kaskaden eine überwiegend pro-inflammatorische Immunantwort über verschiedene Signalwege induziert [109], [111]–[113]. Diese Signalwege sind von großer Bedeutung für den Verlauf der Immunantwort, aber auch für die Proliferation, Zellwachstum und Differenzierung, Migration und Zelladhäsion [114]. Vor allem führt die Aktivierung von NF- κ B sowohl zur vermehrten Transkription und Freisetzung der Zytokine IL-6, TNF und IFN- γ [109], [115] als auch NLRP3 und pro-IL-1 β und somit zur Inflammasom-Aktivierung [86], [114]. Ferner sind intrazelluläre anti-inflammatorische Effekte von HMGB1 beschrieben [116]–[118].

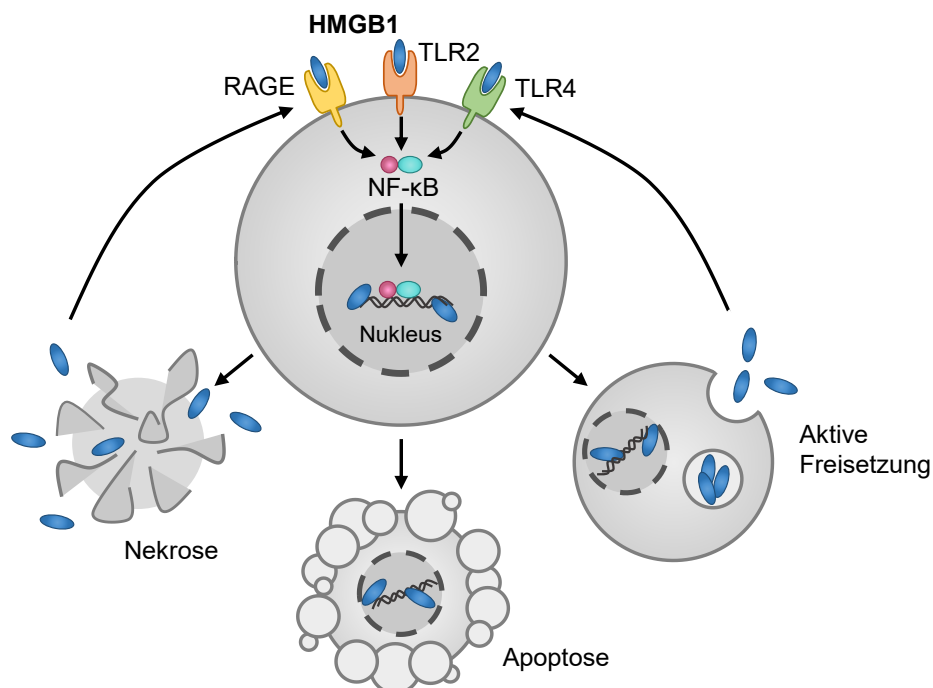


Abbildung 4 | Die Freisetzung und Rolle von extrazellulärem HMGB1.

Das prototypische *damage-associated molecular pattern* (DAMP) HMGB1 bindet während der Homöostase reversibel an DNA und ist daher im Nucleus lokalisiert. Durch die Nekrose gelangt das Protein passiv in den Extrazellulärraum oder es wird aktiv von Immunzellen freigesetzt. Dort interagiert es mit diversen *pattern recognition receptors* (PRRs) wie RAGE oder TLRs, um eine Immunantwort zu induzieren. Dabei wird hauptsächlich der NF- κ B Signalweg aktiviert, wodurch weitere immunologisch aktive Moleküle produziert werden. Von apoptotischen Zellen wird HMGB1 größtenteils zurückgehalten, weshalb hierdurch i.d.R. auch keine Immunantwort ausgelöst wird. Angepasst nach Lotze und Tracey (2005) [109].

1.6.3 Die Funktion von HMGB1 in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen

In Humanstudien konnte HMGB1 bereits mit verschiedenen Erkrankungen, wie Infektionen, sterilen Gewebeschäden (z.B. Trauma) sowie Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden und wurde teilweise als passender korrelierender Biomarker für die klinische Praxis dargestellt. In verschiedensten Entzündungserkrankungen sowie Krebserkrankungen, z.B. bei einer schweren Sepsis [119] oder akuten Lungenentzündung [120], CED- [121], [122], CRC- [123] oder Lungenkrebs-Patienten [124] liegt eine erhöhte Proteinkonzentration von HMGB1 in Serum, Plasma, Stuhl oder Sputum vor. In diesem Kontext wird vermutet, dass HMGB1 eine Entzündung in Folge von nicht-apoptotischem Zellschaden in verschiedenen Geweben initiiert, wie z.B. in der Leber [125], [126], der Niere [127], [128], der Haut [129] oder im Pankreas [117], [130]. Erhöhte HMGB1-Werte werden ebenso mit Ischämie/Reperfusionsschäden in verschiedenen Organen assoziiert, die bspw. durch einen hypovolämischen Schock, Trauma oder im Rahmen von Organtransplantationen ausgelöst werden können [131]–[135]. Des Weiteren ist HMGB1 u.a. in Autoimmunerkrankungen involviert [136] [86]. Meist korreliert die HMGB1-Konzentration im Serum positiv mit dem Schweregrad bzw. dem Verlauf einer Erkrankung. Evolutionär gesehen wäre es nicht von Vorteil für den Organismus, wenn ein derart hoch konserviertes Molekül einen Krankheitsverlauf dabei ausschließlich verstärken würde. Studien mit zellspezifisch, konditionell HMGB1-deletierten Versuchstieren weisen darauf hin, dass dieses Protein durchaus eine mildernde Rolle für verschiedene Erkrankungen spielen könnte. Mäuse mit einer myeloiden HMGB1-Defizienz wiesen bspw. eine verringerte Überlebenschance in Folge einer LPS-induzierten Sepsis auf [118], [137]. Die Deletion aus Epithelzellen resultierte in einer gravierender ausfallenden murinen Colitis [138].

Nach der Erkenntnis, dass die globale HMGB1-Deletion letal ist, wurden darauffolgend hauptsächlich Studien durchgeführt, in denen die Aktivität des extrazellulären Proteins *in vivo* inhibiert wurde. Dazu wurden u.a. HMGB1-neutralisierende Antikörper, verschiedene Chemikalien und Peptide in unterschiedlichen Krankheitsmodellen analysiert [86], [139], [140]. Die Antikörper-basierte Neutralisation von HMGB1 führte bspw. zu einer verminderten Darmbarriere-Dysfunktion [131], [141], und schwächte die Entzündungsantwort der Pankreatitis [142] oder der spontanen Arthritis [143]–[145] ab. Der Einsatz des natürlichen Glycyrrhizins, welches ebenfalls an HMGB1 bindet und dessen Funktion inhibiert, führte zur Eindämmung einer Sepsis [146] oder Arthritis [147]. Ethylpyruvat ist eine Chemikalie, die u.a. die aktive Freisetzung von HMGB1 inhibiert. So führte dessen Einsatz bspw. bereits zur Inhibierung von Tumorwachstum [148] und reduzierte die Feinstaub-induzierte Entzündung der Atemwege [149]. Alle drei Möglichkeiten der HMGB1-Blockade führten zu

einer milderen Entzündungsantwort in der murinen Colitis sowie einer verringerten CRC-Belastung [150]–[154]. In vielen Fällen führte die HMGB1-Inhibierung zur Eindämmung bzw. Minderung eines Entzündungszustandes oder der Krebserkrankung, was dafür spricht, dass HMGB1 ein ideales therapeutisches Zielprotein für die Behandlung einiger Erkrankungen sein könnte [155]. Die genetische und somit sowohl intra- als auch extrazelluläre HMGB1-Defizienz hingegen resultiert in einigen Fällen in einer Verstärkung der Entzündungsreaktion und erhöhter Mortalität. Dieser sich abzeichnende Kontrast in der Wirkungsweise des Proteins könnte eine Art Polarität in dessen Funktionsweise indizieren.

1.6.4 Die Rolle von HMGB1 in der Tumorphagenese

Auch in verschiedenen Krebserkrankungen wurden erhöhte Proteinkonzentration im Serum von Patienten gemessen, wie z.B. beim bereits erwähnten Lungenkrebs [124]. Ferner setzen Tumorzellen nach einer Bestrahlungstherapie HMGB1 frei, was sowohl einen Entzündungszustand hervorrufen kann als auch die Zellproliferation antreibt und somit eine Problematik der Therapieform an sich darstellt [156]. Des Weiteren wird HMGB1 in vielen Tumoren überexprimiert. Dies wurde bspw. für das Zervixkarzinom [157] oder Hautkrebs [158] beschrieben. Außerdem fördert HMGB1 die Progression der Leukämie [159], induziert aber den Zelltod von Tumorzellen durch den metabolischen Einfluss auf die Atmungskette [160]. In einigen Fällen wird im veränderten Gewebe eine erhöhte Expression festgestellt, jedoch korrelierte diese Veränderung nicht mit der Bösartigkeit des Tumors oder mit einer schlechteren Prognose für den Patienten, wie im Beispiel des Glioms [161] und kann dementsprechend an dieser Stelle nicht als geeigneter Biomarker verwendet werden. Bei der Entstehung von Endometriumkarzinomen und eine damit einhergehende Metastasenbildung im Lymphgewebe konnte sogar eine negative Korrelation für HMGB1 gezeigt werden [162]. Auch im Falle eines Hirntumors ist nicht geklärt, ob HMGB1 eine Rolle als „Suppressor oder Promoter“ einnimmt [163]. So sind in vielen Publikationen beide Eigenschaften beschrieben. Gleichzeitig ist bisher kein eindeutiger Mechanismus der HMGB1-Funktionsweise in Krebserkrankungen bekannt [164].

In CRC Patienten ist HMGB1 im Tumorgewebe ebenfalls stärker exprimiert als in gesunden Kontrollen und wird verstärkt freigesetzt [165]. Ein Zusammenhang zwischen der HMGB1-Konzentration im Serum und einer schlechteren Prognose bzw. einer geringeren Überlebensrate konnte jedoch nicht festgestellt werden [123]. Dabei wurde nicht spezifiziert, ob der Krebserkrankung eine CED zugrunde lag. Gleichwohl könnte dies ein entscheidender Faktor sein, da HMGB1 in entzündlichen Erkrankungen nachweislich eine kritische Rolle spielen kann. Der Antikörper-basierte Ansatz zeigte bereits, dass die HMGB1-Inhibition CAC im *Apc^{Min}* Modell lindern kann [151]. Der Einsatz von Glycyrrhizin verminderte die Krebsbelastung durch die Inhibierung der Immunantwort im Mausmodell

[153]. Eine Reduktion der HMGB1-Freisetzung durch Ethylpyruvat inhibierte zumindest bereits das Tumorwachstum im diffusen B-Zell Lymphom [148]. Eine weitere Studie zeigte, dass die Lokalisation von HMGB1 innerhalb der Tumorzellen (zytoplasmatisch und nukleär) einen Einfluss auf die Prognose des CRC-Patienten hat und unterschiedlich mit den Tumorstadien zusammenhängt. So soll eine stärkere zytoplasmatische Expression von HMGB1 mit einer schlechteren und eine starke Expression im Nukleus dagegen mit einer besseren Prognose assoziiert sein [166]. Jedoch wird auch in dieser Studie nicht darauf hingewiesen, ob in den CRC-Patienten eine entzündliche Vorerkrankung im Darm vorgelegen hat oder nicht. Eine weitere aktuelle Studie wies kürzlich daraufhin, dass HMGB1 eine LPS-induzierte Entzündung in CRC vermittelt und ein HMGB1-Knockdown mittels siRNA bzw. HMGB1-Inhibitor diese Entzündung und somit eine Entzündungs-assoziierte Progression und schlechte Prognose reduziert [167]. Nichtsdestotrotz bleibt der Einfluss von HMGB1 in CAC weitestgehend unerschlossen und es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Funktion des Proteins in dieser Schnittstelle zu verstehen.

1.7 Zielsetzung und Umsetzung

Trotz der hohen Prävalenz und steigender Inzidenzen von CED sind die Therapiemöglichkeiten extrem begrenzt und es kommen hauptsächlich entzündungshemmende Therapeutika zur Symptomlinderung zum Einsatz. Eine CED steigert zudem das Risiko für eine Darmkrebserkrankung um ein Vielfaches. In den letzten Jahren konnte die Inzidenz für CRC durch frühzeitige Diagnosen und Endoskopien bereits gesenkt werden. Dennoch besteht nach wie vor ein hoher Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten. Das DAMP HMGB1 wurde in vielen Studien bereits sowohl mit Entzündungs- als auch Krebserkrankungen assoziiert und überwiegend als pro-inflammatorischer bzw. tumorfördernder Faktor beschrieben. Diese Assoziation besteht auch für CU und CRC, wobei der Kausalzusammenhang zwischen CU als Prädisposition und CAC sehr komplex ist und die Funktion des Proteins HMGB1 hierin noch nicht aufgeklärt wurde. Die vorliegende Arbeit untersucht die funktionale zelluläre Relevanz von HMGB1 im Kontext der Immunantwort auf die CU, spontan auftretendem CRC und CAC. Dazu werden folgende Hypothesen überprüft:

- Epitheliales HMGB1 ist funktional an der intestinalen Homöostase und Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere im Rahmen der Immunantwort auf eine Entzündung im Kolon beteiligt.
 - Auswirkung der konditionellen HMGB1-Deletion auf den Verlauf einer Entzündung im Kolon
 - Quantifizierung des Gewebeschadens, einiger Entzündungsmarker, sowie von Apoptose und Autophagie

- HMGB1 beeinflusst abhängig von seinem zellulären Ursprung die spontane Karzinogenese im Kolon.
 - Untersuchung der klinischen Parameter im *Apc^{Min}* Modell mit konditioneller HMGB1-Deletion in Epithelzellen und myeloiden Immunzellen
 - Auswirkung der HMGB1-Deletion auf die Gewebestruktur und Entzündungsparameter sowie molekulare Muster in Normal- und Tumorgewebe
- Der Verlauf einer CAC wird durch HMGB1 als immunregulatorischer Faktor, abhängig von seinem zellulären Ursprung, moduliert.
 - Auswirkung der konditionellen HMGB1-Deletion auf die Tumorentstehung sowie -progression

Zusammenfassend soll im Rahmen dieser Arbeit eine explorative Analyse der funktionellen Rollen von HMGB1 aus epithelialen und myeloiden Zellen bei akut-entzündlichen und chronisch-maladaptiven Prozessen im Darm durchgeführt werden. Anhand der darin generierten Ergebnisse soll außerdem eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Funktionsweise von HMGB1 im selben Kontext geschaffen werden.

2 Material und Methoden

Tabelle 1 | Geräte

Instrument	Hersteller
BD FACSAria™ II (<i>Cell Sorter</i>)	BD Biosciences, USA
BD LSRFortessa™ (<i>Cell Analyzer</i>)	BD Biosciences, USA
Biowizard Xtra Line Clean Bench	Kojair®, Finnland
CO ₂ Inkubator KM-CC17RU2	Panasonic Industrie Europa GmbH, Deutschland
Cooled Inkubator MIR-154-PE	Panasonic Industrie Europa GmbH, Deutschland
Fusion FX Imager	Vilber Lourmat, Frankreich
Improved Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Deutschland
Infinite® F50 Mikroplatten Reader	Tecan Trading AG, Schweiz
Mikroskop BZ-9000 (Biorevo)	Keyence, Japan
Mikroskop DM IL LED	Leica, Deutschland
Mikrotom HM 550	Thermo Scientific™, USA
Mikrowelle HMT882L	Bosch, Deutschland
Multipette® E3	Eppendorf AG, Deutschland
ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies, USA
peqSTAR Thermocycler 732-3242	Peqlab, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRAD Laboratories, USA
Research plus Pipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Semi-dry Blotter	Peqlab, Deutschland
ThermoMixer Comfort	Eppendorf AG, Deutschland
Vii™ 7 System	Applied Biosystems™, USA
Zellsieb „EASYstrainer“ 40 µm und 70 µm (542040 und 542000)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge MC 6	Sarstedt, Deutschland

Tabelle 2 | Reagenzien, Chemikalien

Reagenz/Chemikalie (Artikelnummer)	Hersteller
1,4-Dithioerythritol (DTE, D8255)	SIGMA
10x MM (B71)	Thermo Scientific™, USA
Acrylamid (T802.1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Agarose (84004)	Biozym Scientific GmbH
Ammonium Persulfat (APS)	PanReac AppliChem

Aprotinin	SIGMA
Azoxymethan (A5486)	SIGMA
Benzamidine	SIGMA
Cd4 microbeads, mouse (130-117-043)	Mitenyi Biotech GmbH
Collagenase Typ I (C0130) ≥ 125 CDU/mg	SIGMA
Dako Antibody Diluent (S0809)	Dako North America, Inc., USA
Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (K4003)	Dako North America, Inc., USA
Dako Fluorescent Mounting Medium (S3023)	Dako North America, Inc., USA
Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (K3468)	Dako North America, Inc., USA
Dextran-Natriumsulfat (DSS) M.W.=36.000-50.000 Da	MP biomedical
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (4984.1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
DNA-Polymerase (EP072)	Thermo Scientific™, USA
DNase I recombinant (A3778,0050) 5278 U/mg	PanReac AppliChem
dNTPs (R72501)	Invitrogen, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Calcium und Magnesium (D8537-500ML)	SIGMA
EDTA – Solution pH 8.0 (A3145,1000)	PanReac AppliChem
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	SIGMA
Entellan® new (1.07961.0100)	Merck GKaA, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Ethanol vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
<i>Fetal Calf Serum (FCS), heat inactivated</i>	Gibco™, USA
Formaldehyde solution (F8775-25ML)	SIGMA
Glycerol (G7757-1L)	SIGMA
Goat Serum (Normal) (X0907)	Dako Denmark A/S, Dänemark
HBSS (10X) (14065-056)	Gibco™, USA
Hemalum solution acid cc. To Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
HEPES (H4034-500G)	SIGMA
Hoechst (33258)	Invitrogen™, USA
Kaliumchlorid (6781.1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Kaliumchlorid (6781.3)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (1.04873.1000)	Merck GKaA, Deutschland
LB-Agar (X969.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
LB-Medium (L3522)	SIGMA

MATERIAL UND METHODEN

Leupeptin (L2884)	SIGMA
LS Columns (130-042-401)	Mitenyi Biotech GmbH
Methanol (1437.2511)	ChemSolute® (Th. Geyer)
Midori Green (MG08)	Nippon Genetics Europe GmbH
Nalidixinsäure (N8878) angesetzt: 20 mg/ml stock in 0,1 M NaOH	SIGMA
Natriumbicarbonat (S5761-500G)	SIGMA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumorthovanadat (S6508-10g)	SIGMA
PageRule™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 bis 250 kDa	Thermo Scientific™, USA
Percoll	GE Healthcare Life Sciences, UK
PMSF (P-7626)	SIGMA
Protein Block Serum-Free Ready-to-Use (C0909)	Dako North America, Inc., USA
Proteinase K, recombinant (03115828001)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
RPMI medium 1640 (1x) + GlutaMAX™	Gibco™, USA
Sodium dodecyl sulfate (SDS), ultra pure (2326.2)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Skimmed Milchpulver	Spinnrad GmbH, Germany
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	BioRAD Laboratories, USA
TaqMan™ Fast Advanced PCR Master Mix	Applied Biosystems™, USA
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems™, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	SIGMA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (1.06448.1000)	Merck GKaA, Deutschland
Triton™ X-100 (T8787-100ML)	SIGMA
Trizma® base (T1503-1KG) (Tris base)	SIGMA
Trizma® hydrochloride (T5941-500G) (Tris HCl)	SIGMA
Trypan Blue solution 0.4% for microscopy	SIGMA
Tween® 20 (A4974,0250)	PanReac AppliChem
UltraComp eBeads™ Compensation Beads	Invitrogen™, USA
UltraPure™ Distilled Water (10977-035)	Invitrogen™, USA
Wasserstoffperoxid (1.07209.1000)	Merck GKaA, Deutschland
Xylol z.A.	ChemSolute® (Th. Geyer), Germany

2.1 Selbst angesetzte Puffer und Lösungen

10x PBS Puffer

160 g Natriumchlorid (NaCl)

4 g Kaliumchlorid (KCl)

28,8 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

4,8 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Lösen in 1600 ml voll entsalztem (VE)-H₂O und pH 7,4 einstellen

Auf 2 l mit VE-H₂O auffüllen und autoklavieren

10x TBS Puffer für die Gelelektrophorese

60,5 g Tris

87,6 g Natriumchlorid (NaCl)

Lösen in 800 ml VE-H₂O und pH 7,4 einstellen

Auf 1 l mit VE-H₂O auffüllen und autoklavieren

Citrat Puffer für Immunhistochemie

2,94 g tri-Natriumcitrat Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)

Lösen in VE-H₂O und pH 6,0 einstellen

Auf 1 l mit VE-H₂O auffüllen

0,5 ml 10 % Tween® 20 hinzufügen

Proteinase K Puffer

1,12 g Tris base

0,186 g EDTA

1,169 g Natriumchlorid (NaCl)

2 ml 10 % SDS Lösung

Lösen in 100 ml VE-H₂O und pH 8,0 einstellen

RNase Puffer für die Biopsien

0,363 g Tris base

0,0876 g EDTA

Lösen in 300 ml VE-H₂O und pH 8,0 einstellen

60 µl RNase (100mg/ml) hinzufügen

Bei 4 °C lagern

DTE Lösung für die Zellisolation

50 ml 10x HBSS

50 ml 10x HEPES-Bicarbonat Puffer

50 ml FCS (10%)

350 ml destilliertes H₂O

15,4 mg DTE/100ml (1mM final)

Collagenase-Verdau Lösung für die Zellisolation

500 ml RPMI medium 1640 (1x) + GlutaMAX™

55 ml FCS (10%)

5,5 ml 100x HGPG

1 ml 0,5 M CaCl₂ (1mM final)

1 ml 0,5 M MgCl₂ (1mM final)

100 U/ml Collagenase, 60µl pro 6 ml

DNase (~5000 U/ml)

PerColl Lösungen für den Gradienten der Zellisolation

90 % (V/V) PerColl-Stock (100 ml): 90 ml PerColl + 10 ml 10x PBS

67 % (V/V) PerColl (100 ml): 67 ml PerColl-Stock + 33 ml 1x DPBS

40 % (V/V) PerColl (100 ml): 40 ml PerColl-Stock + 60 ml 1x DPBS

HEPES-Bicarbonat Puffer (10x)

23,8 g HEPES (100 mM final)

21 g Natrium Bicarbonat (250 mM final)

Mit destilliertes H₂O auf 1 l auffüllen

pH auf 7,2 mit HCl justieren

Für ≤ 1 Monat bei RT lagerbar

RIPA Lyse-Puffer für die Proteinisolation

150 mM NaCl (aus 5 M NaCl Lösung)

5 mM EDTA (aus 0,5 M EDTA, pH 8,0 Lösung)

50 mM Tris HCl (aus 1 M Tris, pH 8,0 Lösung)

1,0 % Triton-X 100

0,5 % Natrium Deoxycholat (aus 10 % Lösung)

0,1 % SDS (aus 10 % SDS Lösung)

pH auf 7,4 mit HCl justieren

Bei 4 °C zu lagern

Tabelle 3 | Kits

Kit	Hersteller
Pierce™ BCA Protein Assay kit (23227)	Thermo Scientific™, USA
BD Cytofix/Cytoperm™ Plus (555028)	BD Biosciences
Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814)	Thermo Scientific™, USA
IBL International HMGB1 ELISA	Tecan, Deutschland / Schweiz

In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red von Roche (12156792910)	Merck GKaA, Deutschland
NucleoSpin [®] RNA (740955.250)	Macherey Nagel GmbH und Co. KG, Deutschland
Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrate	Pierce, USA

Tabelle 4 | Software

Software	Entwickler
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, USA
Evolution Capt	Vilber Lourmat, Frankreich
FlowJo Software	Tree Star, Inc., USA
GraphPad Prism 8	GraphPad, USA
ImageJ Fiji	Wayne Rasband (NIH), USA
Magellan	Tecan Trading AG, Schweiz
Microsoft Office 2016 und 2019	Microsoft Corporation, USA
QuantityOne Software	BioRAD Laboratories, USA
ViiA 7 System	Applied Biosystems, USA
Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, George Mason University

2.2 *In vivo* Versuche

Die Tierversuche, die während dieser Arbeit durchgeführt worden sind, wurden von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt. Die Tierversuchsanträge ORG_784, G042/15 und G124/17 waren hierfür die Grundlage. Die Versuchstiere wurden in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gezüchtet und gehalten. Dabei hatten sie nach Belieben Zugang zu Wasser und Futter und waren auf einen 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus eingestellt. Die Versuchstiere wurden mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn aus der Zucht-tierhaltung in die Barrieren für die experimentelle Durchführung transferiert, um ihnen eine Eingewöhnungszeit zu gewähren und ein erhöhtes Stressniveau zu Versuchsbeginn zu vermeiden. Die Versuche wurden ab einem Mindestalter von 8 Wochen gestartet. Die Versuchsmodelle sind ab Abschnitt 2.2.3 detailliert beschrieben. In den Käfigen wurden vor und während des Versuchs stets Versuchstiere mit unterschiedlichen Genotypen gehalten, um einen möglichen Einfluss unterschiedlicher Mikrobiome zu unterbinden.

2.2.1 Mauslinien

Alle verwendeten Mauslinien haben einen C57BL/6J Hintergrund und kommen ursprünglich aus *The Jackson Laboratory*. Die *Hmgb1*-gefloxte Maus (*Hmgb1^{flf}* = Wt Kontrolle) wurde von Robert F. Schwabe von der Columbia University, New York, USA zur Verfügung gestellt. Für die HMGB1-Deletion sind *loxP* Sequenzen zwischen Exon 1 und 2 bzw. 4 und 5 des HMGB1-kodierenden Gens auf Chromosom 5, 89.18 cM gezielt inseriert [168]. Ein sogenannter konditioneller *Knockout* (KO) entsteht durch die Verpaarung von *Hmgb1^{flf}* Mäusen mit heterozygoten Cre-Rekombinase-positiven Mäusen (*Hmgb1^{cre/+}*) in den jeweiligen Promoter-spezifischen Zellen. Exons 2 bis 4 werden ausgeschnitten, wodurch die Expression des Gens (156/215 Aminosäuren) nicht mehr erfolgt (Abbildung 5 A). In dieser Arbeit wurden *Hmgb1^{flf}* Mäuse mit Villin *cre/+* (Insertionsstellen unbekannt, 16 Kopien im Chromosom 17) oder LysM *cre/+* (Gen-Insertion in Chromosom 10, 65.34 cM) Mäusen verpaart, um HMGB1 gezielt in intraepithelialen Zellen des Intestinaltrakts (*Hmgb1^{ΔIEC}* [169]) beziehungsweise Immunzellen der myeloiden Blutzelllinie (*Hmgb1^{ΔLysM}* [170]) zu entfernen. Zu den Leukozyten der myeloiden Linie gehören Monozyten, Dendritische Zellen, Mastzellen und Granulozyten. T- und B-Lymphozyten sind dementsprechend vom Δ LysM-KO ausgeschlossen [170]. HMGB1 war in *Hmgb1^{ΔIEC}* und *Hmgb1^{ΔLysM}* Mäusen auf Transkriptionsebene im Kolongewebe um 91,34 % ($p=0,0002$, $n=8$) bzw. isolierten *bone marrow derived macrophages* (BMDMs) um 81,55 % ($p=0,0286$, $n=4$) verglichen zu *Hmgb1^{flf}* ($n_{\text{Colon}}=8$; $n_{\text{BMDMs}}=4$) Mäusen signifikant herunterreguliert (Abbildung 5 B). Die Proteinmenge von HMGB1 in den BMDMs war ebenfalls stark reduziert (Abbildung 5 C). Die effektive Deletion in Epithelzellen konnte mithilfe der HMGB1-spezifischen immunhistochemischen Färbung gezeigt werden (Abbildung 5 D).

Die *Rag1^{-/-}* Maus wurde von der AG S. Huber (UKE) zur Verfügung gestellt. In RAG-1-defizienten Mäusen ist die B- und T-Zell Differenzierung beeinträchtigt, wodurch es zum Aussetzen der V(D)J Rekombination kommt und somit keine adaptive Immunantwort ($\text{Cd}3^+$, $\text{Cd}4^+$, $\text{Cd}8^+$ Zellen nicht vorhanden) ausgebildet wird [171]. Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind von dieser Deletion nicht betroffen. Die *Apc^{Min}* Maus wurde über *The Jackson Laboratories* bestellt. Die Abkürzung „Min“ ist auf *multiple intestinal neoplasia* zurückzuführen und basiert auf einer chemisch induzierten (ENU) Punktmutation im APC Gen auf Chromosom 18. Die *Apc^{Min}* Maus wurde um 1990 entwickelt und wird seither aufgrund ihrer Genetik für Tumorstudien eingesetzt [172], [173]. Der Einsatz der speziellen Mauslinien in den verschiedenen Modellen wird ab Kapitel 2.2.2 detaillierter erläutert.

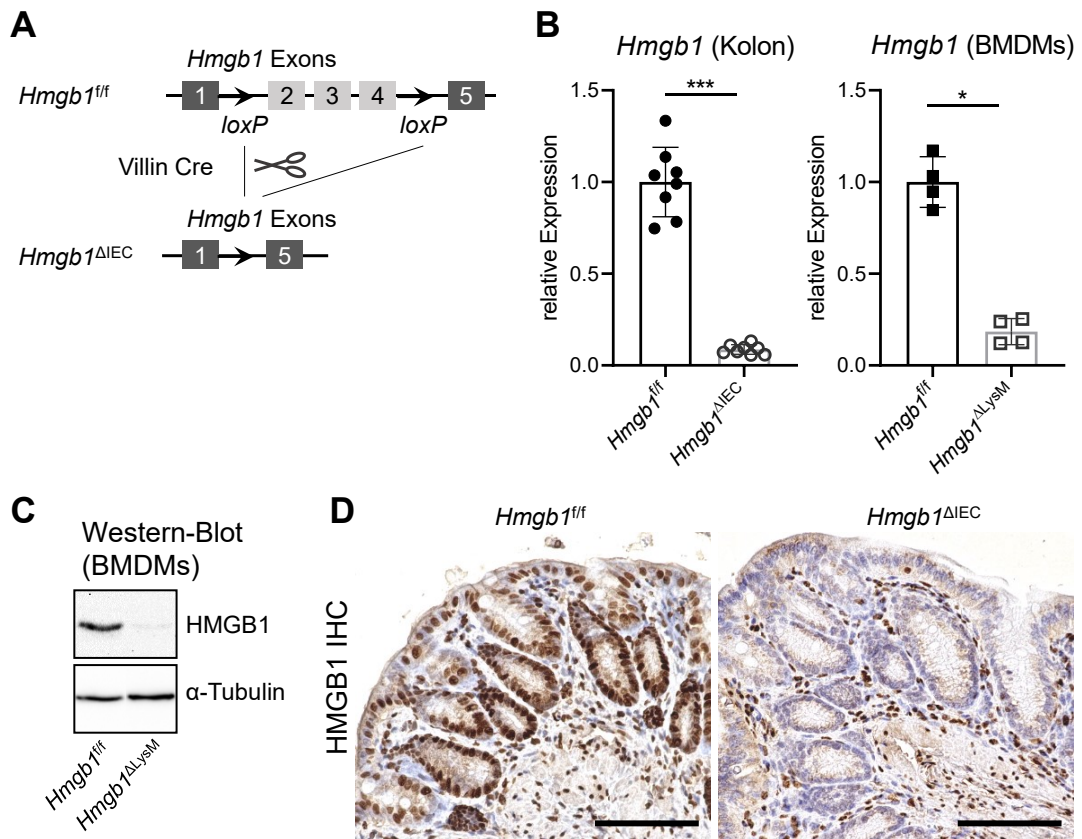


Abbildung 5 | Cre-Lox Strategie und effektive Deletion.

A) Exons 2 bis 4 von *Hmgb1* sind mit *LoxP* Sequenzen homozygot flankiert (*Hmgb1*^{fl/fl}), sodass die jeweils inserierte Cre-Rekombinase (Bsp.: Villin Cre) diese flankierten Exons ausschneidet. Die Knockout Maus (*Hmgb1*^{ΔIEC}) exprimiert fortan kein funktionales HMGB1 mehr in den Epithelzellen. B) relative Expression von *Hmgb1* in Kolongewebe bzw. isolierten *bone marrow derived macrophages* (BMDMs) in *Hmgb1*^{ΔIEC} bzw. *Hmgb1*^{ΔLysM} im Vergleich zu *Hmgb1*^{fl/fl}. C) Nachweis von HMGB1 auf Proteinebene in C) BMDMs mittels Western-Blot und D) im Kolongewebe mittels HMGB1-spezifischer immunhistochemischer Färbung.

Tabelle 5 | Mausstämme

Name	Jax-ID / MGI-Nummer	Offizieller Name der Linie
<i>Hmgb1</i> ^{fl/fl}	031274 / 5629589	B6.129S- <i>Hmgb1</i> ^{tm1.1Rshw/J}
<i>Villin-cre</i>	004586 / 2448639	B6N.Cg-Tg(Vil1-cre)997Gum
<i>LysMcre</i>	004781 / 1934631	B6.129P2- <i>Lyz2</i> ^{tm1(cre)lfo}
<i>Rag1</i> ^{-/-}	002216 / 1857241	B6.129S7- <i>Rag1</i> ^{tm1Mom/J}
<i>Apc</i> ^{Min}	002020 / 88039	C57BL/6J- <i>Apc</i> ^{Min/J}

2.2.2 DSS-Colitis

Die Gabe des Salzes Dextran-Natriumsulfat über das Trinkwasser induziert in Mäusen eine akute Colitis. In den hier vorgelegten Versuchen wurde dabei eine Konzentration von 1,5 – 2,0 % (m/V) eingesetzt. Neben der täglichen Gewichtskontrolle im Versuchsverlauf wurden die Tiere (wenn nicht anders angegeben) an den Tagen 0 (Gesundkontrolle), 4 und 8 endoskopisch untersucht und somit der Schweregrad der Colitis bewertet.

Außerdem wurde über den gesamten Versuch das Gewicht der Tiere aufgezeichnet. Nach 7 Tagen DSS-Gabe wurde wieder auf reines Wasser umgestellt (Abbildung 6), was auf längere Sicht zur Regeneration führt. Das DSS-Modell ist ein gut etabliertes und einfaches Modell, um die Colitis an Mäusen zu studieren [174]–[176].

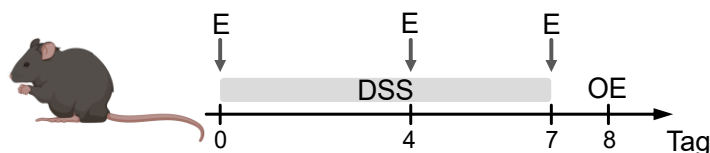


Abbildung 6 | Versuchsschema der murinen DSS-Colitis.

Über das Trinkwasser wurde den *Hmgb1*-KO und -gefloxten Mäusen 1,5–2,0 % (m/V) Dextran-Natriumsulfat (DSS) verabreicht. Die Kontrolltiere hatten im selben Zeitraum normales Trinkwasser zur freien Verfügung. Das DSS-versetzte Wasser wird nach 7 Tagen wieder auf normales Trinkwasser umgestellt. An Tag 8 wurden die Mäuse sakrifiziert und die Organe entnommen (OE), es sei denn, es wird im Ergebnisteil anders angegeben. Die Versuchstiere wurden mittels Endoskopie (E) und täglicher Gewichtsaufzeichnung überwacht.

2.2.3 *Citrobacter rodentium* Infektion

Für die Anzucht von *Citrobacter rodentium* (ICC180, Nalidixinsäure- und Kanamycin-Resistenz, [177]) wurde eine 5 ml LB Medium Kultur inokuliert. Diese Vorkultur wurde über Nacht (16 Stunden) bei 37 °C geschüttelt inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen 100 ml LB Medium mit 250 µl Nalidixinsäure Stock (20 mg/ml in 0,1 M NaOH) mit je 200 µl der Vorkultur inokuliert und für 2 bis 3 Stunden bei 37 °C geschüttelt inkubiert, um die log Phase der Bakterien abzapfen zu können. Dieser Ansatz wurde für 10 min. bei 3000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde 2-mal in PBS gewaschen und zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in DPBS resuspendiert und die OD₆₀₀ gemessen ($1,0 \pm 10^9$ CFU, Blank: DPBS). Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und mehrfach gemessen, um eine genauere Konzentration bestimmen zu können. Der Ansatz wurde daraufhin auf die gewünschte Inokulationsdosis verdünnt. Im Experiment wurden die Versuchstiere mit einer Infektionsdosis von $1-2 \cdot 10^9$ CFU in 200 µl oral gavagiert. Nach der Infektion der Tiere wurde aus dem verbleibenden Bakterienansatz eine Verdünnungsreihe auf MacConkey Agar ausplattiert, um nochmals die Infektionsdosis bestätigen zu können. Zur Infektionskontrolle wurden entsprechende Kontrollmäuse mit DPBS (in dem die Bakterien verdünnt wurden) oral gavagiert. Der Infektionsversuch wurde nach 7 Tagen beendet (Abbildung 7). Das Gewicht wurde über den gesamten Zeitraum aufgezeichnet. Für die Bestimmung des Titers der infizierten Tiere wurde ein Stuhlpellet gewogen und in 5 ml PBS homogenisiert. Das Homogenat wurde daraufhin seriell in DPBS verdünnt, auf LB Agar mit Nalidixinsäure ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Feststellung der *C. rodentium* Kultur wurden Einzelkolonien der Ausstriche gepickt und mittels PCR auf das *espB* Gen getestet. Das murine Infektionsmodell mit *C. rodentium* vermittelt in

Abhängigkeit von der Infektionsdosis, der Genetik sowie der mikrobiellen Variation im Darm der Versuchstiere eine unterschiedlich starke Colitis. Diese weist große Ähnlichkeiten mit enteropathogenen und enterohämorrhagischen *E. coli*-Infektionen auf. Daher dient die *C. rodentium* Infektion als geeignetes Modell zur Untersuchung einer bakteriell-vermittelten Immunantwort im Darm [178], [179].

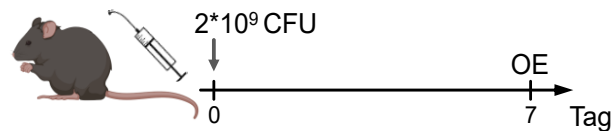


Abbildung 7 | Versuchsschema zur *Citrobacter rodentium* Infektion.

Den Versuchstieren wurden von $1-2 \cdot 10^9$ CFU *Citrobacter rodentium* in 200 μ l oral verabreicht. Als Infektionskontrolle diente die orale Gavage mit 200 μ l DPBS. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse sakrifiziert und die Organe entnommen (OE).

2.2.4 Cd45RB^{high}-vermittelte Colitis

Um die Cd45RB^{high}-vermittelte Colitis zu induzieren, wurden Lymphozyten aus Lymphknoten und der Milz von 8 bis 12 Wochen alten weiblichen Wildtyp (WT) Mäusen isoliert. Dafür wurden die Tiere mit einer Mischung aus 80 % CO₂ und 20 % O₂ narkotisiert und anschließend mit 100 % CO₂ und zervikaler Dislokation getötet. Die Organe wurden unmittelbar nach der Entnahme in RPMI medium 1640 (1x) + GlutaMAX™ auf Eis gesammelt. Für die Isolation wurden die Organe durch ein 100 μ m Zellsieb gerieben bzw. homogenisiert, mit FACS Puffer (DPBS/2,5%FCS) versetzt und bei 4 °C und 350x g für 10 min. zentrifugiert. Mithilfe von 100 μ l/ml *magnetic-activated cell sorting* (MACS) *beads* und 300 μ l MACS Puffer (2 mM EDTA, 1 % FCS in PBS) pro Donor wurden nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec GmbH) die Cd4⁺ Zellen isoliert und angereichert. Diese wurden mit FACS Antikörpern (siehe Tabelle 7) gefärbt (20 min. bei 4 °C), 10 min. bei 4 °C und 350x g zentrifugiert und in FACS Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die isolierten, gefärbten Zellen nochmals durch ein 40 μ m Zellsieb gefiltert und am BD FACSAria™ II (*Cell Sorter*) in der UKE *Cytometry and Cell Sorting Core Unit* sortiert, sodass nur Cd4⁺Cd25⁻Cd45RB^{high} Zellen gesammelt wurden. Die Zellen wurden gezählt und so konzentriert, dass den Rag-defizienten Empfängermäusen (*Rag*^{-/-}) $2 \cdot 10^5$ Zellen in einem angemessenen Volumen intraperitoneal (*i.p.*) injiziert werden konnten. In der gesunden Kontrollgruppe wurde Wurfgeschwistern zum Vergleich PBS (Vehikel) injiziert. Die sich entwickelnde Colitis wurde anhand von Gewichtsverlust, Endoskopie und Histologie nach Entnahme bewertet (Abbildung 8). Die Cd45RB^{high}-vermittelte Colitis wurde 1994 von Powrie et al. erstmals etabliert und wurde seither zu einem hilfreichen Modell zur Untersuchung von CEDs weiterentwickelt [180]–[182]. Bei einem Ungleichgewicht von Effektor T-Zellen zu regulatorischen Immunzellen oder einem vorliegenden Defekt der regulierenden

Mechanismen, kann sich eine chronische T-Zell-vermittelte Entzündung entwickeln. Durch einen Überfluss von Effektor T-Zellen sowie die ausschließlich pro-inflammatorischen Eigenschaften dieser transferierten Zellen entsteht ein entzündliches Milieu im Darm, wodurch das Gewebe auf chronische Weise zu Schaden kommt [53], [183]. Durch die Abwesenheit von anderen T- und B-Zellen kann der Fokus auf die Immunzellen der angeborenen Immunantwort innerhalb der chronischen Colitis gelegt werden.

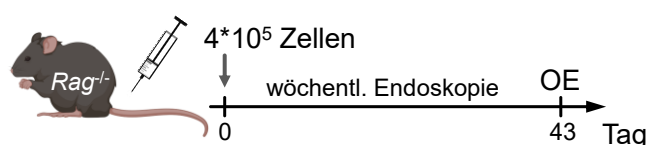


Abbildung 8 | Versuchsschema der Cd45RB^{high} Colitis.

I.p. Injektion von 4×10^5 Cd45RB^{high} Zellen aus WT Donormäusen in *Rag*^{-/-} Rezipienten, die zusätzlich eine zellspezifische *Hmgb1* Deletion oder lediglich die *Hmgb1*-flankierenden *loxP* Stellen trugen. Mittels wöchentlicher Endoskopien wurde das Voranschreiten der Colitis überwacht und bewertet. Gleichzeitig wurde das Gewicht der Mäuse dokumentiert.

2.2.5 *Apc*^{Min} – spontane Karzinogenese

Die *Apc*^{Min} Maus entwickelt aufgrund ihrer Punktmutation im Gen des Tumorsuppressors APC ein Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP)-ähnliches Syndrom. FAP ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit des Menschen in dessen Pathogenese sich vor allem im Dünndarm Adenome bilden (*multiple intestinal neoplasia*, Min), aber im weiteren Verlauf auch kolorektale Karzinome (CRCs). APC ist ein entscheidendes Schlüsselprotein im WNT/ β -Catenin Signalweg. Neben diesem Signalweg, der durch die Mutation von APC beeinflusst wird, können aber auch andere Faktoren eine Rolle in diesem Krebsmodell spielen [184], [185]. Aus diesen Gründen gilt das *Apc*^{Min} Modell im Vergleich zu anderen murinen Karzinogenese-Modellen als physiologischer. Die Mäuse wurden in einem Alter von etwa 12 bis 13 Wochen sakrifiziert (Abbildung 9). Der Endzeitpunkt wurde anhand des Phänotyps der epithelial *Hmgb1*-deletierten Mäuse festgelegt. Die *Apc*^{Min} Maus wird heterozygot (deswegen auch *Apc*^{+/^{min}) gezüchtet, da die homozygoten Nachkommen nicht lebensfähig sind. Die *Apc*^{Min} Mäuse werden in dieser Arbeit wahlweise mit *Apc*^{Wt} (entspricht *Apc*^{+/+}) Mäusen als Kontrollgruppe verglichen.}

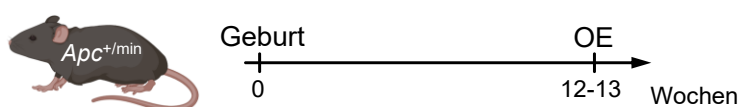


Abbildung 9 | Versuchsschema zum *Apc*^{Min} Mausmodell.

Die *Apc*^{Min} (= *Apc*^{+/^{min}) Mäuse wurden mit den verschiedenen *Hmgb1*-deletierten Mäusen gekreuzt. Für die Untersuchung der Tumorentwicklung wurden die Mäuse regelmäßig auf ihren Gesundheitszustand untersucht und in einem Alter von 12-13 Wochen sakrifiziert. Dieser Zeitpunkt wurde durch den Phänotyp der *Hmgb1* ^{Δ IEC} Mäuse vorgegeben.}

2.2.6 AOM/DSS – Colitis-assoziierte Karzinogenese

Um die Colitis-assoziierte Karzinogenese (CAC) in den konditionellen KO-Mäusen zu untersuchen, wurde ein chronischer Entzündungszustand im Kolon hervorgerufen. Dieser wurde induziert, indem die Versuchstiere drei Behandlungszyklen von je 5 Tagen DSS plus 16 Tage Wasser durchlaufen haben, sodass sich eine Zykluslänge von 21 Tagen ergab. Initial wurde allen Mäusen 5 Tage vor der ersten DSS Gabe 10 mg Azoxymethan (AOM) pro kg Körpergewicht (KGW) *i.p.* injiziert. Zur Überwachung der Tumorentwicklung und -belastung wurden die Mäuse stets an Tag 21 eines Zyklus endoskopiert und bewertet. Außerdem wurde das Gewicht der Tiere über den gesamten Versuchsverlauf aufgezeichnet (Abbildung 10). Dieses Modell gilt als geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der CAC, wie sie bspw. auch in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Menschen beschrieben werden [186]–[189].

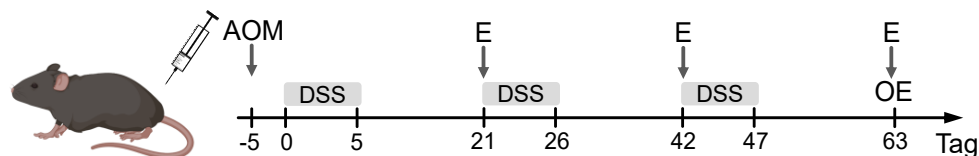


Abbildung 10 | Versuchsschema zum AOM/DSS Mausmodell.

i.p. Injektion von 10 mg/kg KGW AOM in die konditionellen *Hmgb1* KO-Mäuse und die geflochten Kontrollmäuse. 5 Tage nach der AOM-Injektion folgte die erste DSS-Gabe über das Trinkwasser für 5 Tage und damit der erste DSS-Zyklus von insgesamt 21 Tagen. Endoskopien (E) wurden jeweils am Ende eines jeden Zyklus vorgenommen. Insgesamt wurden 3 DSS-Zyklen dieser Art umgesetzt. Das Gewicht der Versuchstiere wurde über den gesamten Zeitraum dokumentiert.

2.3 Maus-Kolonoskopie

Zur Überwachung und Beurteilung der Krankheitszustände während der DSS-Behandlungen und der Karzinogenese, wurden die Versuchstiere von Penelope Pelczar der AG Huber am UKE endoskopiert. Dazu wurden die Mäuse mittels Isofluran narkotisiert (Inhalationsnarkose) und „blind“ bewertet. Die Methode ist 2005 und 2006 von Becker et al. publiziert [190], [191] und bietet eine Prozess-Standardisierung für eine zuverlässige *in life*-Bewertung der mukosalen Schädigung, wodurch die Maus-Kolonoskopie als valide Analyse in die Bewertung der Versuche einfließen kann. Der Endoskopische Index beinhaltet fünf verschiedene Parameter: Transparenz, Vaskularität, Fibrin, Granularität und Stuhlkonsistenz. Für jeden dieser Parameter können 0 bis 3 Punkte und somit additiv insgesamt 15 Punkte vergeben werden. Je höher der Endoskopische Index, desto schwerer ist somit der Colitis bewertet. Die Bewertung der Tumore richtet sich nach deren Größe und Differenzierung. Die Tumore werden mit 1 bis 5 Punkten bewertet. Die Punkte addieren sich mit der Anzahl der Tumore auf, wodurch der gesamte Tumor Score über 5 Punkten liegen

kann. Neben dem Endoskopischen Index (Colitis) und dem Tumor Score bietet die Maus-Kolonoskopie die Möglichkeit hochauflösende repräsentative Bilder zu generieren.

2.4 Organentnahme

Für die genaue Analyse des Kolons, wurden die Mäuse mit einem CO₂ und O₂-Gemisch betäubt und mit CO₂ eingeschläfert. Kurz darauf wurde über der *Vena cava* (große Hohlvene) final Blut entnommen, aus welchem durch Zentrifugation über 10 min. bei 2000x g Serum gewonnen wurde. Dieses Serum wurde für die ELISA Analyse verwendet. Nach der Blutentnahme wurde das Kolon freigelegt und von unterhalb des Zäkums bis zum Anus vermessen. Nachdem der gesamte Stuhl gesammelt und als Probe in Stickstoff eingefroren wurde, wurde der Darm mit DPBS gespült und daraufhin für die verschiedenen Analysen eingeteilt (siehe Abbildung 11). Für die Anfertigung der Gewebeschnitte wurde das distale Ende (~1 cm) des Kolons verwendet (Kapitel 2.7.1). Die 1 - 1,5 cm oberhalb davon wurden für die RNA- und Protein-Isolationen eingesetzt. Dafür wurden sie unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C kurzfristig oder -80 °C langfristig gelagert. Der restliche proximale Abschnitt des Kolons wurde für die Zellisolation und anschließende FACS Analyse benötigt. Dafür wurde er längs aufgetrennt und nochmals in DPBS gespült. Bis zur weiteren Verarbeitung (Kapitel 2.5) wurde das Gewebe in RPMI medium 1640 (1x) + GlutaMAX™ auf Eis gelagert. Für die Histologie einiger *Apc^{Min}* Mäuse wurde das Kolon in voller Länge als sogenannte *swiss roll* fixiert. Die luminale Darmseite zeigt beim Aufrollen des Kolons nach außen. Das Kolon wird von proximal nach distal aufgerollt, der proximale Teil befindet sich also im Inneren der *swiss roll*, der distale Teil außen.

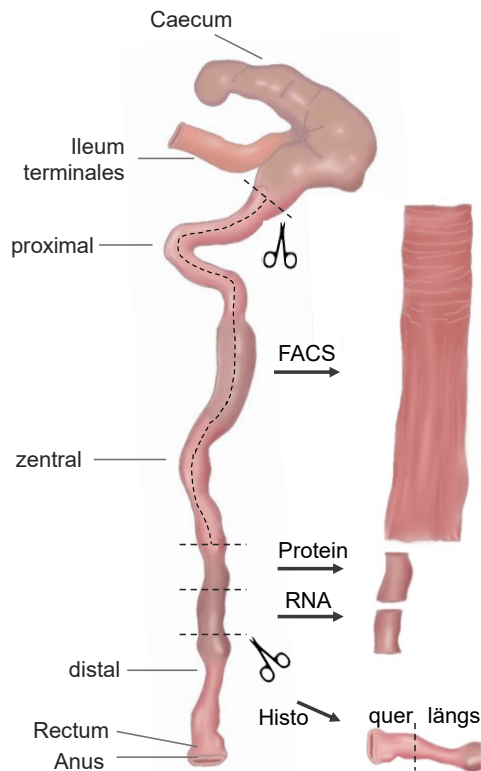


Abbildung 11 | Einteilung des Kolons während der Organentnahme.

Das Kolon wurde kurz unterhalb des Zäkums abgetrennt und in weitere Stücke für die FACS-, Protein-, RNA- und histologische Analysen unterteilt. Der FACS-Teil wurde vor der Weiterverarbeitung longitudinal aufgetrennt, da die Immunzellisolierung dadurch effizienter ist. Vor der Verarbeitung der einzelnen Kolonstücke wurde der gesamte Stuhl entfernt und als Probe gesammelt.

Angepasst von Treuting und Dintzis, 2012 [195]

2.5 Tumor Score

Nach der Organentnahme wurden die Tumore unter einem Makroskop ausgezählt und nach ihrer Größe bewertet. Durch die additive Bewertung für kleine (1 mm) \cong 1, mittlere (2-3 mm) \cong 3 und große Tumore (3-5 mm) \cong 5, ergibt sich der (makroskopische) Tumor Score, die die Tumorbelastung der Maus beschreibt.

2.6 Isolation der Immunzellen aus dem Kolon

Ein für die FACS-Analyse entnommenes Darmstück wurde in etwa 0,5 cm lange Stücke zerkleinert und in 10 ml der frisch angesetzten DTE-Lösung gegeben. Das DTE wurde erst kurz vor der Isolation in die vorgekühlte DTE-Lösung gegeben und gelöst (siehe Tabelle 2 und Abschnitt 2.1). Darauf folgte eine 20 min. lange Inkubation bei 37 °C auf dem Schüttler (15 ml Falcon, liegend). Im nächsten Schritt wurde die Flüssigkeit mit Gewebestücken in eine Petrischale entleert, das Gewebe in den Petrischalendeckel überführt und dort mit einer Sezierschere weiter zerkleinert. Die restliche DTE-Lösung wurde in ein 50 ml Falcon gegeben und mit PBS/1%FCS aufgefüllt, bei 400x g für 5 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die ersten Zellen, die sich hier bereits im Pellet befunden haben, wurden in circa 10 ml PBS/1%FCS resuspendiert und auf Eis gelagert. Gleichzeitig wurde das zerkleinerte Gewebe in 6 ml frisch angesetzter Collagenase-Lösung (60 μ l Collagenase (100 mg/ml) und 12 μ l DNase (5000 U/ml)) bei 37 °C für 45 min geschüttelt inkubiert

(15 ml Falcon, liegend). Nach dem Collagenase-Verdau wurde die gesamte Lösung mit Gewebe durch ein 100 µm Zellsieb mit den zuvor bereits gewaschenen Zellen vereint und mit PBS/1%FCS gespült. Das Gewebe bzw. die gelösten Zellen wurden im Zellsieb zusätzlich mit dem Stempel einer 1 ml Spritze leicht durch das Zellsieb gerieben und weiter zwischendurch gespült. Anschließend wurde die Suspension auf 50 ml mit PBS/1%FCS aufgefüllt, bei 400x g für 10 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde im nächsten Schritt direkt mit 4 ml der 40 % PerColl-Lösung resuspendiert und vorsichtig auf 4 ml der 67 % PerColl Lösung (in 15 ml Falcon vorgelegt) geschichtet (siehe Tabelle 2 und Abschnitt 2.1). Der PerColl-Gradient wurde für 20 min. bei RT und 400x g, Beschleunigung 1 und Bremse 1 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase des Gradienten mit den darin befindlichen Immunzellen mithilfe einer 1 ml Pipette abgenommen und in ein weiteres 50 ml Falcon überführt. Die Zellsuspension wurde mit etwa 30 ml PBS/1%FCS aufgefüllt und nochmals bei 400x g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 500 µl FACS-Puffer (DPBS/2,5%FCS) resuspendiert.

2.6.1 FACS - Durchflusszytometrie Färbung

Für die Färbung der isolierten Immunzellen wurde die Zellsuspension im FACS Röhrchen für 3 min. bei 475x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun mit 1 µl fixierbarem Totzellen-Farbstoff (Zombie Aqua™ von BioLegend, Cat# 423101) in 100 µl DPBS resuspendiert und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nun wurden 200 µl FACS Puffer hinzugefügt und für 3 min. bei 475x g zentrifugiert (gewaschen). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 50 µl Fc Block Lösung (anti-mouse Cd16/32, 1:200 in FACS Puffer) bei 4 °C für 5 min. inkubiert. Die Antikörper, die an extrazelluläre Zielproteine binden (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7), wurden in 50 µl FACS Puffer mit ihrer jeweiligen Verdünnung gelöst und zum Fc Block hinzugefügt, sodass die Zellen nach diesem Schritt in 100 µl vorlagen. Die gesamte Mixtur wurde für 25 min. bei 4 °C inkubiert. Auf diesen Färbeschritt folgten ein Waschschrift mit 200 µl FACS Puffer und eine Zentrifugation für 3 min. bei 475x g. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zur Fixierung in 100 µl DPBS/4 % PFA resuspendiert und für 10 min. bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschrift mit 200 µl FACS-Puffer und Zentrifugation bei 475x g für 3 min. Der Überstand wurde verworfen und die gefärbten, fixierten Zellen mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Somit waren die Zellen bereit für die Messung am BD LSRFortessa™ (*Cell Analyzer*) oder BD FACSAria™ II (*Cell Sorter*). Im Fall einer zusätzlichen intrazellulären Färbung von Arginase 1, wurden die Zellen direkt nach der Isolation und vor der Färbung für 4 Stunden mit *BD GolgiPlug* in RPMI/10%FCS bei 37 °C inkubiert. Das Färbeprotokoll richtete sich dann nach den Angaben des Herstellers des genutzten

BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Kits. Vor der zellspezifischen Analyse wurden die Fluoreszenzkanäle kompensiert, indem dafür vorgesehene Kompensationskügelchen (*UltraComp eBeads*) mit jeweils einem Antikörper der getesteten Antikörper-Kombination nach Angaben des Herstellers gefärbt und einzeln eingelesen wurden. Die Laserintensitäten wurden dementsprechend für jede Farbstoffkombination angepasst.

Tabelle 6 | FACS Antikörper (*innate panel*)

Fluorochrom/Antigen (Artikel-Nummer)	Verdünnung	Klon
APC anti-mouse Cd11b (BLD-101212, Biolegend)	1:400	M1/70
PE anti-mouse Cd11c (BLD-117308, Biolegend)	1:200	N418
Anti-mouse Cd16/32 (BLD-101302, Biolegend) Fc Block	1:400	93 Biolegend
FITC anti-mouse F4/80 (BLD-123108, Biolegend)	1:400	BM8
PE/Cy7 anti-mouse F4/80 (BLD-123114, Biolegend)	1:400	BM8
PerCP/Cy5.5 anti-mouse Ly-6C (BLD-128012, Biolegend)	1:800	HK1.4
BV421™ anti-mouse Ly-6G (BLD-127628, Biolegend)	1:400	1A8
PE anti-mouse Arg1, eBioscience™ (12-3697-82, Invitrogen)	1:200	A1exF5

Tabelle 7 | FACS Antikörper (*Cd45RB^{high} sorting*)

Fluorochrom/Antigen (Artikel-Nummer)	Verdünnung	Klon
PacBlue™ anti-mouse Cd4 (BLD-100531, Biolegend)	1:300	RM4-5
FITC anti-mouse Cd25 (BLD-101908, Biolegend)	1:100	3C7
AF-647 anti-mouse Cd45RB (BLD-103312, Biolegend)	1:300	C363-16A

2.6.2 FACS - Analyse

Mithilfe der Durchflusszytometrie werden die Zellen anhand ihrer Struktur, Form und zellspezifischen Färbung auf ihre Eigenschaften analysiert. Das FACS-Gerät zeichnet einzelne Ereignisse auf, die durch die BD FACSDiva Software gesammelt und anschließend analysiert werden können. Die Analyse wurde mit der FlowJo Software durchgeführt. Die Fenstersetzung (*gating*) in der Auswertung wurde für jeden Versuch so angepasst, dass eine Vergleichbarkeit möglichst gegeben war. Ein Beispiel ist in Abbildung 12 dargestellt.

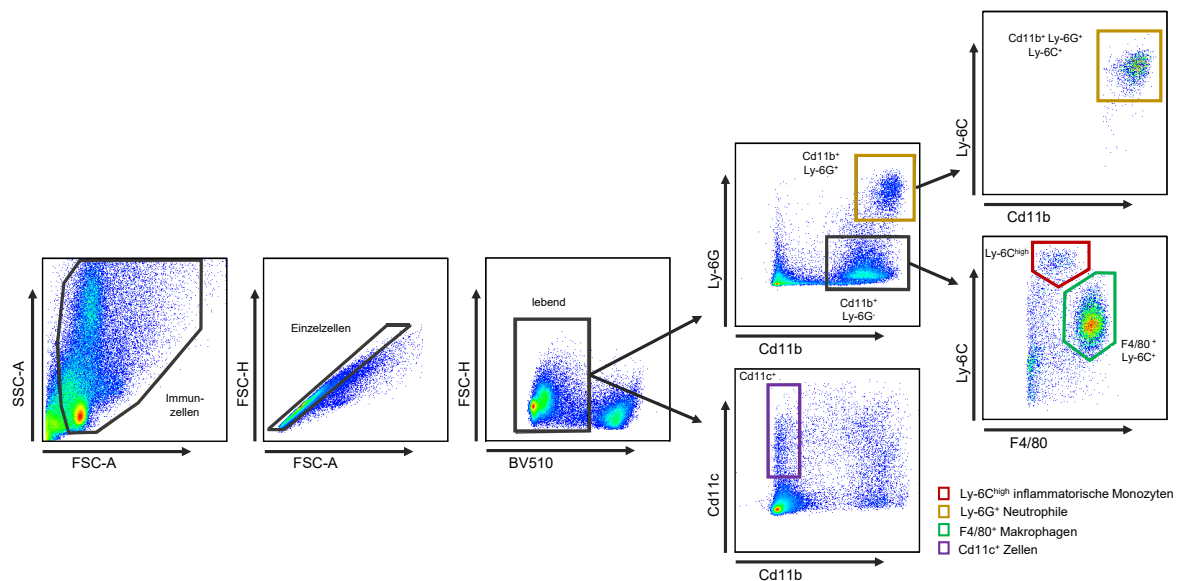


Abbildung 12 | Innate panel gating Strategie.

Das *gate* der Einzelzellen bezieht sich auf die ausgewählten Immunzellen. Aus den Einzelzellen werden die lebenden Zellen bestimmt. Die weiteren *gates* beziehen sich auf die lebenden Zellen.

2.7 Paraffin-basierte Histologie und Mikroskopie

2.7.1 Probenverarbeitung, Anfertigung und Prozedur der Schnitte

Das für die Histologie entnommene Stück Kolon (siehe Abbildung 11 in Kapitel 2.4) wurde unmittelbar nach der Abtrennung des restlichen Darms in 4%igem Roti-Histofix bei 4 °C für mindestens 24 Stunden fixiert. Die Entwässerung wurde im Institut für Pathologie des UKE durchgeführt.

Tabelle 8 | Entwässerungsprotokoll der Pathologie

Entwässerungsprotokoll der Pathologie für die fixierten Gewebe			
60 min.	Formalin	40 min.	Xylol I
30 min.	80 % Ethanol	60 min.	Xylol II
40 min.	80 % Ethanol	20 min.	Paraffin I
30 min.	96 % Ethanol	30 min.	Paraffin II
40 min.	96 % Ethanol	40 min.	Paraffin III
30 min.	100 % Ethanol	60 min.	Paraffin IV
40 min.	100 % Ethanol		
50 min.	100 % Ethanol		

Für das Einbetten der Probe in Paraffinwachs wurde das Stück Kolon in zwei Teile geteilt, sodass ein Teil aufgestellt für den Querschnitt und eins gelegt für den Längsschnitt verwendet werden konnte. Dabei wurde immer der distale Teil zum Querschnitt aufgestellt. Die zuvor auf -8 °C herunter gekühlten Paraffinblöcke wurden für alle

immunhistologischen Färbungen auf 4 µm Dicke am Mikrotom geschnitten. Nach der Streckung des Schnittes im 37 °C warmen Wasserbad (VE-Wasser) wurden sie auf saubere, fettfreie Objektträger aufgezogen und bei 37 °C über Nacht getrocknet. Vor der histologischen Färbung wurden die Schnitte mittels einer Xylol- und Ethanol-Reihe entparaffiniert und wieder in ein wässriges Milieu überführt (Tabelle 9).

Nach den spezifischen Färbungen wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe und abschließender Xylol-Behandlung finalisiert (Tabelle 9). Zum Erhalten der gefärbten Schnitte wurde Entellan als Eindeckmedium verwendet und mit einem Deckgläschen auf dem Objektträger „eingedeckt“. Die fertig prozessierten Gewebeschnitte wurden zum Abdampfen und Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur ruhen gelassen.

Tabelle 9 | Schema Entparaffinierung, Rehydrierung und Dehydratation der Paraffinschnitte

Entparaffinieren und Rehydrierung		Dehydratation	
3 x 4 min.	Xylol	Dippen	50 % Ethanol
4 min.	100 % Ethanol	1 min.	70 % Ethanol
4 min.	90 % Ethanol	2 min.	90 % Ethanol
4 min.	70 % Ethanol	2 min.	100 % Ethanol
4 min.	50 % Ethanol	3 x 4 min.	Xylol
4 min.	VE-H ₂ O		

2.7.2 Hämatoxylin & Eosin Färbung

Für die Hämatoxylin & Eosin (H&E) Färbung wurden entparaffinierte Gewebeschnitte für 10 min. in Hämatoxylin gefärbt und anschließend für 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dies dient der Sichtbarmachung aller basophilen Strukturen und vor allem der Zellkerne. Zur Färbung der eosinophilen Strukturen erfolgte im direkten Anschluss die Inkubation der Schnitte im Eosinbad für 1 min.. Abschließend wurden die Schnitte nach kurzem Waschen in VE-Wasser weiterbehandelt wie zuvor beschrieben weiter prozessiert und final haltbar gemacht.

2.7.3 Immunhistochemie

Um die Freilegung von Proteinen und somit die spezifische immunhistologische Färbung möglich zu machen, wurden die Gewebeschnitte nach der Entparaffinierung für 20 min. in Citratpuffer gekocht. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte nach kurzem Herunterkühlen für 10 min. mit einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung behandelt. Anschließend wurde dreimal für 2 min. in PBS-T (PBS-Puffer mit 0,05 % Tween® 20) gewaschen und die Schnitte mit einem *Dako Pen* umrandet, bevor sie für eine Stunde mit Protein Blockierungslösung in einer Feuchtekammer behandelt

wurden. Es folgte ein einmaliger Waschschrift in PBS-T. Danach wurden die Schnitte mit dem spezifischen Primärantikörper bedeckt und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Anschließend folgt nach dreimaligem Waschschrift die Färbung mit dem Sekundärantikörper (*Rabbit anti-rat IgG (H+L)*) für eine Stunde bei RT im Fall der Ki-67-Färbung. Sowohl bei der Ki-67- als auch bei der Hmgb1-Färbung folgte nach einem dreimaligen Waschschrift für 10 min. mit einem 2 % *goat serum* in PBS behandelt, abgekippt und dann ohne weiteres Waschen mit dem *Anti-Rabbit Dako Envision labeled polymer* für 30 min. bei RT inkubiert. Nach einem dreimaligem Waschschrift folgte die DAB-Substrat Entwicklung. Dafür wurden die Schnitte für ca. 1 min. mit der Arbeitslösung (1 ml DAB / 20 µl DAB Chromogen) bedeckt und sofort in VE-H₂O gestellt und dreimal in neuem VE-H₂O gewaschen. Die Schnitte wurden abschließend mit Hämatoxylin Lösung bei RT gegengefärbt (siehe 2.7.2 H&E Färbung) und final haltbar gemacht (siehe 2.7.1).

Die Färbung der humanen Gewebeschnitte wurde von der *Core Facility Pathologie* (AG Sauter) am UKE durchgeführt.

Tabelle 10 | Immunhistochemie Primärantikörper

Antikörper	Gekoppelte Antigene	Hersteller + Artikelnummer
Anti-mouse Ki67	Rat IgG2a, Clone SolA15	Invitrogen, 14-5698-80
Anti-mouse Hmgb1	Rabbit polyclonal	Abcam, ab1285

Tabelle 11 | Immunhistochemie Sekundärantikörper

Antikörper	Gekoppelte Enzym	Hersteller + Artikelnummer
Rabbit anti-rat IgG (H+L)	HRP-conjugated	Thermo Fisher, 61-9520
Anti-Rabbit Dako Envision labeled polymer	HRP-conjugated	Dako, K4003

2.7.4 TUNEL Fluoreszenzfärbung

Um den apoptotischen Zustand der Zellen zu untersuchen, wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit* (TMR rot) von Roche verwendet. Mithilfe dieses *deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Assays werden Einzel- und Doppelstrangbrüche, die bei der frühen Apoptose entstehen, sichtbar gemacht. Nach dem Entparaffinieren und der Rehydrierung wurden die Schnitte mit dem *Dako Pen* umkreist und anschließend 3-mal 2 min. in PBS gewaschen. Für die Permeabilisierung der Gewebe wurden die Proben für 15 bis 20 min. mit jeweils 100 µl einer Proteinase K Lösung (~20 µg/ml Proteinase K (PCR-Grade, Konzentration ~20 mg/ml) in 10 mM Tris/HCl pH 7,4–8) bei 37 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3-mal 2 min. in PBS gewaschen. Für die Positiv- und Negativkontrolle folgte nun ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei 37 °C in der Feuchtekammer mit je 100 µl einer DNase I-

Lösung (100 U/ml DNase I in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 \pm 1:10 Verdünnung der DNase 1000 U/ml). Danach wurden die Kontrollschnitte 3-mal 3 min in PBS gewaschen. Die Negativkontrolle wurde nun mit 50 μ l der Kit-Färbelösung ohne Kit-Enzymlösung behandelt. Gleichzeitig wurden 50 μ l der Färbelösung verworfen und die restliche Lösung mit der Enzymlösung zusammengefügt, sodass nun die Probeschnitte und die Positivkontrolle mit der Reaktionsmischung gefärbt wurden. Alle Schnitte wurden für 60 min. bei 37 °C in der Feuchtekammer inkubiert. Nach dem Färbeschritt folgten 3 Waschschrirte für 5 min. in PBS. Die Gegenfärbung bzw. Färbung der Zellkerne wurde mit einer 1:10.000 Verdünnung des Hoechst-Farbstoffs mit PBS für 1 min. durchgeführt. Danach wurden die Schnitte 2-mal 5 min. in PBS gewaschen, bevor sie mit DAKO-Fluoromount Eindeckmedium „eingedeckt“ wurden. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet und waren anschließend bei 4 °C für circa 2 Wochen lagerbar.

2.7.5 Mikroskopie

Die Fotos der gefärbten Gewebeschnitte wurden in 10x und 20x Vergrößerung aufgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass stets ein Weißabgleich durchgeführt wurde und die Belichtungszeit für alle Schnitte eines Experiments gleich eingestellt war. Die Aufnahmen wurden mit *ImageJ* bearbeitet (gleich kontrastiert) und die in der Bildunterschrift angegebene Skalierung berechnet und eingefügt. Für die Auswertung der TUNEL-Färbung wurde der manuelle *CellCounter (Analyze Plugin)* verwendet.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 HMGB1 enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA

Die Messung der HMGB1-Konzentration im humanen Serum von an (MC und) CU erkrankten Patienten und im Serum der Versuchstiere wurde mithilfe des HMGB1-spezifischen ELISA nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Messung wurde das Kit (ST51011) von *IBL international* verwendet. Bei der Durchführung wurde bei allen Messungen die Standardkurve im normalen Bereich zur Berechnung der Konzentrationen genutzt. Die Analyse der Patientenproben wurde mit der Erlaubnis der Ethikkommission der medizinischen Verbindung Hamburg (PV-4444) durchgeführt. Das Serum der CU-Patienten und Patientinnen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung entnommen und ist entsprechend der Endoskopie-Daten den verschiedenen Schweregraden zugeordnet. Bei der Analyse der Patienten und Patientinnen sind *Responder* und *Non-Responder* mit inbegriffen. Dies bedeutet, dass die Patienten eine 3-monatige entzündungshemmende Therapie erhalten haben. Für *Responder* bedeutet dies, dass sich der Colitis-Score daraufhin verringert hat, bei *Non-Respondern* nicht.

2.8.2 Proteinisolation und BCA-Messung

Für die Isolation von Protein aus den Gewebeproben wurde selbst angesetzter RIPA Puffer verwendet (siehe S. 26). Dieser wurde kurz vor der Isolation mit Proteinase und Phosphatase Inhibitoren versetzt (10 mM Benzamidin, 2 mM Natriumorthovanadat, 1 µg/ml Leupeptin, 3,4 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF). Pro 100 mg Gewebeprobe wurde 1 ml Puffer hinzugefügt und das Gewebe darin mithilfe einer Mikropistille homogenisiert. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit auf Eis und einer Zentrifugation für 20 min. bei 2500x g und 4 °C wurde die Proteinkonzentration mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die mithilfe von destilliertem H₂O auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellten und mit 5x Lämmli Puffer (250 mM Tris/HCl; 10% SDS; 50% Glycerol; 0,5 M DTT) versetzten Proteinisolate wurden bei 95 °C für 5 min. auf einem Heizblock erhitzt und im Anschluss direkt für die SemiDry-Blot Analyse verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.8.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 6 %iges Sammelgel (6% Acrylamid; 125 mM Tris pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED) und ein 16 %iges Trenngel (16 % Acrylamid; 375 mM Tris pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED) mit Hilfe des BIO-Rad Systems angefertigt. Die Gele wurden mit bis zu 45 µl Protein-Lämmli-Gemisch pro Tasche beladen. Anschließend wurde die Gelelektrophorese unter einer Spannung von 70 V für 20 min., dann 130 V für etwa 45 min. durchgeführt.

2.8.4 SemiDry-Blot

Die aufgetrennten Proteine im 16 % Polyacrylamid Gel wurden mittels SemiDry-Blot Verfahren auf eine 0,25 µm Polyvinylidenfluorid (PVDF) Trägermembran (Thermo Fisher, USA) transferiert. Dafür wurde eine Spannung von 10 V für 120 min. angelegt. Die Membran wurde dann etwa 15 min. lang trocknen gelassen und direkt im Anschluss für 1 Stunde in 5 % Milchpulver in TBS-T (TBS-Puffer mit 0,05 % Tween® 20) geblockt. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden ebenfalls in 5 % Milch/TBS-T Lösung im Falcon angesetzt und über Nacht bei 4 °C gerollt inkubiert. Die Verdünnungen der entsprechenden Antikörper sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Nach jeder Antikörper-Inkubation wurde die Membran 3-mal mit TBS-T gewaschen. Nach der einstündigen Inkubation bei RT mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper wurden die gefärbten Proteinbanden mit dem *Super Signal West Dura Chemiluminescent* Substrat (Kit von Pierce, USA) am *Fusion FX Imager* sichtbar gemacht. Die Auswertung der Signalstärke einer Bande wurde mit der

Evolution *Capt* Software durchgeführt. Die Proteinsignale wurden auf die *housekeeper* Proteine α -Tubulin oder β -Actin normalisiert, dies ist individuell angegeben.

Tabelle 12 | Western-Blot Antikörper

Antigen (Artikelnummer)	Verdünnung	Hersteller
SQSTM1 / p62 (ab109012)	1:4000	Abcam, USA
HMGB1 (ab18256)	1:1000	Abcam, USA
LC3 (2775)	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., USA
α -Tubulin (3873)	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc., USA
β -Actin (A5441)	1:5000	Sigma-Aldrich, Germany
HRP-linked anti-rabbit IgG (7074)	1:10000	Cell Signaling Technology, Inc., USA
HRP-linked anti-rat IgG (61-9520)	1:10000	Invitrogen™, USA
HRP-linked anti-mouse IgG (7076)	1:10000	Cell Signaling Technology, Inc., USA

2.8.5 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Für die Extraktion der RNA aus Gewebe und Zellen wurde das NucleoSpin® RNA Kit von Macherey-Nagel verwendet. Für das Eluieren im letzten Schritt wurde stets Nuklease-freies Wasser genutzt. Die isolierte RNA-Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt. Die Synthese der *complementary DNA* (cDNA) aus der zuvor isolierten RNA wurde mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 and 1000 Reactions* Kit von Applied Biosystems durchgeführt. Wenn möglich, wurden 2 μ g RNA in 20 μ l cDNA-Synthese Mischung umgeschrieben. Für die Analyse spezifischer Gene mittels *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) wurden ausgewählte Sonden von Applied Biosystems genutzt.

2.8.6 Real-time qPCR – Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Für die qPCR wurden 10 μ l Ansätze mit 1 μ l der zuvor umgeschriebenen cDNA angesetzt. Dabei sind 5 μ l TaqMan™ Fast Advanced PCR Master Mix oder TaqMan™ Universal PCR Master Mix (je nach verwendeter Platte und Programm) verwendet worden. Hinzu kamen 0,5 μ l spezifische TaqMan Sonde und 3,5 μ l Nuklease-freies Wasser. Die Proben wurden stets in Duplikaten gemessen und für die weiteren Berechnungen der Mittelwert dieser beiden Werte eingesetzt.

Tabelle 13 | Taqman Sonden für die qPCR

Gen	Artikelnummer
<i>18S</i>	4319413E
<i>Ager</i>	Mm00545814_g1
<i>Arg1</i>	Mm00475988_m1

<i>Ascl2</i>	Mm01268891_g1
<i>Atg4</i>	Mm00463819_m1
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
<i>Chil3</i>	Mm00657889_mH
<i>Cxcl2</i>	Mm00436450_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>Gnai1</i>	Mm01165301_mH
<i>Hmgb1</i>	Mm04205650_gH
<i>Hprt</i>	Mm00446968_m1
<i>Ifng</i>	Mm01168134_m1
<i>Il12b</i>	Mm01288993_m1
<i>Il1b</i>	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
<i>Jun</i>	Mm00495062_s1
<i>Lgr5</i>	Mm00438890_m1
<i>Myc</i>	Mm00487804_m1
<i>Nos2</i>	Mm00440502_m1
<i>Pcna</i>	Mm00448100_g1
<i>Pou5f1 (Oct4)</i>	Mm03053917_g1
<i>S100a8</i>	Mm00496696_g1
<i>Sox9</i>	Mm00448840_m1
<i>Tgfb</i>	Mm01178820_m1
<i>Tlr4</i>	Mm00445273_m1
<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1

2.9 RNA Sequenzierung

Die RNA wurde wie in Kapitel 2.8.5 mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Kits von Macherey-Nagel isoliert und für die Verschickung zur Sequenzierung vorbereitet. Dazu wurde die RNA-Konzentration bestimmt und alle Proben mit Nuklease-freiem Wasser auf dieselbe Konzentration angeglichen. Die Sequenzierung wurde durch Novogene (UK) Co., Ltd. durchgeführt. Es handelte sich um eine eukaryotische RNA-Sequenzierung des gesamten Transkriptoms (whole transcriptome) mit der Illumina Novaseq 6000 PE (paired-end) 150. Die Qualität der Proben wurde von Novogene stets kontrolliert. Nach der Qualitäts- und Reinheitskontrolle wurden die Sequenzierungsdaten von der *Core Facility für Bioinformatik* am UKE (von Minyue Qi und Malik Alawi) weiterverarbeitet und in enger Zusammenarbeit ausgewertet. Für die *pathway enrichment* Analyse wurde die internationale, biologische *Gene Ontology*-Datenbank herangezogen.

2.10 Statistische Analysen

Für die Beurteilung der Ergebnisse wurden statistische Analysen durchgeführt. Für die Berechnung der Signifikanz (p-Wert) wurde für den Vergleich zwischen zwei Gruppen zu einem Zeitpunkt ein ungepaarter Mann-Whitney Test mithilfe der *GraphPad PRISM* Software verwendet. Für den Vergleich unter gruppierten Bedingungen wurde ein *Two-Way* ANOVA Test angewendet. In Gewichtsverläufen handelt es sich dabei um einen *Tukey's* Mehrfachvergleich und bei allen weiteren (bspw. in qPCR Ergebnissen) um einen *Sidak's* Mehrfachvergleich. Die p-Werte der *Two-Way* ANOVA Tests sind angepasste p-Werte (p_{adj}).

Bei allen statistischen Analysen wird das Signifikanzniveau wie folgt angegeben:

p-Wert > 0,05: ns (nicht signifikant); p<0,05: *; p<0,01: **; p<0,001: ***; p<0,0001: ****

In den graphischen Darstellungen wird stets der Mittelwert ± Standardabweichung gezeigt. In Ergebnissen aus Stichproben wie bspw. in den Tumorstudien (gesammelte Ergebnisse über längere Zeit) wird statt der Standardabweichung der Standardfehler angezeigt.

3 Ergebnisse

Mehrere Studien zeigten bisher, dass die HMGB1-Konzentration im Stuhl und Serum der Patienten scheinbar mit dem Schweregrad entzündlicher Erkrankungen korreliert [121], [192]. Auch die Tumorentstehung und -progression scheint, abhängig vom Gewebe und von der Therapie, durch das Protein beeinflusst zu sein [123], [124], [156]–[158], [193]–[195]. Vergleicht man die Publikationen der letzten Jahrzehnte, die sich direkt und indirekt mit der Rolle des DAMP HMGB1 auseinandersetzen, wird durch teilweise widersprüchliche Ergebnisse aus pharmakologischen und anderen Studien kein klares Bild erzeugt und es fehlen größtenteils solide genetische Modelle. Es zeigt sich außerdem, dass HMGB1 in unterschiedlichen Krankheitsmodellen durch sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften charakterisiert werden kann. Dabei ist ebenfalls entscheidend, ob sich das Protein im Zellkern, im Zytosol oder extrazellulär befindet und welche Umgebungsbedingungen herrschen, da diese die Redox-Modulation und somit die Aktivität als Immunregulator beeinflussen [18], [60], [164], [196]. Die Tatsache, dass HMGB1 ubiquitär im Organismus vorliegt und auch der zelluläre Ursprung der freien, aktiven Form nicht immer eindeutig erkennbar ist, erschwert die detaillierte Beschreibung und Spezifizierung eines allgemeinen Mechanismus und somit wie die verschiedenen Funktionen des DAMPs reguliert werden.

In dieser Arbeit soll anhand verschiedener translationaler Colitis-Mausmodelle untersucht werden, ob HMGB1 aus unterschiedlichen Zelltypen am Erhalt der Homöostase der intestinalen Barriere während einer Entzündung beteiligt ist. Weiterhin soll der Einfluss von HMGB1 – ebenfalls aus unterschiedlichen Zelltypen – auf die spontane und die Entzündungs-assoziierte Karzinogenese im Kolon tierexperimentell untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Versuche sollen eine Grundlage für weitere, tiefergehende Untersuchungen zur Funktionsweise von HMGB1 schaffen. Um die entsprechenden Versuche umsetzen zu können, wurden konditionelle Deletionsstrategien verwendet, da eine globale HMGB1-Deletion unumgänglich zum Tod im frühen postnatalen Stadium führt [90].

3.1 HMGB1 ist mit der humanen und murinen Colitis assoziiert

Der Zusammenhang zwischen der HMGB1-Freisetzung und dem Vorhandensein einer CU-Erkrankung konnte auch in Serumproben von Patienten und Patientinnen des UKE mittels eines HMGB1-spezifischen ELISA bestätigt werden. Die Proben wurden parallel zur Koloskopie entnommen und entsprechend dem Schweregrad (Score) zugeordnet. Die HMGB1-Konzentration im Serum aller CU Patienten lag bei 20,39 ng/ml verglichen zu einer Konzentration von 10,11 ng/ml in der gesunden Kontrollgruppe und damit vergleichbar zu Ergebnissen der Studie von Chen *et al.* [192] signifikant höher (Abbildung 13 A, Mann-

Whitney Test, $p < 0,0001$). Die Proteinkonzentration im Serum korrelierte jedoch entgegen der Ergebnisse von Chen *et al.* nicht mit dem Colitis-Schweregrad (Abbildung 13 B). In Patienten mit einem milden Verlauf der CU (Score 0-1) lag die HMGB1-Konzentration bei 20,58 ng/ml, mit moderatem Verlauf (Score 2) bei 19,67 ng/ml und mit einem schweren (Score 3) bei 20,80 ng/ml, wobei die Unterschiede zwischen den Schweregradgruppen nicht signifikant waren ($p_{\text{mild-moderat}}=0,9835$; $p_{\text{mild-schwer}}>0,9999$; $p_{\text{moderat-schwer}}=0,8713$; $p_{\text{gesund-mild}}<0,0001$; $p_{\text{gesund-moderat}}<0,0001$; $p_{\text{gesund-schwer}}<0,0001$). Die Analyse bezieht sich rein auf den Colitis-Score und unterscheidet nicht zwischen *Responder* und *Non-Responder* (s. Abschnitt 2.8.1). Bei einem *Responder* z.B., bei dem sich der Colitis-Score nach einer 3-monatigen entzündungshemmenden Therapie von 3 auf 1 verringerte, blieb der Serum-HMGB1-Wert vergleichbar hoch. Die mikroskopische Untersuchung der HMGB1-spezifisch gefärbten humanen Gewebeschnitte zeigte, dass das Nukleoprotein HMGB1 im gesunden Gewebe klar abgegrenzt im Zellkern jeder Zelle vorliegt. Im geschädigten Gewebe des CU Patienten hingegen ist zunächst einmal die teilweise Auflösung der Kryptenstruktur erkennbar. Weiterhin verliert sich die ursprünglich eindeutige Beschränkung des Proteins auf den Zellkern teilweise im Zytosol der Zellen in der Epithelschicht sowie einiger Zellen in der *Lamina propria* (Abbildung 13 B).

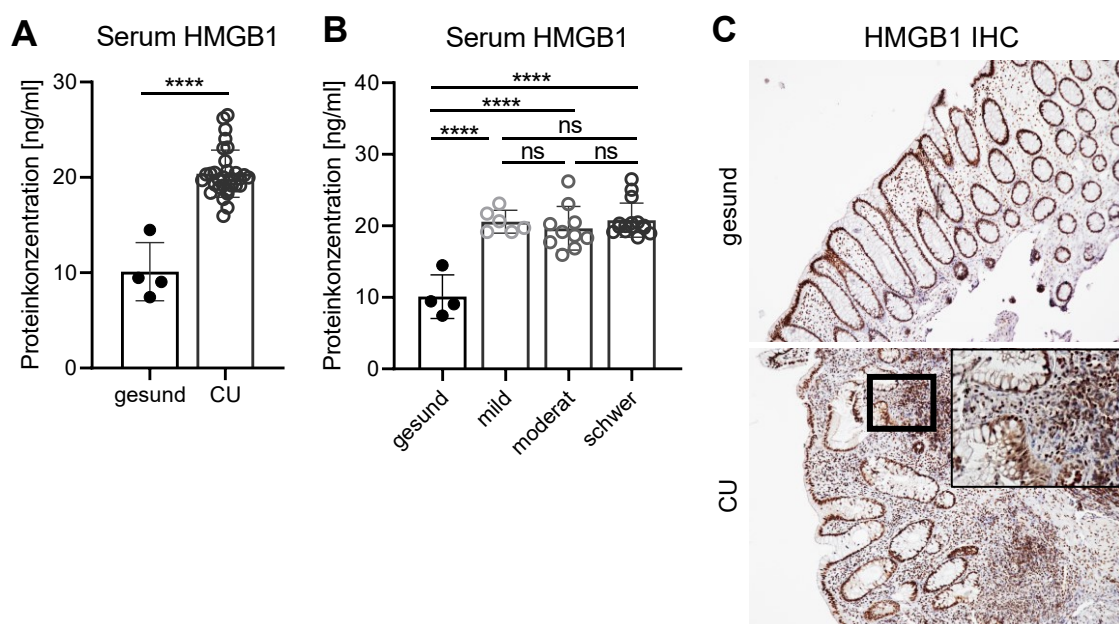


Abbildung 13 | HMGB1 in Humanproben.

A und B) Vergleich der Proteinkonzentration im Serum von gesunden Probanden (n=4) und Patienten mit einem milden (n=6), moderaten (n=10) und schweren (n=15) CU Schweregrad (One-Way ANOVA Test, Sidak's Mehrfachvergleich). C) HMGB1-spezifische immunhistologische Färbung von gesundem Kolongewebe im Vergleich zu Kolongewebe eines CU Patienten.

Nachdem die mukosale HMGB1-Lokalisation und die HMGB1-Konzentration im humanen Serum untersucht worden sind und die bereits publizierten Beobachtungen zum Teil bestätigt werden konnten, wurde die Untersuchung auch im murinen Colitis-Modell

durchgeführt. In diesem Fall wurde durch das Salz Dextran-Natriumsulfat (*dextran sulfate sodium salt*, DSS) eine akute Colitis in Mäusen hervorgerufen. Das Salz wurde geflochten wildtypischen Mäusen über 7 Tage hinweg über das Trinkwasser verabreicht. Die folgenden Daten stammen aus mehreren Wiederholungsversuchen mit demselben reproduzierbaren Phänotyp, wodurch die Tierzahlen in den Graphen der Abbildung 14 variieren. Obwohl das DSS-Colitis-Modell seit 1990 als reproduzierbares Akutmodell gut etabliert ist [176], kann die Ausprägung des Phänotyps der experimentellen Colitis in Mäusen durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Unter diese fallen bspw. Standort-abhängige mikrobielle Variationen sowie eine unterschiedliche Anfälligkeit abhängig vom genetischen Hintergrund der Mauslinie [197], [198]. Die Versuchstiere der Forschungstierhaltung des UKE werden *specific pathogen free* (SPF)-gehalten. In diesen Mäusen ließ sich der typische Krankheitsverlauf einer DSS-Colitis, erkennbar durch Gewichtsverlust, Gewebeschäden und Kolonverkürzung, reproduzieren. Bei der täglichen Gewichtskontrolle zeigte sich ein signifikanter Gewichtsverlust in den DSS-behandelten Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten (Abbildung 14 A). Bis Tag 8 des Versuchs verloren die behandelten Mäuse 5 % ihres Ausgangsgewichts, während die Kontrolltiere 3 % zunahmen ($p < 0,0001$). Der Gewichtsverlust der behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten zeichnete sich bereits ab Tag 6 beginnend ab, und war ab Tag 7 signifikant unterschiedlich ($p = 0,0003$). Ein weiterer wichtiger Parameter zur Bestimmung des Schweregrades der Colitis ist die Verkürzung des Kolons, gemessen von unterhalb des Zäkums bis zum Anus. Die Länge des Kolons der DSS-behandelten Versuchstiere (7,6 cm) verringerte sich im Vergleich zu den unbehandelten (9,0 cm) bis Tag 8 signifikant um 1,4 cm ($p = 0,0121$) (Abbildung 14 B). Wie in Abbildung 13 A gezeigt, ist eine erhöhte HMGB1-Konzentration im Serum ebenfalls ein Kennzeichen der humanen Colitis. Im translationalen Mausmodell war die HMGB1-Konzentration in den DSS-behandelten Mäusen mit 36,2 ng/ml an Tag 4 und 35 ng/ml an Tag 8 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 16,3 ng/ml deutlich erhöht (Abbildung 14 C) und stellt somit eine vergleichbar erhöhte Konzentration von Serum-HMGB1 bei Mäusen nach DSS-Gabe wie bei CU-Patienten dar. Gleiches gilt für die Unabhängigkeit der HMGB1-Konzentration vom Schweregrad der Colitis – im Mausmodell entsprechend der Zeitpunkt der Messung (Tag 4 und Tag 8). Zusätzlich wurde per Genexpressionsanalyse die Transkription von *Hmgb1* sowie der Entzündungsmarker und Zytokine *Tumornekrosefaktor* (TNF)- α , *Interleukin* (IL)-6 und IL-1 β (Abbildung 14 D) in Relation zu den Tag 0 Kontrolltieren untersucht. Die relative Menge an *Hmgb1*-Transkripten ist an Tag 8 im Darmgewebe der DSS-behandelten Mäuse signifikant um den Faktor 1,65 erhöht ($p = 0,0055$). Die Transkriptionslevel der Entzündungsmediatoren *Tnfa* (13-fach), *Il6* (92-fach) und *Il1b* (82-fach) sind während der Colitis in der DSS-behandelten Versuchsgruppe relativ zur Kontrollgruppe ebenfalls stark erhöht ($p_{Tnfa} = 0,0002$;

$p_{Il6}=0,0002$; $p_{Il1b}<0,0001$). In der HMGB1-spezifischen Immunhistochemie wird homolog zu den Humanproben deutlich, dass sich in den erkrankten Mäusen zunächst die typische Struktur der Krypten im Gewebe auflöste und vermehrt Immunzellen in die *Lamina propria* infiltrierten (Abbildung 14 E). Sowohl die Immunzellen in der *Lamina propria* als auch die Epithelzellen waren HMGB1-positiv.

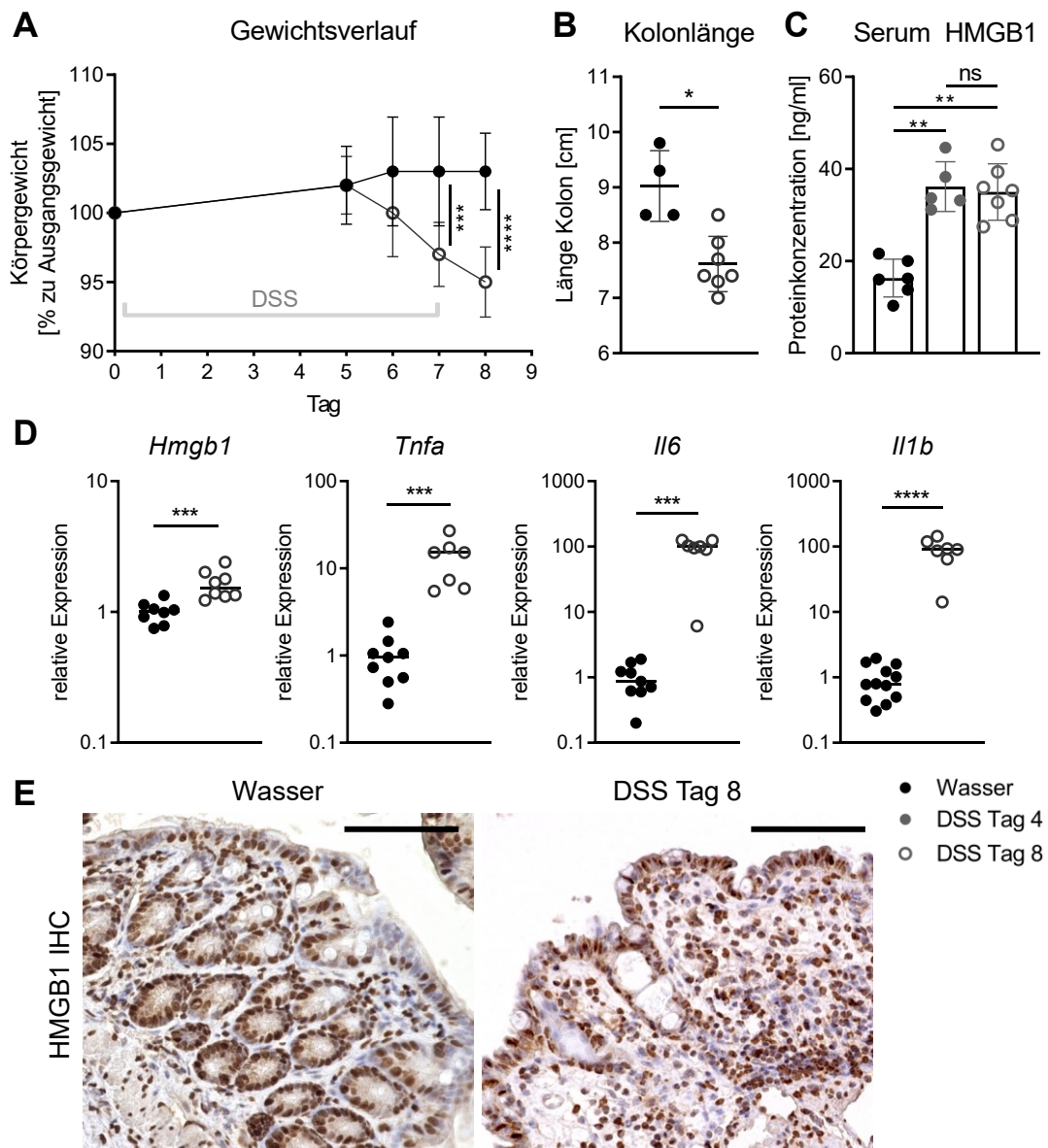


Abbildung 14 | HMGB1 im translationalen CU-Mausmodell.

Wildtypische *Hmgb1^{fl/fl}*-Mäuse wurden für insgesamt 8 Tage mit DSS-versetztem Trinkwasser zur Induktion einer Colitis behandelt. Als gesunde Kontrollen wurden unbehandelte Wurfgeschwister (Wasser) verwendet ($n_{\text{Wasser}}=4-12$; $n_{\text{DSS, Tag 4}}=5$; $n_{\text{DSS, Tag 8}}=7-8$). A) Verlauf des Körpergewichts. B) Kolonlänge an Tag 8. C) HMGB1-Konzentration im Serum an Tag 8. D) Relative *Hmgb1*-Expression sowie die Expression der Entzündungsmarker *Tnfa*, *Il6* und *Il1b* an Tag 8. E) Immunhistologische Färbung (IHC) von HMGB1. Skalierung: 100 µm. Statistische Auswertung: A, Two-Way ANOVA Test; B-D, Mann-Whitney Test.

3.2 Die HMGB1-Defizienz in intestinalen Epithelzellen führt zu einem schwereren Krankheitsverlauf der murinen DSS-Colitis

Zur Untersuchung der Rolle von HMGB1 bei gravierendem epithelialem Zellschaden im Bakterien-besiedelten Darm, wurde das DSS-Modell für eine schwerere Form der akuten Colitis verwendet. Um eine spezifische Rolle von epithelialem HMGB1 aufzudecken, wurden *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäuse mit *Hmgb1*^{fl/fl} Mäusen nun im Verlauf der DSS-Colitis miteinander verglichen. DSS-behandelte HMGB1-defiziente Mäuse verloren bis Tag 8 der DSS-Colitis mehr als doppelt so viel Gewicht wie die DSS-behandelte *Hmgb1*^{fl/fl} Mäuse bezogen auf das Ausgangsgewicht (Gewicht Tag 8: *Hmgb1*^{fl/fl} 93 %, *Hmgb1*^{ΔIEC} 84 %, $p_{\text{Tag7}}=0,0093$, $p_{\text{Tag8}}=0,0006$) (Abbildung 15 A). Unbehandelte Kontrollmäuse beider Genotypen nahmen gleichermaßen an Gewicht zu ($p=0,8257$). Ab Tag 6 zeigte sich der für die DSS-Colitis typische Gewichtsverlust signifikant innerhalb der Genotypen mit 8 % Gewichtsverlust zur jeweiligen Gesundheitskontrolle ($p_{\text{fl/fl Wasser:DSS}}=0,0245$; $p_{\Delta\text{IEC Wasser:DSS}}=0,0262$). Neben dem Gewichtsverlust wurde die Verkürzung des Kolons als etablierter Surrogatparameter für den Schweregrad der intestinalen Entzündung gemessen. Unbehandelte Versuchstiere zeigten keine Genotyp-abhängigen Unterschiede (*Hmgb1*^{fl/fl} = 9 cm; *Hmgb1*^{ΔIEC} = 8,7 cm; $p=0,6857$). An Tag 4 konnte eine leichte Tendenz festgestellt werden (*Hmgb1*^{fl/fl} = 7,1 cm; *Hmgb1*^{ΔIEC} 7,6 cm; $p=0,0823$). In der Verkürzung des Kolons bestätigte sich der beobachtete Phänotyp an Tag 8 mit einer Kolonverkürzung von 7,5 cm (*Hmgb1*^{fl/fl}) zu 6,4 cm und somit einem signifikanten Unterschied von 1,1 cm ($p=0,0004$) (Abbildung 15 B). Zur Beurteilung der phänotypischen Veränderungen im Krankheitsverlauf wurde auf die Mini-Endoskopie oder Maus-Kolonoskopie zurückgegriffen. Zunächst zeigte sich an Tag 0 kein Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,4048$). In den DSS-behandelten Mäusen konnte zwischen den Genotyp-Gruppen an Tag 4 eine Tendenz (*Hmgb1*^{fl/fl} = 2,9; *Hmgb1*^{ΔIEC} = 4,6; $p=0,0563$) und zum Endzeitpunkt des Versuchs ein signifikanter Unterschied (*Hmgb1*^{fl/fl} = 5,6; *Hmgb1*^{ΔIEC} 9,8; $p=0,0007$) beobachtet werden (Abbildung 15 C). Je höher der Endoskopische Index, desto schwerer ist damit die Colitis bewertet, was bedeutet, dass die KO-Mäuse durch die epitheliale HMGB1-Deletion eine wesentlich stärkere Colitis entwickelten als gefloxtete Tiere. Die Messung der HMGB1-Konzentration im Serum bestätigte die frühere Beobachtung, dass die Konzentration unabhängig vom Colitis-Schweregrad ist, da sich die HMGB1-Konzentration weder zwischen Tag 4 (*Hmgb1*^{fl/fl} = 36,2 ng/ml; *Hmgb1*^{ΔIEC} = 40,9 ng/ml; $p=0,9875$) und Tag 8 (*Hmgb1*^{fl/fl} = 35 ng/ml; *Hmgb1*^{ΔIEC} = 31,2 ng/ml; $p=0,9807$) noch zwischen den beiden Genotypen unterschied. Somit hat ein epithelialer HMGB1-KO keine Auswirkungen auf die HMGB1-Konzentration im Serum nach DSS-Behandlung (Abbildung 15 D). Die Analyse der infiltrierenden Immunzellen im Darmgewebe zeigte an Tag 8 eine signifikant höhere Frequenz von Cd11b⁺ Ly-6G⁺ Neutrophilen ($p=0,0407$) und Cd11b⁺ Ly-6C^{high} F4/80^{int} inflammatorischen Monozyten

($p=0,0052$) im Gewebe der *Hmgb1*^{ΔIEC} verglichen zur *Hmgb1*^{flf} Gruppe. Die Frequenz der infiltrierten Cd11b⁺ Ly-6C^{int} F4/80^{high} Makrophagen unterschied sich zwischen den Genotypen an Tag 8 nicht (Abbildung 15 E). Der Vergleich zu den unbehandelten Kontrollmäusen zeigt, dass erst durch einen Entzündungszustand, der durch das DSS hervorgerufen wird, Immunzellen im Gewebe nachweisbar sind. Es handelt sich somit um neue zur Entzündungsstelle eingewanderte Immunzellen.

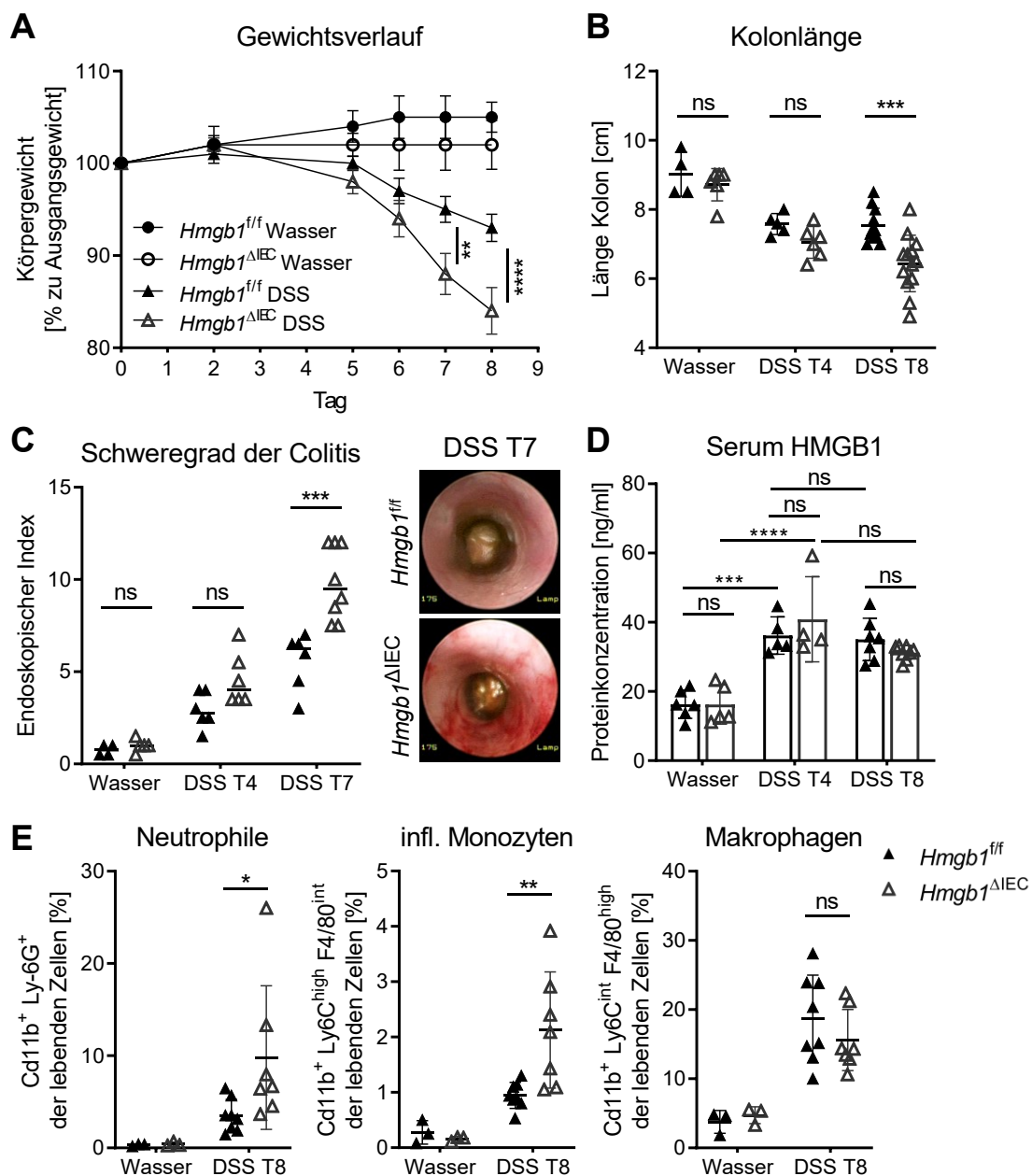


Abbildung 15 | Einfluss von epithelialem HMGB1 auf die DSS-induzierte Colitis.

Hmgb1^{flf} und *Hmgb1*^{ΔIEC}-Mäuse wurden für insgesamt 4 bzw. 8 Tage mit DSS-versetztem Trinkwasser zur Induktion einer Colitis behandelt. Als gesunde Kontrollen wurden unbehandelte Wurfgeschwister (Wasser) verwendet. ($n_{flf\ Wasser}=3-6$; $n_{ΔIEC\ Wasser}=3-6$; $n_{flf\ DSS\ T4}=5-6$; $n_{ΔIEC\ DSS\ T4}=6$; $n_{flf\ DSS\ T8}=6-14$; $n_{ΔIEC\ DSS\ T8}=7-13$). A) Verlauf des Körpergewichts B) Länge des Kolons C) Schweregrad der Colitis D) HMGB1-Konzentration im Serum E) Infiltration von Ly-6G⁺ Neutrophilen, Ly-6C^{high} inflammatorischen Monozyten und F4/80^{high} Makrophagen ins Kolongewebe. Statistische Auswertung: A, D, E Two-Way ANOVA Test; B, C Mann-Whitney Test.

Nach der H&E-Färbung wurden die pathologischen Unterschiede ebenfalls deutlich (Abbildung 16 A). In den gesunden Kontrollmäusen waren keine Unterschiede in der Gewebestruktur zwischen den Genotypen erkennbar. In beiden Gruppen war eine klare Krypten- und Zottenstruktur vorhanden. Auch die Menge an Immunzellinfiltraten und Immunzellen in der *Lamina propria* waren vergleichbar. Bei der DSS-induzierten Colitis führte eine Deletion von HMGB1 in den Epithelzellen zu einer schwerwiegenderen Schädigung der mukosalen Struktur verglichen mit geflochten Kontrolltieren, wobei dieser Unterschied an Tag 8 stärker ausgeprägt war als an Tag 4. Dies konnte hauptsächlich an dem Verlust der Kryptenstruktur und der Epithelzellen der intestinalen Mukosa festgemacht werden. Die HMGB1-spezifische Färbung zeigte neben der Deletion von HMGB1 aus den Epithelzellen, dass die Zellkerne der Epithelzellen in den *Hmgb1^{fl/fl}* Mäusen an Tag 4 und Tag 8 der DSS-Behandlung weniger stark und klar begrenzt gefärbt waren als in den unbehandelten Gesundkontrollen (Abbildung 16 B). Dies deutet auf eine Translokation von HMGB1 aus dem Zellkern ins Zytosol der Epithelzellen als Reaktion auf die DSS-Exposition hin.

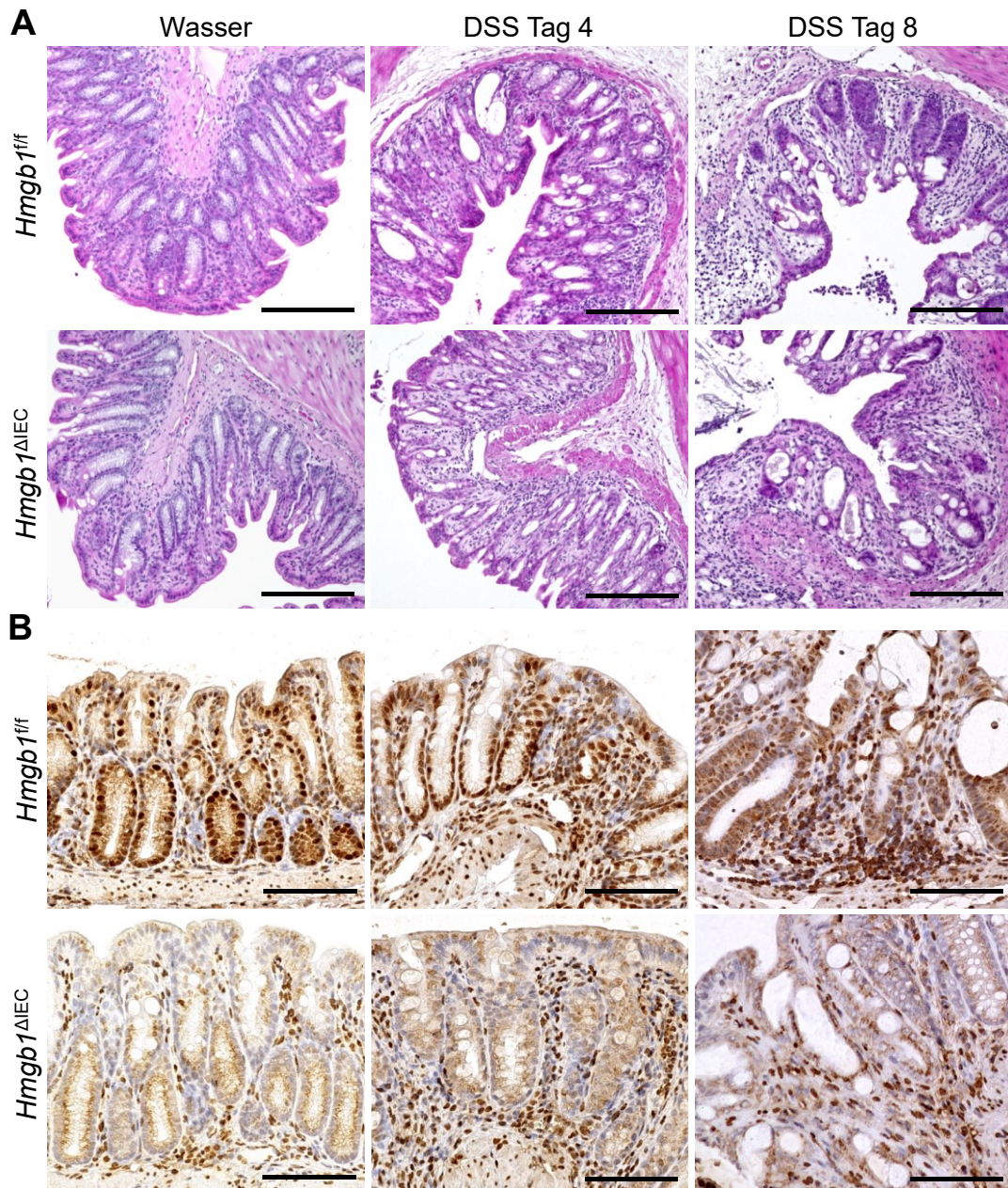


Abbildung 16 | Einfluss von epithelialem HMGB1 auf Gewebestruktur im Kolon in DSS-behandelten Mäusen.

Zur Analyse der Gewebestruktur der Mukosa wurden Querschnitte der Kolons von *Hmgb1^{fl/fl}* und *Hmgb1^{ΔIEC}*-Mäuse nach 4 bzw. 8 Tagen DSS-Behandlung oder Wasser als Kontrolle gefärbt. A) H&E-Färbung, Skalierung: 100 µm, und B) HMGB1-spezifische IHC des Kolons. Skalierung: 100 µm.

Durch die bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von HMGB1 in Epithelzellen zu einer stärker ausgeprägten DSS-induzierten Colitis sowohl hinsichtlich der morphologischen/histologischen Parameter als auch bzgl. der Immunzellinfiltration führt. Wie in Abbildung 14 D gezeigt, verändert eine vorliegende Colitis ebenfalls das Expressionsprofil im Gesamtdarmgewebe. In Abbildung 17 sind daher die Auswirkungen des epithelialen HMGB1-KO auf die Expression von inflammatorischen Genen dargestellt. Die HMGB1-Expression im Gesamtdarmgewebe beträgt in HMGB1-KO Mäusen

8,9 % des regulären Expressionsniveaus wie es in den geflochten Mäusen vorliegt. Somit konnte die HMGB1-Expression durch die Epithel-spezifische Deletion signifikant reduziert werden ($p < 0,0001$). An Tag 4 der DSS-Behandlung lag das Expressionsniveau von HMGB1 in den epithelialen HMGB1-KOs bei 23,2 % und an Tag 8 bei 100 % des Vergleichsniveaus der unbehandelten geflochten Mäuse. Da das Expressionsniveau auch in den geflochten Mäusen unter der DSS-Behandlung verglichen zu der Wasserkontrolle anstieg, unterschieden sich die Genotypgruppen trotz des starken Expressionsanstiegs in den deletierten Mäusen zu jedem der gemessenen Zeitpunkte signifikant ($p_{\text{Tag 4}}=0,0120$; $p_{\text{Tag 8}}=0,0006$). Zusätzlich wurde die Transkription des Gens *Ager*, das für den Hauptrezeptor RAGE kodiert, gemessen. Hier konnten keine Unterschiede in Gesundkontrollen oder in DSS-behandelten Mäusen an Tag 4 verzeichnet werden, jedoch eine gesteigerte Expression an Tag 8 in *Hmgb1*^{ΔIEC} verglichen zu geflochten Mäusen ($p=0,0360$) (Abbildung 17 A). Neben der Expression von *Hmgb1* und *Ager*, die bei Interaktion u.a. verantwortlich für die Aktivierung des pro-inflammatorischen NF-κB-Signalwegs sind, wurden die folgenden z.T. immunregulatorischen Gene (*Tnf*, *Il6*, *Il1b*, *Cxcl2*, *Nos2*, *Arg1* sowie [nicht gezeigt] *Tgfb*, *Ccl2*, *Ifng*, *Mmp9*, *S100a8*, *Cxcl12*, *Nfkb1*, *Retn1a*, *Chil3*) untersucht (Abbildung 17 B). Neben der stärkeren Gen-Expression der sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Marker (M1 bzw. M2), die durch die DSS-Behandlung in den Mäusen beider Genotypen (an Tag 8) induziert wurde, zeigte sich für fast alle gemessenen Gene ein signifikant stärkerer Anstieg der Transkription in den *Hmgb1*^{ΔIEC} Tieren, außer für *Ifng*, *Chil3* und *Retn1a*. Dies unterstreicht den ausgeprägten Phänotyp der DSS-Colitis bei einer Deletion von epithelialelem HMGB1 im Darm. Allerdings geben diese Analysen keinerlei Aufschluss darüber, welche Veränderung die Verschlechterung des Krankheitsverlaufs ab Tag 4 initial bewirkt. Zur Überprüfung einiger Grundmechanismen wurde die Transkription der *Mucin 1* und *2*, die für den Aufbau des Mukus im Darmlumen und somit für den Schutz der intestinalen Barrieren auf apikaler Seite relevant sind. Außerdem wurde die Transkription des *tight junction* Proteins *Occludin* überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Genotypen wiesen in allen Fällen ein vergleichbares Transkriptionsniveau dieser Gene auf. Die Transkription dieser für die mechanische Schutzfunktion der Darmbarriere wichtigen Faktoren schien von der HMGB1-Deletion somit nicht beeinträchtigt zu sein.

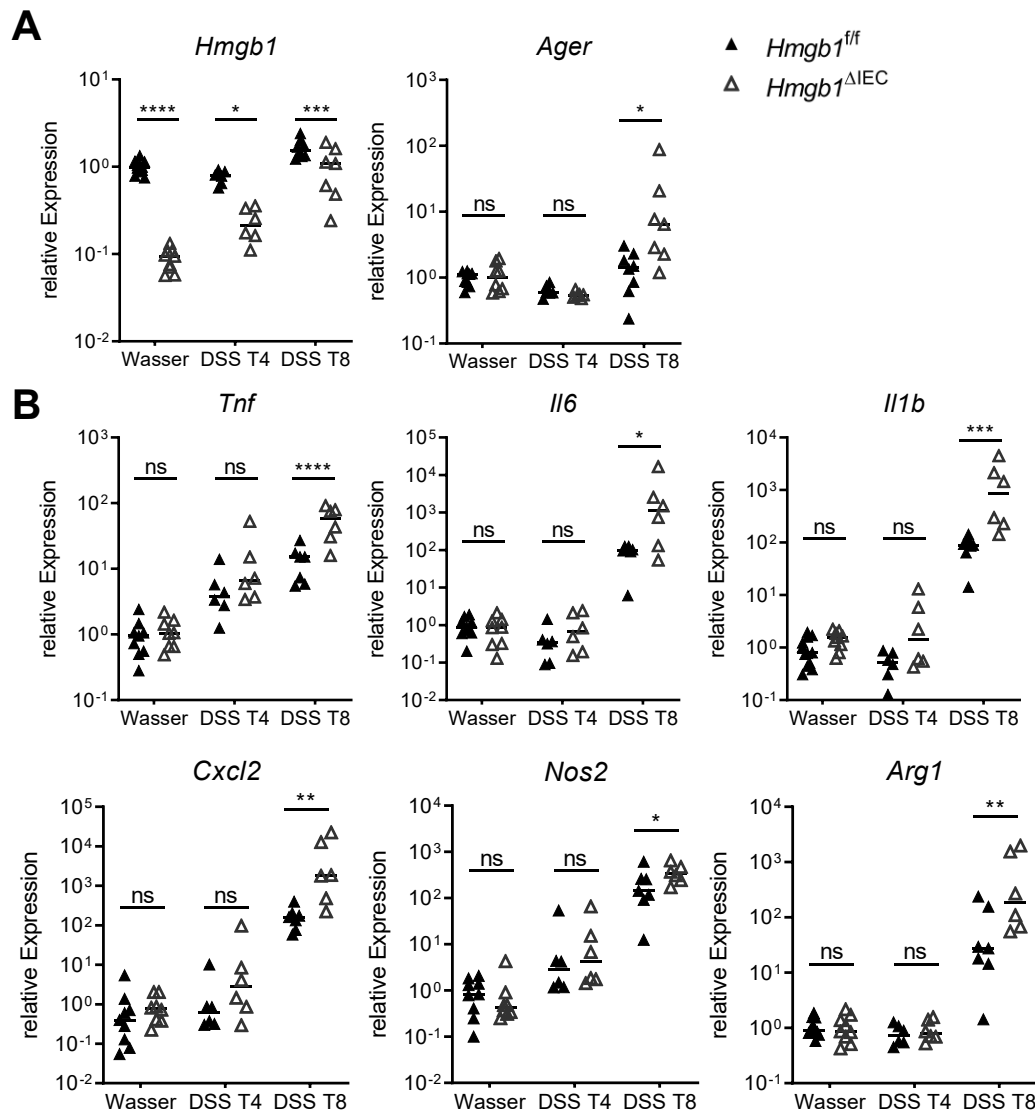


Abbildung 17 | Einfluss von epithelialem HMGB1 auf die Expression von Entzündungsmarkern während der DSS-induzierten Colitis.

Die relative Expression wurde in Gesamtdarmgewebe von *Hmgb1^{fl/fl}* und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäusen nach 4 bzw. 8 Tagen DSS-Behandlung oder Wasser als Gesundheitskontrolle gemessen ($n_{fl/fl\ Wasser}=9-12$; $n_{\Delta IEC\ Wasser}=8-9$; $n_{fl/fl\ Tag\ 4}=6$; $n_{\Delta IEC\ Tag\ 4}=6$; $n_{fl/fl\ Tag\ 8}=7-8$; $n_{\Delta IEC\ Tag\ 8}=6-7$). Die Werte sind auf die *Hmgb1^{fl/fl}* Wasser Kontrollgruppe normalisiert. Expression von A) *Hmgb1* und *Ager* sowie B) der Entzündungsmarker (*Tnf*, *Il6*, *Il1b*, *Cxcl2*, *Nos2*, *Arg1*) von *Hmgb1^{fl/fl}* und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäusen an Tag 0, 4 und 8 während der DSS-Colitis. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA Test.

3.2.1 HMGB1 aus Epithelzellen hat weder Einfluss auf den apoptotischen Prozess im DSS-geschädigten Epithel noch auf die Autophagie-Aktivität

Für den Aufbau der intestinalen Barriere sind eine intakte Proliferation, die Zellmigration sowie das *cell shedding* der Epithelzellen entscheidende Faktoren. Das *cell shedding* hängt von dem Apoptosemechanismus ab, der durch verschiedene Moleküle reguliert wird. An Tag 4 der DSS-Colitis und in Wasser-Kontrollen beider Genotypen wurden die Marker *Fas ligand*, *Casp8* und der anti-apoptischen Marker *Bcl-2* auf Transkriptionsebene untersucht, um mögliche Unterschiede aufzudecken, die durch die HMGB1-Deletion

hervorgerufen werden könnten (Ergebnisse nicht gezeigt). Es konnten keine Defizienz-abhängigen Unterschiede in der Transkription der genannten Gene festgestellt werden. Anhand der Analyse der Gewebeschnitte mittels TUNEL-Färbung konnten weder in unbehandelten Mäusen ($Hmgb1^{ff} = 14,7/\text{Schnitt}$; $Hmgb1^{\Delta IEC} = 14,6/\text{Schnitt}$; $p > 0,9999$) noch im Verlauf an Tag 3 (nicht gezeigt), Tag 4 ($Hmgb1^{ff} = 75,3/\text{Schnitt}$; $Hmgb1^{\Delta IEC} = 67,2/\text{Schnitt}$; $p = 0,9947$) oder zum Krankheits-Maximum an Tag 8 ($Hmgb1^{ff} = 58,1/\text{Schnitt}$; $Hmgb1^{\Delta IEC} = 69,3/\text{Schnitt}$; $p = 0,9649$) der DSS-Behandlung Unterschiede in der Frequenz der TUNEL-positiven Zellen beider Genotypen festgestellt werden (Abbildung 18). Die Anzahl der TUNEL-positiv gefärbten Zellen in der Mukosa steigt zwar im Verlauf der Colitis, jedoch in beiden Genotyp-Gruppen gleichermaßen. An Tag 4 der DSS-Behandlung ist sowohl im Gewebe der geflochten als auch der KO-Mäuse ein signifikanter Anstieg der TUNEL-positiven Zellen erkennbar ($p_{ff \text{ Wasser:DSS T4}} = 0,0036$; $p_{\Delta IEC \text{ Wasser:DSS T4}} = 0,0304$). An Tag 8 steigt die Anzahl dieser Zellen nicht weiter an ($p_{ff \text{ DSS T4:T8}} = 0,8399$; $p_{\Delta IEC \text{ DSS T4:T8}} > 0,9999$). Durch den Verlust der charakteristischen Krypten-Struktur der Mukosa kann im Verlauf der Colitis nicht mehr eindeutig bestimmt werden, ob es sich bei den apoptotischen Zellen um Epithelzellen oder um infiltrierte Immunzellen handelt.

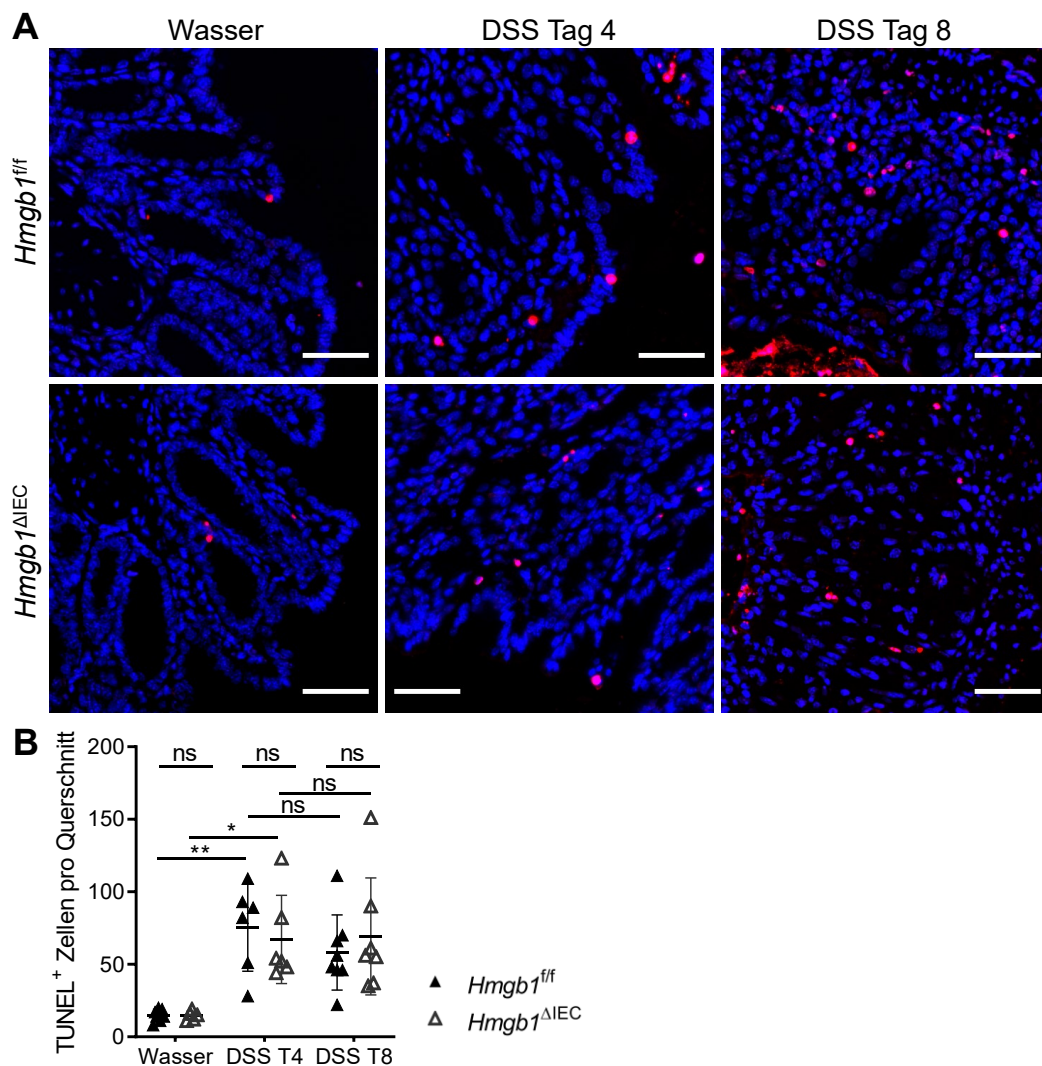


Abbildung 18 | Auswirkung der epithelialen HMGB1-Deletion auf die apoptotischen Prozesse in der Epithelschicht.

Querschnitte des Kolons von *Hmgb1^{fl/fl}* und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäusen nach 4 bzw. 8 Tagen DSS-Behandlung oder Wasser als Gesundheitskontrolle wurden zur Analyse der apoptotischen Zellen gefärbt und ausgewertet ($n_{fl/fl\text{ Wasser}}=7$; $n_{\Delta IEC\text{ Wasser}}=5$; $n_{fl/fl\text{ Tag 4}}=6$; $n_{\Delta IEC\text{ Tag 4}}=6$; $n_{fl/fl\text{ Tag 8}}=8$; $n_{\Delta IEC\text{ Tag 8}}=7$). TUNEL-Färbung repräsentativer Ausschnitte der Querschnitte (Zellkerne in DAPI = blau, apoptotische Zellen in TMR = rot; Skalierung: 50 μm) und die dazugehörige Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA Test.

Ein wichtiger Prozess für das Überleben der Zellen ist die Autophagie. Autophagie spielt in idiopathischen CEDs eine wichtige Rolle, da durch das „Recycling“ von Zellorganellen und die Verstoffwechslung eigener Abbauprodukte die Homöostase und somit das Überleben der Zellen gesichert werden soll. Eine Störung dieser Prozesse kann zu einer Verstärkung der CED führen, da bspw. der phagozytotische Abbau von apoptotischen Zellen durch eine Reduktion der Autophagie in Immunzellen nicht mehr korrekt abläuft oder die Zellen bei einer zu starken Autophagie-Induktion absterben [199], [200]. Daher wurden die Autophagie-Marker *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (LC3) und *sequestosome 1* (p62) im Darmgewebe getestet [201]. Dabei ist im Fall von LC3 das Verhältnis von Lipid-konjugiertem LC3II zur Vorstufe LC3I entscheidend und somit der geringe

Gewichtsunterschied dieser beiden Formen [202]. Aufgrund dessen wurden die Autophagie-Marker mittels Western-Blot untersucht. Im Western-Blot konnten auch für diese Marker-Proteine keine Unterschiede in der im Kolongewebe vorliegenden Menge zwischen den Genotypen in den Wasser-Proben oder Tag 3 der DSS-Proben nachgewiesen werden (Abbildung 19 A, B). Ein Anstieg DSS-bedingter Anstieg von LC3I oder LC3II war in beiden Genotypen nicht zu erkennen. Der Autophagie-Rezeptor p62, der u.a. für den Abbau vorgesehene Proteine an Autophagosomen bindet, wird dabei selbst zum Substrat und somit ebenfalls im Prozess der Autophagie abgebaut. Somit sagt auch die im Gewebe vorhandene Proteinkonzentration etwas über die Aktivität der Autophagie aus. Für p62 zeigte sich weder zwischen den Genotypen noch zwischen den Wasserkontrollen und den Tag 3 DSS-Proben ein deutlicher Unterschied.

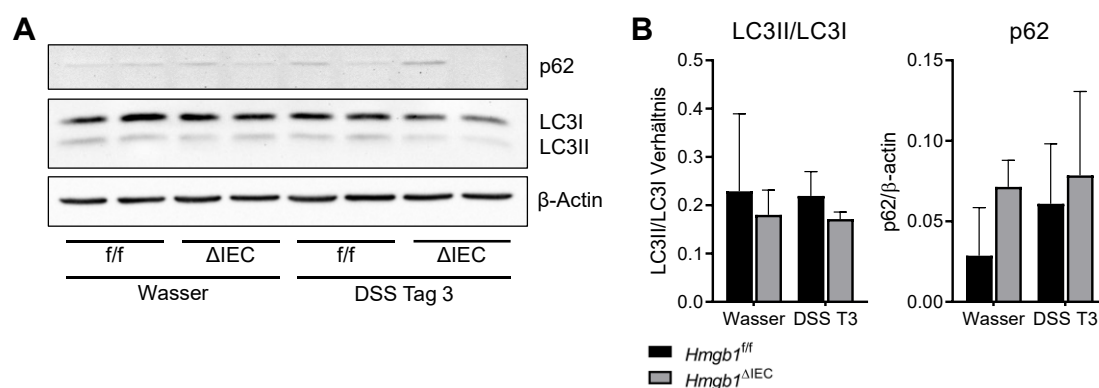


Abbildung 19 | Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf Marker-Proteine der Autophagie im Kolon.

Für die Analyse der Autophagie-Marker wurden Proteine aus Kolongewebe nach 3-tägiger DSS-Behandlung (DSS T3) bzw. Wasser als Kontrolle isoliert und verwendet (n=2 je Gruppe). A) Repräsentativer Western-Blot Gesamtdarmgewebe-Lysaten für die Proteine p62 und B) Quantifizierung der LC3II Levels im Verhältnis zu LC3I (LC3I Umsatz zu LC3II) sowie von p62 zu β-Actin (alle Proteine sind normalisiert auf β-Actin). Eine statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Probenzahl nicht sinnvoll.

3.3 HMGB1 myeloiden Ursprungs ist für die Entstehung und den Verlauf der DSS-induzierten Colitis nicht essentiell.

Es ist bekannt, dass myeloide Immunzellen HMGB1 (abhängig vom Oxidationszustand als Zytokin oder Chemokin) aktiv freisetzen können. Dazu gehören u.a. Monozyten und Makrophagen [92], [110], [203]. Da die Epithelzellen zumindest für das im Serum freie HMGB1 während einer akuten schweren Colitis nicht allein als Hauptquelle in Frage kamen, sollte im Folgenden die Relevanz von HMGB1 myeloiden Ursprungs ergänzend analysiert werden. Dafür wurde der Verlauf der DSS-induzierten Colitis zwischen *Hmgb1^{ΔLysM}* und *Hmgb1^{ff}* Mäusen verglichen. Sowohl unbehandelte als auch DSS-behandelte *Hmgb1^{ΔLysM}* und *Hmgb1^{ff}* Mäuse unterschieden sich weder hinsichtlich der Gewichtsentwicklung noch bzgl. der Kolonlänge (Abbildung 20 A, B). Sowohl die geflochten (-14 %) als

auch die deletierten Mäuse (-16 %) verloren bis Tag 8 etwa gleich viel Gewicht bezogen auf ihr Ausgangsgewicht. Die Kolonlänge war an Tag 10 der DSS-Behandlung in den geflochtenen Mäusen verglichen zu den geflochtenen Gesundkontrollen um 1,85 cm verringert ($p=0,0338$), in den KO-Mäusen lag eine Längen-Differenz von 2,13 cm im Vergleich zu den KO-Kontrollen vor ($p=0,0102$). Genotyp-spezifische Unterschiede waren weder in den Wasser-Kontrollen noch in den DSS-behandelten Mäusen zu verzeichnen. Auch bei der Kolonoskopie wurde deutlich, dass die myeloide Deletion von HMGB1 keinen Einfluss auf den Verlauf bzw. den Schweregrad der DSS-induzierten Colitis zu haben scheint. An Tag 4 wurden die *Hmgb1^{fl/fl}* Mäuse mit einem Endoskopischen Index von 3,9 bewertet, die *Hmgb1^{ΔLysM}* mit 3,2, wobei die Streuung in beiden Gruppen recht stark war und sich keine signifikanten Unterschiede abzeichneten. An Tag 8 zeigte sich mit einem Index von 7,95 für die *Hmgb1^{fl/fl}* und 7,2 für die *Hmgb1^{ΔLysM}* Mäuse, bei starker Streuung ein ähnliches Bild (Abbildung 20 C). An Tag 8 lagen signifikante Unterschiede zwischen den DSS-behandelten Mäusen und den Wasser-Kontrollmäusen beider Genotypen vor ($p_{fl/fl\text{ Wasser:DSS T8}}=0,0217$; $p_{\Delta\text{LysM Wasser:DSS T8}}=0,0071$). An Tag 8 waren in beiden Genotypgruppen Tiere vorzeitig gemäß den Abbruchkriterien aus dem Versuch entnommen worden, die mit dem höchsten Index von 12 bewertet wurden und somit in die Auswertung einfließen. Die vorzeitige Entnahme geschah vor der Messung des Körpergewichts, wodurch sich die Gruppennzahlen der verschiedenen Auswertungen unterscheiden. Die Organentnahme wurde am 10. Tag der Colitis durchgeführt. Da einige Tiere vorzeitig aus dem Versuch entnommen wurden, ist der Gewichtsverlauf lediglich bis Tag 8 dargestellt. Die Analyse der infiltrierten Immunzellen ergab in den DSS-behandelten Mäusen einen Anstieg von $\text{Cd11b}^+ \text{Ly-6G}^+$ neutrophilen Granulozyten, $\text{Cd11b}^+ \text{Ly-6C}^{\text{high}} \text{F4/80}^{\text{int}}$ inflammatorischen Monozyten und $\text{Cd11b}^+ \text{Ly-6C}^{\text{int}} \text{F4/80}^{\text{high}}$ Makrophagen an Tag 10 der Colitis verglichen zu den gesunden Kontrolltieren (Abbildung 20 D). Zwischen den Genotypen gab es jedoch keine erkennbaren Unterschiede. Diese Erkenntnisse ließen darauf schließen, dass HMGB1 myeloiden Ursprungs bei der akuten DSS-induzierten Colitis pathophysiologisch nicht unmittelbar relevant ist.

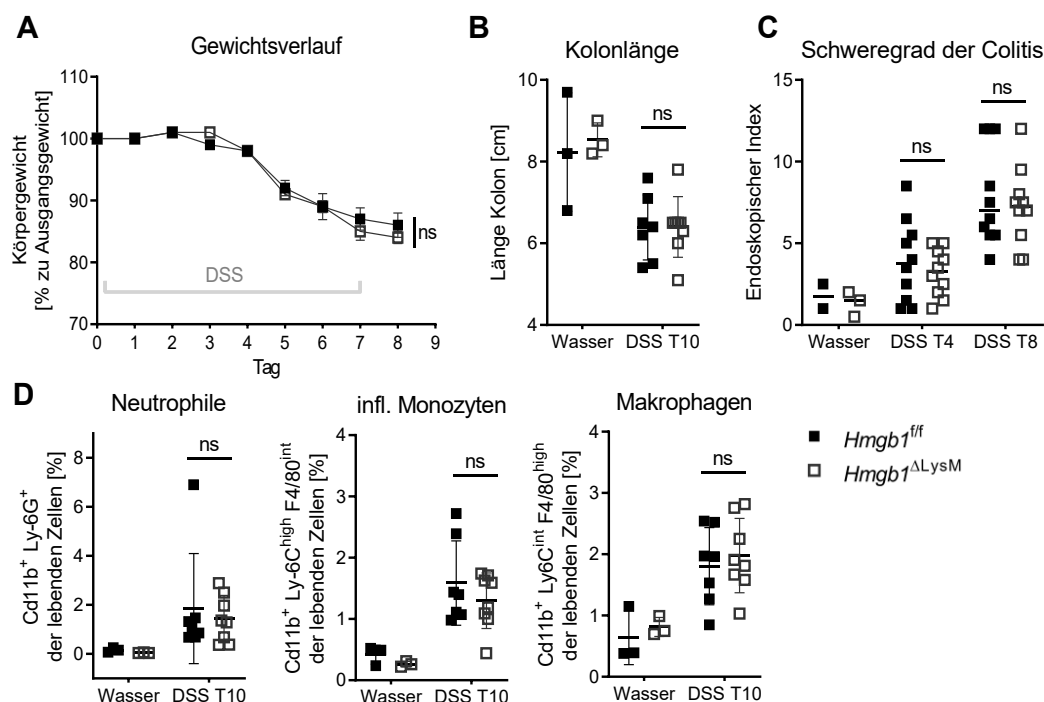


Abbildung 20 | Auswirkung der myeloiden HMGB1-Deletion auf die DSS-induzierten Colitis. *Hmgb1^{f/f}* und *Hmgb1^{ΔLysM}*-Mäuse wurden für insgesamt 10 Tage mit DSS-versetztem Trinkwasser zur Induktion einer Colitis behandelt. Als gesunde Kontrollen wurden unbehandelte Wurfgeschwister (Wasser) verwendet (n_{Wasser}=2-3; n_{ΔLysM Wasser}=3; n_{DSS T4}=10 je Genotyp; n_{f/f DSS T8}=7-10; n_{ΔIEC DSS T8}=9-10; n_{f/f DSS T10}=7; n_{ΔIEC DSS T10}=8). A) Verlauf des Körpergewichts B) Länge des Kolons C) Schweregrad der Colitis D) Infiltration von Ly-6G⁺ Neutrophilen, Ly-6C^{high} inflammatorischen Monozyten und F4/80^{high} Makrophagen ins Kolongewebe. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA Test.

3.4 Die HMGB1-Defizienz in intestinalen Epithelzellen hat keinen Einfluss auf den Verlauf der milderen *C. rodentium*-induzierten Colitis

Das gramnegative Maus-Darmbakterium *Citrobacter rodentium* teilt einige Eigenschaften mit humanen enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) [178]. So dient es im Mausmodell der Erforschung der mukosalen Immunantwort im Zusammenhang mit dem Mikrobiom. HMGB1 interagiert in vielen Fällen mit Pathogen-assoziierten PAMPs wie z.B. LPS bei gramnegativen Bakterien, um als Co-Stimulator eine Immunantwort auszulösen [19], [97], [137]. Um die Relevanz von epitheliale HMGB1 in diesem Zusammenspiel zu analysieren, eignet sich die Bakterien-induzierte Colitis durch *C. rodentium* an dieser Stelle besonders. Die konditionellen KO-Mäuse (*Hmgb1^{ΔIEC}*) und wildtypische Mäuse (*Hmgb1^{f/f}*) wurden dafür mit einer Menge von 2x10⁹ koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU) von *C. rodentium* per Schlundsonde (*oral gavage*) infiziert. Die Kontrollmäuse wurden gleichzeitig mit demselben Applikationsvolumen mit PBS behandelt. Die infizierten Mäuse verloren in den ersten zwei Tagen der Infektionsphase 12 % (*Hmgb1^{f/f}*) bzw. 7 % (*Hmgb1^{ΔIEC}*) ihres Ausgangsgewichts, wobei die Genotypen sich nicht signifikant unterschieden (Abbildung 21 A). Die

Kontrollmäuse aus beiden Genotyp-Gruppen hingegen verloren nicht an Gewicht. Die infizierten Mäuse erholten sich vom Gewichtsverlust, sodass dieser an Tag 7 nach Infektion nicht mehr zu verzeichnen war. Die Kolonlänge der infizierten Mäuse beider Genotypen (*Hmgb1^{ff}*: 7,8 cm; *Hmgb1^{ΔIEC}*: 8,0 cm) unterschied sich nicht verglichen mit der Kolonlänge der Kontrollmäuse (*Hmgb1^{ff}*: 9,0 cm; *Hmgb1^{ΔIEC}*: 8,5 cm) (Abbildung 21 B). Zwischen den Genotypen war ebenfalls kein Unterschied erkennbar. Da die HMGB1-Konzentration im Serum eine Art Biomarker für die humane CU und die murine DSS-Colitis darstellte, wurde diese auch nach der *C. rodentium* Infektion mittels ELISA getestet (Abbildung 21 C). Die HMGB1-Konzentration im Serum der infizierten Mäuse (*Hmgb1^{ff}*: 18,75 ng/ml; *Hmgb1^{ΔIEC}*: 16,35 cm) war verglichen zu den Kontrollmäusen (*Hmgb1^{ff}*: 13,44 ng/ml; *Hmgb1^{ΔIEC}*: 17,22 cm) nicht signifikant erhöht. Die Genotyp-Gruppen unterschieden sich zu keinem der gemessenen Zeitpunkte voneinander. Zur Analyse der Bakterienkolonisierung im Darm, wurde der Stuhl der infizierten Mäuse auf *C. rodentium* analysiert. Im Stuhltiter war kein Unterschied zwischen den *Hmgb1^{ff}* ($9,3 \times 10^{10}$ CFU/g Stuhl) und den *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäusen ($9,6 \times 10^{10}$ CFU/g Stuhl) zu verzeichnen (Abbildung 21 D). Die Höhe des Titers sagt dabei nichts über den Schweregrad der Colitis aus, sondern dient dem Nachweis der erfolgreichen Infektion und auf potentielle Unterschiede der Kolonisierung aus. Auf die Co-Stimulation durch HMGB1 und PAMPs können hauptsächlich Immunzellen des angeborenen Immunsystems reagieren, die entsprechende PRRs wie RAGE und TLRs auf ihrer Oberfläche exprimieren. Durch die Stimulation dieser Rezeptoren, werden weitere immunrelevante Prozesse angestoßen sowie die Rekrutierung dieser Zellen gesteuert [22], [204], [205]. Um die Infiltration dieser Zellen im Zusammenhang mit der bakteriellen Infektion und der epithelialen *Hmgb1*-Deletion zu überprüfen, wurden die Immunzellen aus dem entnommenen Darmgewebe beider Gruppen isoliert und mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Die infizierten Mäuse beider Genotypen wiesen gleichermaßen tendenziell erhöhte Mengen von infiltrierten Cd11b⁺ Ly-6G⁺ Neutrophilen und Cd11b⁺ Ly-6C^{high} F4/80^{int} inflammatorischen Monozyten im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen auf (Abbildung 21 E). Die Genotypen unterschieden sich jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte.

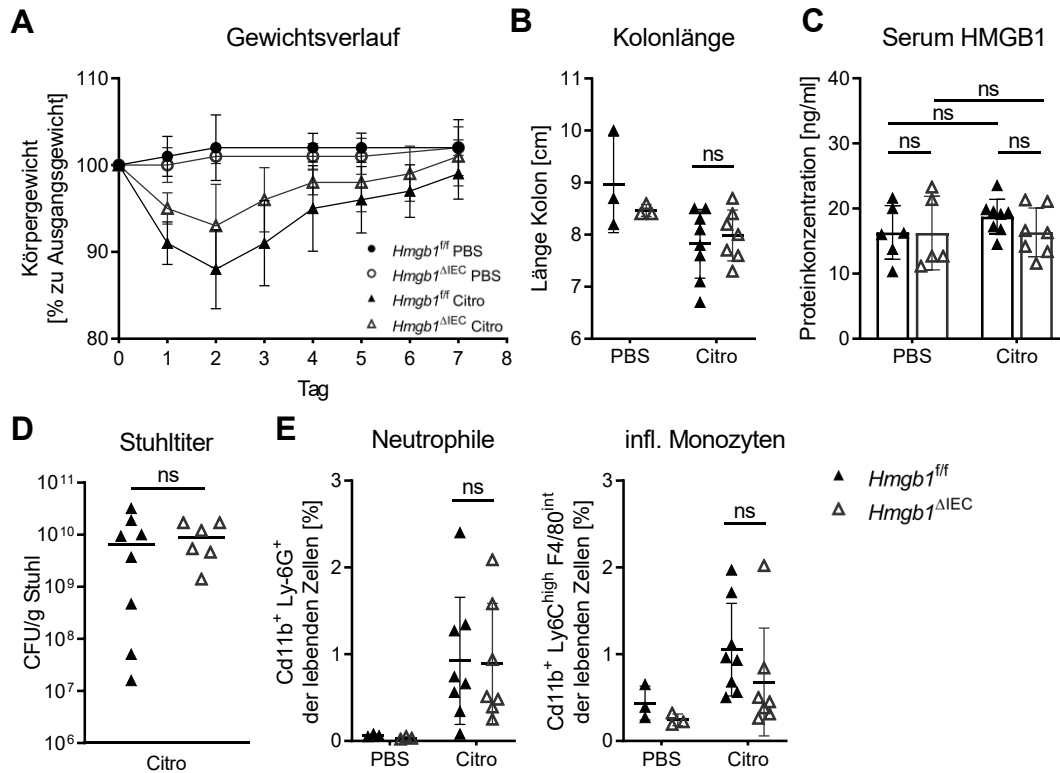


Abbildung 21 | Auswirkung der epithelialen HMGB1-Deletion auf den Verlauf der *C. rodentium* Infektion.

Hmgb1^{fl/fl} und *Hmgb1^{ΔIEC}* wurden mit *C. rodentium* infiziert und für 7 Tage beobachtet. Als gesunde Kontrollen wurden PBS-gavagierte Wurfgeschwister verwendet, welche separat von den infizierten Mäusen gehalten wurden ($n_{fl/fl\ PBS}=3-6$; $n_{ΔIEC\ PBS}=2-5$; $n_{fl/fl\ Citro}=8$; $n_{ΔIEC\ Citro}=6-7$). A) Verlauf des Körpergewichts. B) Kolonlänge. C) HMGB1-Konzentration im Serum. D) Bakterientiter in infizierten Mäusen. E) Infiltration von Ly-6G⁺ Neutrophilen und Ly-6C^{high} inflammatorischen Monozyten ins Kolongewebe. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA Test.

Ein weiteres wichtiges Merkmal sowie messbarer Parameter der *C. rodentium* Infektion ist die Verdickung der Epithelschicht. Diese wurde anhand der Hämalaun & Eosin (H&E) Färbung der Kolon-Querschnitte in jeder Maus gemessen (Abbildung 22 A). Im Vergleich zu den Kontrollmäusen war eine Verdickung der Epithelschicht in den infizierten Mäusen deutlich erkennbar (gelbe Markierung). In den *Hmgb1^{fl/fl}* Mäusen war die Epithelschicht 174,0 μm dick, in den *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäusen 167,4 μm. Hier lag kein Unterschied vor. In den infizierten Mäusen war die Epithelschicht der *Hmgb1^{fl/fl}* (222,5 μm) und *Hmgb1^{ΔIEC}* Versuchsgruppe (236,4 μm) ähnlich stark verdickt im Vergleich zu den gesunden Mäusen. Die HMGB1-spezifische Färbung bestätigt die erfolgreiche Deletion von HMGB1 aus den intestinalen Epithelzellen der *Hmgb1^{ΔIEC}* Tiere. Weiterhin zeigen die histologischen Bilder, dass kein Unterschied im Gewebezustand oder der Krypten- und Zottenstruktur zwischen den Genotypen vorlag (Abbildung 22 B). Vergleicht man die Lokalisation von HMGB1 in den infizierten und gesunden *Hmgb1^{fl/fl}* Mäusen sind keine gravierenden Veränderungen sichtbar.

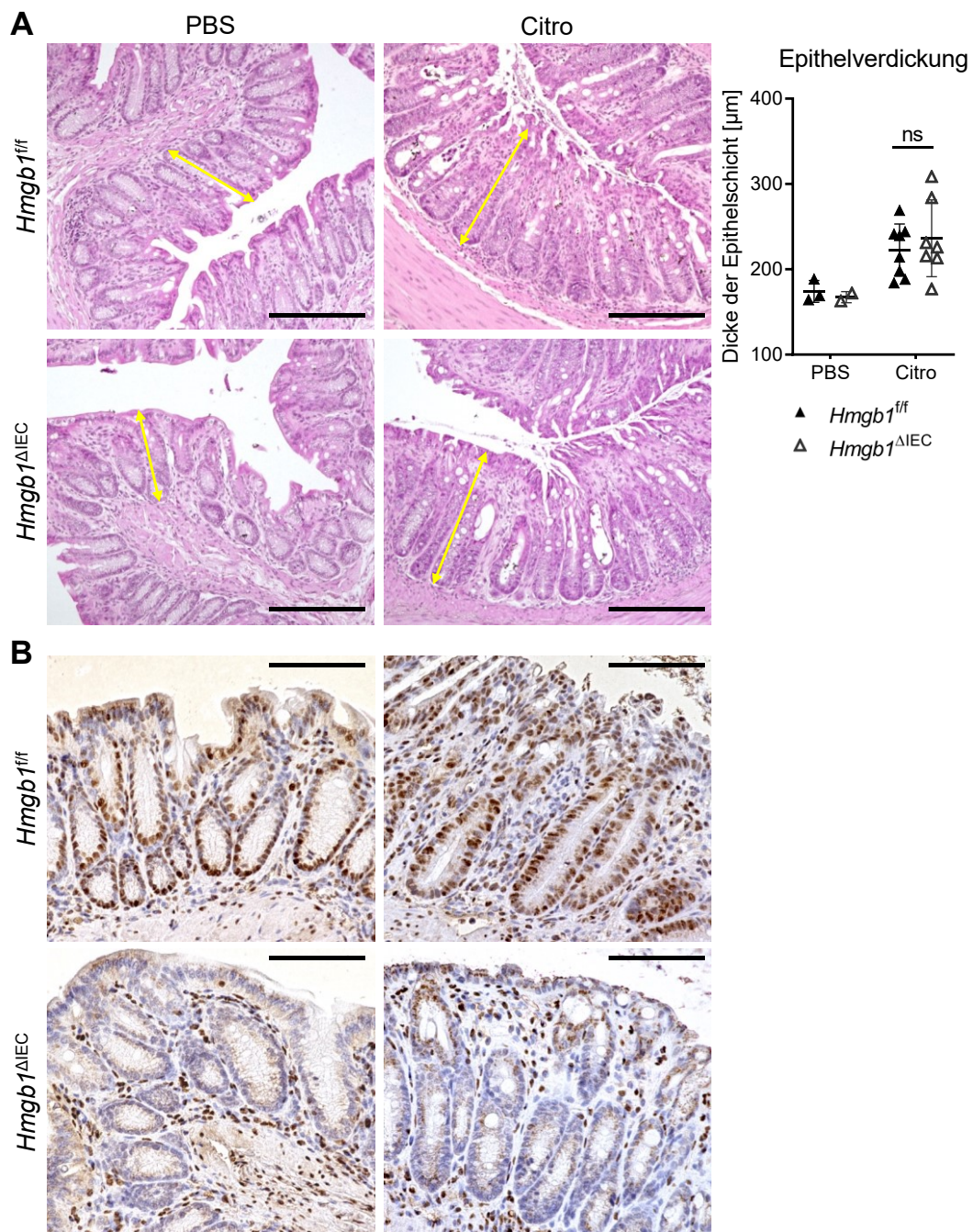


Abbildung 22 | Epithelverdickung und HMGB1-Expressionsmuster nach *C. rodentium* Infektion und HMGB1-Deletion in Epithelzellen.

Hmgb1^{fl/fl} und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäuse wurden mit *C. rodentium* infiziert und der Krankheitsverlauf für 7 Tage beobachtet. Als gesunde Kontrollen wurde Wurfgeschwistern PBS gavagiert ($n_{fl/fl\ PBS}=3$; $n_{ΔIEC\ PBS}=2$; $n_{fl/fl\ Citro}=8$; $n_{ΔIEC\ Citro}=7$). A) H&E Färbung (Epitheldicke in Gelb eingezeichnet) und Quantifizierung (siehe Graph, rechts). Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA Test; Skalierung: 100 µm. B) HMGB1-spezifische immunhistochemische Färbung. Skalierung: 200 µm.

Die qPCR-Analyse ergab, dass, im Vergleich zu den Ergebnissen der Kontrolltiere, eine verstärkte Induktion für die Gene *Il6*, *Cxcl2*, *Nos2* und *Arg1* in den infizierten Mäusen vorlag (Abbildung 23). Die Transkription der Gene *Tnfa* und *Ifng* war in den infizierten Mäusen hingegen nicht erhöht und vergleichbar mit den PBS-Kontrollen. Innerhalb der infizierten

Versuchsgruppe konnten auf mRNA-Ebene der untersuchten Gene keine Genotyp-spezifischen Unterschiede festgestellt werden. Abschließend lässt sich sagen, dass durch die *C. rodentium* Infektion eine milde Form der Colitis (Kolonlänge, Epithelverdickung, erhöhte Entzündungsparameter und Infiltration von angeborenen Immunzellen) wurde und im Vergleich zur DSS-Colitis mit gravierendem epithelialen Zellschaden, ähnelt das *Citrobacter*-Modell eher einer einfacheren Durchfallerkrankung mit weniger ausgeprägtem Zellschaden. Die epitheliale HMGB1-Deletion hatte dabei keinen Einfluss auf den Verlauf der milden *Citrobacter*-vermittelten Colitis.

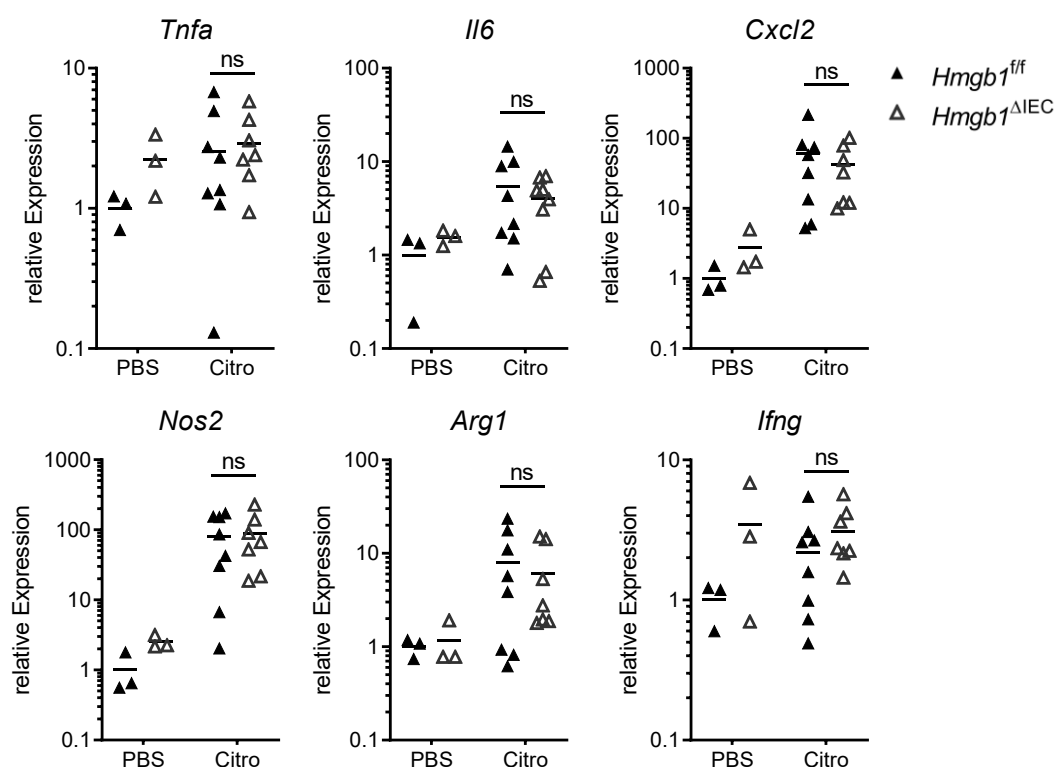


Abbildung 23 | Expression einiger Entzündungsmarker nach *C. rodentium* Infektion und HMGB1-Deletion in Epithelzellen.

Relative Expression von immunregulatorischen Molekülen in *C. rodentium*-infizierten *Hmgb1^{fl/fl}* und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäusen (Infektionstag 7) verglichen mit PBS-Kontrollen ($n_{fl/fl\ PBS}=3$; $n_{\Delta IEC\ PBS}=3$; $n_{fl/fl\ Citro}=8$; $n_{\Delta IEC\ Citro}=7$). Die Werte sind auf die *Hmgb1^{fl/fl}* PBS Kontrollgruppe normalisiert. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA Test.

3.5 HMGB1 hat keinen Effekt auf die chronische Cd45RB^{high}-induzierte Colitis.

Bislang konnte die Relevanz des epithelialen HMGB1 für den Verlauf der murinen DSS-Colitis gezeigt werden. Da die humanen CEDs jedoch sehr komplex sind, kann ein Mausmodell nicht alle involvierten Mechanismen abbilden, die eine CED auslösen oder beeinflussen [180]. Die T-Zell-vermittelte Colitis wird in immundefizienten *Rag^{-/-}* Mäusen durchgeführt (hier: *Rag^{-/-} Hmgb1^{fl/fl}* und *Rag^{-/-} Hmgb1^{ΔIEC}*), die keine T- oder B-Zellen besitzen.

Durch die Injektion von Cd45RB^{high} T-Zellen (Transfer) liegen ausschließlich diese transferierten T-Zellen vor, die von anderen T-Zellen wie supprimierenden T_{reg}-Zellen bspw. nicht reguliert werden können und sich somit ein entzündliches Milieu bildet. Dieses Modell unterscheidet sich dadurch grundlegend vom DSS-Modell, in dem die Entzündung durch Bakterien bzw. bakterielle Antigene in der Mukosa ausgelöst wird, die in Folge der Beschädigung der intestinalen Barriere durch die Salz-Exposition entsteht [206].

Der Gewichtsverlust dient auch innerhalb der Cd45RB^{high}-vermittelten Colitis als Merkmal des Krankheitsverlaufs. Da die PBS-Kontrollmäuse sich im Genotyp nicht unterschieden, wurden sie im Gewichtsverlauf zu einer Gruppe zusammengefasst. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen, die über einen Zeitraum von 44 Tagen 10 % bezogen auf ihr Ausgangsgewicht zunahmen, verloren die Transfer-Mäuse beider Genotypen ab Tag 20 nach dem Zelltransfer bis zum Tag der Organentnahme gleichermaßen an Gewicht ($p_{\text{PBS:Tag 44}} < 0,0001$; $p_{\Delta\text{IEC PBS:Tag 44}} < 0,0001$; $p_{\text{Tag 44 fff:}\Delta\text{IEC}} = 0,5380$) (Abbildung 24 A). In beiden Genotypen konnte an Tag 44 kein Anstieg der HMGB1-Konzentration im Serum im Vergleich zu den PBS-Kontrollen verzeichnet werden. Das Niveau des zirkulierenden Serum-HMGB1 war für alle vier Versuchsgruppen vergleichbar ($Hmgb1^{\text{fff}}_{\text{PBS}} = 10,6$ ng/ml; $Hmgb1^{\Delta\text{IEC}}_{\text{PBS}} = 15,1$ ng/ml; $Hmgb1^{\text{fff}}_{\text{Tag 44}} = 12$ ng/ml; $Hmgb1^{\Delta\text{IEC}}_{\text{Tag 44}} = 10,8$ ng/ml) (Abbildung 24 B). Die wöchentliche Koloskopie lieferte parallel zur Gewichtsmessung eine Bewertung des Krankheitszustandes. In Woche 4 des Versuchs wurden die Transfer-Mäuse mit einem signifikant höheren Endoskopischen Index bewertet als die PBS-Kontrollmäuse ($Hmgb1^{\text{fff}}_{\text{PBS}} = 0,6$; $Hmgb1^{\Delta\text{IEC}}_{\text{PBS}} = 0,7$; $Hmgb1^{\text{fff}}_{\text{Woche 4}} = 4,9$; $Hmgb1^{\Delta\text{IEC}}_{\text{Woche 4}} = 4,1$; $p_{\text{fff PBS:Woche 4}} = 0,0001$; $p_{\Delta\text{IEC PBS:Woche 4}} = 0,0039$). Auf diesem Niveau stagnierte die Bewertung für die darauffolgenden Versuchswochen. Zwischen den Genotypen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 24 C). Der Index erhöhte sich hauptsächlich durch die hohe Bewertung für die Granularität der Darminnenwand. Diese wurde auch bei der Organentnahme deutlich, da die Organe durch die Verdickung der Mukosa extrem versteift waren. Die Analyse der infiltrierten Immunzellen ergab, dass vor allem die Cd11b⁺ Ly-6G⁺ Neutrophilen signifikant ($p_{\text{fff PBS:Tag 44}} < 0,0001$; $p_{\Delta\text{IEC PBS:Tag 44}} = 0,0053$), aber auch die Cd11b⁺ Ly-6C^{high} F4/80^{int} inflammatorischen Monozyten tendenziell in beiden transferierten Genotypgruppen im Vergleich zu den PBS-Kontrollgruppe in erhöhter Frequenz im Gewebe vorlagen ($p_{\text{fff PBS:Tag 44}} = 0,0722$; $p_{\Delta\text{IEC PBS:Tag 44}} = 0,1450$) (Abbildung 24 D). Die Cd11b⁺ Ly-6C^{int} F4/80⁺ Makrophagen hingegen blieben prozentual unverändert. Zwischen den Genotypen war auch in dieser Analyse kein Unterschied zu vermerken. Anhand der H&E-Färbung des Kolongewebes wurde ebenfalls die Verdickung der Mukosa deutlich und zeigt zusätzlich den erhöhten Anteil von Immunzellen in der *Lamina propria*. Die mukosale Verdickung war in beiden Genotypen vergleichbar stark ausgeprägt (Abbildung 25).

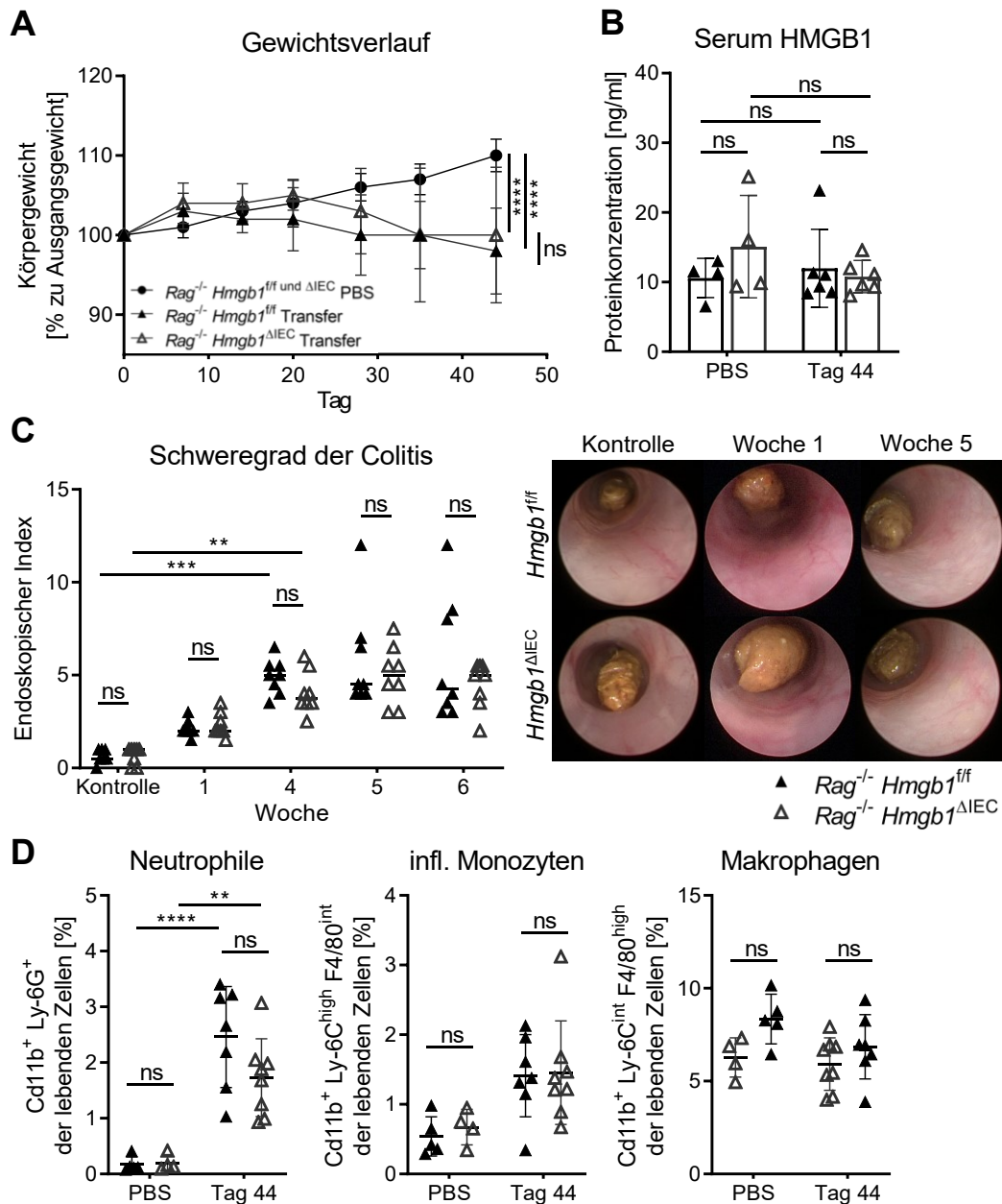


Abbildung 24 | Epitheliales HMGB1 im Verlauf der chronischen $Cd45RB^{high}$ T-Zell induzierten Colitis.

$Rag^{-/-} Hmgb1^{ff}$ und $Rag^{-/-} Hmgb1^{\Delta IEC}$ Mäusen wurden 4×10^5 $Cd45RB^{high}$ T-Zellen i.p. injiziert um eine chronisch verlaufende T-Zell-vermittelten Colitis zu induzieren. Als gesunde Kontrollmäuse wurden Wurfgeschwister verwendet, die mit demselben Applikationsvolumen PBS behandelt wurden ($n_{ff} \text{ PBS}=4-7$; $n_{\Delta IEC} \text{ PBS}=4-8$; $n_{ff} \text{ Tag } 44=6-8$; $n_{\Delta IEC} \text{ Tag } 44=6-8$). Die Mäuse wurden ab dem Zeitpunkt des Zell-Transfers über insgesamt 44 Tage (6 Wochen) beobachtet und u.a. auf A) den Verlauf des Körpergewichts, B) die HMGB1-Konzentration im Serum und C) den Schweregrad der Colitis untersucht. D) Frequenz der ins Kolongewebe infiltrierten $Ly-6G^{+}$ Neutrophilen, $Ly-6C^{high}$ inflammatorischen Monozyten und $F4/80^{high}$ Makrophagen. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA Test.

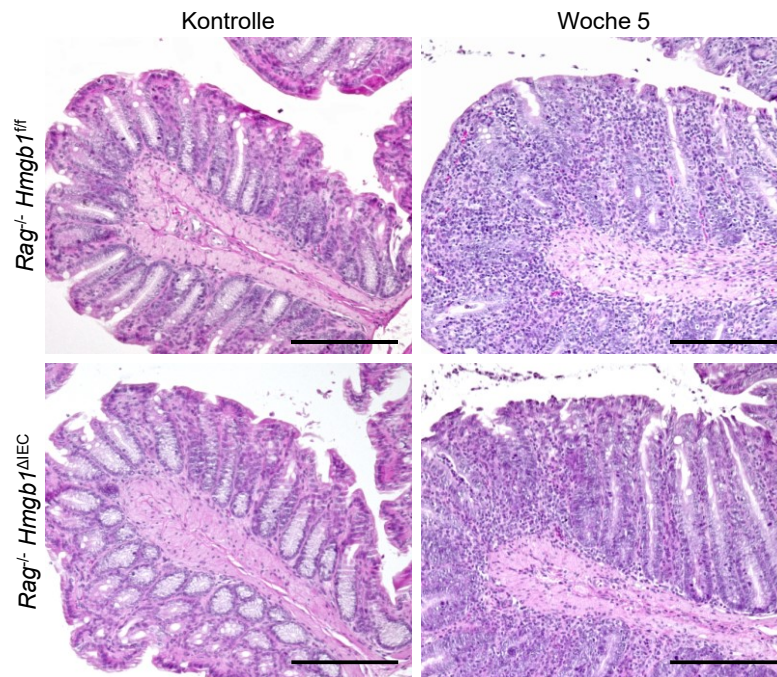


Abbildung 25 | Gewebeschädigung und Verdickung der Mukosa während der Cd45RB^{high}-induzierten Colitis.

Die H&E Färbung 5 Wochen nach dem Cd45RB^{high} T-Zell-Transfer gegenüber den gesunden Kontrolltieren (PBS) beider Genotypen (*Rag*^{-/-} *Hmgb1*^{ff} und *Rag*^{-/-} *Hmgb1*^{ΔIEC}). Skalierung: 200 μm.

Epitheliales HMGB1 hat einen protektiven Einfluss auf die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase während einer Entzündung mit starkem epithelialen Zellschaden. Eine milde Form der Colitis, die durch Bakterien induziert ist und eine T-Zell-vermittelte Inflammation bleiben von einer epithelialen HMGB1-Deletion hingegen unbeeinflusst. Dies könnte bedeuten, dass HMGB1 zumindest in diesem Zusammenhang keine elementare mechanistische Rolle zu spielen scheint bzw. die Funktion in den Epithelzellen oder das aus diesen Zellen freigesetzte HMGB1 kein Schlüsselkriterium für eine adäquate Immunantwort darstellt.

3.6 HMGB1 beeinflusst den Zellzyklus in der Mukosa in der frühen DSS-vermittelten Colitis.

Um Hinweise auf einen möglichen HMGB1-Mechanismus während der DSS-vermittelten Entzündung im Kolon zu erhalten, wurde eine RNA-Sequenzierung von Kolon-Gesamtgewebe aus unbehandelten und DSS-behandelten *Hmgb1*^{ff} und *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäusen kurz vor der phänotypischen Divergenz (DSS Tag 4; n=3 pro Gruppe) durchgeführt. In unbehandelten Mäusen waren nur wenige Gene zu identifizieren, welche zwischen den beiden Genotypen unterschiedlich reguliert waren (Abbildung 26 A). Dabei sind die Gene *Dhx58*, *Rec8*, *Baat*, *Cnbd2* und *Cd200r2* in *Hmgb1*^{ΔIEC} verglichen zu *Hmgb1*^{ff} Mäusen hochreguliert. Die Gene *Raet1e*, *Pcdh17*, *Olf78*, *Gnai1* und *Hmgb1* sind hingegen signifikant

herunterreguliert. Nach 4 Tagen der DSS-Behandlung wurden 21 Gene identifiziert, die in *Hmgb1*^{ΔIEC} signifikant herunterreguliert waren (z.B. besonders homogen in der gesamten Gruppe *Hoxd11* und *13*, *Olfr78*, *Evx2*, *Mcm2* und *Syce2*) und 2 hochregulierte Gene (*Apc2* und *Pcsk5*) (Abbildung 26 B). Zu beiden Zeitpunkten der DSS-Colitis konnte durch die *gene ontology* (GO) *enrichment* Analyse ausgeschlossen werden, dass diese Gene in Signalwege der Apoptose oder der Autophagie involviert waren. Aufgrund der geringen Anzahl an unterschiedlich regulierten Genen der Gesundheitskontrollen, wurde keine signifikante Steigerung oder Minderung bestimmter Signalwege ermittelt. Trotzdem lieferte die Analyse den Hinweis darauf, dass der Signalweg der Adenylylcyclase-Inhibierung, woran *Gnai1* beteiligt ist, durch die HMGB1-Deletion beeinflusst sein könnte (Abbildung 26 C). Die Analyse an Tag 4 ergab, dass die identifizierten Gene zumindest teilweise mit der Angeborenen Immunantwort und der Zellrekrutierung/Zytokin Signalweiterleitung in Verbindung gebracht werden konnten. Die unterschiedliche Regulation der Mehrheit der Gene weist jedoch eindeutig darauf hin, dass HMGB1 an Tag 4 der DSS-Colitis in Prozesse des Zellzyklus (Aktivierung des prä-replikativen Komplex und *G2/M Checkpoints*) involviert ist (Abbildung 26 D, FDR≤0,05). Diese Prozesse sind der *DNA damage response* während der Zellteilung zugeordnet. Ob diese Veränderungen tatsächlich intrazellulär in den Epithelzellen oder in infiltrierenden Zellen stattfindet, kann durch diese Sequenzierungsmethode nicht genau beantwortet werden, da es sich um Gesamtgewebe handelt und nicht um eine Einzelzellmethode. Dies sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Allerdings ist bekannt, dass sich die Stammzellaktivität und die damit verbundene Zellteilung in diesem Gewebe überwiegend auf die in den Krypten liegenden Lgr5⁺ Stammzellen beschränkt [207]–[209]. Ebenfalls ist durch eine aktuelle und sehr umfangreiche Sequenzierungsstudie bekannt, dass die Zellzyklusaktivität in der frühen Phase der DSS-Colitis (Tag 2 bis 4) als erstes hochreguliert wird bevor die Expression inflammatorischer Gene induziert wird und Immunzellen aktiv werden [210]. Weiterhin sind einige der identifizierten Gene an Tag 4 laut *The Human Protein Atlas* Epithelzell-spezifisch, was ebenfalls dafürspricht, dass in der Epithelschicht der KO-Mäuse Prozesse anders reguliert werden als in den geflochten Mäusen [211], [212].

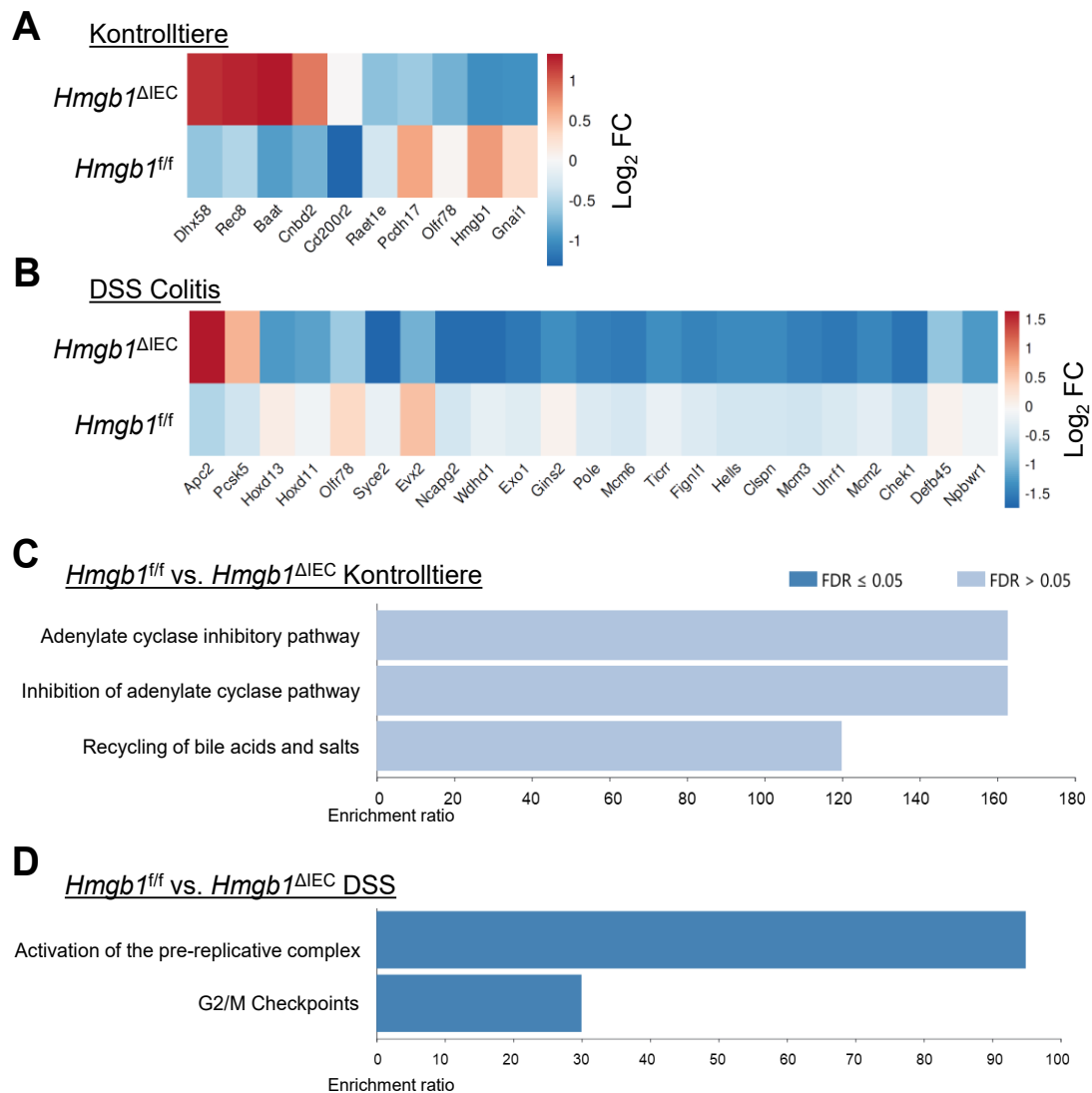


Abbildung 26 | Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Genexpression in der frühen Phase der DSS-Colitis.

Geclusterte *Heatmaps* aller unterschiedlich regulierten Gene in A) gesunden (Wasser) und B) DSS-behandelten Tieren an Tag 4 in *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäusen verglichen zu *Hmgb1*^{ff}. C) *Gene ontology* (GO) *enrichment* Analyse der Gene, die in *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäusen identifiziert wurden. D) *GO enrichment* Analyse der veränderten Gene in *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäusen an Tag 4 der DSS-Colitis. Statistische Auswertung: FDR = *false discovery rate*; FDR > 0,05 = nicht signifikant.

Als Reaktion auf die frühe DSS-vermittelte Entzündung im Kolon scheinen *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäuse Gene unterschiedlich zu exprimieren, die in Zellzyklusprozesse involviert sind. Daher sollte die Zellzyklusaktivität mittels Ki67-spezifischer Färbung und zusätzlicher qPCR Analyse im nachfolgenden Abschnitt überprüft werden. Mit den Ergebnissen der qPCR Analyse konnten die Sequenzierungsergebnisse teilweise bestätigt werden. Die relative Expression von *Gnai1* war in *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäusen leicht reduziert im Vergleich zu den *Hmgb1*^{ff} Mäusen (Abbildung 27). Diese Tendenz konnte auch in isolierten Epithelzellen aus gesunden Mäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). An Tag 3 der DSS-Colitis lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen vor ($p=0,0016$). Da sie als

typische Stammzellvertreter in den Basen der Krypten angesehen werden [207]–[209], [213], [214], wurden weiterhin folgende Proliferationsgene getestet: *Lgr5*, *Pcna*, *Myc* (Abbildung 27) sowie *Ascl2* und *Sox9* (nicht gezeigt). Jedoch konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypgruppen festgestellt werden. *Lgr5* wird regulär während der DSS-induzierten Colitis in den ersten 3-4 Tagen herunterreguliert [210]. Dies war auch in diesen Versuchstieren zu beobachten. An den Tagen 3, 4 und 8 ist *Lgr5* deutlich herunterreguliert, in den deletierten Mäusen tendenziell stärker. Dies trifft für *Myc* und *Ascl2* an Tag 3 und für *Pcna*, *Ascl2* und *Sox9* an Tag 4, also kurz vor der Divergenz der Genotypen zu.

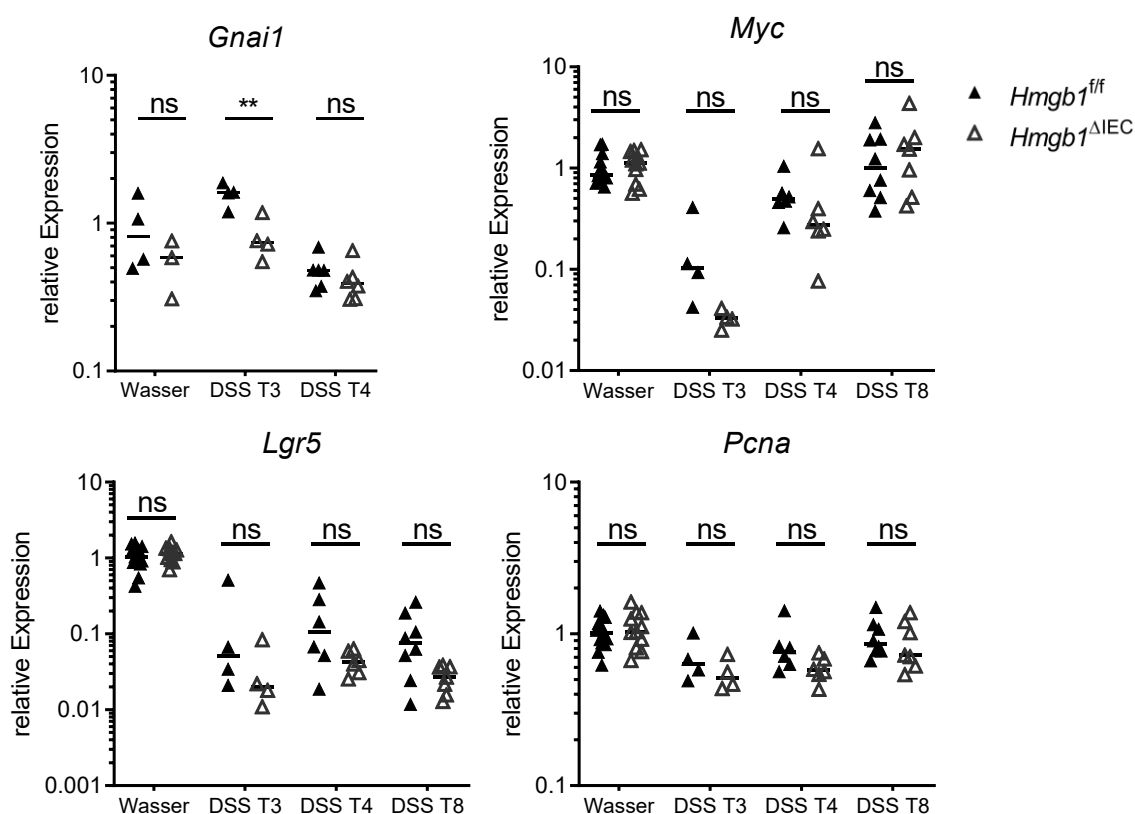


Abbildung 27 | Einfluss von epithelialem HMGB1 auf die Expression von Stammzellmarkern und Proliferationsgenen.

Hmgb1^{fl/fl} und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäuse wurden mit DSS-versetztem Trinkwasser zur Induktion einer Colitis behandelt. Als gesunde Kontrollen wurden unbehandelte (Wasser) Wurfgeschwister verwendet ($n_{fl/fl\ Wasser}=4-13$; $n_{\Delta IEC\ Wasser}=3-11$; $n_{fl/fl\ Tag\ 3}=4$; $n_{\Delta IEC\ Tag\ 3}=4$; $n_{fl/fl\ Tag\ 4}=6$; $n_{\Delta IEC\ Tag\ 4}=6$; $n_{fl/fl\ Tag\ 8}=8$; $n_{\Delta IEC\ Tag\ 8}=7$). Die relative Expression von *Gnai1*, *Myc*, *Lgr5* und *Pcna*. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA.

Zur weiteren Überprüfung, ob in den HMGB1-deletierten Mäusen ein Defizit in der Proliferation und somit der potentiellen Geweberegeneration während der DSS-Colitis vorliegt, wurde zusätzlich zur qPCR Analyse eine Ki67-Färbung durchgeführt. In dieser wurde deutlich, dass die Anzahl der Ki67-positiven Zellen in den Krypten der deletierten Mäuse im gesunden Zustand verglichen mit den geflochten Mäusen geringer war ($p=0,0062$) (Abbildung 28). Eine DSS-Colitis führt durch den Verlust der Epithelzellen zu einer Reduktion

der proliferierenden Zellen, wobei in den erkrankten Mäusen kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen dokumentiert werden konnte ($p_{\text{Tag 4}}=0,1797$; $p_{\text{Tag 8}}=0,3357$).

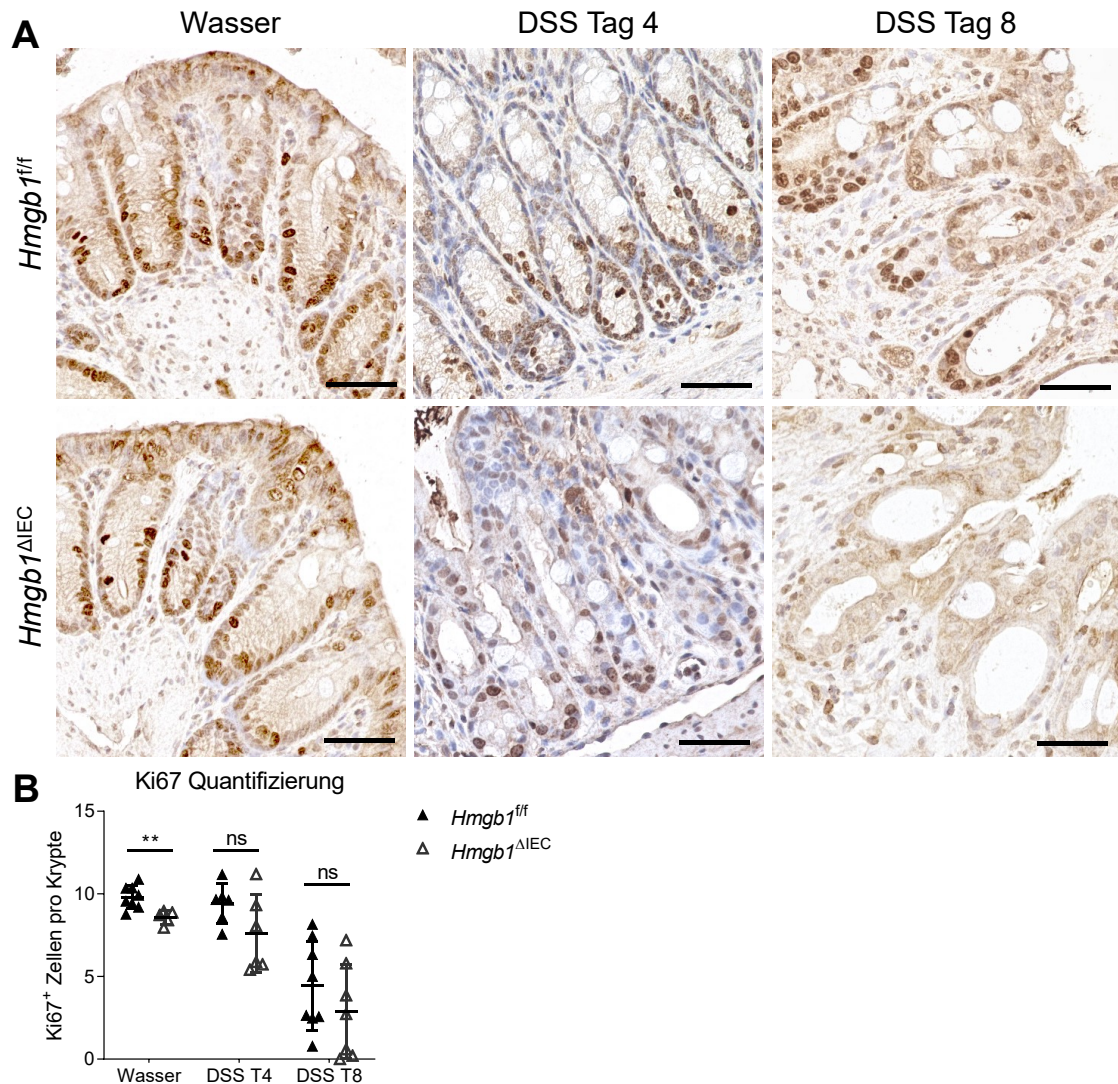


Abbildung 28 | Auswirkung einer HMGB1-Deletion auf den Anteil der Ki67-positiven Zellen in den Krypten im Kolon.

Hmgb1^{fl/fl} und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäuse wurden mit DSS-versetztem Trinkwasser zur Induktion einer Colitis behandelt. Als gesunde Kontrollen wurden unbehandelte (Wasser) Wurfgeschwister verwendet ($n_{fl/fl \text{ Wasser}}=8$; $n_{\Delta IEC \text{ Wasser}}=5$; $n_{fl/fl \text{ Tag 4}}=6$; $n_{\Delta IEC \text{ Tag 4}}=6$; $n_{fl/fl \text{ Tag 8}}=8$; $n_{\Delta IEC \text{ Tag 8}}=7$). A) Ki67-Färbung der Querschnitte. Skalierung: 50 μm . B) Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen in Krypten. Statistische Auswertung: Mann-Whitney Test.

Zusammengefasst konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass HMGB1 in Epithelzellen eine protektive Rolle während der akuten DSS-Colitis spielt, in milderem entzündlichen Krankheitsmodell wie der *C. rodentium* Infektion oder der Cd45RB^{high}-vermittelten Colitis jedoch entbehrlich ist. HMGB1 aus myeloiden Zellen hingegen beeinflusst den Verlauf der DSS-Colitis nicht. Die Sequenzierungsanalyse deutet darauf hin, dass HMGB1 in Epithelzellen in Zellzyklusprozesse involviert ist und wohlmöglich an der

Aufrechterhaltung der Homöostase der Epithelzellen bei starkem Gewebeschaden beteiligt sein könnte und somit entscheidend zu einer intakten Mukosa beiträgt.

3.7 HMGB1 als Tumormarker im Gastrointestinaltrakt des Menschen.

Colitis-Patienten haben ein höheres Risiko an CRC zu erkranken als Menschen ohne entzündliche Vorerkrankung [215], [216]. Außerdem ist HMGB1, auch unabhängig von einer inflammatorischen Prädisposition, in einigen Krebsformen stärker im Tumorgewebe unterschiedlicher Tumorstadien exprimiert und liegt zum Teil in höherer Konzentration im Serum von an Krebs erkrankten Patienten vor. Es wird sogar als Biomarker bspw. in Lungen- und Magenkrebs oder bei einem hepatozellulären Karzinom diskutiert [86]. HMGB1 sollte daher im Rahmen dieser Arbeit auch in diesem Zusammenhang untersucht werden. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss verschiedener HMGB1-Deletionen auf die Colitis-abhängige oder die spontan auftretende Kolorektalkarzinogenese untersucht.

Zunächst wurde mithilfe eines Online-Tools von GEPIA2 die Expression von *Hmgb1* und *Ager* (dem Gen für RAGE) in Tumorgewebe aus Adenokarzinomen und Normalgewebe des Kolons, des Rektums sowie des Magens dargestellt. In allen Arten ist *Hmgb1* im Tumorgewebe verglichen zum Normalgewebe der in dieser Datenbank genutzten Patienten signifikant überexprimiert (Abbildung 29 A). Die Genexpression des HMGB1-Rezeptors *Ager* ist hingegen im Tumorgewebe signifikant supprimiert (Abbildung 29 B). Diese Zusammenhänge könnten indizieren, dass HMGB1 wohlmöglich eine Rolle für die Karzinogenese im Kolon spielt.

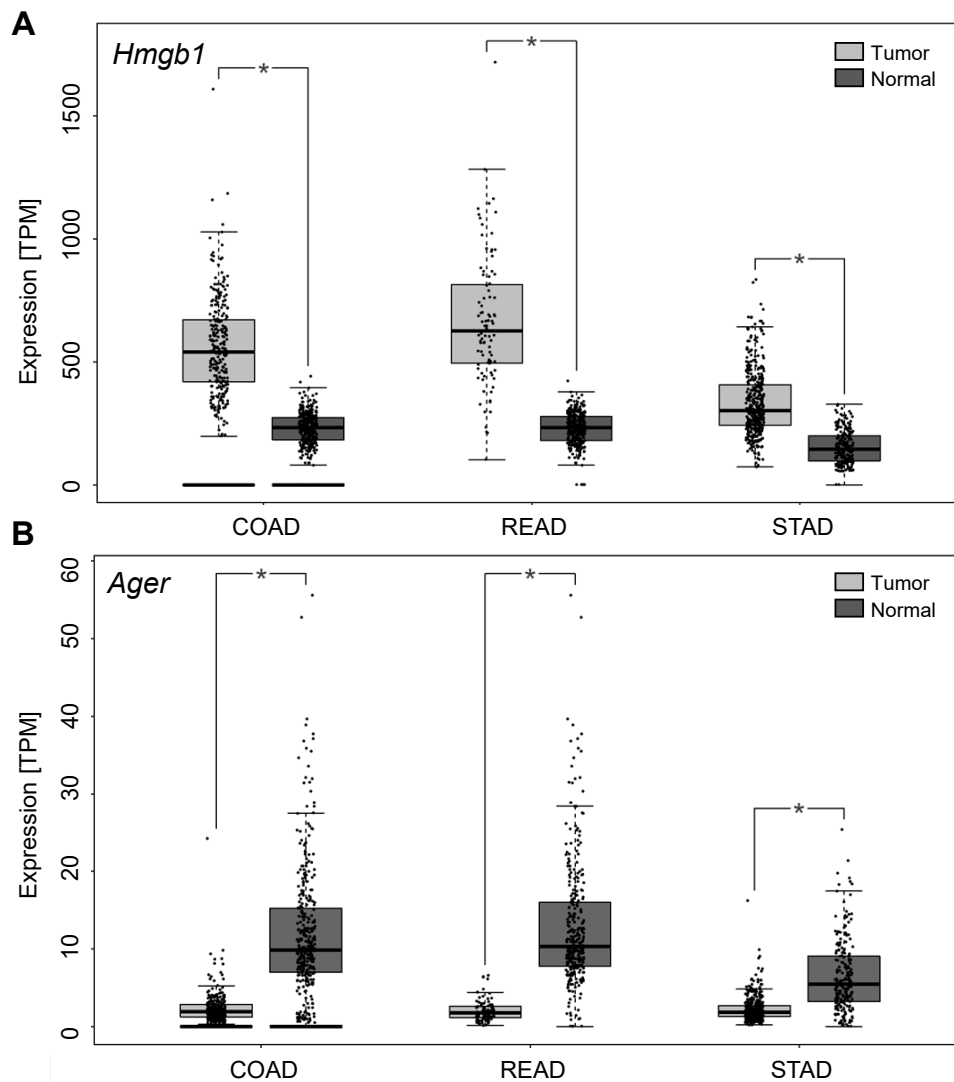


Abbildung 29 | Veränderte Transkription von *Hmgb1* und *Ager* in Karzinomen des gastrointestinalen Traktes.

Expression von *Hmgb1* und *Ager* (Gen für RAGE) in Tumorgewebe aus Adenokarzinomen und Normalgewebe des Kolons (COAD; $n_{\text{Tumor}}=275$; $n_{\text{Normal}}=349$), des Rektums (READ; $n_{\text{Tumor}}=92$; $n_{\text{Normal}}=318$) und des Magens (STAD; $n_{\text{Tumor}}=408$; $n_{\text{Normal}}=211$). Expression in TPM, *transcripts per million*. Die Graphen wurden mithilfe der Online-Datenbank und dem dazugehörigen Online-Tool GEPIA2 erstellt, die auf RNA-Sequenzierung basiert [217]. Statistik: One-Way ANOVA.

3.8 Effektive HMGB1-Deletion in *Apc*^{Min} Mäusen.

Bei Menschen wie bei Mäusen führt eine gestörte Funktionalität von APC zur Entwicklung von kolorektalen Adenomen und vor allem im Menschen auch zu CRC im Rahmen der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP). Zur Untersuchung der Rolle von HMGB1 für die CRC wurden *Apc*^{Min} Mäuse verwendet. Durch die Punktmutation im Gen des Tumorsuppressors APC entwickeln die betroffenen Tiere spontan intestinale Adenome und Karzinome. Daher dient die *Apc*^{Min} Maus der Untersuchung von spontan auftretendem CRC als geeignetes genetisches Modell [185].

Die Apc^{Min} Mäuse wurden mit den $Hmgb1^{\Delta IEC}$ Deletionsmäusen verpaart. Für die Analyse der $Hmgb1$ -Genexpression wurde aus diesen Apc^{Min} Mäusen sowohl Tumorgewebe als auch Normalgewebe (makroskopisch tumorfreie Mukosa) verwendet. Mittels qPCR konnte gezeigt werden, dass die HMGB1-Deletion in den $Apc^{Min} Hmgb1^{\Delta IEC}$ effektiv war, da die $Hmgb1$ -Expression der KO's verglichen zu den geflochten Mäusen im Normalgewebe um 80 % und im Tumorgewebe um 95 % signifikant reduziert war ($p_{normal\ f/f:\Delta IEC}<0,0001$; $p_{Tumor\ f/f:\Delta IEC}<0,0001$) (Abbildung 30 A). In Tumoren gefloxter Mäuse war $Hmgb1$ gegenüber dem Normalgewebe nicht überexprimiert, wodurch sich dieses Ergebnis von der Analyse der humanen Tumorproben unterscheidet. Die zuvor gezeigte starke Reduktion der $Hmgb1$ -Transkription wurde ebenso auf Proteinebene in der HMGB1-spezifischen IHC sichtbar. Die deletierten Epithelzellen zeichneten sich deutlich von den Immunzellen in der *Lamina propria* mit HMGB1-positivem Zellkern ab (Abbildung 31 B).

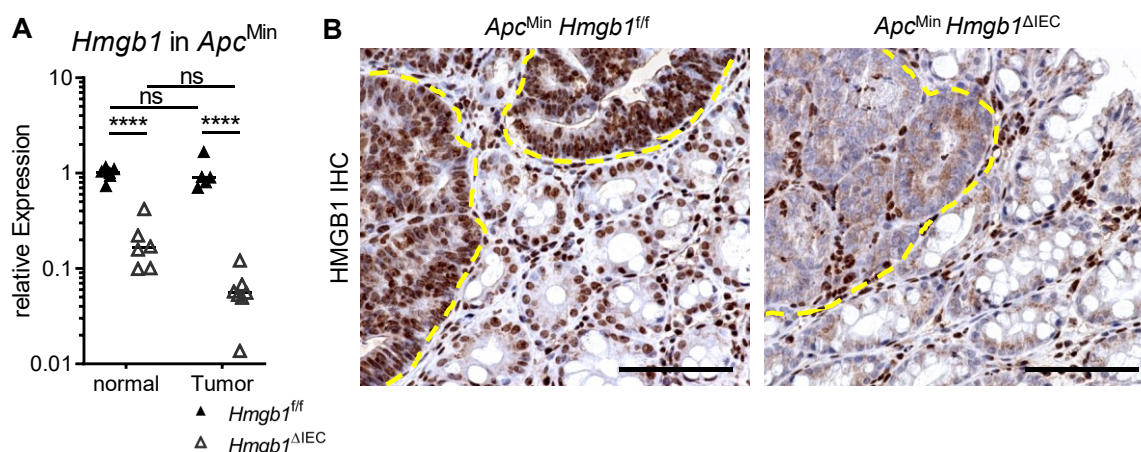


Abbildung 30 | HMGB1 im Apc^{Min} Modell.

Apc^{Min} Mäuse ($Hmgb1^{f/f}$ und $Hmgb1^{\Delta IEC}$) wurden im Alter von etwa 13 Wochen sakrifiziert. A) Relative $Hmgb1$ -Expression in Normalgewebe (makroskopisch tumorfreie Mukosa; $n_{f/f}=6$; $n_{\Delta IEC}=6$) gegenüber Tumorgewebe ($n_{f/f}=5$; $n_{\Delta IEC}=7$) aus Apc^{Min} Mäusen. B) Immunohistochemische Färbung von HMGB1 in Kolongewebe von Apc^{Min} Mäusen (Tumorgewebe in gelb umrandet). Skalierung: 100 μ m. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA.

3.9 Die epitheliale HMGB1-Deletion begünstigt die kolorektale Tumorprogression im Apc^{Min} Modell.

Im Folgenden werden $Apc^{Min} Hmgb1^{f/f}$ mit $Apc^{Min} Hmgb1^{\Delta IEC}$ Mäusen verglichen und für die Bemessung des Kolons gegen entsprechende Apc^{Wt} Mäuse als Gesundheitskontrollen aufgetragen. In tumorbelasteten Mäusen beider Genotypen waren die Kolons im Vergleich zu den Gesundheitskontrollen signifikant um 11 % ($Hmgb1^{f/f}$) bzw. 13 % ($Hmgb1^{\Delta IEC}$) verkürzt ($p_{f/f\ Wt:Min}=0,0033$; $p_{\Delta IEC\ Wt:Min}=0,0008$) (Abbildung 31 A). Es wurde kein Unterschied in der HMGB1-Serumkonzentration beider Versuchsgruppen gemessen (Abbildung 31 B). Die Versuchsgruppen wiesen eine vergleichbare Anzahl an Tumoren auf (Mittelwerte: $Hmgb1^{f/f}$ 2,3 und $Hmgb1^{\Delta IEC}$ 3,5 Tumore; $p=0,1259$) (Abbildung 31 C). Mit Blick auf den

Tumor Score war die Tumorbelastung in den HMGB1-deletierten Mäusen mehr als doppelt so hoch wie in den geflochtenen Mäusen ($p=0,008$) (Abbildung 31 D, E). Wie in Abbildung 31 E ersichtlich, ist der Unterschied im Tumor Score auf 2,3-mal mehr mittlere ($p=0,0532$) und vor allem auf 4,5-mal mehr große Tumore in den HMGB1-deletierten Apc^{Min} Mäusen als in den geflochtenen Mäusen zurückzuführen ($p=0,0004$) (Abbildung 31 F). In den repräsentativen H&E-gefärbten *swiss roll* Gewebeschnitten wird der Unterschied der Tumorbelastung zwischen geflochtenen und deletierten Mäusen noch einmal dargestellt (Abbildung 31 G). Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine verstärkte Tumorprogression, die durch die HMGB1-Deletion in Epithelzellen hervorgerufen wird.

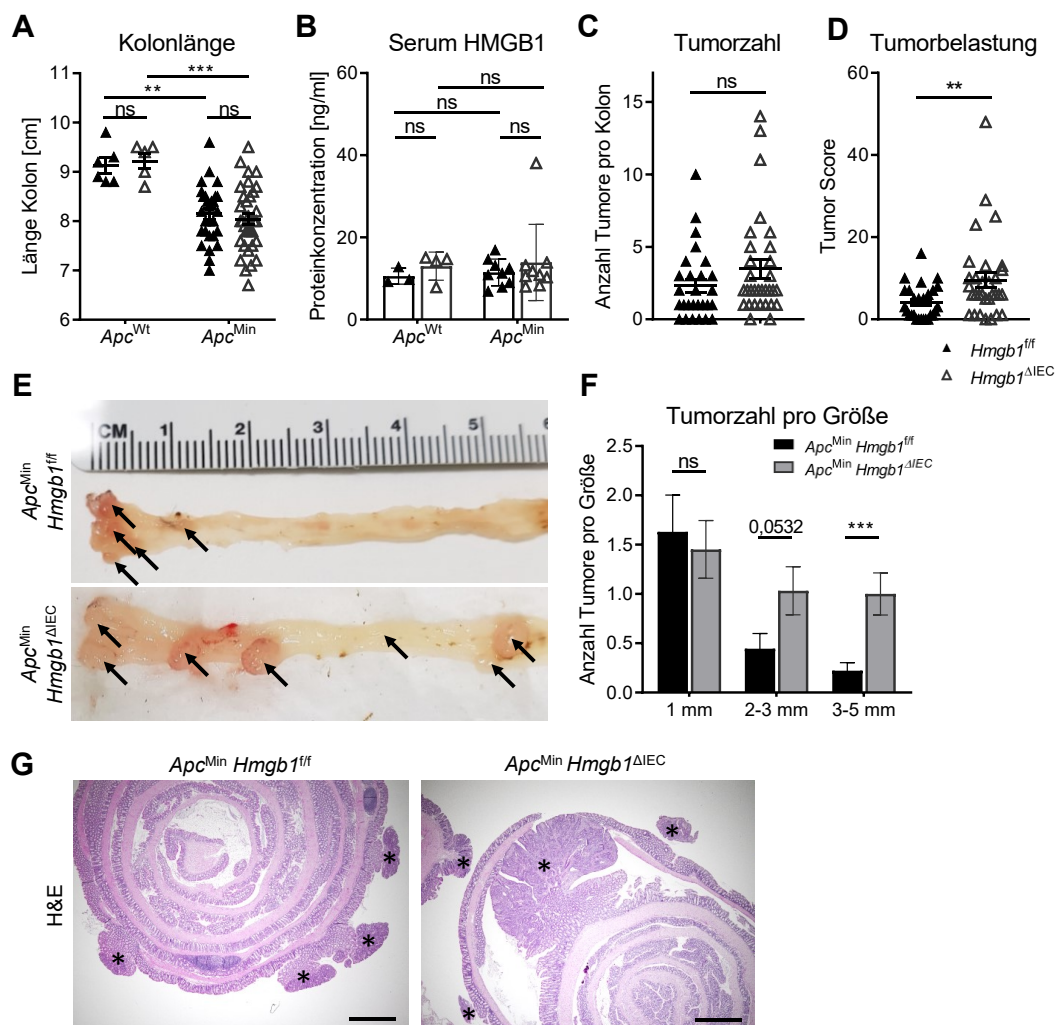


Abbildung 31 | Auswirkung der epithelialen HMGB1-Deletion auf das Tumorstadium im Apc^{Min} Modell.

$Apc^{Min} Hmgb1^{flf}$ und $Apc^{Min} Hmgb1^{\Delta IEC}$ Mäuse wurden im Alter von 13 Wochen sakrifiziert und analysiert ($n_{flf} Apc^{Min}=27$; $n_{\Delta IEC} Apc^{Min}=31$). Als Gesundheitskontrolle wurden wildtypische Wurfgeschwister (Apc^{Wt} beider $Hmgb1$ -Genotypen) verwendet. A) Länge des Kolons ($n_{flf} Apc^{Wt}=6$; $n_{\Delta IEC} Apc^{Wt}=5$). B) HMGB1-Konzentration im Serum ($n_{flf} Apc^{Wt}=3$; $n_{\Delta IEC} Apc^{Wt}=4$; $n_{flf} Apc^{Min}=9$; $n_{\Delta IEC} Apc^{Min}=9$). Die Tumorbelastung als C) Anzahl der Tumore pro Kolon sowie als D) Tumor Score. E) Repräsentative Darstellung der Tumore im Kolon (schwarze Pfeile markieren jeweils einen Tumor). F) Größenverteilung der Tumore. G) H&E-Färbung der Kolons als *swiss rolls*. Das Tumorgewebe ist mit * markiert. Skalierung: 1 mm. Statistische Auswertung: A, B, Two-Way ANOVA Test; C, D, F, Mann-Whitney Test.

Tumore können lokale Entzündungen auslösen, da Tumorzellen das Immunsystem aktivieren. Dabei entsteht ein sogenanntes *tumor micro-environment* (TME), ein spezielles Milieu, das durch bestimmte inflammatorische Komponenten wie Tumor-assoziierte Immunzellen (z.B. TAMs und TANs), Zytokine und Chemokine charakterisiert ist [218], [219]. Aus diesem Grund wurden sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe der Apc^{Min} Mäuse immunregulatorische Gene auf ihre Expression hin untersucht, die bzw. Neutrophilen und Makrophagen spezifisch zugeordnet werden können (Abbildung 32). Im Normalgewebe waren $Cx3cr1$, $Tgfb$ sowie der pro-inflammatorische Marker $Cxcl2$ in $Apc^{Min} Hmgb1^{\Delta IEC}$ verglichen zu $Apc^{Min} Hmgb1^{ff}$ stärker exprimiert ($p_{Cx3cr1}=0,0170$; $p_{Tgfb}=0,0019$; $p_{Cxcl2}=0,0008$; $p_{Tgfb}<0,0001$). Im Tumorgewebe der $Apc^{Min} Hmgb1^{\Delta IEC}$ Mäuse war lediglich die Expression des HMGB1-Rezeptors $Tlr4$ im Vergleich zu den geflochten Mäusen reduziert ($p_{Tlr4}=0,0245$). Alle anderen gemessenen pro-inflammatorischen ($Il1b$, $Ifng$, Tnf) und anti-inflammatorischen ($Chil3$, $Arg1$) Gene waren in beiden Genotypen gleich exprimiert. Dies könnte einen Hinweis auf Veränderungen im Normalgewebe in unmittelbarer Nähe zum Tumor in den deletierten Mäusen sein, welches wiederum einen direkten Einfluss auf die Tumorprogression haben könnte. Im Tumor selbst bzw. im TME lagen keine gravierenden Veränderungen in der Expression immunregulatorischer Gene in $Apc^{Min} Hmgb1^{\Delta IEC}$ verglichen zu $Apc^{Min} Hmgb1^{ff}$ Mäusen vor.

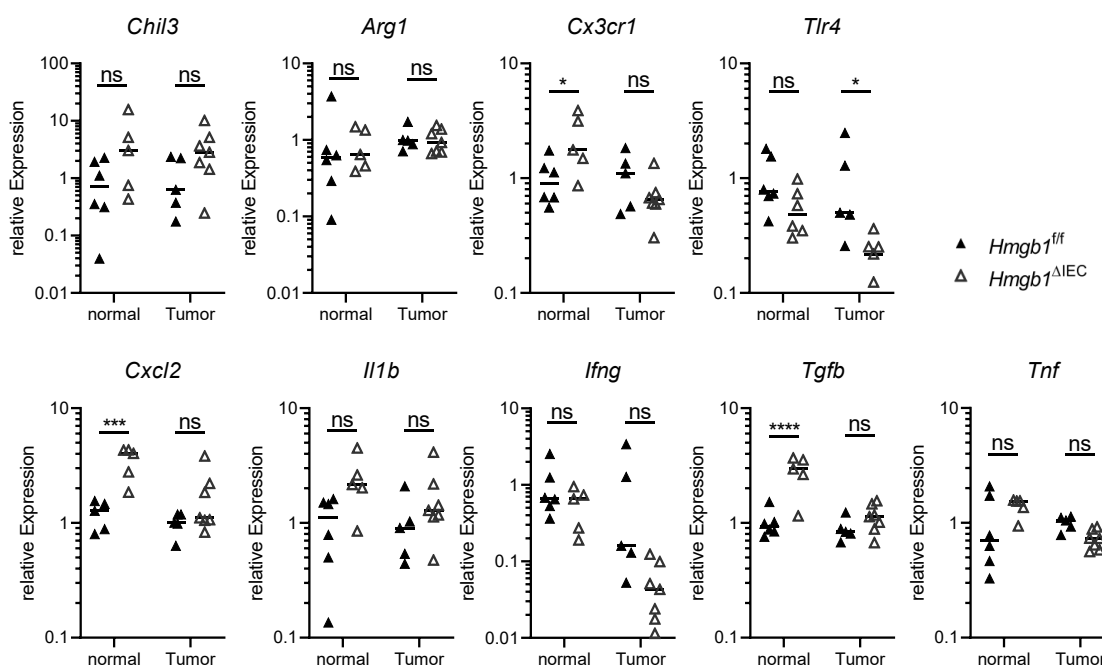


Abbildung 32 | Genexpression im Normal- und Tumorgewebe der Apc^{Min} Mäuse.

$Apc^{Min} Hmgb1^{ff}$ und $Apc^{Min} Hmgb1^{\Delta IEC}$ Mäuse wurden im Alter von 13 Wochen sakrifiziert und analysiert (Apc^{Min} normal: $n_{Hmgb1^{ff}}=6$; $n_{Hmgb1^{\Delta IEC}}=5$; Apc^{Min} Tumor: $n_{Hmgb1^{ff}}=5$; $n_{Hmgb1^{\Delta IEC}}=7$). Relative Expression immunregulatorischer Marker ($Chil3$, $Arg1$, $Cx3cr1$, $Cxcl2$, $Il1b$, $Ifng$, $Tgfb$, Tnf) sowie $Tlr4$ als HMGB1-Rezeptor. Statistische Auswertung: Two-Way ANOVA Test.

Die Tumorprogression war in den *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäusen wesentlich stärker als in den *Hmgb1*^{fl/fl} Mäusen. Neben der Expression immunregulatorischer Gene, sollte auch die Expression von bekannten Schlüsselproteinen für die Proliferation im Tumorgewebe sowie im Normalgewebe mittels qPCR getestet werden, um die Auswirkung der HMGB1-Deletion in Epithelzellen auf die Proliferation zu untersuchen. Für das Zytokin IL-33, welches auch als DAMP charakterisiert ist, wurde bereits ein Proliferations-fördernder Effekt über den NF-κB-Signalweg auf CRC mit erhöhter *Pcna*-Expression in Tumoren beschrieben [220]. SOX9 ist ein vom WNT/β-Catenin-Signalweg abhängiger Transkriptionsfaktor, der in intestinalen Krypten die Multipotenz sowie Differenzierung der Epithelzellen beeinflusst [208]. In der Pathogenese des Magenkarzinoms beispielsweise fördert es die epithelial-mesenchymale Transition [221, S. 9]. SOX9 wurde bisher abhängig der Krebsart jedoch sowohl als Tumorsuppressor als auch als onkogen klassifiziert. Gerade in Bezug auf CRC wurden beide Eigenschaften beschrieben [153], [222], [223]. Im Normalgewebe der *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäuse waren *Sox9* und *Pcna* signifikant um das 2,5-fache bzw. 2-fache höher exprimiert als in den geflochten Mäusen (Abbildung 33 A; $p_{Sox9}N=0,0001$, $p_{Pcna}N=0,0095$). Im Tumorgewebe der KO-Mäuse war eine 1,6-fach nicht signifikant höhere Expression von *Sox9* zu verzeichnen ($p_{Sox9}T=0,0819$). Zur Untersuchung einer erhöhten Stammzellproliferation, die bereits im Normalgewebe vorliegen könnte, wurden zusätzlich *Ascl2* als WNT-empfindliches Zielgen und Hauptregulator des Stammzellmarkers *Lgr5* [224, S. 2], *Lgr5* selbst sowie *Jun* als proto-onkogenen Transkriptionsfaktor [225] getestet. Die Expression der Gene *Jun* und *Lgr5* war durch die HMGB1-Deletion im Normalgewebe signifikant um das 1,7-fache bzw. 1,8-fache erhöht (Abbildung 33 B; $p_{Jun}N=0,0087$; $p_{Lgr5}N=0,0087$). *Ascl2* war in den HMGB1-KOs tendenziell doppelt so hoch exprimiert wie in den geflochten Mäusen ($p_{Ascl2}N=0,0519$). Durch die Deletion von HMGB1 in den Epithelzellen schien vor allem im Normalgewebe der *Apc*^{Min} Mäuse für die Proliferation der epithelialen Stammzellen relevante Gene eine erhöhte Expression vorzuliegen.

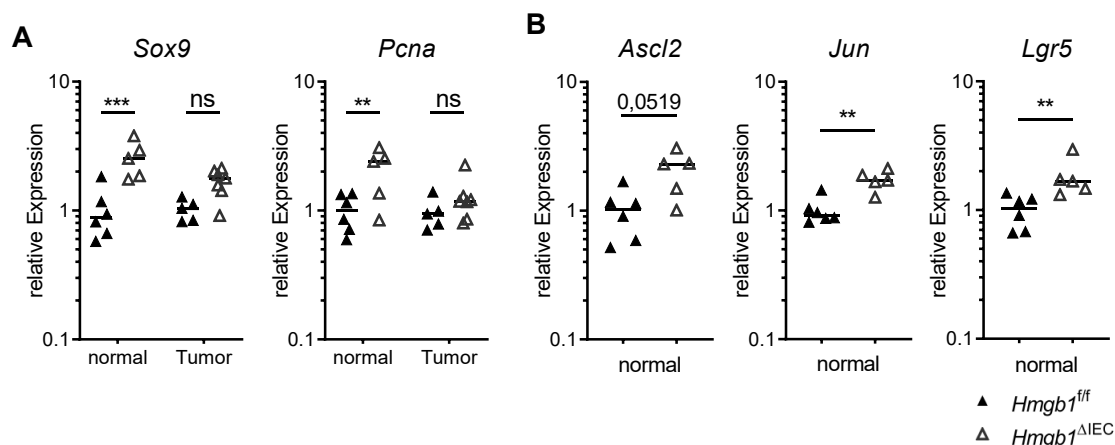


Abbildung 33 | Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Proliferation im Tumor- und im Normalgewebe gefloxter und deletierter *Apc*^{Min} Mäuse.

Apc^{Min} *Hmgb1*^{fl/fl} und *Apc*^{Min} *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäuse wurden im Alter von 13 Wochen sakrifiziert und auf die Genexpression von Genen analysiert, die mit Zellproliferation assoziiert sind (*Apc*^{Min} normal: $n_{Hmgb1^{fl/fl}}=6$; $n_{Hmgb1^{ΔIEC}}=5$; *Apc*^{Min} Tumor: $n_{Hmgb1^{fl/fl}}=5$; $n_{Hmgb1^{ΔIEC}}=7$). Relative Expression von A) *Sox9* und *Pcna* in Normal- und Tumorgewebe und von B) *Ascl2*, *Jun* und *Lgr5* im Normalgewebe (makroskopisch tumorfreie Mukosa). Statistische Auswertung: A, Two-Way ANOVA Test; B, Mann-Whitney Test.

Für die weitere Untersuchung des Phänotyps und vor allem zur Orientierung und Einschätzung des Expressionsmusters für weiterführende Analysen wurde sowohl RNA von Normalgewebe (makroskopisch tumorfrei) als auch des von derselben Maus stammenden Tumorgewebes beider Genotypen (*Apc*^{Min} *Hmgb1*^{fl/fl} und *Apc*^{Min} *Hmgb1*^{ΔIEC}) sequenziert. Im Normalgewebe der *Hmgb1*^{ΔIEC} Mäuse war die Expression von 67 Genen signifikant stärker induziert und von 90 Genen im Vergleich zum Normalgewebe gefloxter Mäuse reduziert (Abbildung 34 A). Unter diesen Genen waren ebenfalls einige enthalten, die bereits im Vergleich von *Hmgb1*^{ΔIEC} und *Hmgb1*^{fl/fl} Kontrollmäusen (Wasser) der DSS-Colitis identifiziert wurden. Dazu zählten *Hmgb1*, *Gnai1*, *Pcdh17* und *Olfir78*. Die Expression dieser Gene scheint also unabhängig von der *Apc*^{Min} Mutation durch die HMGB1-Deletion verändert zu sein. Im Tumorgewebe der KO-Mäuse wurden im Vergleich zu den geflochten Mäusen 182 hoch- und 141 herunterregulierte Gene identifiziert (Abbildung 34 A). Die Expression des Gens *Gnai1* war im Normal- und im Tumorgewebe der KO-Mäuse signifikant reduziert, sodass eine epitheliale HMGB1-Deletion eine verringerte *Gnai1*-Expression unabhängig von der Zellveränderung durch die Tumorgenese bewirkt. Insgesamt war die Expression von 323 Genen im Tumorgewebe und 157 Genen im Normalgewebe, darunter 24 Gene in beiden Geweben gleichermaßen, im Zusammenhang mit der epithelialen HMGB1-Deletion signifikant verändert (Abbildung 34 B).

Die identifizierten Gene beider Gewebe wurden auf bestimmte Signalwege mittels der *GO pathway enrichment* Analyse untersucht. Die HMGB1-Deletion hatte weder im Normal- noch im Tumorgewebe einen relevanten Einfluss auf die Expression Apoptose- oder

Autophagie-spezifischer Gene. Es konnten einige unterschiedlich regulierte Gene in beiden Geweben identifiziert werden, die dem angeborenen Immunsystem und den darin begriffenen Zytokin-Signalwegen zugeordnet werden können. Des Weiteren war die Expression einiger Gene im Normalgewebe der KO-Mäuse verändert, die in die MAPK Signalkaskade involviert sind. Im KO-Tumorgewebe war die Expression von 5 Genen verändert, welche im NF- κ B Signalweg von Bedeutung sind. Im Normalgewebe der KO-Mäuse waren außerdem der *Adenylate cyclase inhibitory pathway* (*Adcy9, Gnai1, Gnat3*), die *GABA B receptor activation* (*Adcy9, Gnai1, Kcnj5, Gnat3*) und die *Transmission across chemical synapses* (*Raf1, Adcy9, Nefl, Snap25, Gnat3, Kcnj5, Cplx1, Gnai1*) durch die HMGB1-Deletion signifikant beeinflusst (FDR \leq 0,05, Abbildung 34 C). Im Tumorgewebe waren hauptsächlich der *Keratan sulfate/keratin metabolism* (*Ogn, Hexb, Lum, Fmod, B3gnt7*), *nuclear receptor transcription pathway* (*Nr2c2, Hnf4g, Thrb, Ppara, Esrrg, Ar, Nr2c2ap*), *antigen processing-cross presentation* (*H2-M2, Psmb8, Cd207, H2-Q4, Tap1, B2m, H2-Q6, Psmb9*), *muscle contraction* (*Kcnd1, Myh11, Mybpc1, Ryr2, Vcl, Fgf12, Sorbs1, Des, Tmod2, Scn7a, Myl6b, Lmod1, Kcnk3, Actg2*) sowie *peptide ligand-binding receptors* (*Pyy, Grp, Pdyn, Npy2r, Cxcl9, Npy, Agt, Cck, Cxcl10, Sstr1, Qrfp, Sstr3*) signifikant verändert (FDR \leq 0,05, Abbildung 34 D). So wie bei der Analyse der DSS-Proben, konnte auch in den *Apc^{Min}* Mäusen keine Aussage über den zellulären Hintergrund der veränderten Signalwege getroffen werden, da es sich um eine Gesamtgewebeanalyse und keine Einzelzellsequenzierung handelte. Gleichwohl sind einige der identifizierten Gene, welche diesen Signalwegen zugeordnet sind, laut *The Human Protein Atlas* im Kolon eher spezifisch für Epithelzellen, Mukus-produzierende Zellen, intestinale endokrine Zellen oder undifferenzierte Zellen und nicht oder weniger für Immunzellen [211], [212], [226]. Unter diese Gene fallen bspw. *Adcy9, Gnat3, Gnai1, Snap25, Cplx1, Olfr78* im Normalgewebe oder *B3gnt7, Fmod* und die Mehrheit der Gene des *Nuclear receptor transcription pathway* im Tumorgewebe.

Des Weiteren wurden im Normalgewebe hochregulierte Gene identifiziert, die bei Überexpression zu einer erhöhten Zellproliferation beitragen können. Dazu gehören u.a. die Onkogene *Raf1* und *Rab43*, die *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) *Fgd1* (zu CdC42) und *Arhgef11* (zu RhoA GTPase), *Arhgdib* (GDP dissociation inhibitor), *Lrp5* (WNT-Rezeptor), *Notch1*, *Cmip* (c-Maf induzierend). Durch die Sequenzierung der *Apc^{Min}* Mäuse wird deutlich, dass die epitheliale HMGB1-Deletion einen Einfluss auf das Genexpressionsmuster des Kolongewebes während der spontanen Karzinogenese hat. Darüber hinaus konnte mittels qPCR gezeigt werden, dass sowohl einige inflammatorisch relevante Gene als auch Gene, die mit der Zellproliferation assoziiert sind, im Normalgewebe der KO-Mäuse stärker exprimiert waren als in den geflochten Mäusen.

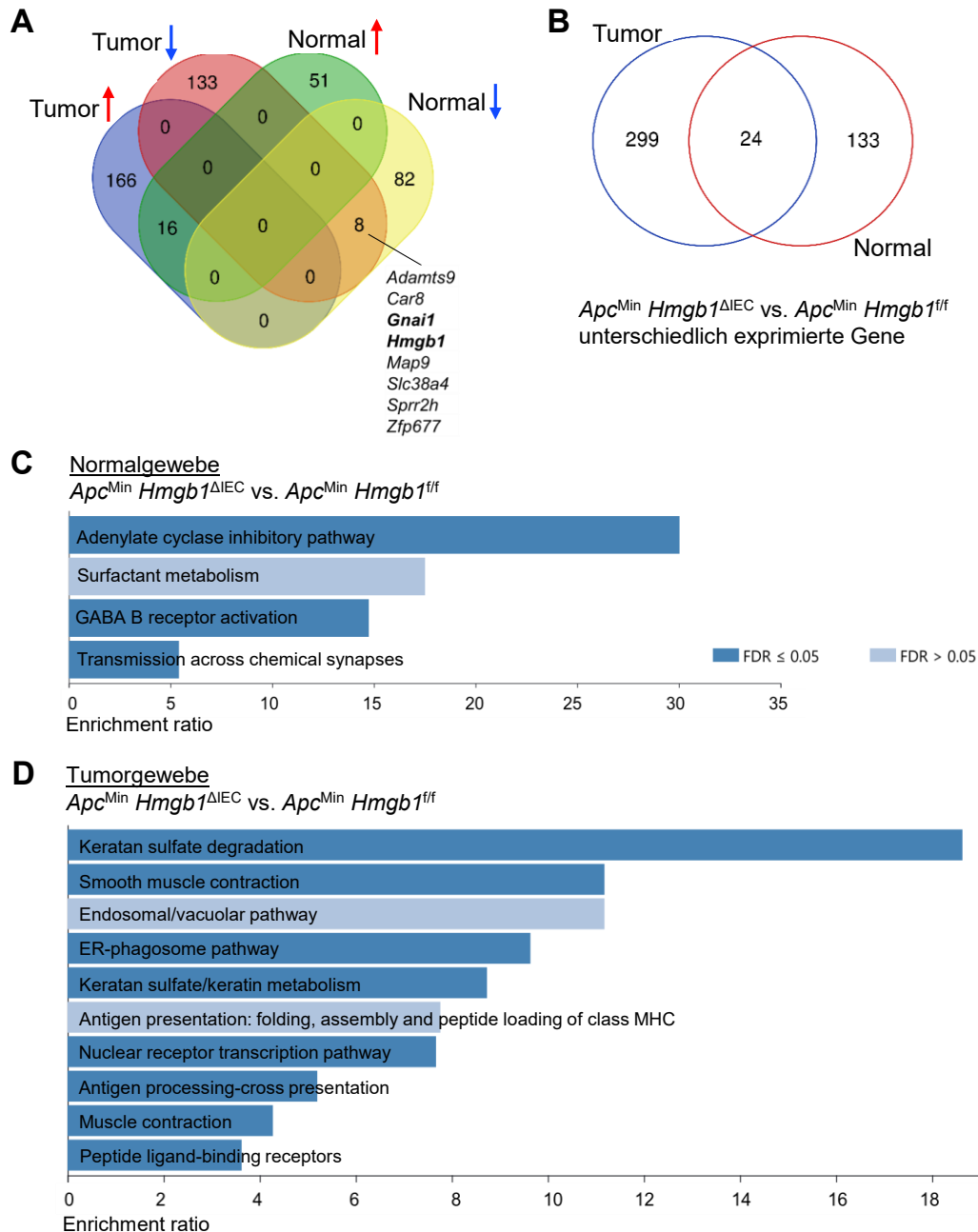


Abbildung 34 | Einfluss von HMGB1 auf die Genexpression in Normal- und Tumorgewebe bei gefloxten und HMGB1-deletierten *Apc^{Min}* Mäusen.

Darstellung der signifikant unterschiedlich regulierten Gene in *Apc^{Min} Hmgb1^{ΔIEC}* verglichen mit *Apc^{Min} Hmgb1^{fl/fl}* (n=4 pro Gruppe) in *VENN Plots* für A und B) signifikant hoch- (roter Pfeil) und herunterregulierte (blauer Pfeil) Gene in Tumoren und Normalgewebe (makroskopisch tumorfreies Gewebe). Ergebnisse der *GO term pathway enrichment* Analyse für C) Normalgewebe und D) zugehöriges Tumorgewebe. FDR = false discovery rate.

3.10 Die epitheliale HMGB1-Deletion hat keinen Einfluss auf die Colitis-assoziierte Karzinogenese im murinen AOM/DSS Modell.

Allgemein wird angenommen, dass die chronische Entzündung einiger Organe eine Prädisposition für die Entstehung maligner Dysplasien in einigen Organen darstellen kann [62], [227]. HMGB1 ist in vielen Publikationen als Treiber für Karzinogeneseprozesse

beschrieben. Bei sterilen entzündlichen Prozessen (z.B. in der Leber) scheint HMGB1 das Wachstum von malignen Tumoren zu begünstigen [228], [229]. Weiterhin gibt es Studien, die zeigen, dass z.B. LPS, welches die geschädigte Darmwand im Bereich von Adenomen penetriert, die Entartung hin zu CRC begünstigt [230]. Daher sollte die spezifische Rolle von HMGB1 bei der chronischen Schädigung der intestinalen Barriere untersucht werden.

Um zu untersuchen, wie sich eine chronische Entzündung im Zusammenhang mit einer epithelialen HMGB1-Deletion auf die Tumorentwicklung auswirkt, wurden *Hmgb1^{fl/fl}* und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäuse im AOM/DSS-Modell untersucht. Der stärker ausgeprägte Gewichtsverlust in epithelialen HMGB1-KOs zeigte sich auch im Modell wiederholter DSS-Applikation ($p_{\text{Tag5}}=0,0795$; $p_{\text{Tag6-8}}=0,0195$; $p_{\text{Tag9}}=0,0035$) (Abbildung 35 A). Trotz der unterschiedlichen Gewichtsentwicklung deutete die Messung der Kolonlänge auf eine ähnlich ausgeprägte Entzündung in beiden Gruppen hin ($p=0,9841$) (Abbildung 35 B). Dies ist ein Indiz dafür, dass die Entzündung zum Endzeitpunkt bei wildtypischen und HMGB1-deletierten Mäusen vergleichbar war. Die intermittierend durchgeführte Kolonoskopie ergab eine nahezu identische Tumorentwicklung in beiden Genotypen (Abbildung 35 C). In der makroskopischen Untersuchung der Tumore am Versuchsende bestätigte sich zum einen die Anzahl der Tumore pro Kolon und zum anderen ergab sich auch ein vergleichbarer makroskopischer Tumor Score, der eine Aussage über eine ähnliche Größenverteilung zuließ (Abbildung 35 D). Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine epitheliale HMGB1-Deletion keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von CRC im AOM/DSS-Modell hat.

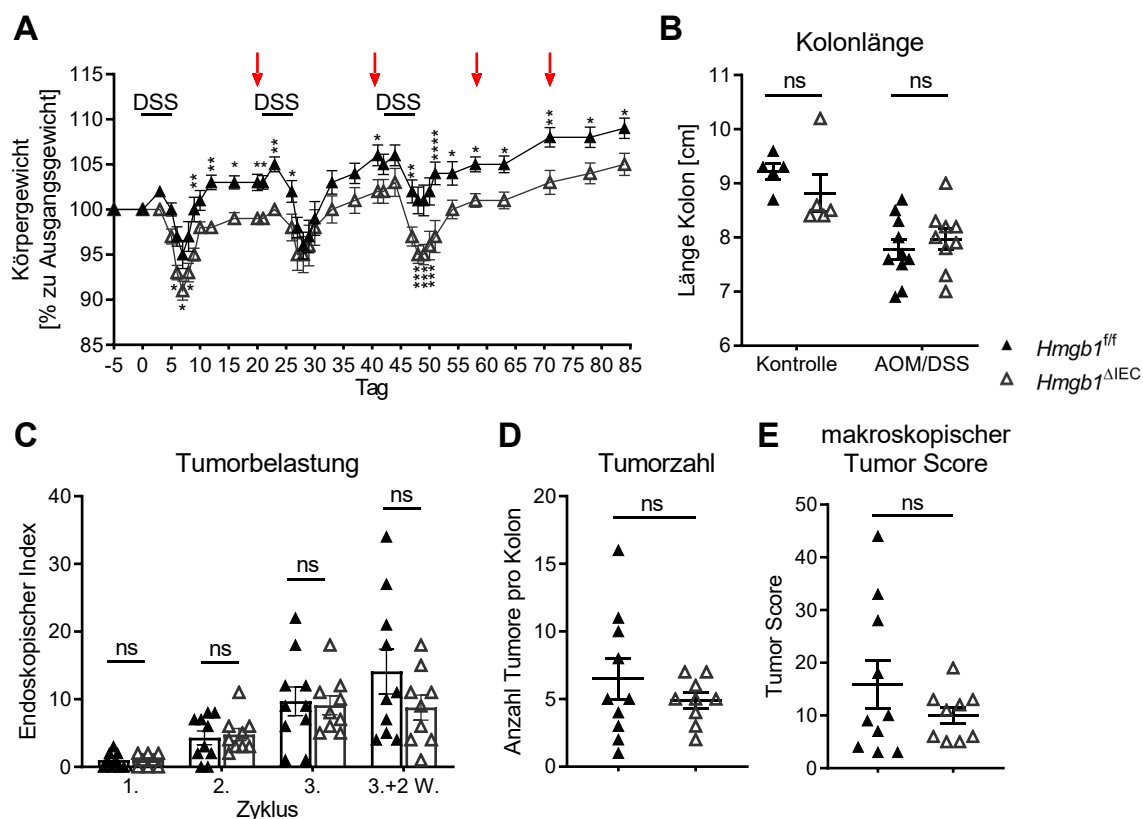


Abbildung 35 | Die phänomenologische Auswirkung der epithelspezifischen HMGB1-Deletion im AOM/DSS-Modell inflammatorischer Karzinogenese im Kolon.

Hmgb1^{fl/fl} und *Hmgb1^{ΔIEC}* Mäuse wurden initial (Tag -5) mit AOM und anschließend über 3 Zyklen mit DSS-versetztem Trinkwasser zur Induktion einer chronischen Colitis behandelt (1 Zyklus: 5 Tage DSS, 16 Tage Wasser). Als gesunde Kontrollen für den Kolonlängenvergleich wurden unbehandelte Wurfgeschwister verwendet ($n_{fl/fl\text{ Kontrolle}}=5$; $n_{\Delta IEC\text{ Kontrolle}}=5$; $n_{fl/fl}=10$; $n_{\Delta IEC}=9$). A) Gewichtsverlauf der AOM/DSS-behandelten Mäuse beider Genotypen. Die roten Pfeile weisen auf die endoskopische Untersuchung der B) Tumorbilastung im Krankheitsverlauf hin. C) Verkürzung des Kolons. Die Tumorbilastung zum Zeitpunkt der Organentnahme angegeben als D) Tumorzahl und E) makroskopischer Tumor Score, der die Tumorgöße berücksichtigt. Statistische Auswertung: A Two-Way ANOVA Test (Fisher's); B, C, Two-Way ANOVA Test; D, E, Mann-Whitney Test.

3.11 Die myeloide HMGB1-Deletion hat keinen Einfluss auf die spontane *Apc^{Min}*-bedingte Karzinogenese.

Um die Relevanz von HMGB1 aus myeloiden Zellen für die intestinale Karzinogenese zu untersuchen, wurden *Apc^{Min}* Mäuse mit Myeloid-zellspezifischen HMGB1-KO Mäusen gekreuzt. Im Folgenden wurden *Apc^{Min} Hmgb1^{ΔLysM}* mit *Apc^{Min} Hmgb1^{fl/fl}* Mäusen verglichen, die sich im Versuchsverlauf ähnlich entwickelten. In der Anzahl der Tumore unterschieden sich die Genotypen nicht voneinander (Abbildung 36 A). Nach der makroskopischen Beurteilung der Tumore wurde deutlich, dass die KO-Mäuse um 37 %, jedoch nicht signifikant, weniger belastet waren als die geflochtenen *Apc^{Min}* Mäuse (Abbildung 36 B; $p=0,0759$). Diese Tendenz war ebenfalls leicht erkennbar beim Auftragen der Tumorzahl gegen die Größe der Tumore (Abbildung 36 C). Insgesamt entwickelten die *Apc^{Min}* Mäuse mit myeloider HMGB1-Deletion im Vergleich zu den geflochtenen Mäusen keinen signifikant veränderten

Phänotyp. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass HMGB1 aus myeloiden Zellen für die spontane Karzinogenese im Kolon nicht relevant ist.

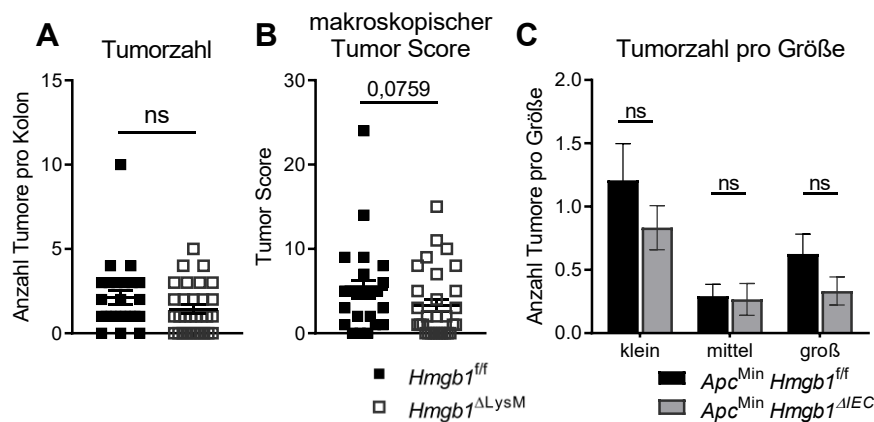


Abbildung 36 | Einfluss der myeloiden HMGB1-Deletion auf die spontane Karzinogenese in *Apc^{Min}*-Mäusen.

Apc^{Min} Hmgb1^{fl/fl} und *Apc^{Min} Hmgb1^{ΔLysM}* Mäuse wurden im Alter von 15 Wochen sakrifiziert und analysiert ($n_{fl/fl}^{ApcMin}=24$; $n_{ΔIEC}^{ApcMin}=29-30$). Als Gesundheitskontrolle wurden wildtypische Wurfgeschwister (*Apc^{Wt}* beider *Hmgb1*-Genotypen) verwendet. Die Tumorbelastung in *Apc^{Min}* Mäusen als B) Anzahl der Tumore sowie C) Tumor Score. D) Größenverteilung der Tumore, klein = 1 mm, mittel = 2-3 mm, groß = 3-5 mm. Statistische Auswertung: A-C, Mann-Whitney Test.

3.12 Die myeloide HMGB1-Deletion reduziert die Colitis-assoziierte Karzinogenese im Kolongewebe.

Die Auswirkung der HMGB1-Deletion aus myeloiden Zellen auf die Karzinogenese im chronisch-entzündeten Darm wurde mithilfe von *Hmgb1^{fl/fl}* und *Hmgb1^{ΔLysM}* Mäusen im AOM/DSS-Modell untersucht. Im Gewichtsverlauf über die drei DSS-Zyklen unterschieden sich die beiden Genotypen nicht signifikant voneinander (Abbildung 37 A). In der Länge des Kolons, die ein Indiz für den Grad der Colitis zum Zeitpunkt der Organentnahme liefert, wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt (Abbildung 37 B). Nach dem 3. Zyklus war die Tumorbelastung der KO-Mäuse verglichen zu den geflochten Mäusen signifikant um 48 % reduziert ($p_{Zyklus3}=0,0074$). Sowohl die Anzahl der Tumore als auch der makroskopische Tumor Score waren in den KO-Mäusen ebenfalls erheblich um 34 % bzw. 37 % im Vergleich zu geflochten Mäusen reduziert (Abbildung 37 D, E; $p_{Tumorzahl}=0,0056$; $p_{TumorScore}=0,0007$). Die Ergebnisse dieses Versuchs indizieren eine tumorfördernde Funktion von HMGB1 in myeloiden Zellen im chronisch-entzündeten Kolon. Da HMGB1 als freigesetzter immunregulatorischer Faktor für die infiltrierenden Immunzellen in Frage kommt, wurden diese auf ihre Frequenz im Tumorgewebe mittels FACS Analyse im nächsten Schritt auf untersucht.

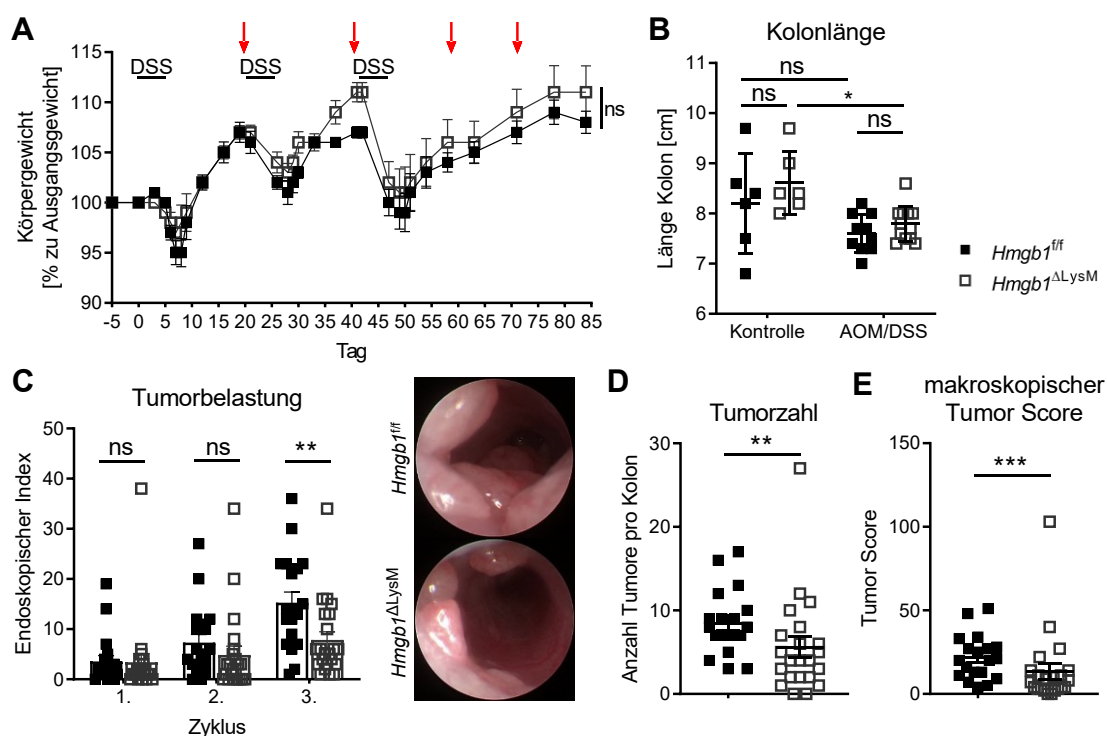


Abbildung 37 | Einfluss der myeloiden HMGB1-Deletion auf die Colitis-assoziierte Karzinogenese.

Hmgb1^{f/f} und *Hmgb1^{ΔLysM}* Mäuse wurden initial (Tag -5) mit AOM und anschließend über 3 Zyklen mit DSS-versetztem Trinkwasser zur Induktion einer chronischen Colitis behandelt (1 Zyklus: 5 Tage DSS, 16 Tage Wasser). Als gesunde Kontrollen für den Kolonlängenvergleich wurden unbehandelte Wurfgeschwister verwendet. A) Gewichtsverlauf und B) Kolonlänge ($n_{Hmgb1^{f/f}}=10$; $n_{Hmgb1^{\Delta LysM}}=12$). C) Tumorbilastung im Krankheitsverlauf mit beispielhaften endoskopischen Aufnahmen (rechts) ($n_{Hmgb1^{f/f}}=19$; $n_{Hmgb1^{\Delta LysM}}=22$). Mittels makroskopischer Bestimmung am entnommenen Darm ermittelte D) Tumorzahl und E) makroskopischer Tumor Score ($n_{Hmgb1^{f/f}}=19$; $n_{Hmgb1^{\Delta LysM}}=22$). Statistische Auswertung: A-C, Two-Way ANOVA Test; D, E, Mann-Whitney Test.

Die Zellen der angeborenen Immunantwort können vor allem über den NF- κ B-Signalweg und entsprechende Zytokine wie IL-6 oder TNF die Entwicklung eines pro-inflammatorischen TME fördern sowie die Proliferation der Epithelzellen [231]. Eine Veränderung der Frequenzen myeloider Zellen im Gewebe kann folglich einen Einfluss auf die Tumorgenese haben. Außerdem soll die Auswirkung auf Zellen des adaptiven Immunsystems ermittelt werden, da bekannt ist, dass eine Veränderung der T-Zell-Populationen die Tumorgenese beeinflussen kann [232]. Weiterhin ist bekannt, dass das Vorhandensein von Tumoren wiederum einen Einfluss auf die Zusammensetzung der T-Zellen hat [233]. Da die Tumorgenese durch die myeloide HMGB1-Deletion reduziert wird, soll mittels FACS-Analyse untersucht werden, ob die Frequenzen der Immunzellpopulationen im TME durch den HMGB1-KO verändert werden.

Der Anteil an Ly-6G⁺ Neutrophilen, Ly-6C^{high} inflammatorischen Monozyten und F4/80⁺ Makrophagen im Tumorgewebe AOM/DSS behandelten Mäuse beider Genotypen vergleichbar (Abbildung 38 A). Zusätzlich wurde die Subpopulation ARG1-produzierender

M2-Typ Makrophagen analysiert, da bereits ein Zusammenhang zwischen der Tumorgenese im CAC-Modell und M1- bzw. M2-Typ TAMs bekannt ist. In der Publikation konnte gezeigt werden, dass bei einer geringeren Tumorbelastung die Anteile von inflammatorischen Monozyten und Makrophagen unverändert waren, M1-TAMs hingegen waren vermehrt und M2-TAMs reduziert im TME vorhanden [234]. Die Population der hier untersuchten ARG1-produzierenden Makrophagen war im Vergleich der Genotypen jedoch vergleichbar. Im Tumorgewebe der myeloiden KO-Mäuse waren etwa gleich viele Cd4⁺, Cd8⁺ T-Zellen sowie T_H17-Zellen vorhanden wie in den geflochten Kontrollmäusen (Abbildung 38 B). Der Anteil der T-regulatorischen (T_{reg})-Zellen war in den KO-Mäusen leicht reduziert, jedoch ohne signifikanten Unterschied ($p=0,0714$). Eine verringerte Anzahl an T_{regs} kann unter Umständen zu einer aktiveren Antitumorantwort führen, da die Effektor-T-Zellen weniger reguliert werden [233], [235]. Die FACS-Analyse deutete nicht auf eine stark veränderte Zusammensetzung der infiltrierten Immunzellen im Tumorgewebe hin. Die reduzierte Tumorgenese in den KO-Mäusen scheint weder auf eine verminderte Infiltration von myeloiden Zellen noch auf eine Veränderung der T-Zell-Populationen zurückzuführen sein, da die HMGB1-Deletion keinen Einfluss auf die Frequenzen der untersuchten Immunzellpopulationen hat. Die Immunzellzusammensetzung ist somit vergleichbar, jedoch kann keine Aussage über eine mögliche intrazelluläre Veränderung in den Immunzellen oder einen Effekt durch die Nicht-Freisetzung von HMGB1 getroffen werden, die sich auf das Tumorwachstum auswirken könnten.

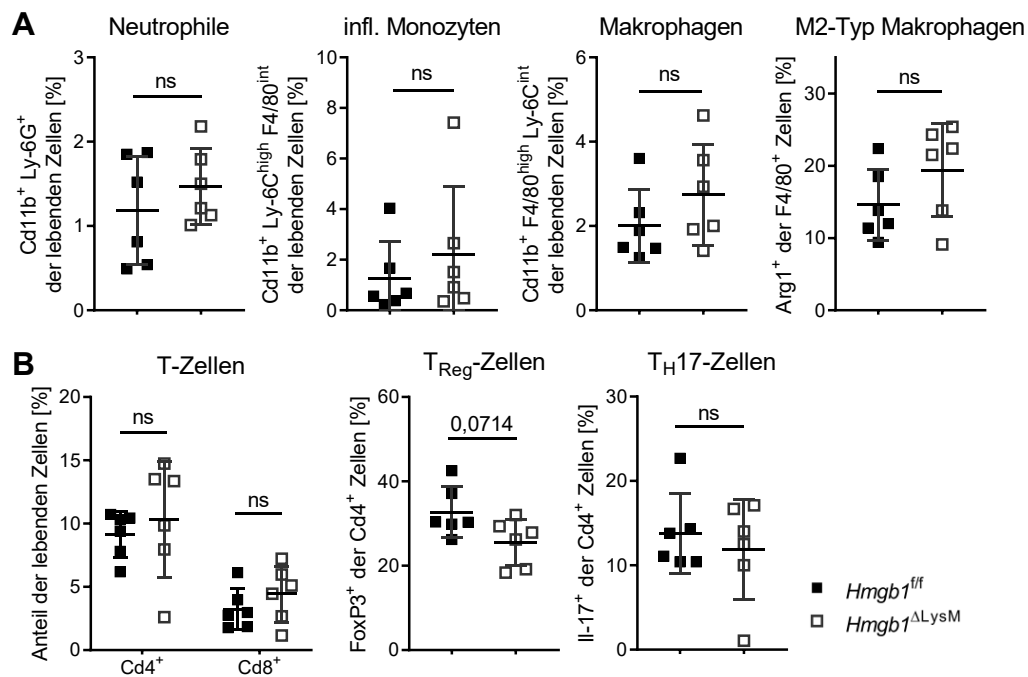


Abbildung 38 | FACS Analyse der Immunzellfrequenzen im Colitis-assoziierten Tumorgewebe nach myeloider HMGB1-Deletion.

Hmgb1^{fl/fl} und *Hmgb1*^{ΔLysM} Mäuse wurden initial (Tag -5) mit AOM und anschließend über 3 Zyklen mit DSS-versetztem Trinkwasser zur Induktion einer chronischen Colitis behandelt (1 Zyklus: 5 Tage DSS, 16 Tage Wasser). Als gesunde Kontrollen für den Kolonlängenvergleich wurden unbehandelte Wurfgeschwister verwendet. Mittels FACS wurde das Tumorgewebe hinsichtlich der Frequenz an unterschiedlichen A) Neutrophilen sowie Monozyten-/Makrophagenpopulationen und B) T-Zellpopulationen bestimmt. Statistische Auswertung: Mann-Whitney Test.

4 Diskussion

Das Zusammenspiel von DAMPs und PAMPs bei entzündlichen Prozessen und deren kombinierter Einfluss auf eine Immunantwort sind besonders an Oberflächen epithelialer Organe relevant [41]. Die hier zugrunde liegenden Wirkmechanismen sind sehr komplex und noch weitestgehend ungeklärt. Dem prototypischen DAMP HMGB1 wird dabei in der Vielzahl wissenschaftlicher Literatur eine Schlüsselrolle bei akuten und chronisch-maladaptiven Entzündungsprozessen in verschiedenen Organen zugeschrieben [86], [164]. Gleichzeitig bestehen zur Funktion von HMGB1 nach wie vor Unklarheiten hinsichtlich der bisher gewonnenen Daten, die sich größtenteils auf Antikörperstudien und Inhibitionsversuche (mit teilweise uneindeutiger Spezifität bzw. Nebeneffekten auf weitere Moleküle), sowie Untersuchungen zu akuten und chronischen Entzündungen in sterilen Organen (z.B. Leber) beschränken. Zudem ist die Wechselwirkung von DAMPs und PAMPs an der mukosalen Barriere überaus unverstanden. Weiterhin fehlen diesbezüglich solide, rein genetische Experimente, die die funktionelle Rolle von HMGB1 Kontext-abhängig adressieren. Im Zentrum der Fragestellung dieser Arbeit stand daher der relative Beitrag von HMGB1 für akut-entzündliche und chronisch-maladaptive Prozesse im Darm als Bakterien-besiedeltes Organ [2]. Das Ziel war eine explorative Ausarbeitung der immunregulatorisch funktionellen Rollen von HMGB1 in diesen Prozessen anhand neuartiger Versuchstiere mit konditionaler HMGB1-Defizienz in verschiedenen Zelltypen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten darüber hinaus eine Datengrundlage für weiterführende *in vivo* und *in vitro* Versuche zur HMGB1-Funktionalität im Rahmen von CEDs und CRC schaffen.

4.1 HMGB1 wird während der humanen CU und der murinen DSS-Colitis freigesetzt

In der hier vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass ein erhöhter Wert für die HMGB1-Konzentration im Serum durchaus eine Colitis anzeigt. Diese Assoziation zwischen einer erhöhten HMGB1-Konzentration im Serum mit der Colitis konnte ebenfalls im DSS-Mausmodell gezeigt werden. Dabei wurde keine Korrelation zwischen der Proteinkonzentration und dem Schweregrad der CU bzw. dem Zeitpunkt der murinen Colitis festgestellt, was hingegen in CU Patienten einer anderen Studie gezeigt worden ist [192]. Chen *et al.* zeigten eine ansteigende HMGB1-Konzentration im Serum von mild/moderat erkrankten Patienten zu schwer erkrankten Patienten. Dabei wurden Patienten mit jeglicher Co-Morbidität von der Analyse in der Publikation ausgeschlossen. Während in der Studie von Chen *et al.* außerdem ausschließlich Proben von unbehandelten Patienten verwendet worden sind, waren in der hier vorgelegten Arbeit Proben mit inbegriffen, die von Patienten vor und nach einer 3-monatigen entzündungshemmenden Therapie entnommen wurden.

Jedoch hatte diese 3-monatige Behandlung der Patienten, die den Schweregrad bei einigen verringerte (Änderung des Colitis-Scores), keinen Einfluss auf die HMGB1-Konzentration im Serum. Insgesamt bestätigen die hier vorgelegten Ergebnisse, dass HMGB1 durchaus eine entzündliche Erkrankung (bei Mäusen mit schwerem Gewebeschaden) anzeigen kann, jedoch keinen Rückschluss auf den Schweregrad einer Colitis zulässt bzw. für die Abschätzung der entzündlichen Aktivität geeignet ist. Um HMGB1 als Biomarker für eine CED in der Diagnostik einsetzen zu können, wäre allerdings genau diese zuverlässige Korrelation zwischen Proteinkonzentration im Serum und Schweregrad entscheidend. Welche Zellen letztendlich für die Freisetzung und den Anstieg von HMGB1 im Serum der Tiere verantwortlich sind, kann an dieser Stelle nicht bestimmt werden. Durch die immunhistochemische Färbung von HMGB1 wird jedoch angedeutet, dass durch die Entzündung im humanen sowie im Maus-Darmgewebe die teilweise Translokation des Proteins vom Zellkern ins Zytosol in Epithel- und in Immunzellen in der *Lamina propria* stattfindet. Es ist anzunehmen, dass auf die Translokation eine aktive oder passive Freisetzung des Proteins in den Extrazellulärraum sowohl durch die Immunzellen [92], [110], [236] als auch Gewebezellen [237], [238] folgt, welche durch das entzündliche Milieu dahingehend stimuliert werden. Diese Translokation und Freisetzung könnten anschließend für den Anstieg der HMGB1-Konzentration im Serum verantwortlich sein.

4.2 HMGB1 aus intestinalen Epithelzellen ist relevant für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere während der murinen DSS-Colitis

Es existieren verschiedene Mausmodelle, die es ermöglichen CEDs bzw. eine CU nachzuziehen und so ihre bisher noch nicht vollständig verstandenen Ursachen zu erforschen. Diese können z.B. chemisch-induziert, durch globale oder konditionelle Knockouts hervorgerufen oder durch den Transfer von pro-inflammatorischen T-Zellen vermittelt sein [175], [178], [239]. Zunächst einmal wurden in der *C. rodentium*-vermittelten und im T-Zell Transfermodell keine gesteigerten HMGB1-Serumlevel im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren gemessen, was auf die zum DSS-Modell unterschiedlichen Pathomechanismen der Colitis-Modelle zurückzuführen sein könnte. Die Krankheitsverläufe in diesen beiden Modellen sind bezogen auf den Gewebeschaden und den allgemeinen Krankheitsverlauf im Vergleich zur DSS-Colitis wesentlich milder. Die Inflammation in der *C. rodentium* Infektion ist zwar deutlich erkennbar durch die erhöhten Entzündungsparameter (z.B. IL-6, CXCL2 und NOS2), die Veränderung der Mukosa in Form einer Verdickung, die Verkürzung des Darms sowie die Immunzellinfiltration, doch ein Anstieg von HMGB1 im Serum im Vergleich zu den gesunden Tieren ist nicht aufgetreten. Durch den Transfer der Cd45RB^{high} Zellen wird ein ähnliches mildes Krankheitsbild wie durch die *C. rodentium* Infektion erzeugt. Die HMGB1-Konzentration liegt in den Mäusen, in die T-Zellen transferiert wurden,

unverändert vor. Dies könnte durch den viel späteren Zeitpunkt der Messung (Tag 44 nach Transfer) begründet sein, jedoch sind die klinischen Symptome zu diesem Zeitpunkt am stärksten gewesen. Ein optimaler Zeitpunkt für eine Konzentrationsmessung im Serum ist nicht bekannt und es wird nach wie vor diskutiert, in welchen Modellen HMGB1 als früher oder später Mediator einer Entzündung funktioniert, der dann im Serum oder Stuhl messbar ist [240], [241]. Ferner liegt wie bei der *C. rodentium* Infektion auch in der T-Zell-vermittelten Colitis eine intaktere epitheliale Darmbarriere vor als in der DSS-Colitis. Insgesamt hatte die HMGB1-Defizienz keinen Einfluss auf die Krankheitsverläufe der *C. rodentium*- und T-Zell-vermittelten Colitis. Abschließend lässt der Vergleich der drei Colitis-Modelle die Schlussfolgerung zu, dass HMGB1 während der DSS-Colitis mit nekrotischem, epitheliale Zellschaden ins Serum freigesetzt wird, in den milder verlaufenden Darmentzündungen jedoch nicht.

In der DSS-Colitis wird der Zellschaden der Epithelzellen direkt durch den hyperosmotischen Effekt des DSS hervorgerufen und erfolgt, im Gegensatz zur Transfer-Colitis, relativ unabhängig von der adaptiven Immunantwort [242], [243]. Zwar wird während der DSS-Colitis wie in der humanen CU vermehrt HMGB1 freigesetzt, in epithelialen KO-Mäusen (*Hmgb1*^{ΔIEC}) ist die HMGB1-Konzentration im Serum jedoch ebenso erhöht wie in den Kontrollmäusen, weshalb Epithelzellen nicht als Hauptquelle für das freigesetzte HMGB1 in Frage kommen. Als weitere mögliche Quelle könnten die Geweberesidenten sowie die infiltrierenden Immunzellen wie bspw. Makrophagen, Dendritische Zellen und Neutrophile (oder Endothelzellen, Thrombozyten usw.) dienen. In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass für die Freisetzung des DAMPs nicht zwangsläufig die primär geschädigten Zellen verantwortlich sein müssen. Während einer Listerien-Infektion bspw. sterben vor allem die infizierten und infiltrierenden Immunzellen im Rahmen der Immunantwort ab, sind jedoch nicht die Quelle des erhöhten HMGB1-Levels, sondern die sekundär betroffenen und gestressten Hepatozyten [238]. Versuchstiere mit einer myeloiden HMGB1-Deletion weisen jedoch keinerlei Unterschiede zu Wildtypmäusen weder in der *C. rodentium* Infektion, noch in der DSS-Colitis auf. Dies weist daraufhin, dass HMGB1 aus myeloiden Zellen keinen relevanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Insgesamt scheint die erhöhte HMGB1-Konzentration im Serum zwar ein Marker für eine schwere akute Colitis zu sein, jedoch hat es keinen immunregulatorischen Einfluss auf den Krankheitsverlauf, da der Niveaustieg sowohl in der humanen als auch in der murinen Colitis nicht mit dem Schweregrad korreliert.

Da die HMGB1-Serumlevels auch bei einer epithelialen HMGB1-Deletion vergleichbar hoch sind wie in geflochtenen Mäusen, ist anzunehmen, dass HMGB1 aus Epithelzellen im DSS-Modell vielmehr lokal eine Rolle spielt, also intrazellulär und parakrin für benachbarte Epithelzellen als auch submukosale Immunzellen, als dass es einen systemischen Effekt

hat. Es ist z.B. bekannt, dass HMGB1 intrazellulär Funktionen in der Transkription diverser Gene übernimmt, auf die eine Deletion verschiedene Auswirkungen haben könnte [88]. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungsanalyse, konnte keine KO-abhängige veränderte Signalwegaktivierung festgestellt werden, die HMGB1 in seiner DAMP-Funktion bestätigen würde. Für NF- κ B- und MAPK-Prozesse relevante Gene, die durch freigesetztes HMGB1 über Immunzellrezeptoren aktiviert werden können, waren in KOs verglichen zu geflochten Mäusen unverändert exprimiert. Dies würde die Annahme bestärken, dass im Rahmen der DSS-Colitis passiv und/oder aktiv freigesetztes HMGB1 aus Epithelzellen keine Rolle spielt, sondern dass durch die HMGB1-Deletion eher intrazelluläre Prozesse ausschlaggebend beeinflusst werden. Czarnewski *et al.* [210] konnten anhand einer sehr umfangreichen Sequenzierungsstudie zeigen, dass in jeder Phase einer DSS-Colitis spezifische Genmodule hoch- oder herunterreguliert sind, die dem Modell somit ein charakteristisches Entzündungsmuster geben und das größtenteils auf die humane CU übertragbar ist. In der Sequenzierungsstudie von Czarnewski *et al.* war ein Modul von Tag 2 bis Tag 4 hochreguliert, welches hauptsächlich durch Zellzyklus-assoziierte Gene charakterisiert ist. Dieses Modul ist für die hier vorliegende Arbeit interessant, da durch die epitheliale HMGB1-Deletion die Expression einiger Zellzyklus-assoziiierter Gene stärker herunterreguliert war als in geflochten Kontrolltieren an Tag 4 der DSS-Behandlung. Auch eine geringere Anzahl an Ki67-positiven Zellen in den Krypten der deletierten Mäuse weisen darauf hin, dass die für die Homöostase fundamentale Zellzyklusaktivität der Epithelzellen beeinträchtigt sein könnte. Dennoch entwickeln die KO-Tiere auch im höheren Alter (bis 1 Jahr) keinen Spontanphänotyp (Daten zum Alterungsversuch nicht gezeigt). Trotzdem könnte diese Beeinträchtigung möglicherweise unter Bedingungen der DSS-Exposition einen verstärkten Verlauf der Colitis fördern. Durch die Sequenzierung der Tag 4-Proben konnten neben der veränderten Zellzyklusaktivität auch eine veränderte Expression von Genen aufgezeigt werden, die mit der Angeborenen Immunantwort sowie der Zellrekrutierung/Zytokin Signalweiterleitung assoziiert sind. Durch die qPCR konnten ebenfalls einige inflammatorisch aktive Gene, wie *Tnf*, *Il6*, *Il1b*, *Cxcl2*, *Nos2* und *Arg1* identifiziert werden, die durch die stärkere Induktion in HMGB1-KOs eine verstärkte Immunantwort in diesen deletierten Mäusen anzeigten, dies jedoch erst nach Tag 4 signifikant unterschiedlich zu den geflochten Mäusen. Dies weist daraufhin, dass die erhöhten Entzündungs-assoziierten Parameter der DSS-Colitis als Konsequenz aus einem grundlegenden Defekt resultieren, jedoch nicht die Ursache selbst für den früh auftretenden Phänotyp der epithelial HMGB1-deletierten Tiere sind. Durch die FACS-Analyse konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Rekrutierung der Immunzellen der Angeborenen Immunantwort, die das charakteristische Expressionsmuster einer DSS-Colitis von Tag 2 bis Tag 14 verstärkt prägen [210], auch in den deletierten Mäusen funktionierte und sogar

mehr Immunzellen im Gewebe an Tag 8 vorlagen als in den geflochten Vergleichstieren. Dies spricht gegen die Hypothese, dass HMGB1 als DAMP aus Epithelzellen, teilweise in Co-Stimulation mit PAMPs, für die Aktivierung der relevanten Rezeptoren und somit Rekrutierung der Immunzellen zu einem frühen Zeitpunkt für dieses Modell relevant wäre. Die Hypothese, dass HMGB1 während der DSS-Colitis einen intrazellulären, für die Mäuse protektiven Effekt bewirkt, wird außerdem durch die publizierten HMGB1-Inhibitionsversuche bestärkt. Durch den Einsatz von Ethylpyruvat, Glycyrrhizin oder HMGB1-neutralisierende Antikörpern in der DSS-Colitis, wird HMGB1 bzw. dessen Freisetzung inhibiert, was den Schweregrad einer Colitis in den meisten Fällen vermindert [150]–[152]. Dies suggeriert eine extrazelluläre Rolle von HMGB1 als Verstärker der entzündlichen Aktivität. Wird diese extrazelluläre Funktion unterbunden, wobei die intrazellulären Funktionen von HMGB1 erhalten bleiben, reduziert sich scheinbar gleichzeitig die entzündliche Aktivität. Ein weiterer Aspekt zu dieser Überlegung ist, dass globale RAGE-KOs, bei denen der extrazelluläre Wirkmechanismus von HMGB1 zumindest auf den RAGE-Rezeptor unterbunden ist, weniger anfällig für Entzündungen im Intestinaltrakt sind als Wildtypmäuse [244]. Die Wirkweise von HMGB1 wird in den Inhibitionsversuchen als auch in den RAGE-KO Mäusen stets auf eine intrazelluläre Funktion eingeschränkt, was jedes Mal eine Verminderung der entzündlichen Aktivität zur Folge hat. Ergänzend zum Sequenzierungsergebnis und der qPCR-Analyse der hier vorliegenden Arbeit lässt sich daraus schließen, dass der HMGB1-RAGE-Signalweg, der HMGB1 als freigesetzten Liganden mit seiner DAMP-Funktion voraussetzen würde, weniger als fehlender Mechanismus für eine adäquate Immunantwort in Frage kommt, sondern die Aufmerksamkeit auf HMGB1-abhängige intrazellulär relevante Prozesse lenkt. Auch globale TLR4-KOs zeigen in der murinen DSS-Colitis zwar einen ähnlichen Phänotyp wie die epithelialen HMGB1-KOs in dieser Arbeit, jedoch mit einem stark abweichenden und teilweise umgekehrten Expressionsmuster der hier festgestellten veränderten Genexpression und deuten somit ebenfalls auf einen abweichenden zugrundeliegenden Mechanismus [245]. Andererseits könnte man vermuten, dass die DAMP-Funktion von HMGB1 durch dessen epitheliale Deletion fehlt, um die gewebeständigen *Lamina propria mononuclear cells* (LPMCs) zu einem frühen Zeitpunkt der Gewebeschädigung auf das Eindringen von Bakterien vorbereitet. Somit würde eine adäquate Aktivierung dieser Zellen durch HMGB1 nicht stattfinden und die entzündliche Aktivität bzw. der Schweregrad der Colitis schwerer ausfallen. Allerdings ist die Datenlage der HMGB1-Inhibitionsversuche mit dieser Annahme nicht direkt vereinbar.

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass zum Zeitpunkt vor der phänotypischen Veränderung die Gen-Expression für Muzine 1 und 2 durch die HMGB1-Deletion beeinträchtigt war (Daten nicht gezeigt). Diese Muzine (im Colon hauptsächlich Muzine 1-4) sind für den Aufbau des Mukus relevant, somit protektiv für die Darmbarriere und werden

während einer Colitis i.d.R. verstärkt exprimiert [246]–[248]. In beiden DSS-behandelten Genotypen war die Mucin-Expression als Teil des Abwehrmechanismus gleichermaßen erhöht, was darauf hindeutet, dass die HMGB1-Deletion keinen grundlegenden Einfluss auf die Produktion des Mucus zu haben scheint. Ein weiterer Grund für einen schwereren Verlauf der Colitis in HMGB1-deletierten Mäuse könnte eine größere Permeabilität der Epithelschicht sein, wodurch das Eindringen von Pathogenen durch die Darmbarriere weniger verhindert werden würde. Für Zellverbindungen und somit die Integrität der Barriere sind *tight junction* Proteine von entscheidender Bedeutung. Dazu zählen Claudin, Occludin, *Zonula occludens* (ZO-1), und weitere *tight junction* Proteine, die gemeinsam eine komplexe Architektur der Zellen und Zellverbände bilden [249]. Dazu ist bekannt, dass der Verlust der Integrität der Darmbarriere charakteristisch für CEDs ist [250]. Ein Defekt der *tight junctions* kann eine CED, abhängig von den Umgebungsbedingungen (genetischer Hintergrund, Mikrobiom, Ernährung) verstärken oder sogar Auslöser sein [251]. Ferner wurde HMGB1 bereits über verschiedene Modelle mit der Dysfunktion unterschiedlicher Zellbarrieren in Verbindung gebracht. In einem Beispiel wird gezeigt, dass aus Leberständigen Immunzellen in die Galle freigesetztes HMGB1 zur Dysfunktion der Darmbarriere beiträgt [141]. Zwei weitere Beispiele zeigen, dass die Überexpression von HMGB1 reziprok mit der Reduktion der *tight junction* Proteinexpression korreliert [252], [253]. Somit wird angenommen, dass vor allem die Freisetzung von HMGB1 die Reduktion der *tight junctions* bewirkt. Neben HMGB1 werden im Rahmen einer Entzündung jedoch auch Zytokine wie TNF α , IFN γ , IL-6, die einen lockernden Effekt auf die *tight junctions* haben und TGF β , IL-10 sowie IL-15, mit eher verstärkender Wirkung, freigesetzt und somit ebenfalls, teilweise über die Aktivierung von NF- κ B, Einfluss auf die Permeabilität der Darmbarriere haben können [251], [254]. Das heißt, dass die mögliche Freisetzung von immunregulatorischen Faktoren im Rahmen der stärkeren Entzündung der epithelialen HMGB1-KOs ebenso eine größere Permeabilität mit sich bringen kann als in den geflochten Kontrollmäusen, wodurch wiederum die Entzündung verstärkt werden würde. Die qPCR Analyse einer der wichtigsten *tight junction* Komponenten, Occludin [255], an Tag 4 ergab weder eine veränderte Expression zwischen behandelten und unbehandelten Mäusen noch zwischen den Genotypen (Daten nicht gezeigt). Da aus Immunzellen stammendes HMGB1 zuvor eher als *tight junctions*-reduzierender Faktor beschrieben wurde, wäre nur eine intrazelluläre protektive Funktion des Proteins in Epithelzellen denkbar, welche die *tight junctions* und somit die Darmbarriere verstärkt, weshalb die Deletion dann zur Schwächung dieser führen würde. Um diesen Zusammenhang genauer zu beleuchten, bedarf es weiterer Untersuchungen, die sowohl eine umfangreiche qPCR- als auch Western-Blot-Analyse der verschiedenen *tight junctions* Komponenten umfassen. Durch einen FITC-Dextran Permeabilitätstest könnte außerdem der trans-epitheliale Fluss während der DSS-Colitis

quantifiziert werden. Diese Untersuchungen sollten möglichst den gesamten Zeitverlauf des DSS-Colitis-Modells abdecken, um den entscheidenden Zeitpunkt herauszufinden, wann genau sich die HMGB1-Deletion auf die Permeabilität auswirken würde [256].

Zum Phänotyp der epithelialen HMGB1-defizienten Maus im DSS-Modell bzw. im Modellsystem „Darm“ existieren bereits veröffentlichte Daten. In einer Studie wird auf eine Veränderung des Apoptose- und des Autophagie-Mechanismus hingewiesen, welche durch die HMGB1-Deletion hervorgerufen wird [138]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch weder mittels TUNEL-Färbung, LC3 und p62 Western-Blot noch durch die Sequenzierung bzw. die *Pathway* Analyse bestätigt werden. Auch die Untersuchung einiger Apoptose-typischer Gene [257], wie *Bcl-2*, *Tnfa*, *Fas ligand* oder *Casp8*, mittels qPCR zeigte ein vergleichbares Niveau zwischen KO und Wildtyp an Tag 4 der DSS-Colitis. Der Phänotyp ist in seinem symptomatischen Krankheitsverlauf zwar vergleichbar mit den publizierten Daten, jedoch muss ein anderer Mechanismus, als der in der zuvor genannten Studie durch die HMGB1-Defizienz verändert sein. Dies könnte verschiedene Gründe haben. Zum einen können die unterschiedlichen Deletionsstrategien ein Grund dafür sein, denn in der vorliegenden Arbeit sind die Exons 2-4, in der Studie von Zhu *et al.* hingegen Exons 2-3 des Gens *Hmgb1* deletiert, was in einer Verschiebung des *open reading frames* und somit einer frühen Terminierung der Translation resultiert. Zum anderen wurde in dieser Arbeit eine niedrigere DSS-Konzentration von 1,5 % über 7 Tage eingesetzt im Vergleich zu 2,5 % bis 3 % über 5 Tage in der publizierten Studie. Die unterschiedliche Dosierung des DSS könnte den Krankheitsverlauf der Colitis verändern. Beispielsweise könnten bestimmte Effekte zu anderen Zeitpunkten auftreten, denn DSS zeigte dahingehend bereits Chargen-abhängige Variationen [174], [258]. Die Vergleichbarkeit bzw. die Reproduzierbarkeit sind somit nicht vollständig gegeben, jedoch ist hervorzuheben, dass der übergeordnete Phänotyp, der durch die epitheliale HMGB1-Deletion hervorgerufen wird, erhalten bleibt, obwohl in dieser Arbeit keine Unterschiede in Apoptose und Autophagie festgestellt wurden.

Eine myeloide HMGB1-Deletion hatte keine Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf der DSS-Colitis. Die Genotypen unterschieden sich weder symptomatisch noch waren Veränderungen der Immunzellinfiltration oder der Expression inflammatorischer Gene erkennbar. In Modellen, in denen die Immunzellen direkt durch Zellschädigung betroffen sind, wie z.B. durch bakteriellen Befall, sind von einer myeloiden HMGB1-Deletion abhängige Phänotypen beschrieben [118], [238]. In diesem Modell jedoch sind primär die Epithelzellen durch das DSS beschädigt, weshalb HMGB1 aus myeloiden Zellen im DSS-Modell möglicherweise nicht immunregulatorisch relevant für den hier hervorgerufenen Krankheitsverlauf ist. Auch Personnaz *et al.* zeigten 2018, dass HMGB1 aus Makrophagen z.B.

scheinbar keinen relevanten Beitrag für Prozesse der Gewebereparatur und Fibrogenese in der entzündeten Leber leistet [259].

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die Epithelzellen durch die HMGB1-Deletion möglicherweise nicht in der Lage sind, die Reproduktion der intestinalen Epithelzellen im Entzündungszustand ausreichend aufrechtzuerhalten, sodass sich die DSS-Colitis verstärkt. Dabei scheinen weder Apoptose- noch Autophagieprozesse in der akuten Phase grundlegend beeinträchtigt zu sein, wobei diese in der hier vorgelegten Arbeit nicht ausführlich, sondern nur orientierend betrachtet wurden. HMGB1 scheint in diesem Modell vor allem in Epithelzellen und weniger in myeloiden Immunzellen von entscheidender Bedeutung zu sein, da eine Deletion aus myeloiden Immunzellen keine vergleichbaren Auswirkungen zeigte. Interessanterweise ist der prägnante Phänotyp, der durch die epitheliale HMGB1-Deletion hervorgerufen wird, nach mehreren Zyklen, also im chronischen Krankheitsmodell weniger von Bedeutung und die Gewichtsverläufe von deletierten und geflochten Mäusen laufen parallel zueinander. Denn geht man nach dem ersten DSS-Zyklus von einem neuen Ausgangsgewicht aus, liegen keine signifikanten Unterschiede mehr vor.

4.3 Die HMGB1-Deletion in intestinalen Epithelzellen führt zu einer verstärkten Tumorprogression in der spontanen Kolorektalkarzinogenese in *Apc*^{Min} Mäusen

In einigen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass eine HMGB1-Überexpression im Tumorgewebe zumindest bei einigen Krebserkrankungen vorliegt [155], [156]. Für die HMGB1-Konzentration im Serum liegen verschiedene Daten vor, sodass HMGB1 keine rein pro- oder anti-tumorgene Rolle zugesprochen werden kann [193]. Vielmehr scheint die Funktion von HMGB1 sehr unterschiedlich und stark abhängig von der Tumorart und dem betroffenen Gewebe zu sein. In CRC Patienten wurde sowohl eine Überexpression in Tumoren als auch eine verstärkte Freisetzung von HMGB1 gezeigt [165]. Die erhöhte *Hmgb1*-Transkription sowie die verringerte *Ager*-Transkription in Tumoren des Gastrointestinaltraktes verglichen zum Normalgewebe konnte im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des GEPIA2-Onlinetools aus einer Datenbank zu RNA-Sequenzierungen von CRC-Patienten dargestellt werden [217]. Bemerkenswert war bei dieser Datenbankanalyse, dass die *Hmgb1*- und *Ager*-Transkription vor allem in Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts signifikant verändert waren, nicht jedoch in anderen Organen wie der Lunge oder den Nieren. Möglicherweise spielt HMGB1 somit explizit im bakterienbesiedelten Darm eine Rolle während der Karzinogenese. Im Gegensatz zu den publizierten Humanstudien wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit eine leichte, jedoch nicht signifikant erhöhte *Hmgb1*-Transkription im Tumorgewebe der Mäuse gemessen. Die *Ager*-

Transkription war ebenfalls in den Tumoren der Mäuse unverändert (Daten nicht gezeigt), wobei diese in den humanen Tumorproben der Online-Datenbank verringert war. Lediglich in den epithelial HMGB1-deletierten *Apc^{Min}*-Mäusen war die *Ager*-Transkription im Tumorgewebe verringert. Eine verstärkte Freisetzung von HMGB1 ins Serum der Tumorbelaasteten Mäuse wurde nicht festgestellt. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass in den Humanstudien keine entzündlichen Vorerkrankungen wie z.B. eine CED berücksichtigt wurden, die zum Teil *per se* erhöhte HMGB1-Konzentrationen im Serum als diagnostisches Merkmal mit sich bringen, was ebenfalls in dieser Arbeit sowohl für die CU Patienten als auch für die DSS-behandelten Mäuse gezeigt wurde [165], [193].

Hinsichtlich der Untersuchung der Rolle von HMGB1 im *Apc^{Min}* Maus-Modell hatte die epitheliale, nicht jedoch die myeloide HMGB1-Deletion eine signifikante Auswirkung auf die Tumorprogression. Möglicherweise fördern einige immunregulatorisch aktive Proteine, für die im Normalgewebe eine erhöhte Expression gemessen wurde, die Tumorprogression, wobei bisher kein genauer mechanistischer Kausalzusammenhang zwischen Entzündungs- und Karzinogeneseprozessen veröffentlicht wurde. Allerdings geht man allgemein davon aus, dass ein entzündliches Milieu ideale Bedingungen für Entartungsprozesse und Tumorprogression in verschiedenen Organen, aber vor allem in Gastrointestinaltrakt darstellt [59], [62], [260], [261]. Bei den stärker exprimierten Genen handelt es sich um das Chemokin *Cxcl2* [262], den M2-Makrophagen Marker *Cx3cr1* [234] sowie *Tgfb*. TGF β ist mit Prozessen der Wundheilung, Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix sowie Fibrose assoziiert und gilt in Verbindung mit Krebserkrankungen zum einen als Tumorsuppressor, zum anderen induziert TGF β , von einigen Tumorarten „umfunktioniert“, tumorgene und pro-metastatische Prozesse [263], [264]. Da diese Gene teilweise auch im DSS-Modell in Verbindung mit der epithelialen HMGB1-Deletion verstärkt exprimiert waren, könnte man auf Entzündungsreaktionen schließen, die zum einen durch einen möglichen Defekt der Regeneration der intestinalen Barriere begründet sein könnten, zum anderen jedoch durch die bereits höhere Tumorbelaastung selbst ausgelöst werden könnten, da bekannt ist, dass das Vorhandensein von tumorösem Gewebe eine spezifische Immunantwort auslöst [265]. Um sowohl den Entzündungszustand auf zellulärer Ebene als auch die Ursache dafür zu untersuchen und mögliche Unterschiede sichtbar zu machen, könnte eine FACS-Analyse durchgeführt werden, die auf Tumor-assoziierte Immunzellen bzw. Immunzell-spezifische Zytokine ausgerichtet ist. *Cxcl2* war neben weiteren Chemokinen auch in den HMGB1-deletierten Mäusen im DSS-Modell stärker exprimiert und korrelierte mit der verstärkten Neutrophilen-Infiltration. CXC-Motiv Chemokine bzw. entsprechende Rezeptoren sind vor allem für die Rekrutierung und Signalweiterleitung zwischen myeloiden Zellen wie Neutrophile, Monozyten und Makrophagen verantwortlich. Außerdem stehen sowohl diese Art von Chemokinen als auch die genannten

Immunzellen im Zusammenhang mit Entzündungen und Subpopulationen wie z.B. M2-TAMs, M2-Tumor-assoziierte Neutrophile (-TANs) sowie unreife Varianten sind mit einer verstärkten Angiogenese, Tumorzellinvasion und Metastasenbildung in CRC assoziiert [266], [267]. Neben *Cxcl2* war auch *Cx3cr1* überexprimiert, welches bereits in anderen Studien mit M2-TAMs und bei Überexpression mit einer schlechteren Prognose für CRC-Patienten korrelierte. Ein KO dieses Gens führte zu einer Verminderung von Metastasierung und einer geringeren Expression von Angiogenese-Markern [268]. *Tgfb*, das ebenfalls überexprimiert war, hat unterschiedliche Funktionen in Bezug auf CRC und wurde bereits über verschiedene Zusammenhänge als pro- als auch anti-tumorgen beschrieben [267]. Abhängig des zellulären Ursprungs wirkt sich TGF β im CRC-Kontext z.B. zytotoxisch auf anti-tumorigene Cd8⁺ T-Zellen aus [269], andererseits führt die Inhibierung der TGF β -Signalwege vermehrt zu Tumorzellinvasion und Metastasierung [270]. Auch die Polarisation von TANs wird durch TGF β beeinflusst und wirkt sich somit indirekt auf die Tumorprogression aus [271]. TGF β wird außerdem von bestimmten T_{reg}-Zellen produziert [82], [272], [273]. Eine erhöhte *Tgfb*-Transkription könnte möglicherweise für eine erhöhte Anzahl von T_{reg}-Zellen im Tumor, die supprimierend auf die Anti-Tumorantwort wirken, sprechen. Außerdem wird angenommen, dass TGF β auch für die Aktivierung dieser Zellen verantwortlich ist [82], was bei erhöhter Expression und einer möglichen verstärkten Freisetzung eine ähnliche Auswirkung auf die Tumorprogression haben könnte. Folglich wäre vor allem die Analyse dieser Immunzell-Subpopulationen, die für ihre pro-tumorigenen Eigenschaften bekannt sind, im Zusammenhang des in der hier vorgelegten Arbeit hervorgerufenen Phänotyps mit einer durch die epitheliale HMGB1-Deletion erhöhten Tumorbelastung sinnvoll. Da auch bestimmte T-Lymphozyten wie bspw. T_H17-Zellen durch vor allem Neutrophile und assoziierte CXCL-CXCR-Signalwege beeinflusst werden, die ebenfalls die Tumorprogression fördern können [267], wäre auch eine T-Zell-Populationsanalyse bzw. das Verhältnis [274] der verschiedenen Subpopulationen geeignet, um den Phänotyp weiter zu beschreiben und mögliche Zell-spezifische Ursachen zu bestimmen. Neben T-Zellen und Neutrophilen, stellen Makrophagen eine der größten Tumor-infiltrierenden Zellpopulationen dar und scheinen gerade aufgrund ihrer stark ausgeprägten Plastizität eine der einflussreichsten Immunzellen für die Entwicklung von Tumoren zu sein. Abhängig vom Subtyp dieser Makrophagen, können die Anwesenheit dieser Zellen entweder eine gute oder eine schlechte Prognose für einen Krebspatienten bedeuten, da sie z.B. entweder die Tumor-Zytotoxizität oder aber die Stimulation des Tumorwachstums fördern können [275]. Im Hinblick auf CRC scheinen Makrophagen jedoch eher inhibitorisch auf das Tumorwachstum zu wirken, weshalb auch die Analyse der im Tumor bzw. TME befindlichen Makrophagen-Subtypen (M1/M2-Polarisation) mittels FACS-Analyse in *Apc*^{Min}-Modell und in Verbindung mit der HMGB1-Deletion in Betracht gezogen werden

sollten. CX3CR1-exprimierende Makrophagen oder *myeloid-derived suppressing cells* (MDSCs), die eher den M2-Subtypen entsprechen, wirken beispielsweise immunsupprimierend auf die T-Zell-vermittelte Anti-Tumorimmunantwort und verstärken zusätzlich die Expansion von weiteren immunsupprimierenden T_{reg}-Zellen [276]. Zu MDSCs ist weiterhin bekannt, dass neben IFN γ , IL-1 β , TNF α , IL-6 und anderen, auch HMGB1 die Regulation dieser Zellen so beeinflusst, dass sie zu einem immunsuppressiven TME beitragen und somit die Tumorprogression fördern [277]. Dieser Zusammenhang zwischen HMGB1 basiert jedoch auf der NF- κ B-Aktivierung durch HMGB1 als extrazellulärer Ligand für PRRs und trifft für HMGB1 aus Epithelzellen (vgl. Phänotyp epithelialer HMGB1-KO) nicht zu. Die erhöhte Expression von *Cx3cr1*, als auch die veränderten Signalwege (*antigen processing-cross presentation* und *peptide ligand-binding receptors*), die in der Sequenzierungsanalyse der epithelialen HMGB1-KOs identifiziert wurden, könnten ebenfalls Hinweise auf veränderte Verhältnisse von Immunzellfrequenzen im Gewebe und somit eine veränderte Anti-Tumorimmunantwort sein. Außerdem wurde durch die Sequenzierung deutlich, dass weitere Faktoren wie CXCL9, CXCL10 (deren niedrige Expression mit einer schlechteren Prognose für CRC-Patienten korreliert [278]), als auch mittels qPCR angedeutet IFN γ , TNF α und TLR4 im Tumorgewebe der HMGB1-KOs im Vergleich zu den geflochten Mäusen stärker herunterreguliert waren, die normalerweise zu einer adäquaten Anti-Tumorantwort beitragen [279]. Insgesamt ist eine durch die HMGB1-Deletion veränderte Immunantwort, ob auf zellulärer Ebene und/oder durch eine veränderte Regulation der für die Tumorprogression relevanten Gene, eine mögliche Erklärung für die erhöhte Tumorprogression.

Eine FACS-Analyse zur Analyse der Immunzellzusammensetzung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da aufgrund der niedrigen Inzidenzen und der geringen Anzahl an spontan auftretenden Tumoren (vor allem in der geflochtenen Versuchsgruppe) nicht genügend Material bzw. eine zu geringe Anzahl an Proben verfügbar waren, um ausreichend auswertbare Ergebnisse sowie eine damit verbundene Vergleichbarkeit zu erreichen. Die niedrige Probenzahl kam u.a. durch die sequentielle Art der Probennahme zustande, die mit der Zucht mit einer niedrigen Tierzahl über einen längeren Zeitraum hinweg verbunden ist. Um eine möglichst große Anzahl an Versuchstieren zum selben Zeitpunkt verwenden zu können, bedarf es eines enormen Zucht- sowie Personalaufwands, der in diesem Projekt nicht realisierbar war. Um die niedrigen Inzidenzen zu umgehen und somit sowohl die Menge an Material als auch an isolierten Zellen zu erreichen, setzten bereits Metzger *et al.* ein sogenanntes beschleunigtes Verfahren ein, indem zur *Apc*-Mutation zusätzlich AOM appliziert wurde, wodurch die Anzahl der CRCs signifikant gesteigert und der Entstehungszeitpunkt vorgezogen werden konnte [280].

Neben der veränderten Expression einiger Entzündungs-typischer Gene, waren die Gene *Sox9*, *Pcna*, *Jun* und *Lgr5* im Normalgewebe der epithelialen HMGB1-KOs stärker exprimiert und sprechen möglicherweise für eine erhöhte Proliferation der Epithelzellen epithelial HMGB1-deletierter Mäuse. LGR5 ist ein Stammzellmarker, dessen Expression auf die Epithelzellen in den Krypten des Kolons beschränkt ist. LGR5 wurde bereits in verschiedenen Publikationen mit CRC, Tumorinvasion und Metastasierung in Verbindung gebracht. Dabei ist LGR5 ein WNT-Zielgen und möglicherweise ist der WNT/ β -Catenin-Signalweg an dieser Stelle der übergeordnete regulierende Faktor, wodurch eine explizite funktionelle Rolle für LGR5 als in CRC fraglich bleibt [281]. Des Weiteren spricht die erhöhte *Pcna*-Transkription ebenfalls für eine erhöhte Proliferation, jedoch sind in Bezug auf CRC unterschiedliche Effekte und keine direkten funktionellen Zusammenhänge bekannt. Im Gegensatz dazu ist SOX9 in vielen aktuellen Publikationen mit CRC verknüpft. SOX9 ist ein HMGB-Transkriptionsfaktor, enthält eine HMG-Bindedomäne und spielt normalerweise eine wichtige Rolle in der Embryogenese sowie in der Zellentwicklung und Differenzierung, auch im intestinalen Epithel [222]. Sowohl die Überexpression von SOX9 in Tumoren von CRC-Patienten [282] als auch die Beschreibung als Onkogen für verschiedene Krebsarten [222], fördert SOX9 die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) über den Hippo/YAP-Signalweg bspw. in Magenkrebs und beeinflusst darüber Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung von Tumorzellen und Stammzellen [221]. Wang *et al.* veröffentlichten dahingehend kürzlich Ergebnisse, die den Zusammenhang zwischen SOX9, YAP und HMGB1 im CRC-Kontext darlegen. Der Einsatz von Glycyrrhizin verringert dabei die Tumorbelastung durch die Inhibition der Immunantwort im AOM/DSS-Mausmodell für CAC [153]. Dabei ist die Vergleichbarkeit aufgrund der Colitis-Assoziation mit dem Entzündungs-unabhängigen *Apc*^{Min}-Modell nur bedingt gegeben. Die Verwendung von Glycyrrhizin zielte in dem Fall auf die Inhibition der HMGB1-Freisetzung und somit auch des HMGB1/TLR-4/NF- κ B-Signalwegs ab und nicht direkt auf eine intrazelluläre Funktion. Andererseits könnte man daraus schließen, dass dadurch vielmehr eine intrazelluläre Funktion von HMGB1 bewahrt oder gefördert werden könnte, die für die Verringerung der Tumorbelastung verantwortlich ist und somit vereinbar mit dem Phänotyp der epithelialen HMGB1-KOs in der spontanen Karzinogenese wäre. Ergänzend zu dieser Hypothese zeigten Luan *et al.* 2017 die Negativkorrelation zwischen HMGB1 und der Progression von Endometriumkarzinomen. Dabei wurde anti-*Hmgb1*-shRNA eingesetzt, was sich inhibierend auf die Transkription auswirkte und somit auch eine potentielle intrazelluläre Funktion blockierte. Dadurch wurde die Expression von E-Cadherin (Epithelmarker) reduziert und von N-Cadherin, Vimentin, SNAI1 und Twist erhöht, was u.a. zur Induktion von EMT führte [162]. Weitere im Normalgewebe der epithelialen HMGB1-KOs überexprimierte Gene wie *Raf1*, *Arhgef11*, *Lrp5* und *Notch1* sind ebenfalls, und vor allem über die

Regulierung von PP2A, mit dem WNT/ β -Catenin-Signalweg und somit dem Zellzyklus bzw. Zellproliferation verbunden [283]. Eine verstärkte Aktivierung dieses Signalwegs, der bereits durch die APC-Mutation weniger stark reguliert ist als in Wildtypen (reduzierter Abbau von β -Catenin), führt möglicherweise auch ohne ein erhöhtes Aufkommen des WNT-Liganden aber mit überexprimierten assoziierten Genen zu einer verstärkten Proliferation der Zellen. Welche Rolle HMGB1 an dieser Stelle im Detail und vor allem auf welcher Ebene der Signalwege spielt, ist nicht bekannt. Diese Überexpression der Gene verbunden mit der HMGB1-Deletion und der phänotypischen Tumorprogression bestärkt jedoch die Annahme, dass HMGB1 eine in den Epithelzellen intrazelluläre, regulatorische Funktion in Bezug auf die Zellproliferation haben könnte. Im Gegensatz dazu scheint HMGB1 in Abhängigkeit von YAP den sogenannten Warburg Effekt, also die aerobe Glykolyse in Leberkrebszellen zu kontrollieren und die Tumorgenese durch die metabolische Veränderung zu fördern [284]. Wahrscheinlich verändern sich gleichzeitig mehrere Prozesse, in die HMGB1 auf verschiedenen Ebenen in Signalwege involviert ist.

Im Zuge der epithelialen HMGB1-Deletion in den *Apc*^{Min}-Mäusen war laut der GO Analyse die *GABA B receptor activation* verändert und assoziierte Gene größtenteils herunterreguliert. Auch einige GABA-B-Rezeptoruntereinheiten waren in HMGB1-KOs weniger stark exprimiert. Eine vor kurzem publizierte Studie zeigte den Zusammenhang zwischen der *Gababr1*-Expression bzw. shRNA-basierter Inhibierung der Expression und einer erhöhten Tumorprogression *in vivo*. Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls wie SOX9 und HMGB1 auf den Hippo/YAP-Signalweg zurückgeführt. Im humanen Krankheitsbild war außerdem eine hohe GABAR1 Expression mit einer verbesserten Prognose von CRC-Patienten einhergehend [285]. Der genaue Zusammenhang zwischen HMGB1 und dem YAP-Signalweg ist bisher nicht bekannt, jedoch stellt er einen wohlmöglich relevanten Signalweg für die intrazelluläre Funktionsweise von HMGB1 dar. Je nach Co-Faktoren werden über die YAP/TAZ-Aktivierung abhängig vom Zelltyp Proliferation, Migration, Stammzellaktivität, Zellschicksale, Morphologie und das Überleben der Zellen gesteuert. Eine strenge Regelung dieses Signalwegs ist aufgrund der Vielseitigkeit und der unterschiedlichen Co-Prozesse nötig, um eine Überstimulation mit erhöhter Proliferation und Gewebeverdickung bzw. eine verspätete Regeneration und beeinträchtigte Wundheilung zu verhindern [286]. Im Vergleich mit der Sequenzierung der DSS-behandelten Mäuse an Tag 4, waren in Verbindung mit der epithelialen HMGB1-Deletion verschiedene *Mcm* Gene und eine Polymerase herunterreguliert, die z.T. Zielgene des YAP/TAZ-Signalwegs im Zellzyklus sind. Im Gegensatz dazu sind in den Tumoren der HMGB1-deletierten Mäuse Gene wie *Myc*, *Nanog*, *Sox9*, *Cyr61* (CNN1), *Cdc42bp* sowie *Jun* hochreguliert, die Zielgene oder Gene, die mit den Zielgenen verknüpft sind bzw. relevante Co-Faktoren für die Transkriptionsaktivierung dieser Gene sind. In den Tumoren waren somit Zielgene

hochreguliert, die am Ende der YAP/TAZ-Signalwege bezüglich EMT, Zellmigration und Zellplastizität und/oder Potenz anstelle von Zellzyklus, wie im DSS-Modell hervorgehen. Damit könnten unterschiedliche Signalwege, abhängig des Krankheitsmodells, von der HMGB1-Deletion betroffen sein und so die Grundlage für veränderte Prozesse darstellen. Im Normalgewebe der epithelial HMGB1-deletierten Mäuse waren Gene wie *Raf1*, *Notch1*, *Mid1*, *Hipk2* und andere stärker exprimiert als in geflochten Mäusen im *Apc^{Min}*-Modell. Neben dem bereits erwähnten WNT/ β -Catenin-Signalweg, der durch einen Teil dieser Gene beeinflusst sein könnte, ist auch der MAPK-Signalweg möglicherweise durch die unterschiedlich regulierten assoziierten Gene verändert. Eine Überexpression des Proto-Onkogens *Raf1* führt möglicherweise zu einer verstärkten Aktivierung des MEK/ERK/MAPK-Signalwegs und führt zur Transkription von AP-1-Komponenten, wie z.B. dem Transkriptionsfaktor JUN, welcher ebenfalls in diesen Mäusen überexprimiert ist [287]. Der MEK/ERK-Signalweg ist für die Progression des Zellzyklus verantwortlich und könnte ebenfalls die erhöhte Tumorbelastung bzw. Tumorprogression erklären.

Durch die Sequenzierungsanalysen dieser Arbeit identifiziert, waren u.a. die Gene *Gnai1* und *Olf78* versuchsübergreifend in den epithelial HMGB1-deletierten Mäusen signifikant herunterreguliert. GNAI1 ist eine inhibitorische G-Proteinuntereinheit, die nach der Stimulierung des entsprechenden GPCRs, bspw. CXCR4, Adenylycyclasen inhibiert und somit die cAMP-Synthese reguliert. cAMP dient der Zelle als vielfältiger *second messenger* und ist relevant für die Signalweiterleitung über Proteinkinasen [288]. Eine Deletion des Gens *Gnai1* resultiert in einer schwereren Colitis und CAC im AOM/DSS-Modell. Ferner wurde in Tumoren von CAC-Patienten eine reduzierte Expression von *Gnai1* und *Gnai3* festgestellt und die Analyse öffentlicher Humandaten von CRC-Patienten zeigte, dass eine niedrige Expression dieser Gene mit vermehrten Krankheitsrückfällen verbunden war [289, S. 1]. Außerdem wurde GNAI1 in einer Studie zu Leberkrebs (*hepatocellular carcinoma*, HCC) als Suppressor für Metastasierung in HCC-Zellen beschrieben und scheint in HCC selbst ebenfalls herunterreguliert zu sein [290, S. 1]. Die geringere *Gnai1*-Transkription in Verbindung mit der epithelialen HMGB1-Deletion könnte darauf hindeuten, dass HMGB1 möglicherweise bei der Regulation der *Gnai1*-Transkription eine Rolle spielt und daher ein interessantes Protein für die weitere Erforschung möglicher Mechanismen darstellt. OLFR-78, ein GPCR, dessen Transkription ebenso wie die von GNAI1 herunterreguliert war, wurde vor kurzem von Kotlo *et al.* als Modulator für Entzündungen im Darm beschrieben. OLFR-78 ist vor allem im Epithel des Kolons exprimiert und die Expression ist in Colitis-Modellen reduziert. OLFR-78-KO Mäuse weisen eine höhere Expression von IL-1 β im unbehandelten Zustand auf sowie ein höheres MPO-Level und einen höheren mukosalen Gewebeschaden nach DSS-Behandlung. Weitere Gene sind unterschiedlich zum

Wildtyp exprimiert, die möglicherweise mit Veränderungen des Mikrobioms aber vor allem mit Entzündung und CRC in Verbindung stehen [291].

Zusammengefasst bewirkte die epitheliale HMGB1-Deletion in *Apc^{Min}*-Mäusen eine erhöhte Tumorbelastung der Mäuse. Dabei war nicht die Anzahl der Tumore verändert, sondern eher die Tumorprogression, die anhand der Tumorgröße bemessen werden konnte. Die Sequenzierungs- und qPCR-Analysen zeigten, dass vor allem im Normalgewebe (makroskopisch tumorfreies Gewebe) dieser Mäuse Entzündungs-assoziierte Gene stärker induziert waren, die auf eine Veränderung der Immunzellzusammensetzung hindeuten könnten. Einige der vermuteten Immunzellen, wie immunsupprimierende Subtypen von TAMs und MDSCs oder T_{reg}-Zellen können für eine erhöhte Tumorprogression verantwortlich sein, weshalb eine FACS-Analyse sinnvoll für die Aufklärung der Immunzellzusammensetzung wäre. Weiterhin war die Expression von Genen verändert, die im Normalgewebe der HMGB1-KOs auf eine erhöhte Aktivierung der Zellzyklusaktivität schließen lassen können. Dabei stehen mögliche Veränderungen der Hippo/YAP-, WNT/ β -Catenin- und MEK/ERK/MAPK-Signalwege im Fokus. Aufgrund der verfügbaren Publikationen zu HMGB1-Inhibitionsversuchen in CRC-Modellen, wäre eine protektive intrazelluläre Funktion von HMGB1 in Epithelzellen eine mögliche Erklärung für den in dieser Arbeit erhaltenen Phänotyp. Gleichzeitig scheint im Tumorgewebe derselben Mäuse zum einen die Anti-Tumorimmunantwort verändert zu sein, zum anderen könnte (nach der *GO Pathway* Analyse) der Metabolismus der Tumorzellen verändert sein, sodass eine Tumorprogression gefördert wäre. Diese Annahmen sind relativ spekulativ und bedürfen einer angemessenen Überprüfung anhand weiterer *in vitro*-Versuche, die die entsprechenden Signalwege und Zellveränderungen in Verbindung mit einer HMGB1-Defizienz überprüfen.

4.4 Die myeloide HMGB1-Deletion führt zu einer geringeren Tumorbelastung während der CAC

Wenngleich HMGB1 eine relevante Rolle in Epithelzellen für die spontane Karzinogenese im Kolon spielt, hat eine HMGB1-Deletion, trotz des Phänotyps in der DSS-Colitis, keine Auswirkung auf den Phänotyp im AOM/DSS-Modell. Der initial signifikant stärkere Gewichtsverlust im ersten DSS-Zyklus war mit dem Phänotyp der epithelialen HMGB1-KOs im DSS-Modell vergleichbar. Analysen von Humanstudien zeigen, dass durch den Einsatz von inflammationshemmenden Therapien in CU Patienten die CRC-Inzidenz in die letzten Dekaden gesunken ist [292]. Anhand dessen könnte man vermuten, dass ein initial stärkerer entzündlicher Phänotyp in AOM/DSS-behandelten Mäusen in einer erhöhten Tumorbelastung resultiert. Die erhöhte Immunzellinfiltration sowie Expression pro-inflammatorischer Gene können zur Aktivierung einiger Signalwege führen, die die Tumorprogression fördern. Dazu gehören z.B. die Proteine IL-6, IL-1 β und TNF α , die in epithelial HMGB1-

deletierten Mäusen im DSS-Modell überexprimiert waren, durch die u.a. MAPK oder NF- κ B, STAT3 und AKT aktiviert werden [293]. Gleichwohl führte der initial erkennbare Phänotyp der HMGB1-KOs nicht zur Erhöhung der Tumorlast. Die Applikation von AOM führt in Mäusen in Kombination mit der Gabe von DSS zu verschiedenen Mutationen. Häufiger als APC sind bei CAC die Tumorsuppressoren TP53 am häufigsten, KRAS, WNT/ β -Catenin-assoziierte Proteine oder KLF6 mutiert, wodurch die Tumorentstehung initiiert wird [187], [293]. Auch deshalb unterscheiden sich die Modelle der spontanen Karzinogenese und der CAC. Eine mögliche Erklärung für die vergleichbare Tumorbelastung im AOM/DSS-Modell könnte sein, dass die HMGB1-Deletion und deren Auswirkung auf die Homöostase der Darmbarriere nach einem initialen DSS-Zyklus durch bestimmte Mechanismen ausgeglichen wird und diese dadurch für die Karzinogenese keine Relevanz mehr hat. HMGB1, welches während der DSS-Colitis durch Gasdermin E -vermittelte Pyroptose freigesetzt wird, scheint außerdem das Tumorwachstum zu fördern. Durch einen Gasdermin E-KO oder eine HMGB1-Neutralisation mittels Antikörper-Behandlung entwickelten AOM/DSS-behandelte Mäuse weniger Tumore. Weiterhin steigerte freies HMGB1 die Proliferation und PCNA-Expression in Kolon-Krebszellen über den ERK1/2-Signalweg [294]. Eine epitheliale HMGB1-Deletion könnte die Tumorfördernde Funktion von aus CRC-Zellen freigesetztem HMGB1 somit ebenfalls unterbinden und sich neben der möglicherweise stärkeren Immunantwort ausgleichend auswirken. Des Weiteren wirkt sich diese in den HMGB1-KOs hervorgerufene Immunantwort, die sich von den geflochten unterscheidet, nicht tumor-progressiv aus. Die Immunzellfrequenzen und Zytokin-Levels sind dabei vielleicht weniger entscheidend, umso wichtiger die funktionellen Eigenschaften der Immunzellen, die sich sowohl progressiv als auch supprimierend auf das Tumorwachstum auswirken können. Die myeloiden Immunzellsubpopulationen mit M1/M2-Phänotypen oder verschiedene T-Zellpopulationen wurden an dieser Stelle nicht genauer untersucht. Somit könnte eine höhere Immunzellinfiltration und stärker exprimierte Zytokine, die normalerweise das Tumorwachstum fördern, durch ebenso erhöhte tumor-supprimierende Zellen, wie z.B. T-Zellen mit Tumor-zytotoxischen Eigenschaften, ausgeglichen werden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte mit der Genmutation, die dem Karzinogeneseprozess zugrunde liegt, verbunden sein. Für die spontane Karzinogenese im *Apc*^{Min}-Modell ist eine spezifische Punktmutation im Tumorsuppressorgen *Apc* verantwortlich. Falls HMGB1 mit der APC-Funktion in Verbindung steht, könnte eine AOM-induzierte, davon abweichende Mutation möglicherweise keinen vergleichbaren Effekt erzielen, der dementsprechend unabhängig von der Entzündungsreaktion wäre. Reed *et al.* vermuten, dass HMGB1 in Folge der WNT-Aktivierung und dem zusätzlichen Verlust von APC aus intestinalen Epithelzellen freigesetzt wird und daraufhin zum Phänotyp der Krypten-Vorläuferzellen beiträgt [295]. Ein Mechanismus, der den darin aufgezeigten pro-tumorigenen Effekt

von HMGB1 erklären würde, der nebenbei im Widerspruch zu den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit steht, wird jedoch nicht beschrieben. Außerdem enthält HMGB1 TCF und LEF1-spezifische DNA-Bindesequenzen, deren Funktion als Transkriptionsfaktoren für den Ablauf des WNT/ β -Catenin-Signalwegs entscheidend sind [86]. Allerdings sind dies nur wenige Indizien für einen tatsächlichen funktionalen Zusammenhang zwischen HMGB1 und APC-abhängigen Prozessen.

Im Gegensatz zur epithelialen führte die myeloide HMGB1-Deletion zu einer signifikant verringerten Tumorbelastung der AOM/DSS-behandelten Mäuse. Dadurch, dass der Gewichtsverlauf der KO-Mäuse keine Abweichungen zu dem der geflochten Mäusen aufwies und sich die Genotypen auch im DSS-Modell bezüglich der Immunzellinfiltration nicht voneinander unterschieden, könnte man davon ausgehen, dass die Immunantwort im AOM/DSS-Modell annähernd vergleichbar abläuft. Dennoch scheinen die HMGB1-deletierten myeloiden Zellen entweder eine veränderte direkte oder indirekte Auswirkung auf die Tumorprogression der Tiere zu haben. Da die Immunzellinfiltration bis auf die T_{reg}-Zellen vergleichbar war, könnte es sein, dass die Polarisation und somit bisher nicht analysierte Subpopulationen der myeloiden Immunzellen im TME durch die HMGB1-Deletion verändert sind. Dabei würden sich beispielsweise M1-Makrophagen oder N1-Neutrophile weniger progressiv auf das Tumorstadium auswirken als M2- und N2-phänotypische myeloide Zellen und vielmehr die Anti-Tumorantwort fördern [266], [271], [277, S. 1]. Weiterhin ist die T_{reg}-Zellfrequenz in den myeloiden HMGB1-KOs leicht reduziert. T_{reg}-Zellen wirken supprimierend auf die protektive Immunantwort in CRC [296] und sind deshalb aktuell ein potentielles Therapieziel für Krebserkrankungen [82], [272], [273]. In *Apc*^{Min}/DREG Mäusen (T_{reg}-depletierte Mäuse) bspw. sind sowohl die Proliferation als auch die Aktivität von speziellen Cd8 $\alpha\beta$ ⁺-T-Zellen im TME erhöht, wodurch die Anti-Tumorantwort ebenfalls verstärkt ist [297]. Eine von der HMGB1-Deletion abhängige phänotypische Veränderung der Makrophagen zum M1-Subtyp im TME könnte dazu führen, dass weniger IL-10 und TGF β (typisch für M2-TAMs) produziert werden würden, die T_{reg}-Zellen induzieren und würden sich somit immunsupprimierend sowie indirekt supprimierend auf das Tumorstadium auswirken [298]. Hubert *et al.* konnten kürzlich für Brust-, Lungen- und Gebärmutterkrebs zeigen, dass durch die Inhibierung von extrazellulärem HMGB1 mittels Glycyrrhizin, *RAGE antagonist peptide* und Ethylpyruvat u.a. Populationen immunsupprimierender Zelltypen wie MDSCs und T_{reg}-Zellen drastisch reduziert und das Verhältnis M1- zu M2-Makrophagen deutlich erhöht waren, ohne dass die Anzahl von Cd45⁺-Zellen verändert war. Außerdem verbesserte das Blockieren von HMGB1 die anti-PD-1 Krebsimmuntherapie (Checkpoint-Inhibitor), dabei wurde betont, dass die intrazellulären protektiven Eigenschaften von HMGB1 durch die gewählten inhibitorischen Eingriffe nicht gehemmt werden würden [299]. Dies zeigt, dass HMGB1 neben der hauptsächlich

Beschreibung als pro-inflammatorisches und chemotaktisches Molekül, abhängig vom zellulären Ursprung, möglicherweise auch eine extrazelluläre immunsupprimierende Rolle spielen könnte, indem es die Immunzellphänotypen im TME beeinflusst. Da sich diese Publikation auf die Tumorgenese in mikrobiell weniger bis gar nicht besiedelten Organen bezieht (Zervix, Lunge, Brustgewebe), müsste diese Hypothese speziell im dicht besiedelten Darm überprüft werden.

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie zeigten Yuan *et al.* für Myofibroblast-spezifische MyD88-KO Mäuse vergleichbare Phänotypen zu den epithelialen HMGB1-KOs im DSS-Modell und den myeloiden HMGB1-KOs im AOM/DSS-Modell der hier vorliegenden Arbeit. MyD88 ist ein Adapterprotein für TLRs und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung nach Bindung an bspw. HMGB1 als DAMP und PAMPs. Der NF- κ B-Signalweg wird aktiviert, woraufhin Zytokine sowie Chemokine im Rahmen der Immunantwort produziert und freigesetzt werden. Daher steht HMGB1 über seine TLR2- und TLR4-Interaktion im direkten Zusammenhang mit MyD88 [113], [115]. Die folgend dargestellten Erkenntnisse der publizierten Studie könnten somit ergänzende Hinweise auf eine mögliche, relevante Funktionsweise liefern.

In der DSS-Colitis waren Gewichtsverlust und Kolonverkürzung wesentlich gravierender in MyD88-KOs verglichen zu DSS-behandelten Kontrollmäusen. Die Ki67-Expression war in den Epithelzellen der KOs reduziert. Die Immunzellinfiltration (Cd11b⁺, F4/80⁺ und Gr1⁺-Zellen) war durch den MyD88-KO in Myofibroblasten unverändert. Trotz des initial gravierenden Gewichtsverlustes der KOs entwickelten diese im AOM/DSS-Modell insgesamt signifikant weniger Tumore als auch weniger große Tumore im Kolon. In beiden Modellen waren in den KOs verglichen zu den Kontrollmäusen signifikant mehr Cd86⁺- und iNOS⁺- sowie signifikant weniger Cd206⁺- und Arg1⁺-Zellen im Kolongewebe vorhanden [300, S. 88]. Eine derartige Verschiebung hin zu M1-phänotypischen Immunzellen anstelle vom M2-Subtyp könnte sowohl eine verstärkte Entzündungsreaktion in der DSS-Colitis erklären, als auch eine erhöhte Anti-Tumorantwort im AOM/DSS-Modell, trotz der initial verstärkten Inflammation. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit würde HMGB1 primär als DAMP aus Epithelzellen relevant für eine DSS-Colitis sein, indem möglicherweise MyD88 in Gewebeständigen Myofibroblasten unmittelbar durch aus Epithelzellen freigesetztes HMGB1 aktiviert werden würde, um M2-Makrophagen für eine adäquate Gewebereparatur zu akquirieren. Dies würde jedoch eher gegen die Annahme sprechen, dass HMGB1 überwiegend eine intrazelluläre Rolle in Transkriptionsprozessen spielt, wobei dies ebenfalls abhängig vom Modell (DSS vs. *Apc*^{Min}) untersucht werden müsste. Im chronisch-maladaptiven AOM/DSS-Modell bewirkt HMGB1 aus myeloiden Zellen als relevante zelluläre Quelle die Colitis-assoziierte Tumorgenese im Kolon sowie die verstärkte Tumorprogression über MyD88 in *Cancer associated fibroblasts* (CAFs), indem

MyD88 weiterhin M2-Makrophagen polarisiert, die immunsupprimierend und in diesem Fall Tumor-fördernd wirken [300], [301]. Yuan *et al.* identifizierten in ihrer Studie keinen spezifischen Rezeptor für den MyD88-Signalweg, verwiesen jedoch darauf, dass vor allem TLRs für die MyD88-Aktivierung verantwortlich sind, die größtenteils mit HMGB1 und verschiedenen PAMPs interagieren. Für die M2-Polarisation der Makrophagen scheint das von Myofibroblasten und CAFs freigesetzte Protein Osteopontin verantwortlich zu sein, welches daher ein mögliches analytisches Mittel für weiterführende *in vitro* Versuche darstellt. In Verbindung mit der hier vorliegenden Arbeit ist noch ungeklärt, ob HMGB1 eher als DAMP oder als aktiv aus Immunzellen freigesetztes Zytokin bzw. Chemokin funktioniert.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse dieser explorativ aufgebauten Arbeit darauf hin, dass HMGB1 stark abhängig vom Zelltyp unterschiedlich relevant für Prozesse in akut-entzündlichen, spontanen Karzinogenese- sowie chronisch-maladaptiven Prozesse ist. So stellt HMGB1 in Epithelzellen einen protektiven Faktor für die murine DSS-Colitis dar, wobei es in den milderen Pathogen-induzierten bzw. der chronischen T-Zell-vermittelten Colitis sein Fehlen ohne Konsequenz auf den entzündlichen Phänotyp bleibt. In der spontanen Karzinogenese im *Apc^{Min}*-Modell schützte HMGB1 in Epithelzellen die geflochtenen Kontrollmäuse vor einer stärkeren Tumorprogression, wie sie in KO-Mäusen festgestellt wurde. Interessanterweise spielte der Epithelzell-spezifische KO keine Rolle im AOM/DSS-Modell, obwohl initial Anzeichen für eine signifikant stärkere Entzündungsreaktion in den KO-Mäusen vorlagen, die in den nächsten Zyklen ausgeglichen zu sein schienen. Im Gegensatz zu HMGB1 in Epithelzellen, nahm HMGB1 aus myeloiden Immunzellen insbesondere eine relevante Rolle im AOM/DSS-Modell ein und förderte die Entzündungs-assoziierte Tumorprogression. Möglicherweise sind dabei, nach kürzlich veröffentlichten Daten von Yuan *et al.*, die scheinbar protektive Rolle von HMGB1-positiven Epithelzellen in der DSS-Colitis und die tumorfördernde Rolle von HMGB1-positiven myeloiden Immunzellen im AOM/DSS-Modell über MyD88 in Myofibroblasten bzw. CAFs miteinander vereinbar. Die Ergebnisse des *Apc^{Min}*-Modells stehen dabei eher außen vor und unterscheiden sich möglicherweise durch den zugrunde liegenden Pathomechanismus wesentlich von den chemisch-induzierten Colitis- und CAC-Modellen.

Appendix

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 EINTEILUNG DES KOLONS UND DIE DARMSCHLEIMHAUT.....	6
ABBILDUNG 2 ROLLE DER PAMPs UND DAMPs WÄHREND EINER CHRONISCH-ENTZÜNDLICHEN DARMERKRANKUNG (CED).....	10
ABBILDUNG 3 DIE STRUKTUR UND FUNKTION VON HMGB1.....	16
ABBILDUNG 4 DIE FREISETZUNG UND ROLLE VON EXTRAZELLULÄREM HMGB1.....	17
ABBILDUNG 5 CRE-LOX STRATEGIE UND EFFEKTIVE DELETION.....	29
ABBILDUNG 6 VERSUCHSSCHEMA DER MURINEN DSS-COLITIS.....	30
ABBILDUNG 7 VERSUCHSSCHEMA ZUR <i>CITROBACTER RODENTIUM</i> INFEKTION.....	31
ABBILDUNG 8 VERSUCHSSCHEMA DER Cd45RB ^{HIGH} COLITIS.....	32
ABBILDUNG 9 VERSUCHSSCHEMA ZUM APC ^{MIN} MAUSMODELL.....	32
ABBILDUNG 10 VERSUCHSSCHEMA ZUM AOM/DSS MAUSMODELL.....	33
ABBILDUNG 11 EINTEILUNG DES KOLONS WÄHREND DER ORGANENTNAHME.....	35
ABBILDUNG 12 INNATE PANEL GATING STRATEGIE.....	38
ABBILDUNG 13 HMGB1 IN HUMANPROBEN.....	47
ABBILDUNG 14 HMGB1 IM TRANSLATIONALEN CU-MAUSMODELL.....	49
ABBILDUNG 15 EINFLUSS VON EPITHELIALEM HMGB1 AUF DIE DSS-INDUZIERTEN COLITIS.....	51
ABBILDUNG 16 EINFLUSS VON EPITHELIALEM HMGB1 AUF GEWEBESTRUKTUR IM KOLON IN DSS- BEHANDELTEN MÄUSEN.....	53
ABBILDUNG 17 EINFLUSS VON EPITHELIALEM HMGB1 AUF DIE EXPRESSION VON ENTZÜNDUNGSMARKERN WÄHREND DER DSS-INDUZIERTEN COLITIS.....	55
ABBILDUNG 18 AUSWIRKUNG DER EPITHELIALEN HMGB1-DELETION AUF DIE APOPTOTISCHEN PROZESSE IN DER EPITHELSCHEIT.....	57
ABBILDUNG 19 EINFLUSS DER EPITHELIALEN HMGB1-DELETION AUF MARKER-PROTEINE DER AUTOPHAGIE IM KOLON.....	58
ABBILDUNG 20 AUSWIRKUNG DER MYELOIDEN HMGB1-DELETION AUF DIE DSS-INDUZIERTEN COLITIS.	60
ABBILDUNG 21 AUSWIRKUNG DER EPITHELIALEN HMGB1-DELETION AUF DEN VERLAUF DER <i>C. RODENTIUM</i> INFEKTION.....	62
ABBILDUNG 22 EPITHELVERDICKUNG UND HMGB1-EXPRESSIONSMUSTER NACH <i>C. RODENTIUM</i> INFEKTION UND HMGB1-DELETION IN EPITHELZELLEN.....	63
ABBILDUNG 23 EXPRESSION EINIGER ENTZÜNDUNGSMARKER NACH <i>C. RODENTIUM</i> INFEKTION UND HMGB1-DELETION IN EPITHELZELLEN.....	64
ABBILDUNG 24 EPITHELIALES HMGB1 IM VERLAUF DER CHRONISCHEN Cd45RB ^{HIGH} T-ZELL INDUZIERTEN COLITIS.....	66
ABBILDUNG 25 GEWEBESCHÄDIGUNG UND VERDICKUNG DER MUKOSA WÄHREND DER Cd45RB ^{HIGH} - INDUZIERTEN COLITIS.....	67

ABBILDUNG 26 EINFLUSS DER EPITHELIALEN HMGB1-DELETION AUF DIE GENEXPRESSION IN DER FRÜHEN PHASE DER DSS-COLITIS.	69
ABBILDUNG 27 EINFLUSS VON EPITHELIALEM HMGB1 AUF DIE EXPRESSION VON STAMMZELLMARKERN UND PROLIFERATIONSGENEN.	70
ABBILDUNG 28 AUSWIRKUNG EINER HMGB1-DELETION AUF DEN ANTEIL DER KI67-POSITIVEN ZELLEN IN DEN KRYPTEN IM KOLON.	71
ABBILDUNG 29 VERÄNDERTE TRANSKRIPTION VON <i>HMGB1</i> UND <i>AGER</i> IN KARZINOMEN DES GASTROINTESTINALEN TRAKTES.	73
ABBILDUNG 30 HMGB1 IM <i>APC^{MIN}</i> MODELL.	74
ABBILDUNG 31 AUSWIRKUNG DER EPITHELIALEN HMGB1-DELETION AUF DAS TUMORWACHSTUM IM <i>APC^{MIN}</i> MODELL.	75
ABBILDUNG 32 GENEXPRESSION IM NORMAL- UND TUMORGeweBE DER <i>APC^{MIN}</i> MÄUSE.	76
ABBILDUNG 33 EINFLUSS DER EPITHELIALEN HMGB1-DELETION AUF DIE PROLIFERATION IM TUMOR- UND IM NORMALGEWEBE GEFLOXTER UND DELETIERTER <i>APC^{MIN}</i> MÄUSE.	78
ABBILDUNG 34 EINFLUSS VON HMGB1 AUF DIE GENEXPRESSION IN NORMAL- UND TUMORGeweBE BEI GEFLOXTEN UND HMGB1-DELETIERTEN <i>APC^{MIN}</i> MÄUSEN.	80
ABBILDUNG 35 DIE PHÄNOMENOLOGISCHE AUSWIRKUNG DER EPITHELSPeZIFISCHEN HMGB1-DELETION IM AOM/DSS-MODELL INFLAMMATORISCHER KARZINOGENESE IM KOLON.	82
ABBILDUNG 36 EINFLUSS DER MYELOIDEN HMGB1-DELETION AUF DIE SPONTANE KARZINOGENESE IN <i>APC^{MIN}</i> -MÄUSEN.	83
ABBILDUNG 37 EINFLUSS DER MYELOIDEN HMGB1-DELETION AUF DIE COLITIS-ASSOZIIERTE KARZINOGENESE.	84
ABBILDUNG 38 FACS ANALYSE DER IMMUNZELLFREQUENZEN IM COLITIS-ASSOZIIERTEN TUMORGeweBE NACH MYELOIDER HMGB1-DELETION.	86

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 GERÄTE	22
TABELLE 2 REAGENZIEN, CHEMIKALIEN.....	22
TABELLE 3 KITS	26
TABELLE 4 SOFTWARE	27
TABELLE 5 MAUSSTÄMME.....	29
TABELLE 6 FACS ANTIKÖRPER (<i>INNATE PANEL</i>).....	37
TABELLE 7 FACS ANTIKÖRPER (<i>CD45RB^{HIGH} SORTING</i>).....	37
TABELLE 8 ENTWÄSSERUNGSPROTOKOLL DER PATHOLOGIE	38
TABELLE 9 SCHEMA ENTPARAFFINIERUNG, REHYDRIERUNG UND DEHYDRATATION DER PARAFFINSCHNITTE	39
TABELLE 10 IMMUNHISTOCHEMIE PRIMÄRANTIÖRPER	40
TABELLE 11 IMMUNHISTOCHEMIE SEKUNDÄRANTIÖRPER	40
TABELLE 12 WESTERN-BLOT ANTIKÖRPER	43
TABELLE 13 TAQMAN SONDEN FÜR DIE QPCR	43

Literaturverzeichnis

- [1] M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, und K. H. Wesker, *PROMETHEUS Innere Organe*, 5. überarbeitete Auflage., Bd. Innere Organe, 3 Bde. Thieme, 2018.
- [2] S. Silbernagl und A. Despopoulos, *Taschenatlas Physiologie*, 8. überarbeitete und Erweiterte Auflage., Bd. Physiologie. Stuttgart: Thieme, 2012.
- [3] P. Paone und P. D. Cani, „Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?“, *Gut*, Bd. 69, Nr. 12, S. 2232–2243, Dez. 2020, doi: 10.1136/gutjnl-2020-322260.
- [4] A.-C. Luissint, C. A. Parkos, und A. Nusrat, „Inflammation and the Intestinal Barrier: Leukocyte–Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling, and Mucosal Repair“, *Gastroenterology*, Bd. 151, Nr. 4, S. 616–632, Okt. 2016, doi: 10.1053/j.gastro.2016.07.008.
- [5] A. Haegbarth und H. Clevers, „Wnt Signaling, Lgr5, and Stem Cells in the Intestine and Skin“, *Am J Pathol*, Bd. 174, Nr. 3, S. 715–721, März 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080758.
- [6] J. M. Williams, C. A. Duckworth, M. D. Burkitt, A. J. M. Watson, B. J. Campbell, und D. M. Pritchard, „Epithelial Cell Shedding and Barrier Function“, *Vet Pathol*, Bd. 52, Nr. 3, S. 445–455, Mai 2015, doi: 10.1177/0300985814559404.
- [7] S. R. Lueschow und S. J. McElroy, „The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine“, *Front. Immunol.*, Bd. 11, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00587.
- [8] M. T. Abreu, „Erratum: Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function“, *Nature Reviews Immunology*, Bd. 10, Nr. 3, Art. Nr. 3, März 2010, doi: 10.1038/nri2728.
- [9] A. Pezzutto, T. Ulrichs, und G.-R. Burmester, *Taschenatlas der Immunologie*, 2. vollständig überarbeitete und Aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme, 2006.
- [10] E. R. Mann und X. Li, „Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: Crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells“, *World J Gastroenterol*, Bd. 20, Nr. 29, S. 9653–9664, Aug. 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9653.
- [11] I. Zanoni u. a., „CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like Receptor 4“, *Cell*, Bd. 147, Nr. 4, S. 868–880, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.09.051.
- [12] C. R. H. Raetz und C. Whitfield, „Lipopolysaccharide endotoxins“, *Annu Rev Biochem*, Bd. 71, S. 635–700, 2002, doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- [13] B. M. Fournier und C. A. Parkos, „The role of neutrophils during intestinal inflammation“, *Mucosal Immunol*, Bd. 5, Nr. 4, S. 354–366, Juli 2012, doi: 10.1038/mi.2012.24.
- [14] C. A. Janeway und R. Medzhitov, „Innate Immune Recognition“, *Annual Review of Immunology*, Bd. 20, Nr. 1, S. 197–216, 2002, doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
- [15] P. Matzinger, „The danger model: a renewed sense of self“, *Science*, Bd. 296, Nr. 5566, S. 301–305, Apr. 2002, doi: 10.1126/science.1071059.
- [16] R. Medzhitov und C. A. Janeway, „Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system“, *Science*, Bd. 296, Nr. 5566, S. 298–300, Apr. 2002, doi: 10.1126/science.1068883.
- [17] S.-Y. Seong und P. Matzinger, „Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses“, *Nature Reviews Immunology*, Bd. 4, Nr. 6, Art. Nr. 6, Juni 2004, doi: 10.1038/nri1372.
- [18] D. Bertheloot und E. Latz, „HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins“, *Cell Mol Immunol*, Bd. 14, Nr. 1, S. 43–64, Jan. 2017, doi: 10.1038/cmi.2016.34.
- [19] J. H. Youn, Y. J. Oh, E. S. Kim, J. E. Choi, und J.-S. Shin, „High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to

- CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes“, *J Immunol*, Bd. 180, Nr. 7, S. 5067–5074, Apr. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.7.5067.
- [20] S. Akira, K. Takeda, und T. Kaisho, „Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity“, *Nat Immunol*, Bd. 2, Nr. 8, S. 675–680, Aug. 2001, doi: 10.1038/90609.
- [21] A. Ozinsky u. a., „The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors“, *PNAS*, Bd. 97, Nr. 25, S. 13766–13771, Dez. 2000, doi: 10.1073/pnas.250476497.
- [22] D. Walsh, J. McCarthy, C. O’Driscoll, und S. Melgar, „Pattern recognition receptors—Molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease“, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Bd. 24, Nr. 2, S. 91–104, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.09.003.
- [23] A. Iwasaki und R. Medzhitov, „Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System“, *Science*, Bd. 327, Nr. 5963, S. 291–295, Jan. 2010, doi: 10.1126/science.1183021.
- [24] G. Y. Chen und G. Nuñez, „Sterile inflammation: sensing and reacting to damage“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 10, Nr. 12, S. 826–837, Dez. 2010, doi: 10.1038/nri2873.
- [25] K. J. Ishii u. a., „Genomic DNA Released by Dying Cells Induces the Maturation of APCs“, *The Journal of Immunology*, Bd. 167, Nr. 5, S. 2602–2607, Sep. 2001, doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2602.
- [26] C. A. Janeway, „Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology“, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, Bd. 54 Pt 1, S. 1–13, 1989, doi: 10.1101/sqb.1989.054.01.003.
- [27] A. Rubartelli und M. T. Lotze, „Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox“, *Trends in Immunology*, Bd. 28, Nr. 10, S. 429–436, Okt. 2007, doi: 10.1016/j.it.2007.08.004.
- [28] E. Silva u. a., „HMGB1 and LPS induce distinct patterns of gene expression and activation in neutrophils from patients with sepsis-induced acute lung injury“, *Intensive Care Med*, Bd. 33, Nr. 10, S. 1829–1839, Okt. 2007, doi: 10.1007/s00134-007-0748-2.
- [29] M. J. L. Bours, E. L. R. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein, und P. C. Dagnelie, „Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation“, *Pharmacol Ther*, Bd. 112, Nr. 2, S. 358–404, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.013.
- [30] D. Foell, H. Wittkowski, T. Vogl, und J. Roth, „S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules“, *J Leukoc Biol*, Bd. 81, Nr. 1, S. 28–37, Jan. 2007, doi: 10.1189/jlb.0306170.
- [31] A. Werman u. a., „The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription“, *PNAS*, Bd. 101, Nr. 8, S. 2434–2439, Feb. 2004, doi: 10.1073/pnas.0308705101.
- [32] Y. Shi, J. E. Evans, und K. L. Rock, „Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells“, *Nature*, Bd. 425, Nr. 6957, S. 516–521, Okt. 2003, doi: 10.1038/nature01991.
- [33] A. Asea u. a., „Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70 ROLE OF Toll-LIKE RECEPTOR (TLR) 2 AND TLR4“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 277, Nr. 17, S. 15028–15034, Apr. 2002, doi: 10.1074/jbc.M200497200.
- [34] S. Basu, R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson, und P. K. Srivastava, „Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway“, *Int Immunol*, Bd. 12, Nr. 11, S. 1539–1546, Nov. 2000, doi: 10.1093/intimm/12.11.1539.
- [35] W. Chen, U. Syldath, K. Bellmann, V. Burkart, und H. Kolb, „Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system“, *J Immunol*, Bd. 162, Nr. 6, S. 3212–3219, März 1999.

- [36] A. Kol, A. H. Lichtman, R. W. Finberg, P. Libby, und E. A. Kurt-Jones, „Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells“, *J Immunol*, Bd. 164, Nr. 1, S. 13–17, Jan. 2000, doi: 10.4049/jimmunol.164.1.13.
- [37] K. A. Scheibner, M. A. Lutz, S. Boodoo, M. J. Fenton, J. D. Powell, und M. R. Horton, „Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2“, *The Journal of Immunology*, Bd. 177, Nr. 2, S. 1272–1281, Juli 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1272.
- [38] M. E. Bianchi, „DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger“, *J Leukoc Biol*, Bd. 81, Nr. 1, S. 1–5, Jan. 2007, doi: 10.1189/jlb.0306164.
- [39] P. Scaffidi, T. Misteli, und M. E. Bianchi, „Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation“, *Nature*, Bd. 418, Nr. 6894, Art. Nr. 6894, Juli 2002, doi: 10.1038/nature00858.
- [40] H. Yang, H. Wang, S. S. Chavan, und U. Andersson, „High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule“, *Mol Med*, Bd. 21 Suppl 1, S. S6–S12, Okt. 2015, doi: 10.2119/molmed.2015.00087.
- [41] R. K. Boyapati, A. G. Rossi, J. Satsangi, und G.-T. Ho, „Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications“, *Mucosal Immunol*, Bd. 9, Nr. 3, S. 567–582, Mai 2016, doi: 10.1038/mi.2016.14.
- [42] I. Tabas und C. K. Glass, „Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities“, *Science*, Bd. 339, Nr. 6116, S. 166–172, Jan. 2013, doi: 10.1126/science.1230720.
- [43] C. Poethko-Müller, M. Thamm, und R. Thamm, „Heuschnupfen und Asthma bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends“, März 2018, doi: 10.25646/2961.
- [44] J. Fuchs, M. Rabenberg, und C. Scheidt-Nave, „Prevalence of selected musculoskeletal conditions in Germany“, Mai 2013, doi: 10.25646/1459.
- [45] A. Gößwald, A. Schienkiewitz, E. Nowossadeck, und M. A. Busch, „Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland“, *Bundesgesundheitsbl.*, Bd. 56, Nr. 5, S. 650–655, Mai 2013, doi: 10.1007/s00103-013-1666-9.
- [46] E. V. Loftus, „Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences“, *Gastroenterology*, Bd. 126, Nr. 6, S. 1504–1517, Mai 2004, doi: 10.1053/j.gastro.2004.01.063.
- [47] S. Alatab *u. a.*, „The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017“, *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, Bd. 5, Nr. 1, S. 17–30, Jan. 2020, doi: 10.1016/S2468-1253(19)30333-4.
- [48] S. C. Ng *u. a.*, „Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies“, *The Lancet*, Bd. 390, Nr. 10114, S. 2769–2778, Dez. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
- [49] I. Ordás, L. Eckmann, M. Talamini, D. C. Baumgart, und W. J. Sandborn, „Ulcerative colitis“, *The Lancet*, Bd. 380, Nr. 9853, S. 1606–1619, Nov. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
- [50] R. Ungaro, S. Mehandru, P. B. Allen, L. Peyrin-Biroulet, und J.-F. Colombel, „Ulcerative colitis“, *The Lancet*, Bd. 389, Nr. 10080, S. 1756–1770, Apr. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
- [51] P. Boal Carvalho und J. Cotter, „Mucosal Healing in Ulcerative Colitis: A Comprehensive Review“, *Drugs*, Bd. 77, Nr. 2, S. 159–173, Feb. 2017, doi: 10.1007/s40265-016-0676-y.
- [52] C. Fiocchi, „Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis“, *Gastroenterology*, Bd. 115, Nr. 1, S. 182–205, Juli 1998, doi: 10.1016/S0016-5085(98)70381-6.

- [53] G. Bouma und W. Strober, „The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 3, Nr. 7, S. 521–533, Juli 2003, doi: 10.1038/nri1132.
- [54] H. Huang *u. a.*, „Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution“, *Nature*, Bd. 547, Nr. 7662, Art. Nr. 7662, Juli 2017, doi: 10.1038/nature22969.
- [55] R. B. Sartor, „Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis“, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, Bd. 3, Nr. 7, S. 390–407, Juli 2006, doi: 10.1038/ncpgasthep0528.
- [56] M. E. Spehlmann, A. Z. Begun, J. Burghardt, P. Lepage, A. Raedler, und S. Schreiber, „Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: Results of a nationwide study“, *Inflammatory Bowel Diseases*, Bd. 14, Nr. 7, S. 968–976, Juli 2008, doi: 10.1002/ibd.20380.
- [57] F. J. Ryan *u. a.*, „Colonic microbiota is associated with inflammation and host epigenomic alterations in inflammatory bowel disease“, *Nat Commun*, Bd. 11, Nr. 1, S. 1512, März 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15342-5.
- [58] S. I. Grivennikov, F. R. Greten, und M. Karin, „Immunity, inflammation, and cancer“, *Cell*, Bd. 140, Nr. 6, S. 883–899, März 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
- [59] J. Terzić, S. Grivennikov, E. Karin, und M. Karin, „Inflammation and Colon Cancer“, *Gastroenterology*, Bd. 138, Nr. 6, S. 2101-2114.e5, Mai 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.058.
- [60] T. Hagemann, F. Balkwill, und T. Lawrence, „Inflammation and cancer: a double-edged sword“, *Cancer Cell*, Bd. 12, Nr. 4, S. 300–301, Okt. 2007, doi: 10.1016/j.ccr.2007.10.005.
- [61] D. M. Parkin, „The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002“, *International Journal of Cancer*, Bd. 118, Nr. 12, S. 3030–3044, 2006, doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.21731>.
- [62] T. A. Ullman und S. H. Itzkowitz, „Intestinal Inflammation and Cancer“, *Gastroenterology*, Bd. 140, Nr. 6, S. 1807-1816.e1, Mai 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.057.
- [63] D. King *u. a.*, „Changing patterns in the epidemiology and outcomes of inflammatory bowel disease in the United Kingdom: 2000–2018“, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 51, Nr. 10, S. 922–934, 2020, doi: 10.1111/apt.15701.
- [64] R. Koch-Institut und G. der epidemiologischen K. in D. e.V., „Krebs in Deutschland 2015/2016“, Robert Koch-Institut, report, 2019. doi: 10.25646/5977.2.
- [65] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, und A. Jemal, „Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries“, *CA Cancer J Clin*, Bd. 68, Nr. 6, S. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [66] O. Olén *u. a.*, „Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study“, *The Lancet*, Bd. 395, Nr. 10218, S. 123–131, Jan. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32545-0.
- [67] D. S. Keller, A. Windsor, R. Cohen, und M. Chand, „Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence“, *Tech Coloproctol*, Bd. 23, Nr. 1, S. 3–13, Jan. 2019, doi: 10.1007/s10151-019-1926-2.
- [68] A. J. Rowan *u. a.*, „APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational ‘hotspot’ and interdependence of the ‘two hits’“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 97, Nr. 7, S. 3352–3357, März 2000, doi: 10.1073/pnas.97.7.3352.
- [69] M. J. Schell *u. a.*, „A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC“, *Nat Commun*, Bd. 7, Nr. 1, Art. Nr. 1, Juni 2016, doi: 10.1038/ncomms11743.
- [70] X.-L. Li, J. Zhou, Z.-R. Chen, und W.-J. Chng, „p53 mutations in colorectal cancer: molecular pathogenesis and pharmacological reactivation“, *World J Gastroenterol*, Bd. 21, Nr. 1, S. 84–93, Jan. 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i1.84.

- [71] A. Russo *u. a.*, „The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment“, *J Clin Oncol*, Bd. 23, Nr. 30, S. 7518–7528, Okt. 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.00.471.
- [72] N. R. West, S. McCuaig, F. Franchini, und F. Powrie, „Emerging cytokine networks in colorectal cancer“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 15, Nr. 10, Art. Nr. 10, Okt. 2015, doi: 10.1038/nri3896.
- [73] G. M. Cooper, „The Development and Causes of Cancer“, *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*, 2000, Zugegriffen: Aug. 02, 2021. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- [74] M. Todaro *u. a.*, „Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4“, *Cell Death Differ*, Bd. 15, Nr. 4, S. 762–772, Apr. 2008, doi: 10.1038/sj.cdd.4402305.
- [75] J. F. Alhmod, J. F. Woolley, A.-E. Al Moustafa, und M. I. Malki, „DNA Damage/Repair Management in Cancers“, *Cancers (Basel)*, Bd. 12, Nr. 4, S. 1050, Apr. 2020, doi: 10.3390/cancers12041050.
- [76] S. Romero-Garcia, J. S. Lopez-Gonzalez, J. L. B´ez-Viveros, D. Aguilar-Cazares, und H. Prado-Garcia, „Tumor cell metabolism“, *Cancer Biol Ther*, Bd. 12, Nr. 11, S. 939–948, Dez. 2011, doi: 10.4161/cbt.12.11.18140.
- [77] T. Gulic *u. a.*, „Tumor-Associated Myeloid Cells in Cancer Progression“, in *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context*, N. Rezaei, Hrsg. Cham: Springer International Publishing, 2020, S. 29–46. doi: 10.1007/978-3-030-30845-2_3.
- [78] J. Zhou, Z. Tang, S. Gao, C. Li, Y. Feng, und X. Zhou, „Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies“, *Front Oncol*, Bd. 10, Feb. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00188.
- [79] C. Murdoch, M. Muthana, S. B. Coffelt, und C. E. Lewis, „The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 8, Nr. 8, S. 618–631, Aug. 2008, doi: 10.1038/nrc2444.
- [80] S.-Y. Wu, T. Fu, Y.-Z. Jiang, und Z.-M. Shao, „Natural killer cells in cancer biology and therapy“, *Molecular Cancer*, Bd. 19, Nr. 1, S. 120, Aug. 2020, doi: 10.1186/s12943-020-01238-x.
- [81] B. Farhood, M. Najafi, und K. Mortezaee, „CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review“, *J Cell Physiol*, Bd. 234, Nr. 6, S. 8509–8521, Juni 2019, doi: 10.1002/jcp.27782.
- [82] Y. Togashi, K. Shitara, und H. Nishikawa, „Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy“, *Nat Rev Clin Oncol*, Bd. 16, Nr. 6, S. 356–371, Juni 2019, doi: 10.1038/s41571-019-0175-7.
- [83] E. Pikarsky *u. a.*, „NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer“, *Nature*, Bd. 431, Nr. 7007, S. 461–466, Sep. 2004, doi: 10.1038/nature02924.
- [84] E. Voronov und R. N. Apte, „IL-1 in Colon Inflammation, Colon Carcinogenesis and Invasiveness of Colon Cancer“, *Cancer Microenviron*, Bd. 8, Nr. 3, S. 187–200, Dez. 2015, doi: 10.1007/s12307-015-0177-7.
- [85] F. M. Corvinus *u. a.*, „Persistent STAT3 Activation in Colon Cancer Is Associated with Enhanced Cell Proliferation and Tumor Growth“, *Neoplasia*, Bd. 7, Nr. 6, S. 545–555, Juni 2005.
- [86] R. Kang *u. a.*, „HMGB1 in Health and Disease“, *Mol Aspects Med*, Bd. 0, S. 1–116, Dez. 2014, doi: 10.1016/j.mam.2014.05.001.
- [87] M. Stros, „HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin“, *Biochim Biophys Acta*, Bd. 1799, Nr. 1–2, S. 101–113, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.bbagr.2009.09.008.
- [88] M. E. Bianchi und A. Agresti, „HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation“, *Curr Opin Genet Dev*, Bd. 15, Nr. 5, S. 496–506, Okt. 2005, doi: 10.1016/j.gde.2005.08.007.

- [89] S. S. Lange, D. L. Mitchell, und K. M. Vasquez, „High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 105, Nr. 30, S. 10320–10325, Juli 2008, doi: 10.1073/pnas.0803181105.
- [90] S. Calogero *u. a.*, „The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice“, *Nat Genet*, Bd. 22, Nr. 3, S. 276–280, Juli 1999, doi: 10.1038/10338.
- [91] M. S. Kwak, H. S. Kim, B. Lee, Y. H. Kim, M. Son, und J.-S. Shin, „Immunological Significance of HMGB1 Post-Translational Modification and Redox Biology“, *Front. Immunol.*, Bd. 11, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01189.
- [92] T. Bonaldi *u. a.*, „Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion“, *EMBO J*, Bd. 22, Nr. 20, S. 5551–5560, Okt. 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg516.
- [93] N. Sapojnikova, J. Maman, F. A. Myers, A. W. Thorne, V. I. Vorobyev, und C. Crane-Robinson, „Biochemical observation of the rapid mobility of nuclear HMGB1“, *Biochim Biophys Acta*, Bd. 1729, Nr. 1, S. 57–63, Mai 2005, doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.03.002.
- [94] H. J. Huttunen, C. Fages, J. Kuja-Panula, A. J. Ridley, und H. Rauvala, „Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis“, *Cancer Res*, Bd. 62, Nr. 16, S. 4805–4811, Aug. 2002.
- [95] H. Yang *u. a.*, „A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 107, Nr. 26, S. 11942–11947, Juni 2010, doi: 10.1073/pnas.1003893107.
- [96] J. P. Rowell, K. L. Simpson, K. Stott, M. Watson, und J. O. Thomas, „HMGB1-facilitated p53 DNA binding occurs via HMG-Box/p53 transactivation domain interaction, regulated by the acidic tail“, *Structure*, Bd. 20, Nr. 12, S. 2014–2024, Dez. 2012, doi: 10.1016/j.str.2012.09.004.
- [97] J. H. Youn *u. a.*, „Identification of lipopolysaccharide-binding peptide regions within HMGB1 and their effects on subclinical endotoxemia in a mouse model“, *European Journal of Immunology*, Bd. 41, Nr. 9, S. 2753–2762, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/eji.201141391>.
- [98] H. Yang *u. a.*, „Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1“, *PNAS*, Bd. 101, Nr. 1, S. 296–301, Jan. 2004, doi: 10.1073/pnas.2434651100.
- [99] J. Li *u. a.*, „Structural Basis for the Proinflammatory Cytokine Activity of High Mobility Group Box 1“, *Mol Med*, Bd. 9, Nr. 1, Art. Nr. 1, Jan. 2003, doi: 10.1007/BF03402105.
- [100] W. Gong, Y. Li, F. Chao, G. Huang, und F. He, „Amino acid residues 201-205 in C-terminal acidic tail region plays a crucial role in antibacterial activity of HMGB1“, *Journal of Biomedical Science*, Bd. 16, Nr. 1, S. 83, Sep. 2009, doi: 10.1186/1423-0127-16-83.
- [101] Y. J. Oh *u. a.*, „HMGB1 Is Phosphorylated by Classical Protein Kinase C and Is Secreted by a Calcium-Dependent Mechanism“, *The Journal of Immunology*, Bd. 182, Nr. 9, S. 5800–5809, Mai 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0801873.
- [102] J. H. Youn und J.-S. Shin, „Nucleocytoplasmic Shuttling of HMGB1 Is Regulated by Phosphorylation That Redirects It toward Secretion“, *The Journal of Immunology*, Bd. 177, Nr. 11, S. 7889–7897, Dez. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.11.7889.
- [103] E. Venereau *u. a.*, „Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release“, *J Exp Med*, Bd. 209, Nr. 9, S. 1519–1528, Aug. 2012, doi: 10.1084/jem.20120189.
- [104] M. Schiraldi *u. a.*, „HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4“, *J Exp Med*, Bd. 209, Nr. 3, S. 551–563, März 2012, doi: 10.1084/jem.20111739.

- [105] E. Venereau, M. Schiraldi, M. Ugucioni, und M. E. Bianchi, „HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation“, *Mol Immunol*, Bd. 55, Nr. 1, S. 76–82, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.molimm.2012.10.037.
- [106] G. Hoppe, K. E. Talcott, S. K. Bhattacharya, J. W. Crabb, und J. E. Sears, „Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1“, *Experimental Cell Research*, Bd. 312, Nr. 18, S. 3526–3538, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.yexcr.2006.07.020.
- [107] D. J. Antoine, H. E. Harris, U. Andersson, K. J. Tracey, und M. E. Bianchi, „A Systematic Nomenclature for the Redox States of High Mobility Group Box (HMGB) Proteins“, *Mol Med*, Bd. 20, Nr. 1, S. 135–137, März 2014, doi: 10.2119/molmed.2014.00022.
- [108] L. Zandarashvili u. a., „Real-time kinetics of high-mobility group box 1 (HMGB1) oxidation in extracellular fluids studied by in situ protein NMR spectroscopy“, *J Biol Chem*, Bd. 288, Nr. 17, S. 11621–11627, Apr. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.449942.
- [109] M. T. Lotze und K. J. Tracey, „High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 5, Nr. 4, S. 331–342, Apr. 2005, doi: 10.1038/nri1594.
- [110] D. Tang u. a., „Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1“, *Journal of Leukocyte Biology*, Bd. 81, Nr. 3, S. 741–747, 2007, doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.0806540>.
- [111] I. E. Dumitriu u. a., „Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products“, *J Immunol*, Bd. 174, Nr. 12, S. 7506–7515, Juni 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.12.7506.
- [112] R. Kokkola u. a., „RAGE is the Major Receptor for the Proinflammatory Activity of HMGB1 in Rodent Macrophages“, *Scandinavian Journal of Immunology*, Bd. 61, Nr. 1, S. 1–9, 2005, doi: <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2005.01534.x>.
- [113] M. Yu u. a., „HMGB1 SIGNALS THROUGH TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR) 4 AND TLR2“, *Shock*, Bd. 26, Nr. 2, S. 174–179, Aug. 2006, doi: 10.1097/01.shk.0000225404.51320.82.
- [114] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, und S.-C. Sun, „NF- κ B signaling in inflammation“, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Bd. 2, Nr. 1, Art. Nr. 1, Juli 2017, doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- [115] J. S. Park u. a., „Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein“, *J Biol Chem*, Bd. 279, Nr. 9, S. 7370–7377, Feb. 2004, doi: 10.1074/jbc.M306793200.
- [116] H. Huang u. a., „Hepatocyte-specific high-mobility group box 1 deletion worsens the injury in liver ischemia/reperfusion: a role for intracellular high-mobility group box 1 in cellular protection“, *Hepatology*, Bd. 59, Nr. 5, S. 1984–1997, Mai 2014, doi: 10.1002/hep.26976.
- [117] R. Kang u. a., „Intracellular Hmgb1 Inhibits Inflammatory Nucleosome Release and Limits Acute Pancreatitis in Mice“, *Gastroenterology*, Bd. 146, Nr. 4, S. 1097–1107.e8, Apr. 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.015.
- [118] H. Yanai u. a., „Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 110, Nr. 51, S. 20699–20704, Dez. 2013, doi: 10.1073/pnas.1320808110.
- [119] J. Sundén-Cullberg u. a., „Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock“, *Crit Care Med*, Bd. 33, Nr. 3, S. 564–573, März 2005, doi: 10.1097/01.ccm.0000155991.88802.4d.
- [120] E. Abraham, J. Arcaroli, A. Carmody, H. Wang, und K. J. Tracey, „Cutting Edge: HMG-1 as a Mediator of Acute Lung Inflammation“, *The Journal of Immunology*, Bd. 165, Nr. 6, S. 2950–2954, Sep. 2000, doi: 10.4049/jimmunol.165.6.2950.
- [121] F. Palone u. a., „Role of HMGB1 as a suitable biomarker of subclinical intestinal inflammation and mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease“,

- Inflamm Bowel Dis*, Bd. 20, Nr. 8, S. 1448–1457, Aug. 2014, doi: 10.1097/MIB.000000000000113.
- [122] R. Vitali *u. a.*, „Fecal HMGB1 is a novel marker of intestinal mucosal inflammation in pediatric inflammatory bowel disease“, *Am J Gastroenterol*, Bd. 106, Nr. 11, S. 2029–2040, Nov. 2011, doi: 10.1038/ajg.2011.231.
- [123] H. Lee *u. a.*, „Diagnostic significance of serum HMGB1 in colorectal carcinomas“, *PLoS One*, Bd. 7, Nr. 4, S. e34318, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0034318.
- [124] G.-H. Shang *u. a.*, „Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer“, *Respir Med*, Bd. 103, Nr. 12, S. 1949–1953, Dez. 2009, doi: 10.1016/j.rmed.2009.05.019.
- [125] P. Huebener *u. a.*, „The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis“, *J Clin Invest*, Bd. 125, Nr. 2, S. 539–550, Feb. 2015, doi: 10.1172/JCI76887.
- [126] A. Tsung *u. a.*, „The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion“, *J Exp Med*, Bd. 201, Nr. 7, S. 1135–1143, Apr. 2005, doi: 10.1084/jem.20042614.
- [127] T. Nakamura *u. a.*, „Positive association of serum levels of advanced glycation end products and high mobility group box-1 with asymmetric dimethylarginine in nondiabetic chronic kidney disease patients“, *Metabolism*, Bd. 58, Nr. 11, S. 1624–1628, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.metabol.2009.05.018.
- [128] Y. Oyama *u. a.*, „High-mobility group box-1 protein promotes granulomatous nephritis in adenine-induced nephropathy“, *Lab Invest*, Bd. 90, Nr. 6, S. 853–866, Juni 2010, doi: 10.1038/labinvest.2010.64.
- [129] W. Zhang *u. a.*, „Proinflammatory effect of high-mobility group protein B1 on keratinocytes: an autocrine mechanism underlying psoriasis development“, *J Pathol*, Bd. 241, Nr. 3, S. 392–404, Feb. 2017, doi: 10.1002/path.4848.
- [130] A. K. Kocsis *u. a.*, „Plasma concentrations of high-mobility group box protein 1, soluble receptor for advanced glycation end-products and circulating DNA in patients with acute pancreatitis“, *Pancreatology*, Bd. 9, Nr. 4, S. 383–391, 2009, doi: 10.1159/000181172.
- [131] R. Yang *u. a.*, „Anti-HMGB1 Neutralizing Antibody Ameliorates Gut Barrier Dysfunction and Improves Survival after Hemorrhagic Shock“, *Mol Med*, Bd. 12, Nr. 4, Art. Nr. 4, Apr. 2006, doi: 10.2119/2006-00010.Yang.
- [132] M. Andrassy *u. a.*, „High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart“, *Circulation*, Bd. 117, Nr. 25, S. 3216–3226, Juni 2008, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769331.
- [133] K. Hayakawa *u. a.*, „Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism“, *Neuropharmacology*, Bd. 55, Nr. 8, S. 1280–1286, Dez. 2008, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.040.
- [134] N. Kamo *u. a.*, „ASC/caspase-1/IL-1 β signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury“, *Hepatology*, Bd. 58, Nr. 1, S. 351–362, Juli 2013, doi: 10.1002/hep.26320.
- [135] C. P. Sodhi *u. a.*, „Intestinal Epithelial TLR-4 Activation Is Required for the Development of Acute Lung Injury after Trauma/Hemorrhagic Shock via the Release of HMGB1 from the Gut“, *J Immunol*, Bd. 194, Nr. 10, S. 4931–4939, Mai 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1402490.
- [136] M. Magna und D. S. Pisetsky, „The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases“, *Mol Med*, Bd. 20, S. 138–146, März 2014, doi: 10.2119/molmed.2013.00164.
- [137] M. Deng *u. a.*, „The Endotoxin Delivery Protein HMGB1 Mediates Caspase-11-Dependent Lethality in Sepsis“, *Immunity*, Bd. 49, Nr. 4, S. 740–753.e7, Okt. 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.08.016.

- [138] X. Zhu *u. a.*, „Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation“, *J Clin Invest*, Bd. 125, Nr. 3, S. 1098–1110, März 2015, doi: 10.1172/JCI176344.
- [139] U. Andersson, H. Yang, und H. Harris, „Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases“, *Expert Opin Ther Targets*, Bd. 22, Nr. 3, S. 263–277, März 2018, doi: 10.1080/14728222.2018.1439924.
- [140] H. Yang und K. J. Tracey, „Targeting HMGB1 in inflammation“, *Biochim Biophys Acta*, Bd. 1799, Nr. 1–2, S. 149–156, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.bbagr.2009.11.019.
- [141] R. Yang *u. a.*, „Bile high-mobility group box 1 contributes to gut barrier dysfunction in experimental endotoxemia“, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Bd. 297, Nr. 2, S. R362–369, Aug. 2009, doi: 10.1152/ajpregu.00184.2009.
- [142] H. Sawa *u. a.*, „Blockade of high mobility group box-1 protein attenuates experimental severe acute pancreatitis“, *World J Gastroenterol*, Bd. 12, Nr. 47, S. 7666–7670, Dez. 2006, doi: 10.3748/wjg.v12.i47.7666.
- [143] R. Kokkola *u. a.*, „Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity“, *Arthritis Rheum*, Bd. 48, Nr. 7, S. 2052–2058, Juli 2003, doi: 10.1002/art.11161.
- [144] H. Schierbeck *u. a.*, „Monoclonal Anti-HMGB1 (High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1) Antibody Protection in Two Experimental Arthritis Models“, *Mol Med*, Bd. 17, Nr. 9, Art. Nr. 9, Sep. 2011, doi: 10.2119/molmed.2010.00264.
- [145] N. E. Stevens, M. J. Chapman, C. K. Fraser, T. R. Kuchel, J. D. Hayball, und K. R. Diener, „Therapeutic targeting of HMGB1 during experimental sepsis modulates the inflammatory cytokine profile to one associated with improved clinical outcomes“, *Scientific Reports*, Bd. 7, Nr. 1, Art. Nr. 1, Juli 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06205-z.
- [146] F. Zhao *u. a.*, „Glycyrrhizin Protects Rats from Sepsis by Blocking HMGB1 Signaling“, *BioMed Research International*, Bd. 2017, S. e9719647, Apr. 2017, doi: 10.1155/2017/9719647.
- [147] L. Mollica *u. a.*, „Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities“, *Chem Biol*, Bd. 14, Nr. 4, S. 431–441, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.chembiol.2007.03.007.
- [148] T. Zhang, X.-W. Guan, J. G. Gribben, F.-T. Liu, und L. Jia, „Blockade of HMGB1 signaling pathway by ethyl pyruvate inhibits tumor growth in diffuse large B-cell lymphoma“, *Cell Death & Disease*, Bd. 10, Nr. 5, Art. Nr. 5, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1563-8.
- [149] S. M. Bhat, N. Massey, L. A. Karriker, B. Singh, und C. Charavaryamath, „Ethyl pyruvate reduces organic dust-induced airway inflammation by targeting HMGB1-RAGE signaling“, *Respir Res*, Bd. 20, Nr. 1, S. 27, Feb. 2019, doi: 10.1186/s12931-019-0992-3.
- [150] S. H. Davé *u. a.*, „Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis“, *J Leukoc Biol*, Bd. 86, Nr. 3, S. 633–643, Sep. 2009, doi: 10.1189/jlb.1008662.
- [151] S. Maeda *u. a.*, „Essential roles of high-mobility group box 1 in the development of murine colitis and colitis-associated cancer“, *Biochem Biophys Res Commun*, Bd. 360, Nr. 2, S. 394–400, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.065.
- [152] R. Vitali *u. a.*, „Dipotassium Glycyrrhizate Inhibits HMGB1-Dependent Inflammation and Ameliorates Colitis in Mice“, *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 6, Juni 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066527.
- [153] G. Wang *u. a.*, „Glycyrrhizin Attenuates Carcinogenesis by Inhibiting the Inflammatory Response in a Murine Model of Colorectal Cancer“, *International Journal of Molecular Sciences*, Bd. 22, Nr. 5, Art. Nr. 5, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22052609.
- [154] H. Yamasaki *u. a.*, „Roles of high-mobility group box 1 in murine experimental colitis“, *Mol Med Rep*, Bd. 2, Nr. 1, S. 23–27, Feb. 2009, doi: 10.3892/mmr_00000056.

- [155] S. VanPatten und Y. Al-Abed, „High Mobility Group Box-1 (HMGB1): Current Wisdom and Advancement as a Potential Drug Target“, *J Med Chem*, Bd. 61, Nr. 12, S. 5093–5107, Juni 2018, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01136.
- [156] S. He u. a., „HMGB1 released by irradiated tumor cells promotes living tumor cell proliferation via paracrine effect“, *Cell Death Dis*, Bd. 9, Nr. 6, S. 648, Mai 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0626-6.
- [157] X. Pang, Y. Zhang, und S. Zhang, „High-mobility group box 1 is overexpressed in cervical carcinoma and promotes cell invasion and migration in vitro“, *Oncol Rep*, Bd. 37, Nr. 2, S. 831–840, Feb. 2017, doi: 10.3892/or.2016.5317.
- [158] A. Sharma, R. Ray, und M. R. Rajeswari, „Overexpression of high mobility group (HMG) B1 and B2 proteins directly correlates with the progression of squamous cell carcinoma in skin“, *Cancer Invest*, Bd. 26, Nr. 8, S. 843–851, Okt. 2008, doi: 10.1080/07357900801954210.
- [159] I. M. Yasinska u. a., „High mobility group box 1 (HMGB1) acts as an ‚alarmin‘ to promote acute myeloid leukaemia progression“, *Oncoimmunology*, Bd. 7, Nr. 6, S. e1438109, 2018, doi: 10.1080/2162402X.2018.1438109.
- [160] G. Gdynia u. a., „The HMGB1 protein induces a metabolic type of tumour cell death by blocking aerobic respiration“, *Nat Commun*, Bd. 7, S. 10764, März 2016, doi: 10.1038/ncomms10764.
- [161] L. Jia u. a., „Overexpression of high mobility group box 1 (HMGB1) has no correlation with the prognosis in glioma“, *Biomark Med*, Bd. 13, Nr. 10, S. 851–863, Juli 2019, doi: 10.2217/bmm-2019-0031.
- [162] X. Luan, C. Ma, P. Wang, und F. Lou, „HMGB1 is negatively correlated with the development of endometrial carcinoma and prevents cancer cell invasion and metastasis by inhibiting the process of epithelial-to-mesenchymal transition“, *Onco Targets Ther*, Bd. 10, S. 1389–1402, 2017, doi: 10.2147/OTT.S123085.
- [163] R. A. Seidu, M. Wu, Z. Su, und H. Xu, „Paradoxical Role of High Mobility Group Box 1 in Glioma: A Suppressor or a Promoter?“, *Oncol Rev*, Bd. 11, Nr. 1, S. 325, März 2017, doi: 10.4081/oncol.2017.325.
- [164] R. Kang, Q. Zhang, H. J. Zeh, M. T. Lotze, und D. Tang, „HMGB1 in cancer: good, bad, or both?“, *Clin Cancer Res*, Bd. 19, Nr. 15, S. 4046–4057, Aug. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0495.
- [165] H. J. Kang u. a., „Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers“, *Lab Invest*, Bd. 89, Nr. 8, S. 948–959, Aug. 2009, doi: 10.1038/labinvest.2009.47.
- [166] C.-Q. Wang u. a., „Subcellular localization of HMGB1 in colorectal cancer impacts on tumor grade and survival prognosis“, *Sci Rep*, Bd. 10, Nr. 1, S. 18587, Okt. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-75783-2.
- [167] Y. Yang u. a., „HMGB1 mediates lipopolysaccharide-induced inflammation via interacting with GPX4 in colon cancer cells“, *Cancer Cell Int*, Bd. 20, S. 205, 2020, doi: 10.1186/s12935-020-01289-6.
- [168] P. Huebener u. a., „High-Mobility Group Box 1 Is Dispensable for Autophagy, Mitochondrial Quality Control, and Organ Function In Vivo“, *Cell Metabolism*, Bd. 19, Nr. 3, S. 539–547, März 2014, doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.014.
- [169] B. B. Madison, L. Dunbar, X. T. Qiao, K. Braunstein, E. Braunstein, und D. L. Gumucio, „Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine“, *J Biol Chem*, Bd. 277, Nr. 36, S. 33275–33283, Sep. 2002, doi: 10.1074/jbc.M204935200.
- [170] J. Shi, L. Hua, D. Harmer, P. Li, und G. Ren, „Cre Driver Mice Targeting Macrophages“, *Methods Mol Biol*, Bd. 1784, S. 263–275, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_24.
- [171] P. Mombaerts, J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, und V. E. Papaioannou, „RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes“, *Cell*, Bd. 68, Nr. 5, S. 869–877, März 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90030-g.

- [172] A. R. Moser, H. C. Pitot, und W. F. Dove, „A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse“, *Science*, Bd. 247, Nr. 4940, S. 322–324, Jan. 1990, doi: 10.1126/science.2296722.
- [173] L. K. Su *u. a.*, „Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene“, *Science*, Bd. 256, Nr. 5057, S. 668–670, Mai 1992, doi: 10.1126/science.1350108.
- [174] B. Chassaing, J. D. Aitken, M. Malleshappa, und M. Vijay-Kumar, „Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice“, *Curr Protoc Immunol*, Bd. 104, S. 15.25.1-15.25.14, Feb. 2014, doi: 10.1002/0471142735.im1525s104.
- [175] D. D. Eichele und K. K. Kharbanda, „Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis“, *World J Gastroenterol*, Bd. 23, Nr. 33, S. 6016–6029, Sep. 2017, doi: 10.3748/wjg.v23.i33.6016.
- [176] I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, und R. Nakaya, „A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice“, *Gastroenterology*, Bd. 98, Nr. 3, S. 694–702, März 1990, doi: 10.1016/0016-5085(90)90290-h.
- [177] S. Wiles, K. M. Pickard, K. Peng, T. T. MacDonald, und G. Frankel, „In Vivo Bioluminescence Imaging of the Murine Pathogen *Citrobacter rodentium*“, *Infect Immun*, Bd. 74, Nr. 9, S. 5391–5396, Sep. 2006, doi: 10.1128/IAI.00848-06.
- [178] E. P. Koroleva, S. Halperin, E. O. Gubernatorova, E. Macho-Fernandez, C. M. Spencer, und A. V. Tumanov, „*Citrobacter rodentium*-induced colitis: A robust model to study mucosal immune responses in the gut“, *J Immunol Methods*, Bd. 421, S. 61–72, Juni 2015, doi: 10.1016/j.jim.2015.02.003.
- [179] V. F. Crepin, J. W. Collins, M. Habibzay, und G. Frankel, „*Citrobacter rodentium* mouse model of bacterial infection“, *Nat Protoc*, Bd. 11, Nr. 10, S. 1851–1876, Okt. 2016, doi: 10.1038/nprot.2016.100.
- [180] D. V. Ostanin *u. a.*, „T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade“, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Bd. 296, Nr. 2, S. G135-146, Feb. 2009, doi: 10.1152/ajpgi.90462.2008.
- [181] F. Powrie, „T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles“, *Immunity*, Bd. 3, Nr. 2, S. 171–174, Aug. 1995, doi: 10.1016/1074-7613(95)90086-1.
- [182] F. Powrie, M. W. Leach, S. Mauze, S. Menon, L. B. Caddle, und R. L. Coffman, „Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells“, *Immunity*, Bd. 1, Nr. 7, S. 553–562, Okt. 1994, doi: 10.1016/1074-7613(94)90045-0.
- [183] F. Powrie, „Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses“, *Ann N Y Acad Sci*, Bd. 1029, S. 132–141, Dez. 2004, doi: 10.1196/annals.1309.030.
- [184] R. Fodde, R. Smits, und H. Clevers, „APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 1, Nr. 1, S. 55–67, Okt. 2001, doi: 10.1038/35094067.
- [185] J. Ren, H. Sui, F. Fang, Q. Li, und B. Li, „The application of ApcMin/+ mouse model in colorectal tumor researches“, *J Cancer Res Clin Oncol*, Bd. 145, Nr. 5, S. 1111–1122, Mai 2019, doi: 10.1007/s00432-019-02883-6.
- [186] B. Parang, C. W. Barret, und C. S. Williams, „AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer“, *Methods Mol Biol*, Bd. 1422, S. 297–307, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-3603-8_26.
- [187] M. D. Robertis *u. a.*, „The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies“, *Journal of Carcinogenesis*, Bd. 10, Nr. 1, S. 9, Jan. 2011, doi: 10.4103/1477-3163.78279.
- [188] A. J. Snider, A. B. Bialkowska, A. M. Ghaleb, V. W. Yang, L. M. Obeid, und Y. A. Hannun, „Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon“, *Methods Mol Biol*, Bd. 1438, S. 245–254, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-3661-8_14.

- [189] A. I. Thaker, A. Shaker, M. S. Rao, und M. A. Ciorba, „Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS)“, *J Vis Exp*, Nr. 67, Sep. 2012, doi: 10.3791/4100.
- [190] C. Becker *u. a.*, „In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy“, *Gut*, Bd. 54, Nr. 7, S. 950–954, Juli 2005, doi: 10.1136/gut.2004.061283.
- [191] C. Becker, M. C. Fantini, und M. F. Neurath, „High resolution colonoscopy in live mice“, *Nat Protoc*, Bd. 1, Nr. 6, S. 2900–2904, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.446.
- [192] Y. Chen, D. Wu, und L. Sun, „Clinical Significance of High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) and Nod-Like Receptor Protein 3 (NLRP3) in Patients with Ulcerative Colitis“, *Med Sci Monit*, Bd. 26, S. e919530-1-e919530-8, Jan. 2020, doi: 10.12659/MSM.919530.
- [193] X. Shen, L. Hong, H. Sun, M. Shi, und Y. Song, „The expression of high-mobility group protein box 1 correlates with the progression of non-small cell lung cancer“, *Oncol Rep*, Bd. 22, Nr. 3, S. 535–539, Sep. 2009, doi: 10.3892/or_00000468.
- [194] D. Tang, R. Kang, H. J. Zeh, und M. T. Lotze, „High-mobility Group Box 1 [HMGB1] and Cancer“, *Biochim Biophys Acta*, Bd. 1799, Nr. 1–2, S. 131, 2010, doi: 10.1016/j.bbagr.2009.11.014.
- [195] W. Zhang, F. An, M. Xia, Q. Zhan, W. Tian, und Y. Jiao, „Increased HMGB1 expression correlates with higher expression of c-IAP2 and pERK in colorectal cancer“, *Medicine (Baltimore)*, Bd. 98, Nr. 3, Jan. 2019, doi: 10.1097/MD.00000000000014069.
- [196] A. Agresti und M. E. Bianchi, „HMGB proteins and gene expression“, *Current Opinion in Genetics & Development*, Bd. 13, Nr. 2, S. 170–178, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0959-437X(03)00023-6.
- [197] M. Mähler *u. a.*, „Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis“, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Bd. 274, Nr. 3, S. G544–G551, März 1998, doi: 10.1152/ajpgi.1998.274.3.G544.
- [198] U. Roy *u. a.*, „Distinct Microbial Communities Trigger Colitis Development upon Intestinal Barrier Damage via Innate or Adaptive Immune Cells“, *Cell Rep*, Bd. 21, Nr. 4, S. 994–1008, Okt. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.097.
- [199] B.-Z. Shao, Y. Yao, J.-S. Zhai, J.-H. Zhu, J.-P. Li, und K. Wu, „The Role of Autophagy in Inflammatory Bowel Disease“, *Frontiers in Physiology*, Bd. 12, S. 63, 2021, doi: 10.3389/fphys.2021.621132.
- [200] M. Kubota *u. a.*, „Autophagy deficiency exacerbates colitis through excessive oxidative stress and MAPK signaling pathway activation“, *PLoS One*, Bd. 14, Nr. 11, S. e0225066, Nov. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0225066.
- [201] S. Pankiv *u. a.*, „p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy“, *J Biol Chem*, Bd. 282, Nr. 33, S. 24131–24145, Aug. 2007, doi: 10.1074/jbc.M702824200.
- [202] I. Tanida, N. Minematsu-Ikeguchi, T. Ueno, und E. Kominami, „Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy“, *Autophagy*, Bd. 1, Nr. 2, S. 84–91, Juli 2005, doi: 10.4161/auto.1.2.1697.
- [203] S. Gardella *u. a.*, „The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway“, *EMBO reports*, Bd. 3, Nr. 10, S. 995–1001, Okt. 2002, doi: 10.1093/embo-reports/kvf198.
- [204] T. Kawasaki und T. Kawai, „Toll-Like Receptor Signaling Pathways“, *Front Immunol*, Bd. 5, Sep. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- [205] K. Kierdorf und G. Fritz, „RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond“, *Journal of Leukocyte Biology*, Bd. 94, Nr. 1, S. 55–68, 2013, doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.1012519>.
- [206] P. Kiesler, I. J. Fuss, und W. Strober, „Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases“, *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, Bd. 1, Nr. 2, S. 154–170, März 2015, doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.006.

- [207] N. Barker *u. a.*, „Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5“, *Nature*, Bd. 449, Nr. 7165, Art. Nr. 7165, Okt. 2007, doi: 10.1038/nature06196.
- [208] P. Blache *u. a.*, „SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes“, *The Journal of Cell Biology*, Bd. 166, Nr. 1, S. 37, Juli 2004, doi: 10.1083/jcb.200311021.
- [209] L. G. van der Flier *u. a.*, „Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate“, *Cell*, Bd. 136, Nr. 5, S. 903–912, März 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.031.
- [210] P. Czarnewski *u. a.*, „Conserved transcriptomic profile between mouse and human colitis allows unsupervised patient stratification“, *Nat Commun*, Bd. 10, Nr. 1, S. 2892, Juni 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10769-x.
- [211] P. J. Thul *u. a.*, „A subcellular map of the human proteome“, *Science*, Bd. 356, Nr. 6340, Mai 2017, doi: 10.1126/science.aal3321.
- [212] M. Uhlén *u. a.*, „Tissue-based map of the human proteome“, *Science*, Bd. 347, Nr. 6220, Jan. 2015, doi: 10.1126/science.1260419.
- [213] J. Chappell und S. Dalton, „Roles for MYC in the Establishment and Maintenance of Pluripotency“, *Cold Spring Harb Perspect Med*, Bd. 3, Nr. 12, Dez. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a014381.
- [214] F. J. Kubben *u. a.*, „Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation“, *Gut*, Bd. 35, Nr. 4, S. 530–535, Apr. 1994, doi: 10.1136/gut.35.4.530.
- [215] P. M. Choi und M. P. Zelig, „Similarity of colorectal cancer in Crohn’s disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention.“, *Gut*, Bd. 35, Nr. 7, S. 950–954, Juli 1994, doi: 10.1136/gut.35.7.950.
- [216] C. D. Gillen, R. S. Walmsley, P. Prior, H. A. Andrews, und R. N. Allan, „Ulcerative colitis and Crohn’s disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis.“, *Gut*, Bd. 35, Nr. 11, S. 1590–1592, Nov. 1994, doi: 10.1136/gut.35.11.1590.
- [217] Z. Tang, C. Li, B. Kang, G. Gao, C. Li, und Z. Zhang, „GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses“, *Nucleic Acids Research*, Bd. 45, Nr. W1, S. W98–W102, Juli 2017, doi: 10.1093/nar/gkx247.
- [218] F. Colotta, P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, und A. Mantovani, „Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability“, *Carcinogenesis*, Bd. 30, Nr. 7, S. 1073–1081, Juli 2009, doi: 10.1093/carcin/bgp127.
- [219] G. Lorusso und C. Rüegg, „The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis“, *Histochem Cell Biol*, Bd. 130, Nr. 6, S. 1091–1103, Dez. 2008, doi: 10.1007/s00418-008-0530-8.
- [220] Y. Li *u. a.*, „IL-33 facilitates proliferation of colorectal cancer dependent on COX2/PGE2“, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Bd. 37, Nr. 1, S. 196, Aug. 2018, doi: 10.1186/s13046-018-0839-7.
- [221] H. Zhou, G. Li, S. Huang, Y. Feng, und A. Zhou, „SOX9 promotes epithelial-mesenchymal transition via the Hippo-YAP signaling pathway in gastric carcinoma cells“, *Oncol Lett*, Bd. 18, Nr. 1, S. 599–608, Juli 2019, doi: 10.3892/ol.2019.10387.
- [222] A. Matheu *u. a.*, „Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9“, *Cancer Res*, Bd. 72, Nr. 5, S. 1301–1315, März 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3660.
- [223] B. M. Javier *u. a.*, „Recurrent, truncating SOX9 mutations are associated with SOX9 overexpression, KRAS mutation, and TP53 wild type status in colorectal carcinoma“, *Oncotarget*, Bd. 7, Nr. 32, S. 50875–50882, Mai 2016, doi: 10.18632/oncotarget.9682.
- [224] K. S. Yan und C. J. Kuo, „Ascl2 reinforces intestinal stem cell identity“, *Cell Stem Cell*, Bd. 16, Nr. 2, S. 105–106, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.stem.2015.01.014.
- [225] M. J. Lukey, K. S. Greene, J. W. Erickson, K. F. Wilson, und R. A. Cerione, „The oncogenic transcription factor c-Jun regulates glutaminase expression and

- sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy“, *Nat Commun*, Bd. 7, Nr. 1, S. 11321, Apr. 2016, doi: 10.1038/ncomms11321.
- [226] M. Uhlen *u. a.*, „A pathology atlas of the human cancer transcriptome“, *Science*, Bd. 357, Nr. 6352, Aug. 2017, doi: 10.1126/science.aan2507.
- [227] X. Yao, G. Zhao, H. Yang, X. Hong, L. Bie, und G. Liu, „Overexpression of high-mobility group box 1 correlates with tumor progression and poor prognosis in human colorectal carcinoma“, *J Cancer Res Clin Oncol*, Bd. 136, Nr. 5, S. 677–684, Mai 2010, doi: 10.1007/s00432-009-0706-1.
- [228] B. Khambu *u. a.*, „HMGB1 promotes ductular reaction and tumorigenesis in autophagy-deficient livers“, *J Clin Invest*, Bd. 128, Nr. 6, S. 2419–2435, Mai 2019, doi: 10.1172/JCI91814.
- [229] C. Hernandez, P. Huebener, J.-P. Pradere, R. A. Friedman, und R. F. Schwabe, „HMGB1 links chronic liver injury to progenitor responses and hepatocarcinogenesis“, *J Clin Invest*, Bd. 128, Nr. 6, S. 2436–2450, Apr. 2019, doi: 10.1172/JCI91786.
- [230] S. I. Grivennikov *u. a.*, „Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth“, *Nature*, Bd. 491, Nr. 7423, S. 254–258, Nov. 2012, doi: 10.1038/nature11465.
- [231] M. J. Waldner und M. F. Neurath, „Mechanisms of Immune Signaling in Colitis-Associated Cancer“, *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, Bd. 1, Nr. 1, S. 6–16, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.jcmgh.2014.11.006.
- [232] M. Martin *u. a.*, „RORyt+ hematopoietic cells are necessary for tumor cell proliferation during colitis-associated tumorigenesis in mice“, *European Journal of Immunology*, Bd. 45, Nr. 6, S. 1667–1679, 2015, doi: 10.1002/eji.201444915.
- [233] E. Pastille *u. a.*, „Transient Ablation of Regulatory T cells Improves Antitumor Immunity in Colitis-Associated Colon Cancer“, *Cancer Res*, Bd. 74, Nr. 16, S. 4258–4269, Aug. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3065.
- [234] A.-M. Georgoudaki *u. a.*, „Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis“, *Cell Reports*, Bd. 15, Nr. 9, S. 2000–2011, Mai 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.084.
- [235] J. E. Olguín *u. a.*, „Early and Partial Reduction in CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells during Colitis-Associated Colon Cancer Induces CD4+ and CD8+ T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis“, *J Cancer*, Bd. 9, Nr. 2, S. 239–249, Jan. 2018, doi: 10.7150/jca.21336.
- [236] M. S. Kwak *u. a.*, „Peroxisome-mediated disulfide bond formation is required for nucleocytoplasmic translocation and secretion of HMGB1 in response to inflammatory stimuli“, *Redox Biology*, Bd. 24, S. 101203, Juni 2019, doi: 10.1016/j.redox.2019.101203.
- [237] D. CHEN, L. M. BELLUSSI, D. PASSALI, und L. CHEN, „LPS may enhance expression and release of HMGB1 in human nasal epithelial cells in vitro“, *Acta Otorhinolaryngol Ital*, Bd. 33, Nr. 6, S. 398–404, Dez. 2013.
- [238] A. Volmari *u. a.*, „Leukocyte-Derived High-Mobility Group Box 1 Governs Hepatic Immune Responses to *Listeria monocytogenes*“, *Hepatology*, Juli 2021, doi: 10.1002/hep4.1777.
- [239] A. Mizoguchi, „Animal models of inflammatory bowel disease“, *Prog Mol Biol Transl Sci*, Bd. 105, S. 263–320, 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-394596-9.00009-3.
- [240] J. Sunden-Cullberg, A. Soop, L. Tokics, und C.-J. Treutiger, „HMGB1 is an early mediator of inflammation and may be negatively regulated by soluble receptor for advanced glycation end products in experimental endotoxemia and in sepsis“, *Crit Care*, Bd. 12, Nr. Suppl 5, S. P44, 2008, doi: 10.1186/cc7077.
- [241] H. Wang *u. a.*, „HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice“, *Science*, Bd. 285, Nr. 5425, S. 248–251, Juli 1999, doi: 10.1126/science.285.5425.248.
- [242] L. Schwartz *u. a.*, „Hyperosmotic stress contributes to mouse colonic inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A“, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Bd. 295, Nr. 5, S. G934–941, Nov. 2008, doi: 10.1152/ajpgi.90296.2008.

- [243] L. A. Dieleman, B. U. Ridwan, G. S. Tennyson, K. W. Beagley, R. P. Bucy, und C. O. Elson, „Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice“, *Gastroenterology*, Bd. 107, Nr. 6, S. 1643–1652, Dez. 1994, doi: 10.1016/0016-5085(94)90803-6.
- [244] M. Body-Malapel u. a., „The RAGE signaling pathway is involved in intestinal inflammation and represents a promising therapeutic target for Inflammatory Bowel Diseases“, *Mucosal Immunol*, Bd. 12, Nr. 2, S. 468–478, März 2019, doi: 10.1038/s41385-018-0119-z.
- [245] Y.-J. Shi, H.-F. Gong, Q.-Q. Zhao, X.-S. Liu, C. Liu, und H. Wang, „Critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) in dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal injury and repair“, *Toxicol Lett*, Bd. 315, S. 23–30, Okt. 2019, doi: 10.1016/j.toxlet.2019.08.012.
- [246] K. M. Tytgat, F. J. Opdam, A. W. Einerhand, H. A. Büller, und J. Dekker, „MUC2 is the prominent colonic mucin expressed in ulcerative colitis“, *Gut*, Bd. 38, Nr. 4, S. 554–563, Apr. 1996, doi: 10.1136/gut.38.4.554.
- [247] T. Shirazi, R. J. Longman, A. P. Corfield, und C. S. J. Probert, „Mucins and inflammatory bowel disease“, *Postgraduate Medical Journal*, Bd. 76, Nr. 898, S. 473–478, Aug. 2000, doi: 10.1136/pmj.76.898.473.
- [248] Y. Niv, „Mucin gene expression in the intestine of ulcerative colitis patients: a systematic review and meta-analysis“, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, Bd. 28, Nr. 11, S. 1241–1245, Nov. 2016, doi: 10.1097/MEG.0000000000000707.
- [249] C. Chelakkot, J. Ghim, und S. H. Ryu, „Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications“, *Experimental & Molecular Medicine*, Bd. 50, Nr. 8, Art. Nr. 8, Aug. 2018, doi: 10.1038/s12276-018-0126-x.
- [250] K. Takeuchi, L. Maiden, und I. Bjarnason, „Genetic aspects of intestinal permeability in inflammatory bowel disease“, *Novartis Found Symp*, Bd. 263, S. 151–158; discussion 159-163, 211–218, 2004.
- [251] J. Landy u. a., „Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer“, *World J Gastroenterol*, Bd. 22, Nr. 11, S. 3117–3126, März 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i11.3117.
- [252] S. Evran u. a., „The effect of high mobility group box-1 protein on cerebral edema, blood-brain barrier, oxidative stress and apoptosis in an experimental traumatic brain injury model“, *Brain Res Bull*, Bd. 154, S. 68–80, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.10.013.
- [253] S. Liu, P. Sappington, R. Delude, und M. Fink, „HMGB1 DOWN-REGULATES TIGHT JUNCTION PROTEIN EXPRESSION IN CACO-2 CELLS THROUGH A NITRIC OXIDE DEPENDENT PATHWAY.: 136-S“, *Critical Care Medicine*, Bd. 33, Nr. 12, S. A36, Dez. 2005.
- [254] D. Günzel und A. S. L. Yu, „Claudins and the modulation of tight junction permeability“, *Physiol Rev*, Bd. 93, Nr. 2, S. 525–569, Apr. 2013, doi: 10.1152/physrev.00019.2012.
- [255] G. J. Feldman, J. M. Mullin, und M. P. Ryan, „Occludin: structure, function and regulation“, *Adv Drug Deliv Rev*, Bd. 57, Nr. 6, S. 883–917, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.addr.2005.01.009.
- [256] Y. Yan u. a., „Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis“, *PLOS ONE*, Bd. 4, Nr. 6, S. e6073, Juni 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006073.
- [257] Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, und Y. Baran, „Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis“, *Tumor Biol.*, Bd. 37, Nr. 7, S. 8471–8486, Juli 2016, doi: 10.1007/s13277-016-5035-9.
- [258] M. Perše und A. Cerar, „Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks“, *J Biomed Biotechnol*, Bd. 2012, S. 718617, 2012, doi: 10.1155/2012/718617.
- [259] J. Personnaz u. a., „Macrophage-derived HMGB1 is dispensable for tissue fibrogenesis“, *FASEB BioAdvances*, Bd. 1, Nr. 4, S. 227–245, 2019, doi: 10.1096/fba.2018-00035.

- [260] S. Danese und A. Mantovani, „Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin–Yang interplay between inflammation and cancer“, *Oncogene*, Bd. 29, Nr. 23, Art. Nr. 23, Juni 2010, doi: 10.1038/onc.2010.109.
- [261] E. Elinav, R. Nowarski, C. A. Thaiss, B. Hu, C. Jin, und R. A. Flavell, „Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 13, Nr. 11, S. 759–771, Nov. 2013, doi: 10.1038/nrc3611.
- [262] E. Bonavita, M. R. Galdiero, S. Jaillon, und A. Mantovani, „Chapter Four - Phagocytes as Corrupted Policemen in Cancer-Related Inflammation“, in *Advances in Cancer Research*, Bd. 128, X.-Y. Wang und P. B. Fisher, Hrsg. Academic Press, 2015, S. 141–171. doi: 10.1016/bs.acr.2015.04.013.
- [263] Y. Itatani, K. Kawada, und Y. Sakai, „Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment“, *Int J Mol Sci*, Bd. 20, Nr. 23, S. 5822, Nov. 2019, doi: 10.3390/ijms20235822.
- [264] E. Battle und J. Massagué, „Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer“, *Immunity*, Bd. 50, Nr. 4, S. 924–940, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.024.
- [265] H. Gonzalez, C. Hagerling, und Z. Werb, „Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression“, *Genes Dev*, Bd. 32, Nr. 19–20, S. 1267–1284, Okt. 2018, doi: 10.1101/gad.314617.118.
- [266] B. Zhang u. a., „Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma“, *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 2, S. e57114, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0057114.
- [267] Y. Itatani u. a., „The Role of Chemokines in Promoting Colorectal Cancer Invasion/Metastasis“, *Int J Mol Sci*, Bd. 17, Nr. 5, Apr. 2016, doi: 10.3390/ijms17050643.
- [268] J. Zheng, M. Yang, J. Shao, Y. Miao, J. Han, und J. Du, „Chemokine receptor CX3CR1 contributes to macrophage survival in tumor metastasis“, *Mol Cancer*, Bd. 12, Nr. 1, S. 141, Nov. 2013, doi: 10.1186/1476-4598-12-141.
- [269] L.-Y. Chang u. a., „Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- β -mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells“, *Cancer Res*, Bd. 72, Nr. 5, S. 1092–1102, März 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2493.
- [270] L. Yang u. a., „Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis“, *Cancer Cell*, Bd. 13, Nr. 1, S. 23–35, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.004.
- [271] Z. G. Fridlender u. a., „Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: ‚N1‘ versus ‚N2‘ TAN“, *Cancer Cell*, Bd. 16, Nr. 3, S. 183–194, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.
- [272] Y. Ohue und H. Nishikawa, „Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target?“, *Cancer Sci*, Bd. 110, Nr. 7, S. 2080–2089, Juli 2019, doi: 10.1111/cas.14069.
- [273] A. Tanaka und S. Sakaguchi, „Regulatory T cells in cancer immunotherapy“, *Cell Res*, Bd. 27, Nr. 1, S. 109–118, Jan. 2017, doi: 10.1038/cr.2016.151.
- [274] A. J. Templeton u. a., „Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis“, *J Natl Cancer Inst*, Bd. 106, Nr. 6, S. dju124, Juni 2014, doi: 10.1093/jnci/dju124.
- [275] R. Braster, M. Bögels, R. H. J. Beelen, und M. van Egmond, „The delicate balance of macrophages in colorectal cancer; their role in tumour development and therapeutic potential“, *Immunobiology*, Bd. 222, Nr. 1, S. 21–30, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.imbio.2015.08.011.
- [276] M. Lee, Y. Lee, J. Song, J. Lee, und S.-Y. Chang, „Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease“, *Immune Netw*, Bd. 18, Nr. 1, S. e5, Jan. 2018, doi: 10.4110/in.2018.18.e5.
- [277] S. Jin, Z. Yang, X. Hao, W. Tang, W. Ma, und H. Zong, „Roles of HMGB1 in regulating myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment“, *Biomarker Research*, Bd. 8, Nr. 1, S. 21, Juni 2020, doi: 10.1186/s40364-020-00201-8.

- [278] W. Shi *u. a.*, „Analysis of Genes Involved in Ulcerative Colitis Activity and Tumorigenesis Through Systematic Mining of Gene Co-expression Networks“, *Front Physiol*, Bd. 10, S. 662, Mai 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.00662.
- [279] M. Jinushi, M. Baghdadi, S. Chiba, und H. Yoshiyama, „Regulation of cancer stem cell activities by tumor-associated macrophages“, *Am J Cancer Res*, Bd. 2, Nr. 5, S. 529–539, 2012.
- [280] R. Metzger, M. Maruskova, S. Krebs, K.-P. Janssen, und A. B. Krug, „Increased Incidence of Colon Tumors in AOM-Treated Apc1638N/+ Mice Reveals Higher Frequency of Tumor Associated Neutrophils in Colon Than Small Intestine“, *Frontiers in Oncology*, Bd. 9, S. 1001, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.01001.
- [281] R. G. Morgan, E. Mortensson, und A. C. Williams, „Targeting LGR5 in Colorectal Cancer: therapeutic gold or too plastic?“, *Br J Cancer*, Bd. 118, Nr. 11, S. 1410–1418, Mai 2018, doi: 10.1038/s41416-018-0118-6.
- [282] B. Lü *u. a.*, „Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer“, *Am J Clin Pathol*, Bd. 130, Nr. 6, S. 897–904, Dez. 2008, doi: 10.1309/AJCPW1W8GJBQGCNI.
- [283] N. Wlodarchak und Y. Xing, „PP2A as a master regulator of the cell cycle“, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Bd. 51, Nr. 3, S. 162–184, Mai 2016, doi: 10.3109/10409238.2016.1143913.
- [284] R. Chen *u. a.*, „HMGB1 Controls Liver Cancer Initiation through YAP-dependent Aerobic Glycolysis“, *Hepatology*, Bd. 67, Nr. 5, S. 1823–1841, Mai 2018, doi: 10.1002/hep.29663.
- [285] H. Wang, H. Zhang, Z. Sun, W. Chen, und C. Miao, „GABAB receptor inhibits tumor progression and epithelial-mesenchymal transition via the regulation of Hippo/YAP1 pathway in colorectal cancer“, *Int J Biol Sci*, Bd. 17, Nr. 8, S. 1953–1962, 2021, doi: 10.7150/ijbs.58135.
- [286] I. M. Moya und G. Halder, „Hippo–YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine“, *Nat Rev Mol Cell Biol*, Bd. 20, Nr. 4, S. 211–226, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41580-018-0086-y.
- [287] K. Mercer, S. Giblett, A. Oakden, J. Brown, R. Marais, und C. Pritchard, „A-Raf and Raf-1 work together to influence transient ERK phosphorylation and G1/S cell cycle progression“, *Oncogene*, Bd. 24, Nr. 33, S. 5207–5217, Aug. 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208707.
- [288] C. H. Serezani, M. N. Ballinger, D. M. Aronoff, und M. Peters-Golden, „Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function“, *Am J Respir Cell Mol Biol*, Bd. 39, Nr. 2, S. 127–132, Aug. 2008, doi: 10.1165/rcmb.2008-0091TR.
- [289] Z.-W. Li *u. a.*, „GNAI1 and GNAI3 Reduce Colitis-Associated Tumorigenesis in Mice by Blocking IL6 Signaling and Down-regulating Expression of GNAI2“, *Gastroenterology*, Bd. 156, Nr. 8, S. 2297–2312, Juni 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.040.
- [290] J. Yao *u. a.*, „GNAI1 Suppresses Tumor Cell Migration and Invasion and is Post-Transcriptionally Regulated by Mir-320a/c/d in Hepatocellular Carcinoma“, *Cancer Biol Med*, Bd. 9, Nr. 4, S. 234–241, Dez. 2012, doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2012.04.003.
- [291] K. Kotlo *u. a.*, „The olfactory G protein-coupled receptor (Olfr-78/OR51E2) modulates the intestinal response to colitis“, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Feb. 2020, doi: 10.1152/ajpcell.00454.2019.
- [292] C. Castaño-Milla, M. Chaparro, und J. P. Gisbert, „Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis“, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 39, Nr. 7, S. 645–659, 2014, doi: 10.1111/apt.12651.
- [293] M. Romano *u. a.*, „From Inflammation to Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Molecular Perspectives“, *Anticancer Res*, Bd. 36, Nr. 4, S. 1447–1460, Apr. 2016.
- [294] G. Tan, C. Huang, J. Chen, und F. Zhi, „HMGB1 released from GSDME-mediated pyroptotic epithelial cells participates in the tumorigenesis of colitis-associated colorectal cancer through the ERK1/2 pathway“, *J Hematol Oncol*, Bd. 13, Nr. 1, S. 149, Nov. 2020, doi: 10.1186/s13045-020-00985-0.

- [295] K. R. Reed *u. a.*, „Secreted HMGB1 from Wnt activated intestinal cells is required to maintain a crypt progenitor phenotype“, *Oncotarget*, Bd. 7, Nr. 32, S. 51665–51673, Juni 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10076.
- [296] E. Timperi *u. a.*, „Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer“, *Oncoimmunology*, Bd. 5, Nr. 7, S. e1175800, Juli 2016, doi: 10.1080/2162402X.2016.1175800.
- [297] L. Szeponik, P. Akeus, W. Rodin, S. Raghavan, und M. Quiding-Järbrink, „Regulatory T cells specifically suppress conventional CD8 $\alpha\beta$ T cells in intestinal tumors of APCMin/+ mice“, *Cancer Immunol Immunother*, Bd. 69, Nr. 7, S. 1279–1292, Juli 2020, doi: 10.1007/s00262-020-02540-9.
- [298] Y. Chen, Y. Song, W. Du, L. Gong, H. Chang, und Z. Zou, „Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression“, *Journal of Biomedical Science*, Bd. 26, Nr. 1, S. 78, Okt. 2019, doi: 10.1186/s12929-019-0568-z.
- [299] P. Hubert *u. a.*, „Extracellular HMGB1 blockade inhibits tumor growth through profoundly remodeling immune microenvironment and enhances checkpoint inhibitor-based immunotherapy“, *J Immunother Cancer*, Bd. 9, Nr. 3, S. e001966, März 2021, doi: 10.1136/jitc-2020-001966.
- [300] Q. Yuan *u. a.*, „MyD88 in myofibroblasts enhances colitis-associated tumorigenesis via promoting macrophage M2 polarization“, *Cell Reports*, Bd. 34, Nr. 5, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108724.
- [301] R. Kalluri, „The biology and function of fibroblasts in cancer“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 16, Nr. 9, S. 582–598, Aug. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.73.

Curriculum vitae

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Dr. Peter Hübener für seine Betreuung meiner praktischen Arbeit und die Bereitstellung als auch Finanzierung des interessanten Forschungsthemas bedanken. Vielen Dank für die Diskussionen und deine persönliche Unterstützung, die mich sehr motiviert haben.

Ich möchte mich außerdem bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Herkel für seine Betreuung, die Ratschläge und das Anfertigen des 1. Gutachtens bedanken. Zudem war es eine Bereicherung im Umfeld seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu können, die mir stets bei Problemen und Fragen behilflich waren.

Bei Prof. Dr. Stefan Hoth bedanke ich mich für das Anfertigen des 2. Gutachtens. Außerdem danke ich Johannes Herkel und Stefan Hoth sowie PD Dr. Hartwig Lüthen und Prof. Dr. Christian Lohr für die Mitgliedschaft in der Prüfungskommission meiner Disputation.

Ich möchte weiterhin meiner Arbeitsgruppe ganz herzlich für ihre tolle Unterstützung danken. Vielen Dank Steph, Annika, Karlotta, Elisabeth und natürlich Peter für eure Hilfe über die ganze Zeit, die wir quasi im Mehrschichtsystem zusammengearbeitet haben.

Ich bedanke mich bei Anja Koop und bei Dave Stateczny für das Korrekturlesen. Danke, dass ihr euch auch mit all meinen Problemen und mit meinem Gejammer befasst habt und es nie müde wurdet. Danke Anja für dein Interesse auch an meinen alltäglichen Belangen und meinem Wohlbefinden in der Laborzeit. Du hattest immer ein offenes Ohr.

Ganz besonders danke ich Penelope Pelczar für ihre Zeit und Unterstützung bei der Endoskopie meiner Mäuse und ihre ganz persönliche Betreuung und die Ideen zum Voranbringen meiner Versuche. Gleichzeitig danke ich der AG Huber für das Einbeziehen in ihr Lab-Meeting und den austauschreichen Journal Club mit anregenden Diskussionen und neuen Ideen auf sehr hohem wissenschaftlichem Niveau. Danke Samuel Huber und Nicola Gagliani, dass ihr mich auch als externe Doktorandin so gefördert habt.

Minyue Qui und Malik Alawi danke ich sehr für die Auswertung der Sequenzierungsdaten.

Ich danke dem gesamten Team der Forschungstierhaltung für die tolle Arbeit. Im Besonderen danke ich Richard Dabels dafür, dass er mich so sehr bei der Mausezucht unterstützt und beraten hat. Einen besseren Tierpfleger kann man sich nicht vorstellen.

Ich danke allen Post-Docs, Doktoranden und TAs aus O58 für die gemeinsame Zeit im Labor und den alltäglichen Austausch.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Danke, dass ihr stets für mich da seid, ein offenes Ohr für mich habt und meine schlechten Launen aushaltet.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg,

Katharina Josephine Fölsch