

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Entwicklung einer neuen Immuntherapie für das Pankreaskarzinom auf Basis von gentechnisch veränderten Bakterien

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Gregor Martin Thomas Uhl
aus Trier

promoviert am 27. November 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. nat. M. Chmielewski
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. habil. C. P. Neumann-Haefelin

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten

Herr PD Dr. Markus Chmielewski
Herr Dr. Marc Herb

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die den *in* und *ex vivo* Experimenten dieser Arbeit zugrundeliegende Handhabung lebendiger Versuchstiere wurde ohne meine direkte Mitarbeit von Dr. Markus Chmielewski, Dr. Tobias Riet und Simon Lennarz durchgeführt.

Die Schnitte der Gewebeproben am Kryotom wurden ohne meine Mithilfe von der Medizinisch-Technischen Assistentin Danuta Chrobok durchgeführt. Die anschließenden Färbungen habe ich gemeinsam mit Frau Chrobok durchgeführt.

Die in dieser Arbeit in Abschnitt 4.2.1 Abbildung 7 beschriebenen Messergebnisse wurden, bis auf die Bereitstellung der Bakterien, ohne meine Mitarbeit im Labor des Instituts für medizinische Mikrobiologie, Infektiologie und Hygiene von Herr Dr. Marc Herb ermittelt. Die graphische Darstellung wurde ebenfalls von Herr Dr. Herb angefertigt und von mir im Nachgang formatiert.

Die Auswahl der Parameter und Durchführung des Cytokin-Multiplex erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mahabir-Brenner des Zentrums für molekulare Medizin Köln.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Köln Fortune Doktorandenstipendium der Fakultät für Medizin der Universität zu Köln.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 23.06.2025

Unterschrift:

Danksagung

Ich danke zuerst meinen Eltern, Großeltern, meiner Schwester und allen anderen aus meiner Familie. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt und nie allzu ernsthaft an der Fertigstellung dieser Arbeit gezweifelt habt.

Weiter möchte ich allen Beteiligten an der Wertschöpfungskette des Kaffees danken.

Nicht zuletzt den vielen anderen Endverbrauchern aus unserer und benachbarten Arbeitsgruppen, mit denen ich in der doch etwas länger als ursprünglich geplanten Zeit viele Gelegenheiten zum Konsum wahrnehmen konnte. Danke für den Spaß, den ihr mir in die häufiger mal frustrierende Wissenschaft gebracht habt.

Und natürlich auch nochmal ein explizites Dankeschön an alle, von und Dank derer ich in den vergangen fast fünf Jahren so viel lernen konnte:

Dana und Petra für die Anleitung, Hilfe und unzähligen Bakti-Kulturen

Fabian, GreDaniel, Nora und all den anderen für die oben beschriebenen Kaffeepausen und mentale und tatkräftige Unterstützung.

Markus, Tobi und Simon für die Ideen, Ratschläge und die Handhabung der Mäuse, sowie Dr. Marc Herb für die fachkundige Unterstützung und das Bereitstellen der Western-Blot Daten für diese Dissertation.

Ebenso bedanke ich mich bei Köln Fortune für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Für Nico, Tarek und Maxim

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	12
2.1 Grundlagen des Pankreaskarzinoms	12
2.2 Die Tumormikroumgebung	12
2.2.1. Bakterien als Teil der TME	13
2.2.2. Genetisch modifizierte Bakterien als Therapie	14
2.3 Grundlagen der in dieser Arbeit generierten Bakterien	14
2.3.1. FimH-Display-System	14
2.3.2. Hochkonservierte TNF-α Peptide	15
2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	16
2.4.1. Design und Klonierung von einem Vektor, der die Expression von TNF-α Peptiden via FimH-Display ermöglicht	16
2.4.2. Nachweis einer zusätzlichen biologischen Funktion der TNF-Bakterien im Vergleich zu Vehicle-Bakterien <i>in vitro</i>	16
2.4.3. Nachweis einer zusätzlichen biologischen Funktion der TNF-Bakterien im Vergleich zu Vehicle-Bakterien <i>in vivo</i>:	16
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Material	17
3.1.1. Antikörper	17
3.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze	18
3.1.3. Puffer und Stammlösungen	19
3.1.4. Zelllinien und Bakterienstämme	19
3.1.5. Plasmide und Restriktionsenzyme	20
3.1.6. Kits	21
3.1.7. Verbrauchsmaterialien	21
3.1.8. Mauslinien	22
3.1.9. Geräte und Software	22

3.2 Methoden	23
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	23
3.2.2. Bakterienkulturen	25
3.2.3. Aufkonzentration und Reinigung von Bakterienkulturüberständen	26
3.2.4. Zellkultur	26
3.2.5. Arbeit mit primären Murinen Zellen und Geweben	28
3.2.6. Zytotoxizität	29
3.2.7. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	31
3.2.8. Durchflusszytometrie (FACS)	32
3.2.9. Immunhistochemie	33
3.2.10. Immunblot	34
3.2.11. Statistische Auswertung und grafische Darstellung	35
4. ERGEBNISSE	36
4.1 Generierung der Bakterien	36
4.1.1. Design der Konstrukte	36
4.1.2. Generierung der P1516-Bakterien	37
4.1.3. Nachweis des Konstruktes	38
4.2 In Vitro Testung	39
4.2.1. Untersuchung des NF κ B-Signalwegs	39
4.2.2. Einfluss auf PBMCs gesunder Spender	41
4.2.3. Zytotoxizität Untersuchung anhand Bakterienkultur-Überstände	42
4.2.4. Zytotoxizität Untersuchung anhand Bakterien-Tumorzellen Co-Kultur	43
4.2.5. Zytotoxizität Untersuchung anhand Makrophagen-Tumorzellen Co-Kultur	43
4.3 In Vivo Testung	45
4.3.1. Überlebensanalyse	46
4.3.2. Nachweis des Konstruktes im Gewebe	46
4.3.3. Untersuchung des adaptiven Immunsystems	48
4.3.4. Tumorinfiltration durch Zellen des Immunsystems	50
4.3.5. Zytokine im peripheren Blut	51
5. DISKUSSION	55
5.1 2xTNF-Bakterien, nicht aber Vehicle-, 1xTNF- oder P1516-Bakterien führen zur Aktivierung des NFκB-Signalwegs über den TNF-R	55
5.2 TNF-Bakterien zeigen <i>in vitro</i> keinen zusätzlichen zytotoxischen Effekt auf Panc02-Zellen	55

5.3	TNF-Bakterien zeigen <i>in vitro</i> keinen zusätzlichen aktivierenden Effekt auf humane PBMCs oder murine Makrophagen	56
5.4	2xTNF-Bakterien verlängern Überleben von Panc02-Tumor tragenden Mäusen	57
5.5	I.p. Verabreichung von 2xTNF-Bakterien an Panc02-Tumor tragenden Mäuse ist sicher und führt zur Kolonisation des Tumors	57
5.6	Mögliche Reaktion des Immunsystems	57
5.7	Limitationen dieser Arbeit	58
5.7.1.	Limitationen der <i>in vitro</i> Arbeit.	58
5.7.2.	Limitationen der <i>in vivo</i> Arbeit.	59
5.8	Zusammenfassung und Ausblick	60
6.	LITERATURVERZEICHNIS	61
7.	ANHANG	67
7.1	Abbildungsverzeichnis	67
7.2	Tabellenverzeichnis	67
7.3.	Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Konstrukte	67

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
CAF	Krebs assozierte Fibroblasten
CD	Cluster of Differentiation
DAB	3,3-Diaminobenzidin
Dam	DNA adenine methyltransferase
Dcm	DNA cytosine methyltransferase
ddH ₂ O	double-distilled water
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
E:T	Effektor zu Zielzell Verhältniss
EGF	epidermale Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	fetal calv serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFP	green fluorescent protein
GLuc	Gaussia Luciferase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
hEGF	humaner epidermaler Wachstumsfaktor
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IκB	Inhibitor of kappa B
KO	Knockout
LB-Medium	lysogeny broth
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MOI	Multiplicity of Infection
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
n	Anzahl

NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDAC	duktale Adenokarzinom des Pankreas
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PMS	Phenazinmethosulfat
POI	Protein of Interest
RFU	relative fluorescence units
RPM	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raum Temperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TME	Tumormikroenvironment
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
WT	Wildtyp
XTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

1. Zusammenfassung

Das duktale Pankreaskarzinom ist eine der tödlichsten Krebsentitäten. In den meisten Fällen wird es im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, für das derzeit keine kurative Therapieoption verfügbar ist. Eine der größten Hürden für die Therapie stellt die immunsuppressiven Tumormikroumgebung dar. Teil dieser sind Bakterien, die den Tumor besiedeln. Zwischen Patient:innen ist die Verteilung der Stämme und die damit assoziierten Effekte heterogen. Die gezielte Transplantation von Bakterien kann für spezielle Kollektive das Ansprechen auf Therapien verbessern. Eine weitere Methode, die bisher vor allem präklinisch erprobt wurde, ist die Einführung von gentechnisch veränderten Bakterien. Hierbei wird sich die natürliche Eigenschaft von Bakterien, gezielt Tumorgewebe zu kolonisieren, zunutze gemacht, um Therapeutika lokal freizusetzen. In dieser Arbeit wurden gentechnisch modifizierten Bakterien des Stammes *Escherichia coli*, die rekombinante immunstimulatorische Proteine FimH-abhängig auf ihrer Oberfläche präsentieren können, generiert und getestet. FimH ist ein bakterielles Adhäsinprotein, das sich an der Spitze der Fimbrien von *E.coli* befindet und die Funktion hat, Bakterien an Wirtszellen anzuhafoten. Durch genetische Modifikation wurde das FimH Protein mit hochkonservierten Fragmenten von TNF- α fusioniert und auf der bakteriellen Oberfläche exprimiert.

Ziel war es, die rekombinanten Proteine mit immunstimulierenden und zytolytischen Eigenschaften im Pankreaskarzinom mittels genetisch modifizierter Bakterien herzustellen, um den Tumor zu behandeln. Hierzu wurden verschiedene TNF- α Varianten genutzt.

Die induzierbare Expression der Proteine durch die verwendeten Bakterien konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Bioaktivität der rekombinanten TNF- α -FimH Fusionsproteine wurden murine Makrophagen aus Mäusen des Stammes C57BL/6N Myd88 $^{-/-}$ Trif $^{-/-}$ verwendet. Hierzu wurde die TNF- α -Rezeptor-abhängige Signalweiterleitung in murinen Makrophagen untersucht. Im anschließenden *in vivo* Versuch wurde in immunkompetenten Mäusen des Stammes C57BL/6N die antitumorale Wirkung untersucht. Die intraperitoneale Verabreichung der Bakterien mit induzierbarer TNF- α -FimH-Expression führte bei Mäusen mit orthotopen syngenen Pankreaskarzinomen zu einer signifikant längeren Überlebensdauer als bei Mäusen, die mit wt-Bakterien behandelt wurden. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte in dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden. Die Verabreichung der Bakterien führte nicht zu signifikanten Veränderungen der Blutzytokinwerte oder zu anderen adversen Effekten.

2. Einleitung

Diese experimentelle Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines neuartigen Therapieansatzes für das Pankreaskarzinom.

2.1 Grundlagen des Pankreaskarzinoms

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) war 2022 für die viertmeisten Krebstodesfälle über beide Geschlechter hinweg in der EU verantwortlich, während es nur die siebthöchste Inzidenz hatte.¹ In den USA wird erwartet, dass das PDAC bis 2030 die zweithäufigste Ursache für Krebstodesfälle sein wird.²

Mit einer relativen Fünf-Jahres-Überlebensrate von 13 % gehört es zu den Krebsarten mit der schlechtesten Prognose ab Zeitpunkt der Diagnose.³ Eine Heilung ist nur durch chirurgische Resektion erreichbar, die nur in einem frühen Stadium möglich ist. In einem solch frühen Stadium werden jedoch nur 15 bis 20 % der Patient:innen diagnostiziert.⁴

Symptome treten häufig erst in fortgeschrittenem, metastasiertem Stadium auf und sind unspezifisch. Das einzige Symptom mit einem positiven prädiktiven Wert von mehr als 1 % ist der Ikterus, welcher wiederum nur in 30 % der Fälle auftritt.⁵

Ein Screeningverfahren für die asymptomatische Allgemeinbevölkerung wird derzeit nicht empfohlen. Bei Patient:innen mit speziellen hereditären Risikofaktoren können Screeningverfahren zum Einsatz kommen, diese Gruppe macht jedoch nur etwa 10 % der Pankreaskarzinomfälle aus.⁶

Kurz- und mittelfristig muss daher davon ausgegangen werden, dass weiterhin eine Mehrzahl der Patient:innen in lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Stadium diagnostiziert werden. Hier kommen aktuell FOLFIRINOX, NALIRIFOX und die Kombination aus Gemcitabin mit nabPaclitaxel als Erstlinientherapien zum Einsatz.⁷ Während verlängertes Überleben bei höherer Lebensqualität durch Chemotherapien nachgewiesen werden konnte⁸ und neue Therapieregime Vorteile gegenüber vorherigen haben⁹, bleiben substantielle Fortschritte aus. Immuncheckpoint-Inhibitoren, die die Therapie vieler anderer Krebsarten in den letzten Jahren revolutioniert haben, zeigen beim PDAC eine unzureichende Effektivität.¹⁰ Auch andere Immuntherapien wie chimäre Antigenrezeptor T-Zellen scheinen auf das PDAC nicht gut übertragbar zu sein.^{11,12}.

Die Tumormikroumgebung (TME) wird als bedeutende Hürde für die Therapie des PDAC betrachtet.

2.2 Die Tumormikroumgebung

Charakteristisch für die TME des PDAC ist ein ausgeprägtes, desmoplastisches Stroma. Dieses wird zu großen Teilen von krebsassoziierten Fibroblasten (CAF) gebildet. CAFs

rekrutieren sich aus pankreatischen Sternzellen, aber auch aus Stammzellen des Knochenmarks und Fettgewebes.¹³ Wie die Herkunft sind auch ihre Funktionen vielfältig: Neben der Stroma-Bildung fördern sie das Tumorwachstum¹⁴ und die Immunsuppression.¹⁵ Gleichzeitig scheinen sie den Tumorprogress auch einzudämmen: Die Depletion von CAF in Mäusen mit PDAC führte zu einem verstärkten invasiven Wachstum und einer verkürzten Überlebenszeit.¹⁶

Die im TME befindlichen Immunzellen zeigen im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe ein ausgeprägt immunsuppressiveres Expressionsmuster. So werden regulatorische T-Zellen fast ausschließlich im Tumorgewebe detektiert.¹⁷

Die bei über 90 % der PDAC nachgewiesene KRAS Mutation¹⁸ führt über Freisetzung von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF),¹⁹ vermehrte PD-L1- und verminderte MHC-1-Expression²⁰ zusätzlich zu einer Beeinträchtigung von CD8+ T-Lymphozyten.

Ein weiterer möglicher Faktor ist das Tumormikrobiom. So zeigten Pushalkar und Kollegen die Unterdrückung des adaptiven Immunsystems durch das Mikrobiom. Sie postulierten, dass das Mikrobiom eine Toleranz des PDAC durch eine Aktivierung spezifischer Toll-like Rezeptoren (TLR) von Monozyten bewirkt.²¹

2.2.1. Bakterien als Teil der TME

Bakterien sind ein erst in jüngster Zeit in den Fokus gerückter Bestandteil der TME. In Mäusen konnte die selektive Kolonisierung von Tumoren und deren Metastasen durch Bakterien nachgewiesen werden.²²⁻²⁴ Geller et al. fanden in 76 % von menschlichen Pankreastumorproben Bakterien.²⁵

Die Tumorinfiltration ist unabhängig von Chemotaxis und Motilität²⁶ der Bakterien und erfolgt vermutlich vaskulär.²⁴ Zu den beeinflussenden Faktoren zählen unter anderem Immunzellen,^{26,27} Zytokinsekretion²⁸ und der bakterielle Stoffwechsel.²⁶ Die Kolonisierung ist sowohl hinsichtlich des Verteilungsmusters als auch der Stämme heterogen.²⁹

Die Effekte der bakteriellen Kolonisation sind vielfältig und heterogen.

Routy et al. zeigten den Zusammenhang zwischen der Kolonisation mit bestimmten Stämmen und dem Ansprechen auf eine PD-1-Checkpointinhibitor-Therapie in Mäusen. Durch die Transplantation dieser Stämme konnten Resistenzen bei vormals nicht auf PD-1-Therapie ansprechenden Mäusen überwunden werden³⁰. Auch für eine Untergruppe menschlicher Melanom-Patient:innen konnte nach Transplantation von Stuhl von auf die Therapie ansprechenden Patient:innen ein signifikant besseres Ansprechen beobachtet werden.³¹

Auch für das PDAC besteht ein Zusammenhang zwischen Tumormikrobiom und sowohl Überleben als auch Infiltration durch CD8+ T-Zellen.³²

2.2.2. Genetisch modifizierte Bakterien als Therapie

Neben der Identifikation von für Krebstherapien förderlichen oder hinderlichen²⁵ Stämmen ist auch das gezielte Einbringen von gentechnisch veränderten Bakterien ein vielversprechender Ansatz, um Therapiemöglichkeiten zu erweitern. Hier werden die natürlichen tumorinfiltrierenden Eigenschaften genutzt, um Wirkstoffe gezielt in das TME zu bringen.

Hierfür werden verschiedene Bakterienarten, meist *Escherichia coli* (*E. coli*)^{33,34} oder *Salmonella*,^{35,36} verwendet. Die durch die Bakterien eingebrachten Wirkstoffe sind häufig Bestandteile der bakteriellen Membran³³ oder Zytokine.^{35,37,38} Die Induktion der Wirkstofffreigabe kann beispielsweise durch die im TME vorherrschende Hypoxie³⁹ oder durch äußere Reize wie ionisierende Bestrahlung³⁸ oder ultraschallvermittelte Hyperthermie³⁷ erfolgen.

In präklinischen Modellen zeigten verschiedene Ansätze vielversprechende Ergebnisse.^{37,40,41} Auch in einer veterinär-klinischen Studie konnte ein Überlebensvorteil für Hunde gezeigt werden, die zusätzlich zu der standardmäßigen Chemotherapie mit IL-2-freisetzenden Salmonellen behandelt wurden.³⁵ Klinische Studien mit menschlichen Patient:innen konnten hingegen noch keinen Durchbruch erzielen.³⁶

2.3 Grundlagen der in dieser Arbeit generierten Bakterien

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem gentechnisch veränderten Bakterienstamm *E. coli* BL-21-Gold, welcher mit dem bakteriellen Vektor pET-11a ausgestattet wurde, um induzierbar rekombinante TNF-α-FimH Fusionsproteine zu exprimieren.

2.3.1. FimH-Display-System

Die Grundlage für die in dieser Arbeit entworfenen Bakterien bildet das in unserem Labor entwickelte FimH-Display-System. FimH ist ein adhäsives Protein, das an der Spitze von Typ-1-Fimbrien lokalisiert ist. Diese Typ-1-Fimbrien kommen natürlicherweise auf *E. coli* vor und ermöglichen das Anheften an Glykoproteine.⁴²

Das FimH-Display fusioniert ein rekombinantes Protein-of-Interest (POI) an das Ende dieser Typ-1-Fimbrie. Auf diese Weise kann von den bereits vorhandenen, für Faltung und Transport auf die Oberfläche optimierten Prozessen des Bakteriums Gebrauch gemacht werden.

Die auf diese Weise an die Oberfläche transportierten Proteine sind biologisch aktiv.⁴³ Die Expression wird durch einen lacUV5-Promotor reguliert, der durch den künstlichen Zucker Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) aktiviert werden kann.

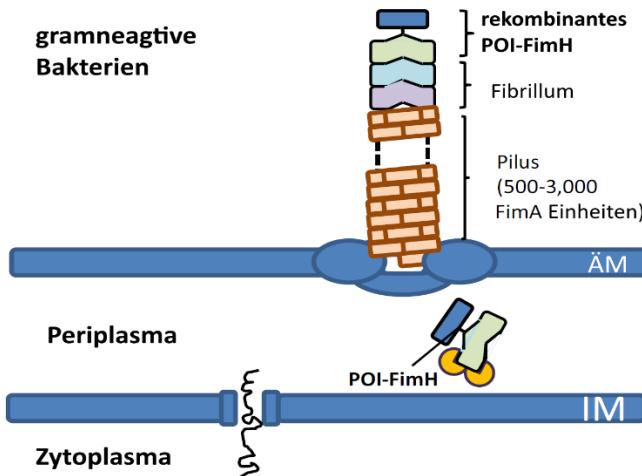


Abbildung 1: Schematische Darstellung des FimH-Displays. Das POI wird im Periplasma zwischen innerer Membran (IM) und äußerer Membran (ÄM) gefaltet und an der Spitze eines Fimbriums an die Bakterienoberfläche gebracht. Aus Chmielewski et al. 2019⁴³

2.3.2. Hochkonservierte TNF-α Peptide

Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) ist ein Zytokin, das hauptsächlich von Makrophagen und T-Zellen ausgeschüttet wird.⁴⁴ Er ist Ligand des ubiquitär vorhandenen TNF-Rezeptors 1 (TNF-R1) und des hauptsächlich auf Lymphozyten, dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimierten TNF-R2.⁴⁵

Neben regulatorischen Funktionen z. B. bei der Bildung von B-Zell-Follikeln in der Milz⁴⁶ ist er vor allem bei akuten wie chronischen Entzündungsreaktionen und bei der Steuerung von Zelltod und Überleben von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich fördert es die Tumorinfiltration durch Bakterien.²⁸

Die konkrete Wirkung von TNF-α hängt unter anderem von dem aktivierte Rezeptor ab. So vermittelt TNF-R1 ganz allgemein proinflammatorische Signale, während TNF-R2 eher antiinflammatorische und gewebeschützende Funktionen unterstützt.⁴⁵ Die Bindung von TNF-α an TNF-R1 kann über Aktivierung von Caspase-8 die Apoptose auslösen. Gleichzeitig führt TNF-R1 zur Aktivierung des NF-κB-Signalwegs und damit zur Aktivierung sowie zum Überleben der Zelle.⁴⁷ Der am Ende überwiegende Effekt ist dabei das Resultat eines komplexen Zusammenspiels unterschiedlicher Signalwege und ist aktuell noch nicht völlig verstanden.

Um zu untersuchen, inwiefern die primäre Sequenz von TNF-α Einfluss auf dessen Effekt hat, verglichen Lu, Chen und Kollegen TNF-α über neun verschiedene Spezies hinweg. Dabei identifizierten sie innerhalb von TNF-α mehrere hochkonservierte Peptide, die sie anschließend auf ihre Zytotoxizität untersuchten. Hierbei beobachteten sie für die beiden Peptide P15 und P16 eine von TNF-R1 und Caspase-3 unabhängige zytotoxische Aktivität auf Tumorzellen und Erythrozyten.⁴⁸ Aufgrund dieser Eigenschaft und der für das FimH-Display geeigneten Größe wählten wir diese beiden Peptide als Payload für unsere Bakterien aus.

2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

2.4.1. Design und Klonierung von einem Vektor, der die Expression von TNF- α Peptiden via FimH-Display ermöglicht

- Kann ein aus FimH-Display und TNF- α Peptid bestehendes Konstrukt auf der Oberfläche von *E.coli* Bakterien exprimiert und nachgewiesen werden?

2.4.2. Nachweis einer zusätzlichen biologischen Funktion der TNF-Bakterien im Vergleich zu Vehicle-Bakterien *in vitro*

- Zeigen die rekombinanten TNF- α -FimH Fusionsproteine eine Bioaktivität via TNF- α Rezeptor?
- Führen die Bakterien mit rekombinanter TNF- α -FimH Expression zu einer verstärkten Zytokin Produktion durch involvierte Immunzellen?
- Zeigen die Bakterien mit rekombinanter TNF- α -FimH Expression eine zytotoxische Wirkung auf Zellen unterschiedlicher solider Tumorlinien?
- Verstärken die Bakterien mit rekombinanter TNF- α -FimH Expression eine tumorlytische Wirkung von Makrophagen?

2.4.3. Nachweis einer zusätzlichen biologischen Funktion der TNF-Bakterien im Vergleich zu Vehicle-Bakterien *in vivo*:

- Wie beeinflusst die Injektion von Bakterien mit rekombinanter TNF- α -FimH Expression das Überleben von tumortragenden Mäusen?
- Kann eine Expression des Konstruktes im Tumorgewebe nachgewiesen werden?
- Kann eine veränderte B- oder T-Zell Antwort beobachtet werden?
- Kann eine Veränderung der Immuninfiltration des Tumorgewebes beobachtet werden?
- Kann ein Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen im peripheren Blut von behandelten Mäusen beobachtet werden?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Antikörper

ELISA	Hersteller	Katalog-Nr.	Assay
c-Myc Antibody, anti human/mouse/rat, HRP	Miltenyi Biotec	130-092-113	FimH/c-Myc
Rabbit anti C-Myc Tag Polyclonal Antibody	EnoGene	E16TPU002	FimH/c-Myc
c-myc Antibody, anti-human/mouse/rat, Biotin	Miltenyi Biotec	130-124-899	FimH/c-Myc
IFN gamma Monoclonal Antibody (AN-18)	Thermo Fisher	14-7313-81	IFN-γ
IFN gamma Monoclonal Antibody (R4-6A2), Biotin	Thermo Fisher	13-7312-81	IFN-γ
anti-mouse IL-2	Bio-Legend	503706	Maus-IL2
Biotin anti-mouse IL-2	Bio-Legend	503804	Maus-IL2
Biotin anti-mouse TNF-α Antibody	Bio-Legend	506311	Maus-TNF
anti-mouse TNF-α Antibody	Bio-Legend	510801	Maus-TNF
Biotin Anti-Mouse IFN-γ	BD Bioscience	551506	Maus-IFN-γ
Anti-Mouse IFN-γ	Thermo Fisher	14-7313-81	Maus-IFN-γ
Purified Mouse Anti-Human IL-2	BD Bioscience	555051	IL2
Biotin Mouse Anti-Human IL-2	BD Bioscience	555040	IL2
Human TNFalpah ELISA Kit	ImmunoTools	31673019	TNF
Humanes Interleukin2	Apotheke der Uni zu Köln		IL2
Humanes Interferon Gamma	Apotheke der Uni zu Köln		IFN-γ
Durchflusszytometrie	Hersteller	Katalog-Nr.	
Brilliant Violet 510™ anti-mouse CD19 Antibody	Bio-Legend	115546	
PE anti-mouse CD69 Antibody	Bio-Legend	104507	
APC anti-mouse CD80 Antibody	Bio-Legend	104713	
PE/Cyanine7 anti-mouse CD86 Antibody	Bio-Legend	105014	

APC anti-mouse CD86 Antibody	Bio-Legend	105011	
PE anti-mouse F4/80 Antibody	Bio-Legend	123110	
FITC anti-mouse NK-1.1 Antibody	Bio-Legend	156507	
anti-mouse CD19 APC-conjugated	ImmunoTools	22270196	
APC anti-mouse CD3ε Antibody	Bio-Legend	100311	
FITC anti-mouse CD3ε Antibody	Bio-Legend	100305	
CD8a Antibody, anti-mouse, PerCP	Miltenyi Biotec	130-122-953	
CD44 Antibody, anti-mouse, PE-Vio® 770	Miltenyi Biotec	130-102-377	
CD62L VioBlue	Miltenyi Biotec	130-102-425	
CD4 Antibody, anti-mouse, APC	Miltenyi Biotec	130-116-487	
Goat Anti-Mouse IgG-PE	Southernbiotech	1030-09	
Negative Compensation Beets	Biolegend	750002765	
Positive Compensation Beets	Biolegend	750002762	
Westernblot	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung
Monoklonale anti β-Actin AB	Sigma-Aldrich	A2228	1:10000
Monoklonale anti phospho-IKKα/β (Ser176/180) AB	Cell Signaling Technology	#2697	1:1000
Monoklonale anti phospho-NF-κBp65 (Ser536) AB	Cell Signaling Technology	#3033	1:1000
Monoklonale anti IκBα AB	Cell Signaling Technology	#4812	1:1000
Monoklonale anti IKK AB	Cell Signaling Technology	#8943	1:1000
Polyklonale anti phospho-ERK1/2 (Thr202/204) AB	Cell Signaling Technology	#9101	1:1000

3.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze

Name	Hersteller	Katalog-Nr.	zusätzliche Informationen
RPMI-1640 GlutaMAX	Thermo Fisher	61870044	
FBS Good	PAN Biotech	P40-37500	
DMEM (1X) GlutaMAX	Thermo Fisher	61965059	
Trypsin/EDTA (10x)	PAN Biotech	P10-024100	Stammlösung 1:10 in PBS
Accutase	Bio-Legend	423201	
XTT Sodium Salt	AppliChem	A2240,0500	
BioChemica			
Phenazine methosulfate	Sigma Aldrich	P9625	
Trypton	Carl Roth	8952.2	
Yeast Extract	Carl Roth	2363.1	

Natrium Chlorid	Carl Roth	3957.2	
IPTG	Carl Roth	CN08.2	Stammlösung 0,2M
LymphoPrep™	ProGen	757475	
Dimethylsulfoxid	Carl Roth	7029.1	
Penicillin-Streptomycin	PAN Biotech	P10-024100	
Kanamycin	Carl Roth	T832.2	Stammlösung: 20mg/ml
Ampicillin	Carl Roth	K029.5	Stammlösung: 100mg/ml

3.1.3. Puffer und Stammlösungen

PBS: 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na2HPO4, 18 mM KH2PO4 in ddH₂O

Wasch-Puffer (PBS-T): 1x PBS mit 0,1 % Polysorbat20

Coating Puffer: 17% (Na₂ CO₃ 10,6g/500ml) 8 % (Na HCO₃ 8,4g/500 ml) 75% ddH₂O

Blocking-Lösung: 100ml PBS + 3g BSA

LB-Medium: 10 g NaCl, 10 g Trypton und 5 g Yeast werden in 1L ddH₂O aufgelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das Medium bei 4°C gelagert.

Agarose-Gel: 4 g Agarose wurden in der Mikrowelle bei 800 Watt in 400ml TAE-Puffer gelöst. Anschließend wurden 40 µl Thiazol Orange beigefügt, das Gemisch in eine Gelkammer gegossen und bei RT aushärten lassen.

Ampicillin (100 mg/ml): 10 g Ampicillin-Salz wurden unter sterilen Bedingungen in 100 ml 0,9%NaCl aufgelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Kanamycin (20 mg/ml): 2 g Kanamycin-Salz wurden unter sterilen Bedingungen in 100 ml 0,9%NaCl aufgelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

XTT (1 mg/ml): 100 mg XTT-Salz wurden unter sterilen Bedingungen in 100 ml RPMI-1640 gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

IPTG (0,2 M): 5 g IPTG wurden in 104,7 ml 0,9% NaCl aufgelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

1x Trypsin: 5 ml 10xTrypsin wurden mit 45 ml PBS verdünnt und anschließend bei 4 °C gelagert.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % Nonidet P-40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 1 % SDS, 0,5 % Benzonase-Endonuklease (Merck Millipore) sowie Protease- und Phosphataseinhibitor-Cocktails

3.1.4. Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinie	Standardmedium	Quelle	Kulturbedingungen
-----------	----------------	--------	-------------------

Panc02	RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep	RRID:CVCL_D627	37°C 5% CO ₂
Panc02 #3006	RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep	Im Rahmen dieser Arbeit generiert	37°C 5% CO ₂
Panc02 #3032	RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep	Im Rahmen dieser Arbeit generiert	37°C 5% CO ₂
MC38	RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep	RRID:CVCL_B288	37°C 5% CO ₂
MC38 #3006	RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep	Im Rahmen dieser Arbeit generiert	37°C 5% CO ₂
HEK 293T	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	RRID:CVCL_0063	37°C 10% CO ₂

Bakterienstamm	Quelle	Name in der Arbeit
E.coli BL-21-Gold	Agilent	Vehicle-Bakterien
E.coli BL-21-Gold #1404	Laborintern	GLuc-Bakterien
E.coli BL-21-Gold #2170	Laborintern	1xTNF-Bakterien
E.coli BL-21-Gold #3025	Laborintern	2x TNF-Bakterien
E.coli BL-21-Gold #3060	Im Rahmen dieser Arbeit generiert	P1516-Bakterien
E.coli DH5α Dcm negativ Dam negativ	Thermo Fisher	-

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC): Die Blutbank der Uniklinik Köln stellte Leukozyten-Konzentrate („Buffy-Coats“) bereit.

3.1.5. Plasmide und Restriktionsenzyme

Plasmid	Bestandteil	Quelle
#1404	FimH-Display mit dem POI Gaussia Luciferase	Chmielewski et al (2019)
#1559	FimH-Display mit dem POI hEGF	Chmielewski et al (2019)
#2070	FimH-Display mit dem POI P16	laborintern
#2129	FimH-Display mit dem POI hIL10	Chmielewski et al (2019)
#3006	Kontinuierliche dTomato Expression, GFP-Expression bei Aktivierung der Caspase3	laborintern
#3025	FimH-Display mit dem POI P16glyP16	laborintern
#3032	Kontinuierliche dTomato + Clickbeagle Luciferase Expression	laborintern

#3058	pUCIDT-Vektor mit P1516	Integrated Technologies	DNA
#3060	FimH-Display mit dem POI P1516	Im Rahmen dieser Arbeit generiert	
#3076	gag und pol des Murines Leukämievirus	Laborintern	
#3077	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitisvirus	Laborintern	
Enzyme	Erkennungs Sequenz	Puffer	Quelle
Nco I	5' C↓ C A T G G 3' 3' G G T A C↑ C 5'	10x Puffer Tango	Thermo Scientific
SexAI	5' A↓ C C W G G T 3' 3' T G G W C C↑ A 5'	Cut smart (Biolegend)	New England Biolabs

3.1.6. Kits

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
Ncol (10 U/µL)	Thermo Fisher	ER0572
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher	10723941
NucleoSpin Tissue, Mini kit	Macherey Nagel	740952.50
NucleoBond Xtra Midi kit	Macherey Nagel	740410.100
Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH)	Sigma	4744926001
NucleoSpin Tissue, Mini kit	Macherey Nagel	740952.50
NucleoBond Xtra Midi kit	Macherey Nagel	740410.100
ImmPACT® DAB Substrate Kit	Vectorlabs	SK-4105
Tissue-Tek Compound	Sakura	4583
BLOXALL® Endogenous Blocking Solution	Biozol	VEC-SP-6000
Protein Block, Serum-Free	Agilent	X090930-2
Antibody Diluent	Agilent	S202230-2
VectaMount® Express Mounting Medium	Vectorlabs	VECH-5700-60

3.1.7. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
500mL Centrifuge Tube	Corning	431123
30 kDa Filter	Merck Millipore	UFC903024
µMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	130-042-602
µ Columns	Miltenyi Biotec	130-042-701

Kryoeinbettformen	Sakura	4557
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher	5100-0001
CRYO.S 2ml	Greiner Bio-One	122263-TRI
Lumox® multiwell Zellkulturplatte	Sarstedt	94.6120.096
Maxisorp 96 Well	Thermo Fisher	1018551
Falcon™ Zellsiebe 70µm	Thermo Fisher	10788201
Leucosep Röhrchen	Greiner Bio-One	227290

3.1.8. Mauslinien

Mauslinie	Quelle
C57BL/6N WT	
C57BL/6N Myd88 ^{-/-} und Trif ^{-/-} ⁴⁹	AG Pasparakis, Institut für Genetik, Universität zu Köln

3.1.9. Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Hidex Sense Microplate Reader	Hidex Oy
CellDrop™ FL Fluorescence Cell Counter	DeNovix
Photometer Multiscan GO	Thermo Fisher Scientific
Nanodrop1000	Thermo Fisher Scientific
FACS Canto II	Becton Dickinson
Olympus BX53M	Olympus
Software	Hersteller
BioRender	BioRender
Excel	Microsoft
FlowJo V10 Software	FlowJo
GraphPad Prism 8	GraphPad
Vector NTI	Thermo Fisher scientific
R Studio	Posit PBC
OlyVIA 2.4	Olympus Soft Image Solutions
OLYMPUS cellSense Dimensions 2.2	Olympus Soft Image Solutions

3.2 Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

Design und Klonierung von Expressionsvektoren

Die gewünschte DNA-Sequenz wurde mithilfe von Vector NTI entworfen und bei Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa) als pUCIDT-Vektor bestellt. Dieser Vektor enthält neben der gewünschten Sequenz eine Ampicillin-Resistenz.

Transformation chemokompetenter *E. coli* DH5 Bakterien

Chemokompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Sie wurden mit 100 ng DNA des Vektors oder des Ligationsansatzes für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 60 Sekunden, gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation auf Eis. Die Bakterien wurden in 600 µl LB-Medium resuspendiert und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf LB-Platten mit Ampicillin (200 µg/ml) ausgestrichen wurden. Die Platten wurden invertiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Wachstum der Bakterien auf den Platten überprüft und 10 bis 20 Klone gepickt. Dazu wurde ein einzeln wachsender Klon identifiziert, mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte entnommen und anschließend in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionszusatz überführt.

Extraktion von Plasmid-DNA

Eine Kultur von Bakterien mit dem gewünschten Plasmid wurde bis zu einer OD600 von 2,0 bei 37 °C und 200 RPM in LB-Medium mit Selektionszusatz kultiviert. Anschließend erfolgten die Zelllyse und die Isolation der DNA mithilfe des NucleoSpin Tissue Mini Kits oder des NucleoBond Xtra Midi Kits (beide Macherey-Nagel) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die eluierte DNA wurde in ddH₂O resuspendiert und mithilfe eines Spektralphotometers bei 260 nm/280 nm quantifiziert. Die gelöste DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Enzymatischer Verdau

Die Restriktionsenzyme wurden basierend auf den Schnittstellen des entsprechenden Vektors ausgewählt. Ein Reaktionsansatz bestehend aus DNA, Restriktionsenzymen und Puffer wurde vorbereitet. Der verwendete Puffer und die Menge der Enzyme wurden entsprechend den Herstellerangaben oder basierend auf laborspezifischen Erfahrungen ausgewählt, um eine effektive Enzymaktivität von jeweils 1 U pro 1 µg DNA zu gewährleisten.

Dem Reaktionsansatz wurde ddH₂O hinzugefügt, bis die Endkonzentration des verwendeten Puffers der 1-fachen Konzentration entsprachen. Der Reaktionsansatz wurde 60 Minuten bei

37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 20 Minuten gestoppt.

Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:6 in Loadingpuffer verdünnt. Ein Agarose-Gel in einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer wurde mit Längenmarkern und DNA-Proben beladen. Eine elektrische Spannung von 80 V bis 120 V wurde für 15 bis 45 Minuten angelegt. Sobald eine ausreichende Trennung der Fragmente zu beobachten war, wurde das Gel aus der Kammer entnommen und im Transilluminator analysiert. Benötigte DNA-Fragmente wurden anhand ihrer Größe identifiziert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mithilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) entsprechend dem Herstellerprotokoll extrahiert.

Ligation

Die Insert-DNA wurde im molaren Verhältnis von 3:1 mit dem Zielvektor ligiert. Die benötigte Masse der Insert-DNA wurde mithilfe der folgenden Formel berechnet:

$$m(\text{Insert}) = \frac{m(\text{Vektor}) \times n_{\text{Basenpaare}}(\text{Insert}) \times 3}{n_{\text{Basenpaare}}(\text{Vektor})}$$

Ein Ligationsansatz mit 100 ng Vektor-DNA, der entsprechenden Menge an Insert-DNA, 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl T4-Ligasepuffer wurde angesetzt und mit ddH₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert.

Transfektion von HEK 293T Zellen

4 × 10⁶ HEK 293T-Zellen wurden auf 10-cm-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht inkubiert.

Ein Reaktionsansatz mit 8 µg des Expressionsplasmids, 4 µg des MLV-Retrovirus-Verpackungsvektors (#3076) und 4 µg des VSV-Transfer-Plasmids (#3077) wurde angesetzt und mit RPMI-1640 auf ein Gesamtvolumen von 250 µl aufgefüllt. Ein zweiter Ansatz mit 16 µg PEIpro und 234 µl RPMI-1640 wurde vorbereitet. Beide Ansätze wurden jeweils für 15 Sekunden vortexiert, anschließend zusammengeführt, erneut vortexiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Die Mischung wurde anschließend vorsichtig auf eine Platte mit HEK 293T-Zellen pipettiert und durch sanftes Schwenken mit dem Medium vermischt. Die Platte wurde für insgesamt 48 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand der Platte abpipettiert, in einem Röhrchen gelagert und neues Medium hinzugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde erneut der Überstand abgenommen, und die Platte wurde anschließend entsorgt.

Transduktion von adhärent wachsenden Tumorzelllinien

Eine 6-Well-Platte wurde mit 1 ml PDL pro Well gefüllt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Das PDL wurde abpipettiert, und 2×10^4 Tumorzellen wurden pro Well in 1 ml Medium ausgesät. Nach einer Inkubation über Nacht wurde 1 ml des entsprechenden Virusüberstandes je Well hinzugegeben, und die Platte wurde für 90 Minuten bei 1200 g und 32 °C zentrifugiert.

Nach 72 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden in Zellkulturflaschen überführt. Die Transduktion wurde mithilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert, wobei Mock-Zellen als Referenz dienten. Bei Konstrukten, die für ein Fluorochrom codierten, wurde die Expression alternativ auch mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

3.2.2. Bakterienkulturen

Anlegen einer Bakterienkultur

Bakterienkulturen wurden in der Regel aus Glycerol-Stocks des entsprechenden Stammes angelegt. Dazu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine etwa stecknadelkopfgroße Menge des gefrorenen Glycerol-Stocks entnommen und in LB-Medium inkuliert.

Die verwendeten *E. coli*-Bakterien weisen eine Verdopplungszeit von etwa 20 Minuten auf, was bedeutet, dass selbst geringe Unterschiede in der Ausgangs-Bakterienmenge nach einigen Stunden der Kultivierung erhebliche Unterschiede in der Zellkonzentration verursachen können. Um konsistente Bedingungen für Experimente mit lebenden Bakterien zu gewährleisten, wurde am Vortag eine Vorkultur vorbereitet. Am Tag des Experiments wurde diese in frisches LB-Medium überführt. Das Volumen der überführten Vorkultur wurde an die OD600 angepasst, um die gewünschte Ausgangszahl sicherzustellen.

Vorbereitung von Bakterien für Assays mit lebendigen Bakterien

Es wurden Vorkulturen angelegt. Sterile Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 250 ml und 100 ml wurden mit 100 ml bzw. 50 ml LB-Medium gefüllt. Gegebenenfalls wurden der entsprechende Selektionszusatz und/oder IPTG hinzugefügt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine etwa stecknadelkopfgroße Menge aus dem entsprechenden Glycerol-Stock entnommen und in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben inkuliert. Der Kolben wurde über Nacht bei 37 °C und 200 RPM inkubiert. Am Morgen wurde die OD600 gemessen, und anhand der Formel:

$$\text{zu überführendes Volumen [ml]} = \text{OD}_{600} \times 0,5 \text{ ml}$$

wurde das Volumen für einen 50-ml-Kolben berechnet. Dieser wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C und 200 RPM weiter inkubiert.

Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 4000 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in PBS resuspendiert. Die OD600 wurde erneut gemessen, und die Bakterienzahl wurde mit der folgenden Formel geschätzt:

$$\text{Zellzahl [pro ml]} = OD_{600} \times 8 \times 10^8$$

Die Bakterienkultur wurde anschließend auf Eis gelagert.

3.2.3. Aufkonzentration und Reinigung von Bakterienkulturüberständen

Generierung von Bakterien-Überstand Konzentraten

Zur Generierung von Bakterien-Überstand wurden 2-Liter-Erlenmeyerkolben mit LB-Medium, 5 ml/l IPTG und dem entsprechenden Selektionszusatz befüllt. Diese wurden aus Vorkulturen beimpft und bei 37 °C und 200 RPM inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 2,0 erreicht wurde.

Die Bakterienkultur wurde in 500-ml-Zentrifugengefäßen für 30 Minuten bei 4000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert und in einen 50-ml-Falcon überführt. Die Falcons wurden über 64 Stunden bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert.

Anschließend wurden die Falcons für 30 Minuten bei 4000 RPM und 4 °C erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in 30-kDa-Filterröhren überführt, die unmittelbar vorher mit PBS gespült wurden, und bei Raumtemperatur (RT) mit 4000 × g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, das Retentat aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Reinigung des Konzentrats zur Generierung eines ELISA-Standards

Das Konzentrat wurde mithilfe des μMACS™ c-myc Isolation Kits gereinigt. Hierzu wurde das Konzentrat gemäß dem Protokoll zuerst gelabelt und anschließend durch μ Columns im μMACS™ Separator geleitet. Nach zwei Waschschritten wurde die Antikörperbindung mit dem Elution Buffer aufgehoben.

Das Eluat wurde mithilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop) bei 37 kDa und einem ε-Wert von 7,58 quantifiziert, wobei 1 µl frischer Elution Buffer als Nullwert verwendet wurde.

3.2.4. Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden unter Sicherheitsbänken in Laboren der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen in Inkubatoren unter den in 3.1.4 beschriebenen Kulturbedingungen gehalten.

Splitten adhärent wachsender Zellkulturen

Zellkulturen in Monolayer wurden bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % gesplittet. Dazu wurde zuerst das Medium abpipettiert und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde, je nach Größe der Zellkulturflasche, 0,5 ml – 3 ml 1× Trypsin hinzugefügt und gleichmäßig verteilt. Falls Oberflächenmerkmale der Zellen in nachfolgenden

Experimenten untersucht werden sollten, wurde Accutase als Zelldissoziationsreagenz genutzt. Die Flasche wurde für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Zelldissoziationsreagenz wurde nach dem Lösen der Zellen durch Zugabe von Medium neutralisiert.

Die Zellsuspension wurde in einen Falcon-Tube überführt und bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt, und ein Teil der Zellen wurde in die Zellkulturflasche zurückgegeben. Je nach Größe der Flasche wurde die Kultur auf ein Volumen von 10 bis 40 ml frischem Medium aufgefüllt. Die Zellkulturflaschen wurden spätestens nach zwei Wochen ausgetauscht.

Präparation von humanen PBMCs aus Vollblut

Humane PBMCs wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus peripher venösem Blut isoliert. Dazu wurden Freiwilligen etwa 80 ml Vollblut aus einer peripheren Vene entnommen. Leucosep-Röhrchen wurden mit 15 ml LymphoPrep vorgefüllt und für 30 Sekunden bei 1300 RPM zentrifugiert. In einem separaten Falcon-Tube wurden 15 ml Vollblut mit 15 ml PBS vermischt. Das Gemisch wurde anschließend vorsichtig in die Leucosep-Röhrchen pipettiert und bei 20 °C und 800 RPM für 20 Minuten zentrifugiert. Um die Schichtung intakt zu halten, wurden die Bremsen der Zentrifuge deaktiviert.

Die Lymphozytenschicht wurde vorsichtig abpipettiert und in ein frisches Röhrchen überführt, das mit PBS aufgefüllt wurde, und bei Raumtemperatur (RT) und 1300 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis der Überstand klar war. Anschließend wurde das Pellet in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in Zellkulturflaschen überführt.

Lagerung von Zellen bei -150°C

Für die mittel- und langfristige Lagerung wurden die Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert, und das Pellet wurde je nach Zellzahl in 2 bis 5 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Cryotubes (CRYO.S) wurden mit 100 µl DMSO befüllt. Anschließend wurden 900 µl der Zellsuspension hinzugegeben, das Cryotube mehrfach invertiert und in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter gestellt. Dieser wurde über Nacht bei -80 °C gelagert.

Die Cryotubes wurden am nächsten Tag in einen -150 °C Kühlschrank überführt, und die Position wurde dokumentiert.

3.2.5. Arbeit mit primären Murinen Zellen und Geweben

Für alle Mausversuche lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Köln vor. Für alle Versuche wurden, sofern nicht anders angegeben, C57BL/6-Mäuse CEAtg+/- tg verwendet. Während der Versuche wurden die Mäuse abhängig von der Belastung bis zu zweimal täglich kontrolliert. Die Kontrolle der Tumorgröße erfolgte zusätzlich wöchentlich durch eine Lumineszenzmessung im IVIS unter Narkose mit 2,5 % Isofluran.

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und anschließend mit 70 % Isopropanol desinfiziert.

Implantation orthotoper Panc02-Tumore

Die Operationen wurden unter bedarfsgerechter Narkose mit Ketamin und Xylazin durchgeführt. Nach Desinfektion mit Cutasept wurde die Bauchhaut eröffnet, die Milz angehoben und 5×10^4 Panc02-Zellen in 30 µl PBS in das Pankreas injiziert. Nach Rückverlagerung von Milz und Pankreas wurden das Bauchfell und die Bauchhaut vernäht. Postoperativ wurde eine Analgesie mit Metamizol verabreicht.

Milz-Präparation

Die Bauchdecke wurde mit einem sterilen Skalpell geöffnet. Die Milz wurde im linken Oberbauch lokalisiert, mit einer Pinzette entnommen und in steriles PBS resuspendiert.

Unter einer Sicherheitswerkbank wurde die Milz mit dem Stempel einer 2-ml-Spritze durch einen 100-µm-Filter gedrückt. Der Filter wurde anschließend mehrmals mit PBS gespült. Das Filtrat wurde durch einen 70-µm-Filter in einen Falcon-Tube überführt und für 15 Minuten bei 1500 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurde das Pellet in RPMI [XX] resuspendiert, gezählt und in Kultur genommen.

Bauchfell-Spülung

Die Bauchdecke wurde mit einem sterilen Skalpell vorsichtig eröffnet, wobei das Peritoneum parietale erhalten blieb. Anschließend wurde die Haut des linken Hinterlaufs ebenfalls inzidiert. Durch den linken Leistenkanal wurde eine Kanüle intraperitoneal eingeführt, und 5 ml kaltes RPMI-Medium wurden injiziert.

Das Peritoneum wurde für 3 Minuten mithilfe einer anatomischen Pinzette geschüttelt. Anschließend wurde das Medium aus dem Peritoneum aspiriert und in ein Röhrchen überführt. Die Zellzahl wurde bestimmt, und die Zellen wurden in Kultur genommen.

Präparation von Organen nach in Vivo Versuchen

Die Bauchdecke wurde mit einem sterilen Skalpell von der Leiste bis zum Sternum eröffnet. Die Leber, das Pankreas, die Milz sowie makroskopisch sichtbare Tumoren wurden mit einer sterilen Pinzette entnommen und in PBS gespült.

Falls erforderlich, wurde eine Hälfte der Milz für die Präparation von PBMCs verwendet. Falls nötig, wurde auch ein Stück des Tumors abgewogen und für die Durchflusszytometrie vorbereitet.

Bettung der Organe für Kryostat-Schnitte

Ein Metallklotz wurde in einer mit Trockeneis gefüllten Styroporbox vorgekühlt. Die Organe wurden in Kryoeinbettformen auf den Metallklotz gelegt und schrittweise mit Eindeckmedium (Tissue-Tek) bedeckt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen im Medium entstehen.

Nachdem die Organe vollständig bedeckt und das Eindeckmedium vollständig gefroren waren, wurden sie bei -80 °C gelagert.

Herstellen einer Einzelzelluspension aus explantiertem Tumorgewebe

Nach der Explantation der Tumoren wurden 10 mg schwere Stücke aus dem Randbereich des Tumors entnommen. Diese Stücke wurden in kleinere Fragmente von weniger als 1 mm zerteilt und in 50-mL-Röhrchen überführt. Anschließend wurden 10 ml Collagenase Typ IV (1 mg/ml) in DMEM/F12 (STEMCELL), ergänzt mit 2 % FBS, zu den Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden für 1,5 Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Das Gewebehomogenat wurde durch ein 70-µm-Zellsieb in neue 50-mL-Röhrchen filtriert, und die Siebe wurden mehrmals mit serumfreiem RPMI gespült. Dem Gewebehomogenat wurde DNase zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml zugesetzt und bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden nach Zentrifugation des Gewebehomogenats bei 400 × g für 5 Minuten gesammelt und in PBS resuspendiert.

3.2.6. Zytotoxizität

Tumorzelllinie-Bakterien Co-Kultur

In 48-Well-Platten wurden zur Hälfte Panc02-Zellen mit 150.000 Zellen pro Well in je 200 µl Medium ausgesät. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Bakterien wurden wie oben beschrieben vorbereitet.

Kurz vor der Zugabe der Bakterien wurde das Medium durch RPMI mit FCS ohne Antibiotika ersetzt. Anschließend wurden die Bakterien gemäß einem vorher festgelegten Schema (Abbildung 2) zu den Zellen gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Wachstum

der Bakterien wurde nach 4 Stunden durch Zugabe von Kanamycin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml gestoppt. Nach weiteren 20 Stunden Inkubation wurde der Prozess beendet und ein XTT-Zellviabilitätsassay durchgeführt.

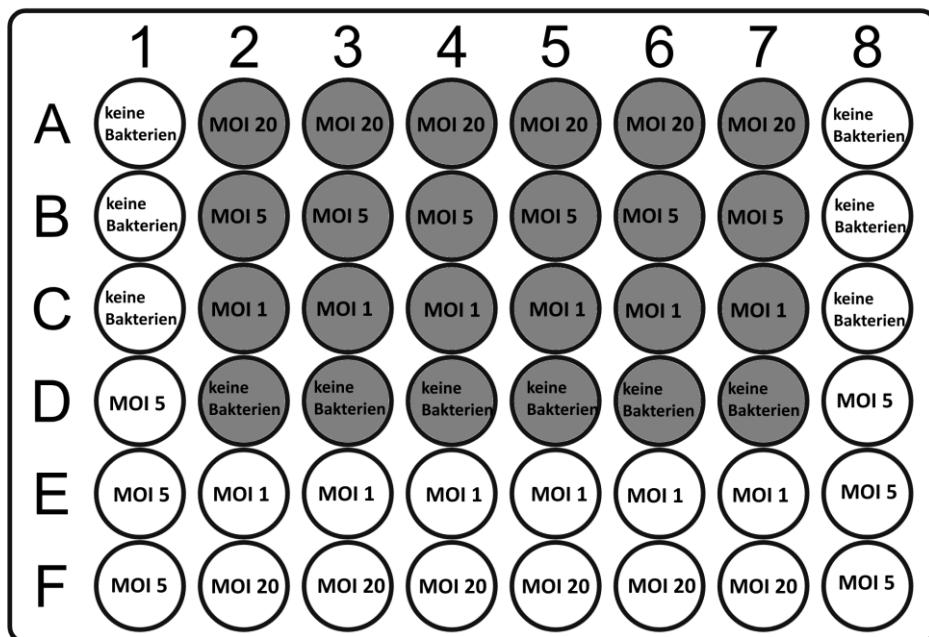


Abbildung 2: Layout für die Tumorzelllinie-Bakterien Co-Kultur. In den grau hinterlegten Wells wurden Tumorzellen vorgelegt, in den weiß hinterlegten Wells wurden keine Tumorzellen gegeben

XTT basierte Assays

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (XTT) ist ein Tetrazoliumsalz, das von stoffwechselaktiven Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan-Farbstoff reduziert wird. Diese Reaktion kann durch Zugabe von Phenazinmethosulfat (PMS) verstärkt werden. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist direkt proportional zur Anzahl stoffwechselaktiver Zellen in einem Well. Der entstehende Formazan-Farbstoff kann mithilfe eines Spektrometers durch Subtraktion der OD bei 650 nm von der OD bei 450 nm quantifiziert werden. Mithilfe von XTT und PMS kann so die Viabilität von Zellen oder die Zytotoxizität von Behandlungen im Rahmen eines Platten-Assays gemessen werden.

Die Formel zur Berechnung der Zytotoxizität lautet:

$$\text{Zytotoxizität (in \%)} = \left(1 - \frac{\text{OD}_{450-650}(\text{Bakterien und Tumorzellen}) - \text{OD}_{450-650}(\text{Bakterien})}{\text{OD}_{450-650}(\text{Tumorzellen})} \right) * 100$$

Für Tests auf 48-Well-Platten wurden 7,5 ml XTT-Stammlösung (1 mg/ml) mit 150 µl PMS (0,4 mg/ml) versetzt. Anschließend wurden 150 µl der XTT+PMS-Mischung zu jedem Well pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 450 µl pro Well erreicht wurde.

Für Tests auf 96-Well-Platten wurden 5 ml XTT-Stammlösung mit 100 µl PMS versetzt, und 50 µl der Mischung wurden in jedes Well pipettiert. Das Gesamtvolumen betrug 150 µl pro Well. Die Platte wurde lichtgeschützt bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Messung erfolgte entweder mithilfe eines ELISA-Readers oder eines Hidex-Readers. Bei der Messung mit dem ELISA-Reader wurde die Inkubation alle 30 Minuten unterbrochen, und eine Messung wurde durchgeführt. Bei der Messung mit dem Hidex-Reader wurde die OD alle 5 Minuten automatisiert gemessen. Nach Erreichen einer OD_{450–650} von 3,0 wurde die Inkubation in beiden Fällen beendet.

Fluoreszenz basierte Zellproliferations Assay

Tumorzellen mit Fluorochrom wurden mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Well auf eine Lumox® 96-Well-Platte (Sarstedt) ausgesät. Nach vier Stunden wurden konzentrierte Überstände von Bakterienkulturen hinzugefügt, und die Platte wurde im Hidex Microplate-Reader bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert.

Der Hidex Plate-Reader führte jede Stunde eine Well-Scan-Messung der Fluoreszenz durch. Nach 24 bis 72 Stunden wurde die Inkubation beendet. Falls erforderlich, wurde anschließend ein XTT-Assay durchgeführt und/oder Überstände für weitere Analysen entnommen.

Bakterien-Ko-Kultur mit Makrophagen und Tumorzellen

Bakterien-Vorkulturen wurden vorbereitet. Murine Makrophagen wurden mittels Bauchfell-Spülung gewonnen und in RPMI mit FCS und IPTG resuspendiert.

Auf eine 96-Well-Platte wurden Panc02- oder MC38-Zellen mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Well ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Auf eine zweite 96-Well-Platte wurden entweder keine, 2×10^4 oder 4×10^4 Makrophagen pro Well pipettiert. Anschließend wurden die Bakterien mit einer MOI von 1 hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Platte wurde anschließend bei $2600 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, und das Pellet wurde in 50 µl RPMI mit FCS und Kanamycin resuspendiert und mit einer Mehrkanalpipette auf die Platte mit den Tumorzelllinien überführt. Die Platte wurde für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde ein LDH-Release-Assay (Sigma) durchgeführt.

3.2.7. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Die ELISAs wurden mit den in Abschnitt 3.1.1 aufgeführten Antikörpern durchgeführt. Die Antikörper ohne Konjugat fungierten als Capture-Antikörper, während die mit Biotin oder HRP konjugierten als Detektionsantikörper dienten.

Coating

Der Capture-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in Coating-Puffer gelöst und mit 50 µl pro Well auf eine 96-Well-Platte (Maxisorp, Fa. Nunc) aufgetragen. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Blocking:

Jede Platte wurde mit 200 µl Blocking-Lösung pro Well befüllt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Platten wurden ausgeschlagen und, falls erforderlich, für bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert. Anschließend oder nach dem Auftauen wurden die Platten dreimal mit 200 µl PBS-T pro Well gewaschen.

Proben und Standard:

Die Proben wurden gegebenenfalls mit PBS verdünnt und in 50-µl-Volumina aufgetragen. Die Standardreihe wurde mittels Serienverdünnung in je 50 µl PBS erstellt. Dazu wurden in alle Wells außer das erste 50 µl PBS vorgelegt. Das erste Well wurde mit 100 µl des Standards in der gewünschten Startkonzentration befüllt. Anschließend wurden 50 µl aus dem ersten Well entnommen und durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren im zweiten Well um 50 % verdünnt. Dieser Vorgang wurde bis zum vorletzten Well wiederholt. Die Proben und der Standard wurden für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS-T (200 µl pro Well) gewaschen.

Detektion:

Der Capture-Antikörper wurde in PBS auf eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt und mit 50 µl pro Well aufgetragen. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut gewaschen. Bei Capture-Antikörpern mit Biotin-Konjugat wurde anschließend 50 µl Streptavidin-POD pro Well aufgetragen, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut gewaschen.

Entwicklung:

Für die Entwicklung wurden 100 µl TMB pro Well hinzugefügt und für 5 bis 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Die OD wurde bei 450–570 nm gemessen.

3.2.8. Durchflusszytometrie (FACS)

Alle Messungen wurden am FACS Canto II (BD) durchgeführt und mithilfe von FlowJo ausgewertet.

Vorbereitung der Proben

Etwa 3×10^6 Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, zweimal mit 2 ml PBS gewaschen, und der Überstand wurde verworfen, sodass die Zellen in etwa 100 µl PBS resuspendiert waren.

Wenn primäre und sekundäre Antikörper verwendet wurden, wurden zuerst die primären Antikörper zu den Zellen gegeben, diese vortexiert und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend oder bei direkter Färbung wurden die Zellen erneut zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Die mit Fluorochrom konjugierten Antikörper wurden hinzugefügt, erneut vortexiert, inkubiert und gewaschen. Die Proben wurden bis zur Messung auf Eis gelagert.

Messung der Proben

Die Proben wurden vor der Messung vortexiert. Ein Gate für lebende Zellen wurde gesetzt. Bei Erreichen von 10.000 erfassten Zellen in diesem Gate oder nach einer Minute wurde die Messung beendet.

Wenn mehr als ein Fluorochrom gleichzeitig gemessen wurde, wurden Kompensations-Beads (Miltenyi) zur Kompensation verwendet. Die Daten wurden anschließend mit FlowJo 8 ausgewertet.

3.2.9. Immunhistochemie

Färbung von Gewebeschnitten

Tiefgefrorene Gewebeschnitte wurden in -20 °C kaltes Aceton überführt und für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden sie an der Luft bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Danach wurden sie dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei RT in BLOXALL® (Biozol) inkubiert und erneut in PBS gewaschen. Danach wurden sie für 10 Minuten bei RT in „Protein Block“ (Agilent) inkubiert und an der Luft bei RT getrocknet.

Anti-c-Myc-HRP-Antikörper wurden 1:100 mit „Antibody Diluent“ (Agilent) verdünnt. Die Schnitte wurden für 2 Stunden mit dem Antikörper inkubiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen. 1 ml DAB-Diluent wurde ein Tropfen DAB-Chromogen (beides Vectorlabs) beigefügt und auf die Schnitte geträufelt. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Nach 2 bis 10 Minuten wurden die Schnitte für 5 Minuten in Wasser gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte für 10 Sekunden in Hämalaun gefärbt und in Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden mit 70 %, 90 % und schließlich 100 % Alkohol dehydriert. Anschließend wurden sie in VectaMount® (Vectorlabs) eingedeckt und im Ofen für 15 Minuten bei 65 °C getrocknet.

Aufnahme von Schnittbildern

Gefärbte und fixierte Schnitte wurden mit dem Olympus BX53M und der Software cellSense gescannt. Die Übersichtsaufnahmen wurden mit einem 10×-Objektiv aufgenommen.

3.2.10. Immunblot

Lysierung von Makrophagen

Makrophagen wurden in RIPA-Puffer lysiert und anschließend einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen.

Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer erhitzt, der 0,2 % (w/v, Endkonzentration) SDS und 10 % β-Mercaptoethanol enthielt, und einer Standard-SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen.

Standard-SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers (Bio-Rad Laboratories, Inc.) durchgeführt, unter Verwendung einer Criterion-Gelkassette mit einem 12 % Tris/HCl-Gel, montiert in einer Criterion-Zelle, die mit 1X TGS-Laufpuffer gefüllt war.

Die Lysate wurden zur Denaturierung der Proteine für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt, anschließend 1 Minute auf Eis inkubiert und kurz zentrifugiert (10.000 x g, 1 Min., RT), bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

Die SDS-PAGE wurde bei konstanter Spannung von 70 V durchgeführt. Die Gele wurden nach dem Lauf in 1X Roti®-Blot K Kathodenpuffer inkubiert, bis der Proteintransfer erfolgte.

Western Blot

Der Proteintransfer vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mithilfe des Trans-Blot® Turbo™ Transfer-Systems. Das Blotten wurde mit dem StandardSD-Protokoll durchgeführt (konstant 25 V, 1 A, 30 Minuten) gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Antikörperfärbung

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen 1 Stunde lang in Blockierungspuffer (TBS-T + 5 % Milchpulver) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Blockierungspuffer wurde entfernt, und die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit dem in Blockierungspuffer verdünnten Primärantikörper inkubiert.

Am nächsten Tag wurden ungebundene Primärantikörper durch dreifaches Waschen in TBS-T (jeweils 5 Minuten) entfernt. Danach wurden die Membranen 1 Stunde lang mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert.

Ungebundene Sekundärantikörper wurden durch zweimaliges Waschen in TBS-T entfernt. Anschließend wurden die Membranen einmal in TBS gewaschen, um verbleibendes Detergens zu entfernen, und bis zur Visualisierung in TBS bei 2–8 °C gelagert

3.2.11. Statistische Auswertung und grafische Darstellung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mithilfe von GraphPad Prism 8.0.2 (263) sowie R 4.2.1 mit RStudio und den Paketen dplyr, readxl und openxlsx durchgeführt. Die Signifikanz wurde mittels gepaartem oder ungepaartem Student's T-Test berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant eingestuft.

Die grafische Darstellung der Messwerte wurde mithilfe von GraphPad Prism 8.0.2 (263) erstellt. P-Werte kleiner 0,05 wurden mit *, kleiner 0,005 mit ** und kleiner 0,0005 mit *** markiert. Abbildungen wurden mit BioRender und Paint.net erstellt. Die Darstellung der Histologie wurde mit OlyVIA und Paint.net erstellt.

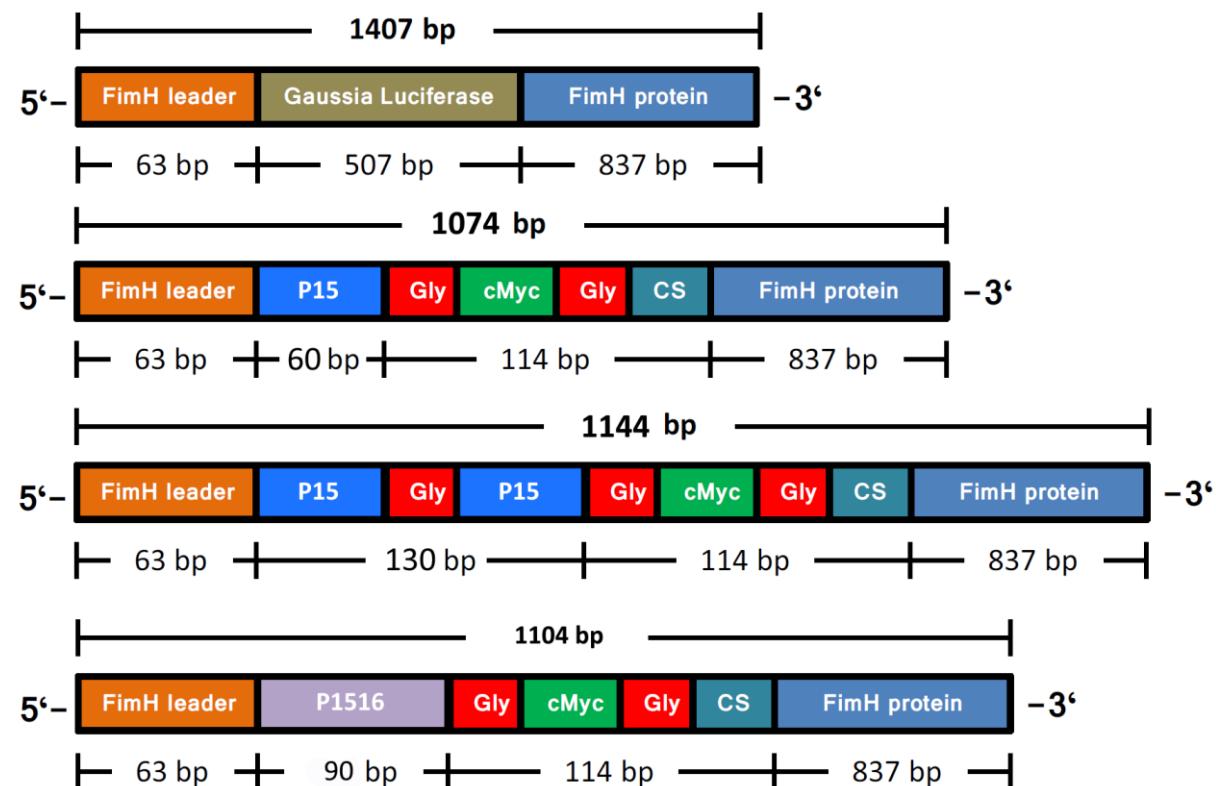
4. Ergebnisse

4.1 Generierung der Bakterien

Zunächst wurden die Expressionskassetten der Konstrukte entworfen und mittels molekularbiologischer Klonierung sowie Ligation in BL21-GOLD-Bakterien eingebracht. Anschließend wurde die Expression der Proteine nachgewiesen. Die GLuc-, 1xTNF- und 2xTNF-Bakterien wurden bereits vor Beginn meiner Arbeit von der Arbeitsgruppe generiert, während das Konstrukt P1516 im Rahmen meiner Arbeit hergestellt wurde.

4.1.1. Design der Konstrukte

A



B

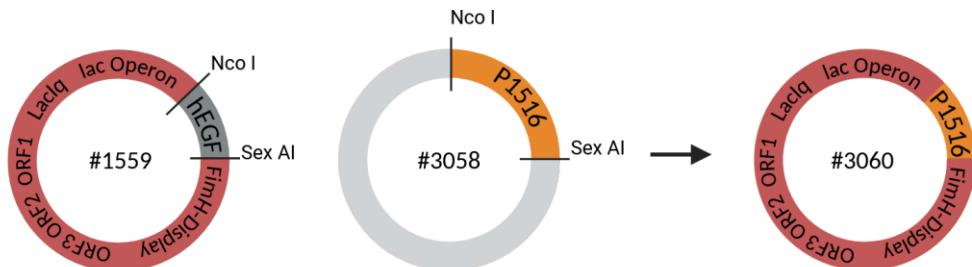


Abbildung 3 Design der in dieser Arbeit verwendeten FimH-Displays **A:** Schematischer Aufbau der Expressionskassetten von GLuc, 1xTNF, 2xTNF und P1516 (nach Chmielewski et al.⁴³) **B:** Ligation der Expressionskassette von P1516 in den Frame von #1559. Die in A gezeigte Expressionskassette wurde in einem pUCIDT-Vektor (#3058) bestellt. Als Zielvektor wurde das Plasmid von einem hEGF über den FimH-Display exprimierenden Bakterium genutzt, bei dem mittels Restriktionsverdau das hEGF-Gen entfernt wurde.

Basierend auf dem publizierten FimH-Display wurden Expressionskassetten für 1xTNF-, 2xTNF- und P1516-Bakterien designet (Abbildung 3 A). Der Aufbau ist, abgesehen vom POI, für alle Expressionskassetten gleich: FimH leader, POI, glycin-linker, c-Myc-Tag, glycin-linker und FimH-Protein. Das POI für die 1xTNF-Bakterien ist das Protein P15⁴⁸. Das POI für 2xTNF-Bakterien besteht aus zwei durch einen Glycin-Linker verbundenen P15-Proteinen. Das POI für P1516-Bakterien ist das Protein P1516⁴⁸. Die DNA der Vektoren für die 1xTNF-Bakterien (Laborintern #2170) und 2xTNF-Bakterien (Laborintern #3025) war zu Beginn meiner Arbeit bereits im Labor vorhanden.

Name	Aminosäuresequenz
P15/1xTNF	K G Q G C P S T H V L L T H T I S R I A
P1515/2xTNF	K G Q G C P S T H V L L T H T I S R I A K G Q G C P S T H V L L T H T I S R I A
P1516	K G Q G C P S T H V L L T H T I S R I A V S Y Q T K V N L L

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der Verschiedenen Konstrukte (nach Lu et al.)

4.1.2. Generierung der P1516-Bakterien

Für P1516 wurde der pUCIDT-Vektor (Laborintern #3058) erstellt. Der Vektor #3058 enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Nco I und Sex AI, wobei Nco I direkt vor dem FimH-Leader schneidet und Sex AI innerhalb des FimH-Proteins.

Das Plasmid des publizierten Vektors, der für ein FimH-Display mit humanem epidermale Wachstumsfaktor (hEGF) als POI codiert⁴³ (Laborintern #1559), wurde als Backbone genutzt, da es die gleichen Schnittstellen enthält, wodurch ein Austausch des POI ermöglicht wird (Abbildung 3B).

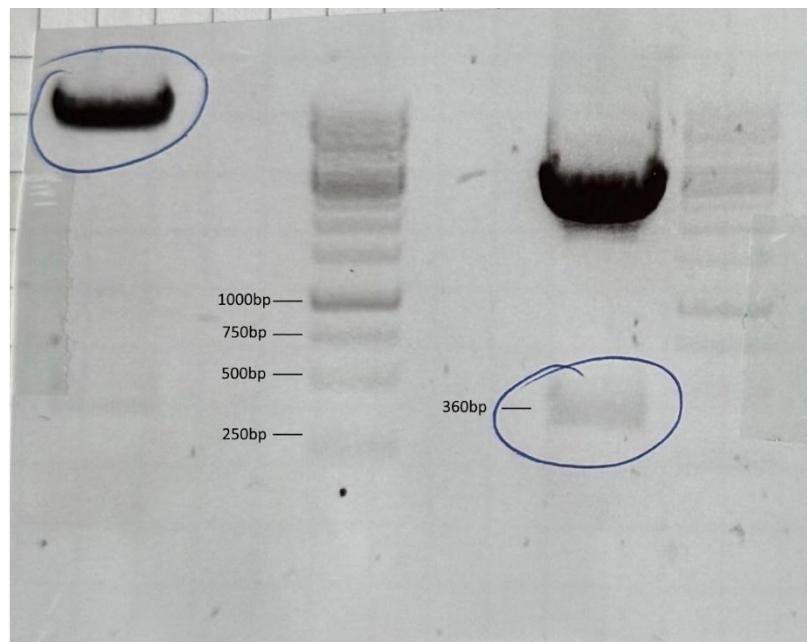


Abbildung 4 Gelelektrophorese des Restriktionsverdau von #1559 (links) und #3058 (rechts) mit Nco I und Sex AI. Die umkreisten Banden stellen den Zielvektor (links, 6382 bp) und das Insert (rechts, 360bp) für die Ligation von #3060 dar.

Zur Generierung der P1516-Bakterien wurden zunächst chemokompetente Bakterien mit #3058 transformiert. Die Plasmid-DNA wurde mithilfe eines Mini-Preps isoliert und mit den Restriktionsenzymen Nco I und Sex AI verdaut. Auch die Plasmid-DNA von #1559 wurde mit Nco I und Sex AI verdaut (Abbildung 4).

Anschließend wurde eine Ligation durchgeführt, bei der das 6328 Basenpaare (bp) große Fragment von #1559 als Zielvektor und das 360 bp große Fragment von #3058 als Insert verwendet wurden. Schließlich wurden BL21-Gold-Bakterien mit dem resultierenden Vektor (Laborintern #3060) transformiert. Diese Bakterien werden fortan als P1516-Bakterien bezeichnet.

4.1.3. Nachweis des Konstruktes

Zur Überprüfung der Expression der Kassetten wurde zunächst ein Nachweis der Konstrukte im Überstand der entsprechenden Bakterienkulturen durchgeführt. Bakterienkulturen der 2xTNF-, 1xTNF-, P1516-, GLuc- und Vehicle-Bakterien wurden angelegt, und aufkonzentrierte Überstände wurden gewonnen. Ein FimH-cMyc-ELISA wurde durchgeführt. Der aufgereinigte und spektrometrisch quantifizierte Überstand der 1xTNF-Bakterien wurde als Standard verwendet.

Im Vergleich zum Blank zeigten sich signifikant höhere OD-Werte für die Überstände der 2xTNF-, 1xTNF- und P1516-Bakterien, nicht jedoch für die Überstände der GLuc- oder Vehicle-Bakterien (Abbildung 5A). Damit konnten cMyc und so das jeweilige FimH-POI-cMyc-Protein für 2xTNF, 1xTNF und P1516 nachgewiesen werden.

Anhand des Standards wurde die Konzentration der Proteine in den Überständen von 2xTNF, 1xTNF und P1516 berechnet (Abbildung 5B+C).

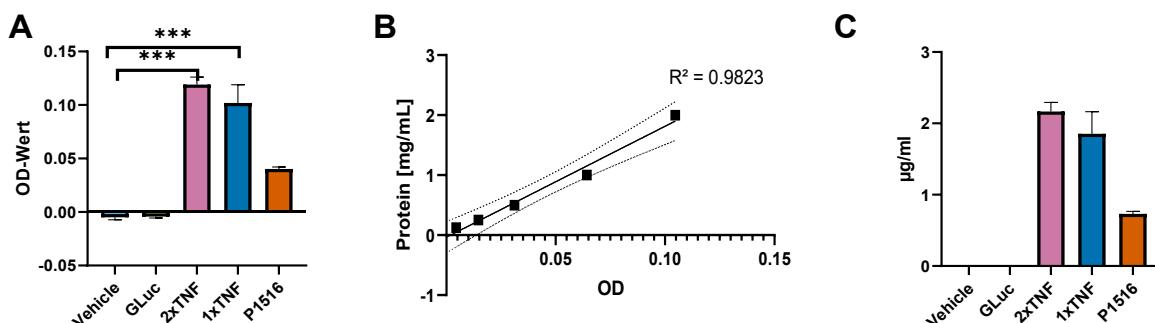


Abbildung 5 Nachweis von cMyc in Bakterienkulturüberständen. **A:** Blank-bereinigte OD-Werte eines cMyc basierten ELISAS von verschiedenen Bakterienkulturüberständen. In Überständen von 2xTNF-, 1xTNF- und P1516-Bakterienkulturen konnte cMyc nachgewiesen werden, in solchen von Vehicle- oder GLuc-Bakterienkulturen konnte kein cMyc nachgewiesen werden. **B:** Standardkurve des aus 1xTNF-Bakterienkulturüberstand gewonnenen Standards. Auf Basis der für den Standard gemessenen Konzentration von 2,02 mg/ml konnte die Formel $Y = 18,50 \cdot X - 0,03543$ errechnet werden mit einem R^2 von 0,9823. **C:** Auf Basis der Formel errechnete Konzentrationen des POI-FimH-c-Myc-Proteins in den verschiedenen Bakterienkulturüberständen.

4.2 In Vitro Testung

Die *in vitro* Testung erfolgte mit lebendigen Bakterien sowie mit konzentrierten Überständen von Bakterienkulturen. Es wurden die spezifische Aktivierung des NF κ B-Signalwegs über den TNF-R in Makrophagen, die Aktivierung peripherer Monozyten, ein möglicher direkter zytotoxischer Effekt sowie die Interaktion von Bakterien, Makrophagen und Tumorzellen untersucht.

4.2.1. Untersuchung des NF κ B-Signalwegs

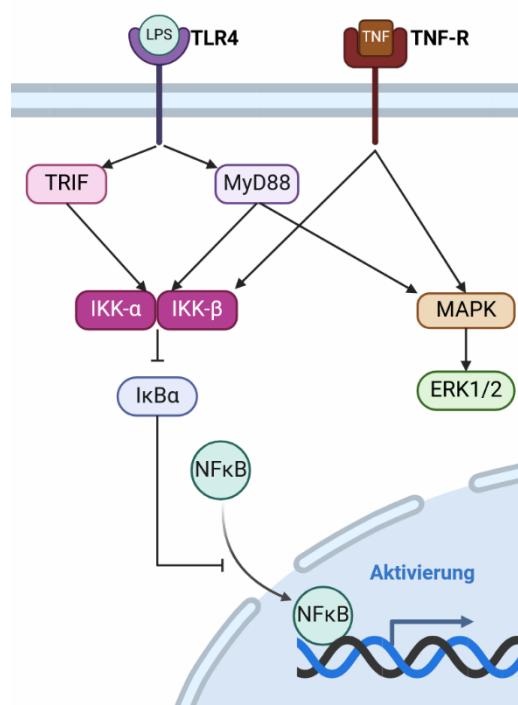


Abbildung 6 Stark vereinfachte Darstellung des NF κ B-Signalwegs und MAPK-Signalwegs: Bindung an den TLR-4 führt über TRIF- und MyD88-abhängige Wege zur Phosphorylierung von IKK- α und IKK- β . Im phosphorylierten Zustand fördern IKK- α / β die Phosphorylierung von I κ B α , was dessen Abbau begünstigt. I κ B α verhindert dann nicht mehr die Translokation von NF- κ B in den Zellkern, wodurch NF- κ B seine Wirkung entfalten kann. Zusätzlich kommt es über MyD88 zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2. Sowohl die Phosphorylierung von IKK- α / β als auch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs können ebenfalls durch die Aktivierung des TNF-R vermittelt werden.⁵⁰ Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt

Zur Untersuchung des TNF-R-Signalwegs wurden murine Makrophagen aus Mäusen des Stammes C57BL/6N Myd88 $^{-/-}$ Trif $^{-/-}$ ⁴⁹ mit einem funktionellen Knockout (KO) des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) durch einen KO von MyD88 und TRIF verwendet. In diesen Makrophagen wird der NF κ B-Signalweg nicht durch unspezifische Reize wie LPS induziert. Als Kontrollen wurden sowohl Wildtyp-(WT)-Makrophagen als auch lösliches TNF, Lipopolysaccharid (LPS) und PBS verwendet.

In WT-Makrophagen wurde eine Phosphorylierung von IKK- α - β 5 und 15 Minuten nach Behandlung mit Vehicle-Bakterien beobachtet. In MyD88-TRIF-KO-Makrophagen wurde eine

Phosphorylierung von IKK- α -/ β 5 und 15 Minuten nach Behandlung mit löslichem TNF und 15 Minuten nach Behandlung mit 2xTNF-Bakterien beobachtet.

In WT-Makrophagen wurde eine deutlich reduzierte Menge I κ B 15 Minuten nach Behandlung mit Vehicle-Bakterien festgestellt. In MyD88-TRIF-KO-Makrophagen wurde eine deutlich reduzierte Menge I κ B 5 und 15 Minuten nach Behandlung mit löslichem TNF und 2xTNF-Bakterien festgestellt.

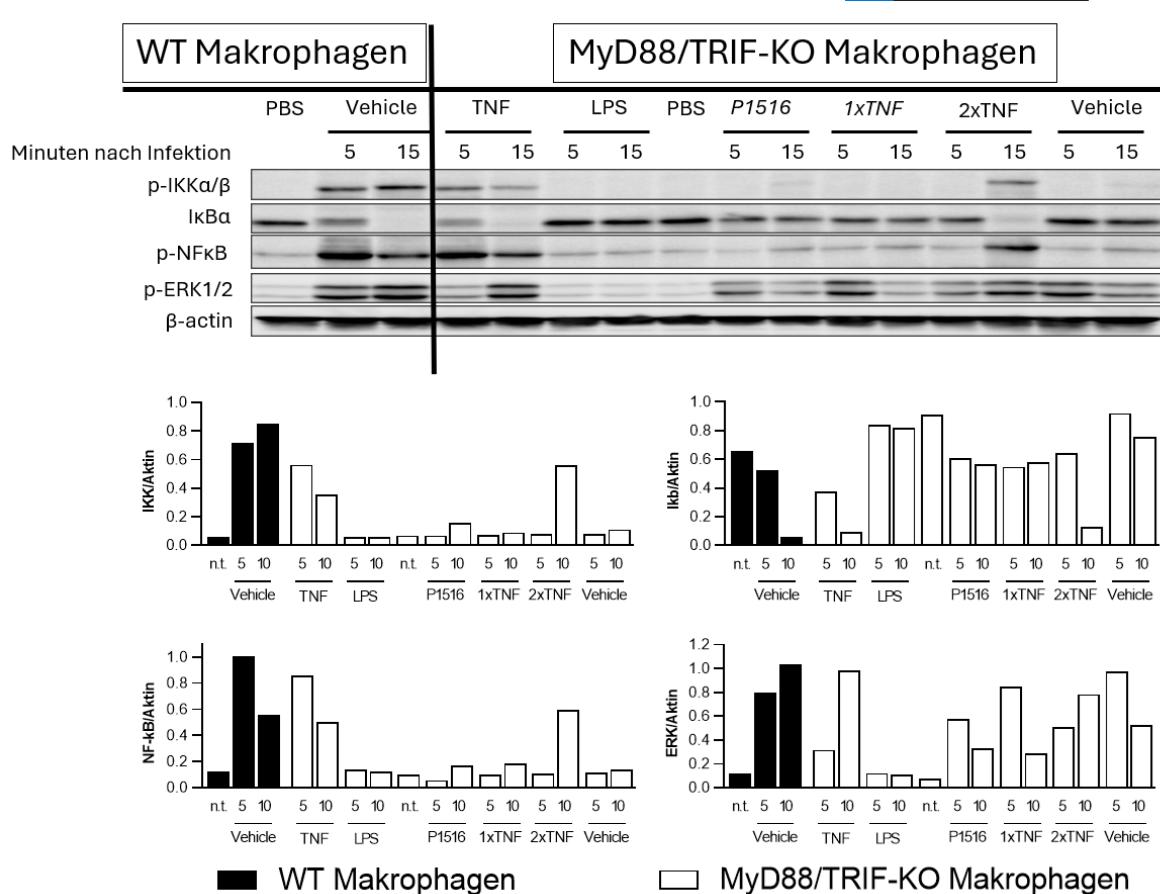


Abbildung 7 Untersuchung der Aktivierung des NF κ B-Signalwegs in WT und MyD88/TRIF-KO Makrophagen durch Bakterien. Dargestellt ist das Gel (oben) sowie die Konzentrationen von phosphorylierten IKK- α -/ β , NF κ B und ERK1/2 sowie von I κ B α jeweils in Relation zur β -Aktin Konzentration (unten) jeweils 5 und 10 Minuten nach Infektion mit Bakterien bzw. nach Zugabe von löslichem TNF oder LPS. Bei WT-Makrophagen konnte nach der Infektion mit Vehicle-Bakterien die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs mit Phosphorylierung von IKK- α -/ β , folgendem Abbau von I κ B α und steigender Konzentration von NF κ B beobachtet werden. In MyD88/TRIF-KO Makrophagen ließ sich diese Aktivierung nur nach Infektion mit 2xTNF-Bakterien oder Zugabe von TNF beobachten. Die Phosphorylierung von ERK1/2 war auch in KO Makrophagen nach Infektion mit allen Bakterien zu beobachten, ebenso wie nach Zugabe von TNF.

In WT-Makrophagen wurde eine Phosphorylierung von NF κ B 5 Minuten und in geringerem Ausmaß 15 Minuten nach Behandlung mit Vehicle-Bakterien festgestellt. In MyD88-TRIF-KO-Makrophagen wurde eine Phosphorylierung von NF κ B 5 und 15 Minuten nach Behandlung mit löslichem TNF sowie 15 Minuten nach Behandlung mit 2xTNF-Bakterien festgestellt.

In WT-Makrophagen wurde eine Phosphorylierung von ERK1/2 5 und 15 Minuten nach Behandlung mit Vehicle-Bakterien festgestellt. In MyD88-TRIF-KO-Makrophagen wurde eine Phosphorylierung von ERK1/2 in unterschiedlichem Ausmaß 5 und 15 Minuten nach Behandlung mit löslichem TNF, P1516-, 1xTNF-, 2xTNF- und Vehicle-Bakterien festgestellt. Zusammenfassend wurde in WT-Makrophagen eine Aktivierung des NF κ B-Signalwegs durch Vehicle-Bakterien nachgewiesen. In MyD88-TRIF-KO-Makrophagen führten ausschließlich lösliches TNF und 2xTNF-Bakterien zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs.

4.2.2. Einfluss auf PBMCs gesunder Spender

PBMCs wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert und mit Vehicle-Bakterien, 2xTNF-Bakterien oder PBS behandelt. Im Überstand der mit Vehicle-Bakterien und 2xTNF-Bakterien behandelten PBMCs wurden signifikant erhöhte Spiegel von TNF und IFN- γ , nicht jedoch von IL2, nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Vehicle- und 2xTNF-Bakterien wurde nicht festgestellt. (Abbildung 8)

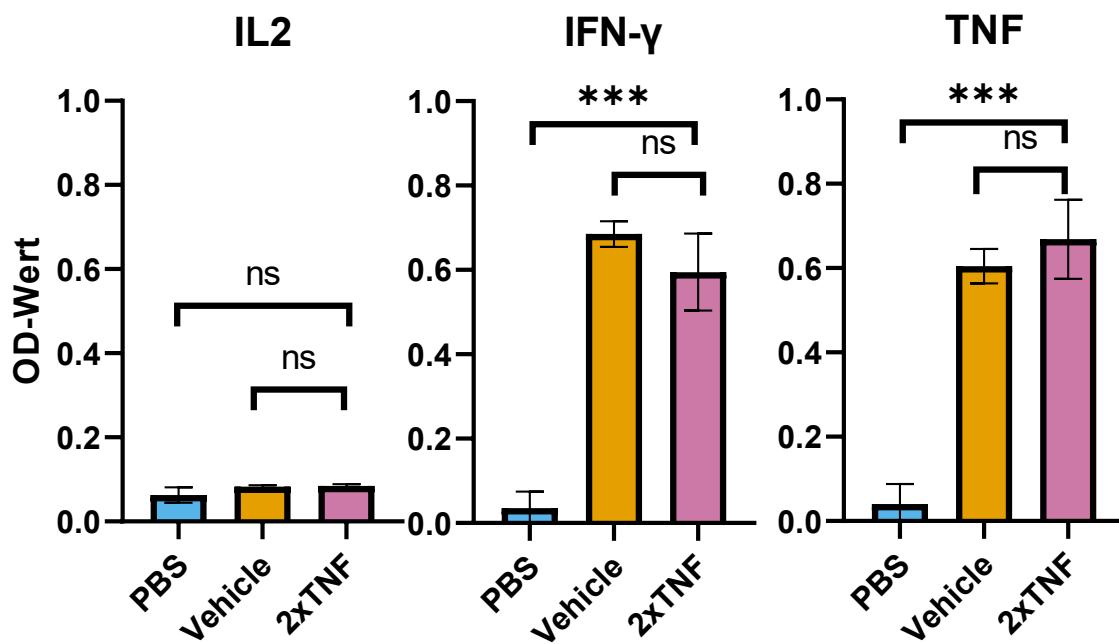


Abbildung 8 Zytokinproduktion humaner PBMCs gesunder Spender 24 Stunden nach Infektion mit 2xTNF-Bakterien oder Vehicle-Bakterien. Dargestellt sind OD-Werte von IL-2-, INF- γ - und TNF-ELISA. Es zeigt sich ein im Vergleich zu nicht infizierten PBMCs signifikant erhöhter INF- γ und TNF-Wert für beide Bakterien-Stämme. Ein signifikanter Unterschied zwischen Vehicle-Bakterien und 2xTNF-Bakterien konnte nicht gezeigt werden. Für IL-2 zeigte sich kein signifikant unterschiedlicher Wert gegenüber der Kontrolle für beide Bakterien-Stämme.

4.2.3. Zytotoxizität Untersuchung anhand Bakterienkultur-Überstände

Fluoreszierende Tumorzellen wurden mit äquivalenten Volumina aufkonzentrierter Bakterienkultur-Überstände behandelt. Die Proliferation wurde über 48 Stunden anhand von Fluoreszenz-Messungen verfolgt, anschließend erfolgte ein XTT-Zellviabilitätstest.

Eine unterschiedlich stark ausgeprägte Hemmung des Zellwachstums durch Überstände aller Bakterien wurde beobachtet (Abbildung 9A). Im XTT-Test wurde ebenfalls für jeden Überstand ein zytotoxischer Effekt festgestellt (Abbildung 9B). Zwischen verschiedenen Versuchsansätzen zeigte sich eine starke Variabilität in den Effektstärken (Abbildung 9C), sodass keine statistische Auswertung möglich war.

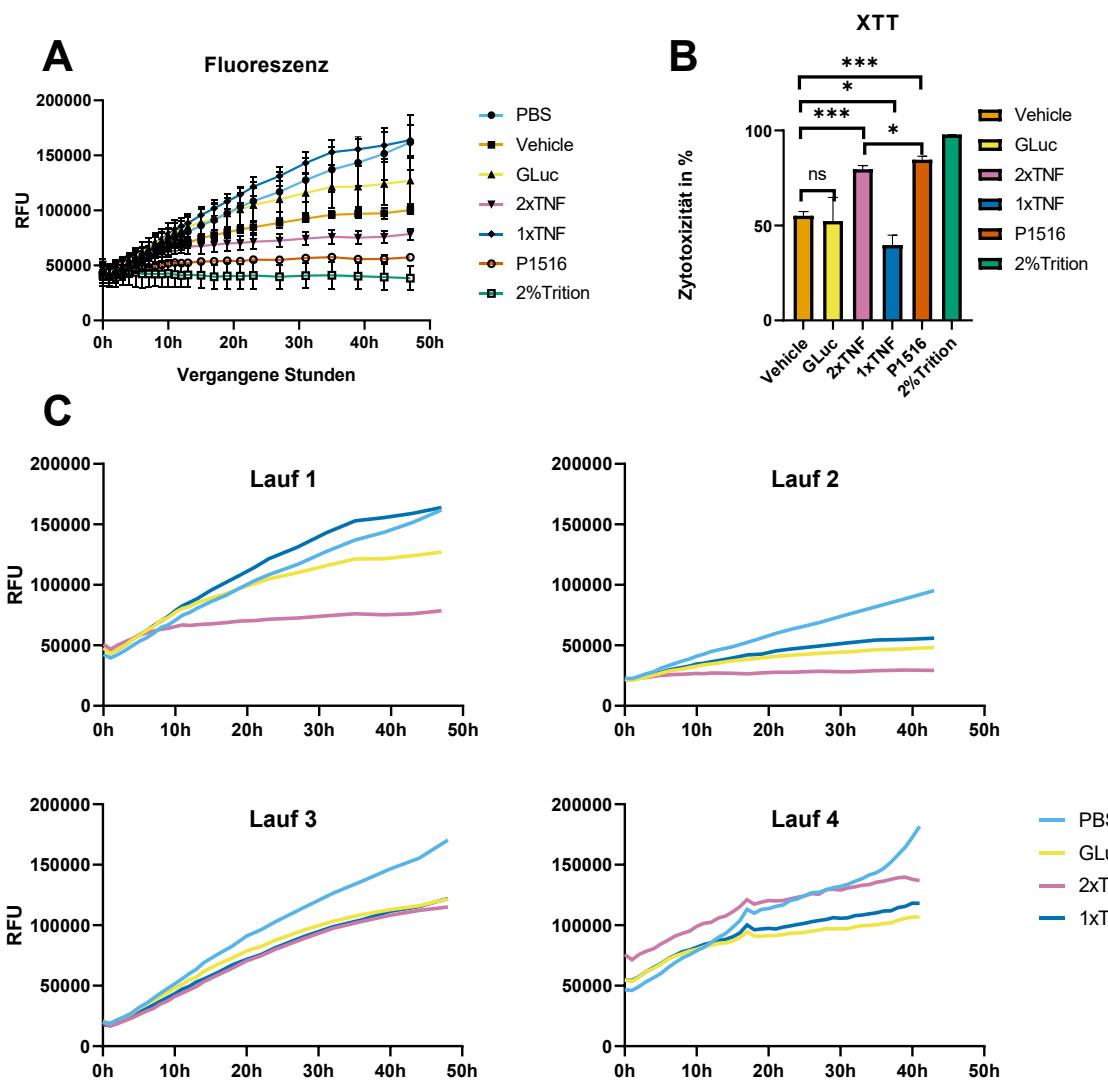


Abbildung 9 Proliferations- und Zytotoxassays mit Bakterienkulturüberständen **A.** Fluoreszenz-Proliferationsassay mit dTomato exprimierenden Panc02-Zellen: Dargestellt ist die Entwicklung der der Fluoreszenz-Werte der Wells in relative fluorescence units (RFU) über 48 Stunden. Als Positivkontrolle wurde 2% Triton X-100 verwendet. Hier war der RFU-Wert über die Zeit konstant, es war also keine Proliferation zu beobachten. Für die Bakterienüberstände bis auf 1xTNF konnte jeweils eine eingeschränkte Proliferation im Vergleich zu den mit PBS behandelten Wells beobachtet werden. **B.** XTT-Zytotoxassay im Anschluss an A: Dargestellt ist die Zytotoxizität der Bakterienüberstände relativ zu PBS. Für alle Bakterienüberstände konnte in unterschiedlichem Ausmaß eine Zytotoxizität nachgewiesen werden. Die Reihenfolge der Effektstärken ist dabei äquivalent zu den Ergebnissen des Proliferationsassays. **C.** Darstellung vier verschiedener Versuchsdurchläufe von Fluoreszenz-Proliferationsassays

mit dTomato exprimierenden Panc02-Zellen. Dargestellt sind für alle Läufe nur die Gruppen PBS, GLuc, 2xTNF und 1xTNF. Zwischen den Läufen wurde eine Varianz der Effektstärken der einzelnen Überstände festgestellt.

4.2.4. Zytotoxizität Untersuchung anhand Bakterien-Tumorzellen Co-Kultur

Tumorzellen wurden für 4 Stunden mit lebenden Vehicle- und 2xTNF-Bakterien co-inkubiert.

Anschließend wurde das Wachstum der Bakterien durch Zugabe eines Antibiotikums gestoppt.

Nach insgesamt 24 Stunden wurde ein XTT-Test durchgeführt.

Ein dosis- bzw. MOI-abhängiger zytotoxischer Effekt wurde für beide Bakterien beobachtet.

Zwischen den beiden Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

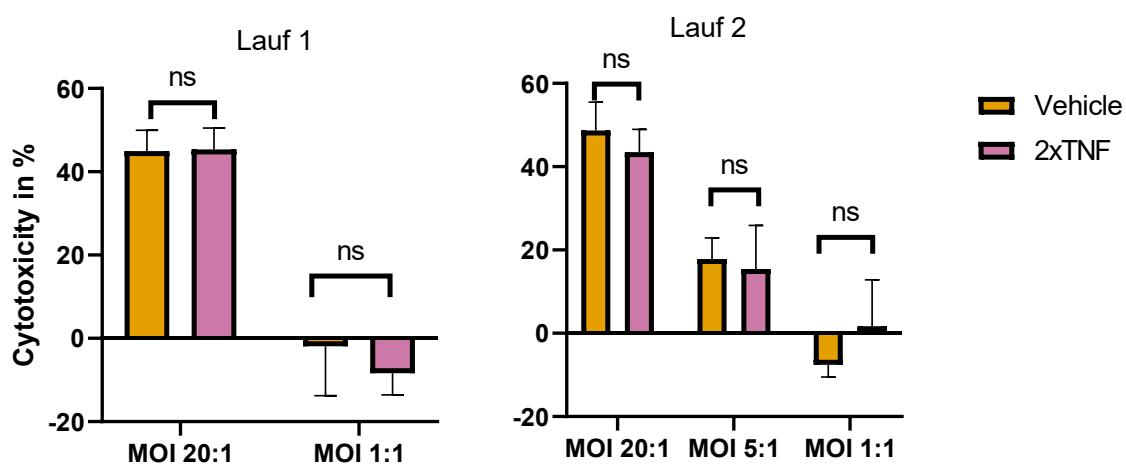


Abbildung 10 Zytotoxizität in Bakterien-Tumorzell-Ko-Kultur Panc02-Tumorzellen wurden mit Bakterien in Verschiedenen MOIs infiziert. Nach 4 Stunden wurde das Bakterienwachstum abgestoppt und nach weiteren 20 Stunden ein XTT-Zytotoxassay durchgeführt. Dargestellt ist die Zytotoxizität für MOI 20, 5 und 1 mit Vehicle- und 2xTNF-Bakterien. Für MOI 20 und 5 konnte bei beiden Bakterien eine Zytotoxizität beobachtet werden. Signifikante Unterschiede zwischen Vehicle- und 2xTNF-Bakterien konnten nicht beobachtet werden.

4.2.5. Zytotoxizität Untersuchung anhand Makrophagen-Tumorzellen Co-Kultur

Murine Makrophagen wurden mit Vehicle- oder 2xTNF-Bakterien bei einer MOI von 1 infiziert.

Das Wachstum der Bakterien wurde nach einer Stunde gestoppt, und die Makrophagen wurden mit Panc02- oder MC38-Zellen co-inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die LDH-Freisetzung im Überstand gemessen.

Für Panc02-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der LDH-Freisetzung zwischen Tumorzellen, die mit Makrophagen co-inkubiert wurden, die zuvor mit Bakterien oder PBS behandelt worden waren. Für MC38-Zellen zeigte sich eine signifikant erhöhte LDH-Freisetzung bei Co-Inkubation mit Makrophagen, die zuvor mit Bakterien behandelt worden waren, im Vergleich zu solchen, die mit PBS behandelt worden waren. Zwischen

Makrophagen, die mit Vehicle-Bakterien oder 2xTNF-Bakterien behandelt wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

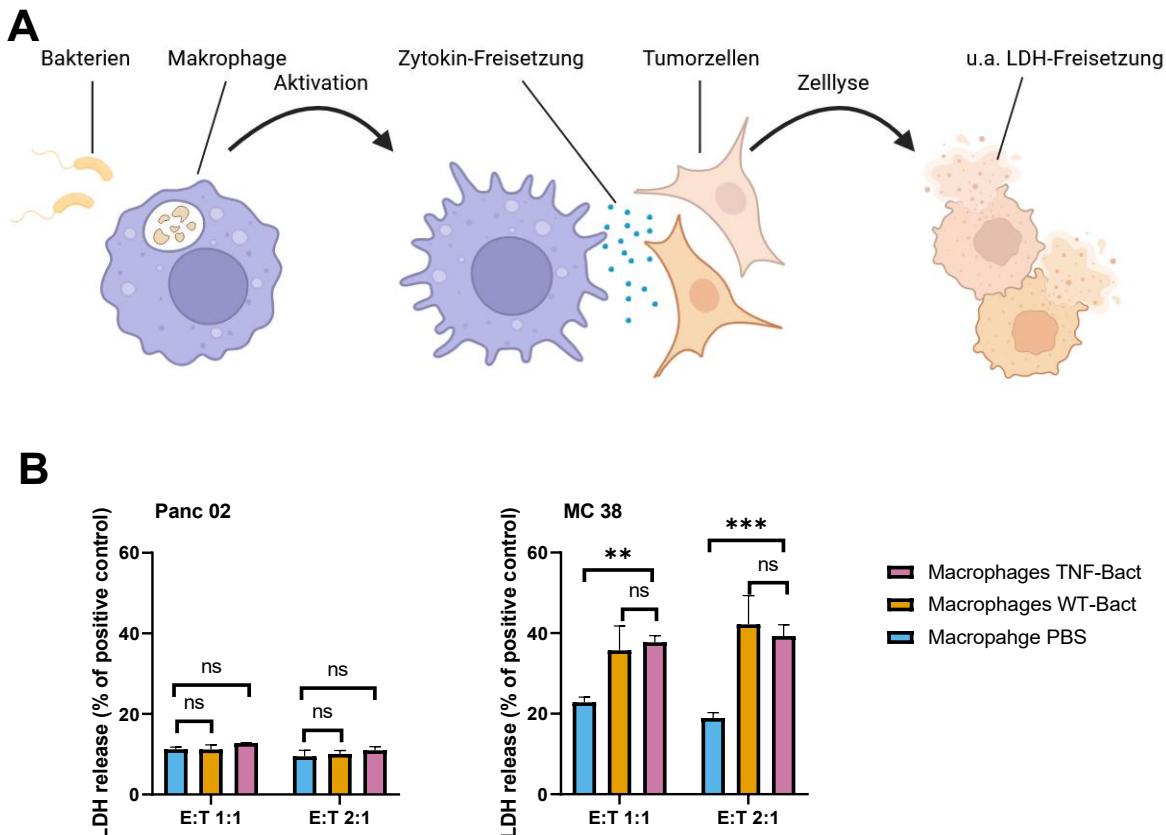


Abbildung 11 Makrophagen-Co-Kultur A. Schematischer Versuchsablauf: Makrophagen werden mit Bakterien infiziert und anschließend mit Tumorzellen co-kultiviert. Durch die Aktivierung werden Zytokine freigesetzt, die zum Untergang der Tumorzellen führen. Dabei wird u.a. LDH in den Kulturüberstand freigesetzt, welches gemessen und somit der Außmaß des Zelluntergangs bestimmt wird. **B.** Ergebnisse der LDH-Messung als Prozentwert der Positivkontrolle mit Panc02 und MC38 als Ziel-Zellen in Effektor (E) zu Ziel (T) Verhältnissen 1:1 und 2:1. Es zeigte sich für Panc02 Zellen unabhängig des E:T Verhältnisses kein Signifikanter Unterschied zwischen Infektion mit Vehicle- und 2xTNF-Bakterien. Auch gegenüber Makrophagen, die mit PBS infiziert wurden, zeigte sich kein Unterschied. Für MC38-Zellen konnte unabhängig des E:T Verhältnisses eine signifikant höhere LDH-Freisetzung gemessen werden zwischen mit Bakterien und mit PBS infizierten Makrophagen. Zwischen Vehicle- und 2xTNF-Bakterien zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

4.3 In Vivo Testung

Nach der in vitro-Testung der Bakterien wurde die in vivo-Testung durchgeführt. Hierfür wurde ein Mausmodell mit orthotopen Panc02-Tumoren in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen verwendet. Neben dem Nachweis des Konstrukts im Tumorgewebe und der Untersuchung des allgemeinen Überlebens nach Bakteriengabe lag der Fokus auf der Reaktion des Immunsystems.

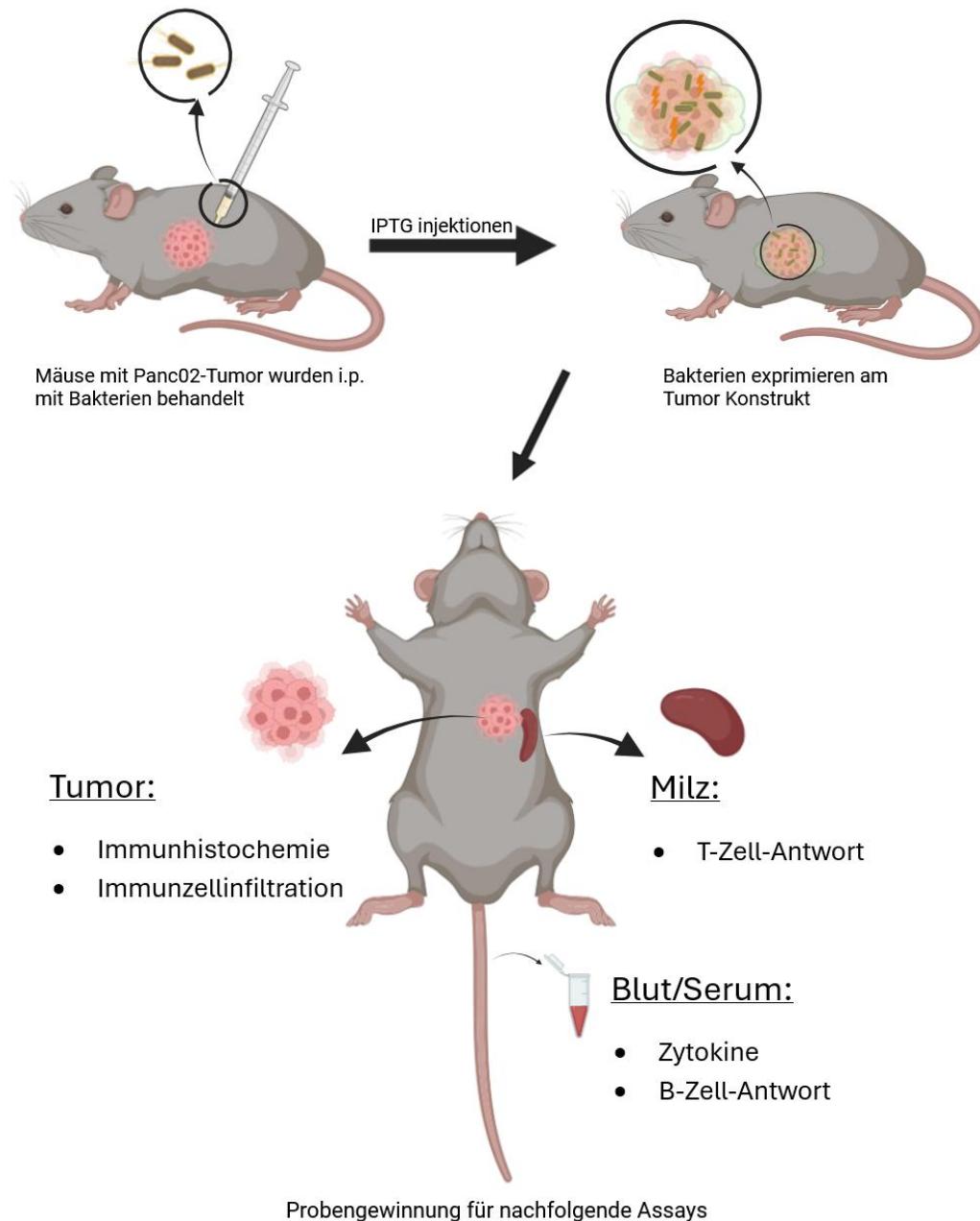


Abbildung 12 Übersicht über den Ablauf der in- und ex-Vivo Versuche. Mäusen mit Panc02-Tumoren wurden intra peritoneal (i.p.) mit Bakterien behandelt. Die Expression des FimH-Displays wurde durch Injektion von IPTG alle 2 bis 3 Tage induziert. Nach Tötung wurden verschiedene Organe entnommen für nachfolgende Assays.

4.3.1. Überlebensanalyse

Im ersten Versuch wurde geprüft, ob die intraperitoneale Behandlung von wt Mäusen des Stammes C57bl/6N mit orthotopen und syngenen Panc02-Tumoren durch unterschiedliche Bakterien das Überleben beeinflusst. Um die Verteilung der Bakterien innerhalb der Versuchstiere nachvollziehen zu können, wurden GLuc-Bakterien verwendet, die mithilfe der Gaussia-Luciferase nach einer Luciferin-Injektion detektiert werden konnten. Zusätzlich erhielt eine zweite Gruppe 1xTNF- und eine dritte Gruppe 2xTNF-Bakterien. Die Bakterieninjektion erfolgte an Tag 32 nach der Tumorimplantation.

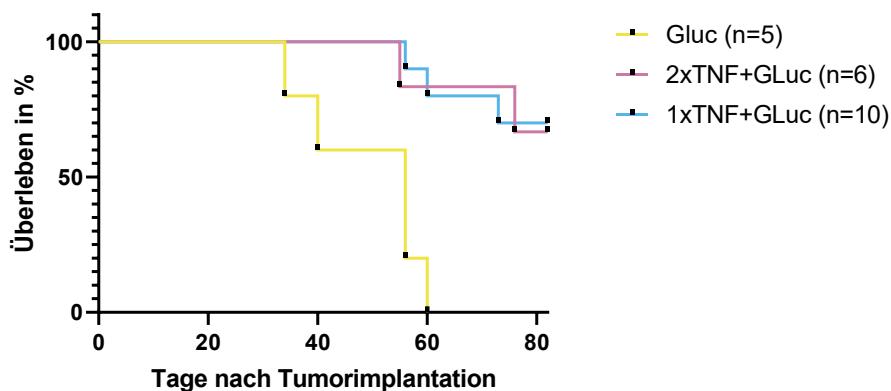


Abbildung 13 Überleben von Panc02-Tumor tragenden Mäusen nach Behandlung mit Bakterien. Mäusen wurden orthotope Panc02-Tumore implantiert. An Tag 32 wurden sie per i.p. Injektion mit GLuc- (n=5), 2xTNF- und GLuc- (n=6), oder 1xTNF- und GLuc-Bakterien (n= 10) behandelt. Das Tumorwachstum wurde über Bioluminiszens-Messungen mittels IVIS überprüft. Dargestellt ist das Gesamtüberleben der drei Gruppen. Alle allein mit GLuc-Bakterien behandelten Mäuse mussten bis Tag 60 geopfert werden, während 4 von 6 der mit 2xTNF- und GLuc-Bakterien und 7 von 10 der mit 1xTNF- und GLuc-Bakterien behandelten Tieren bis zum Ende des Versuchs an Tag 82 überlebten.

In der Gruppe der ausschließlich mit GLuc-Bakterien behandelten Mäuse wurde ein medianes Überleben von 56 Tagen beobachtet, wobei die letzte Maus an Tag 60 verstarb. In den Gruppen mit zusätzlicher Behandlung durch 1xTNF- bzw. 2xTNF-Bakterien überlebten 7 von 10 bzw. 4 von 6 Tieren bis zum Ende des Versuchs an Tag 82.

Im Vergleich zur GLuc-Gruppe zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikant verlängertes Überleben. Zwischen der 1xTNF- und der 2xTNF-Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 13).

4.3.2. Nachweis des Konstruktes im Gewebe

Zur Untersuchung der Persistenz der Bakterien und der Expression der Konstrukte im Gewebe wurden Mäusen orthotope Pankreastumore implantiert. Nach 14 Tagen wurde die Tumorgröße kontrolliert, und die Mäuse wurden intraperitoneal mit Vehicle-, GLuc- und 2xTNF-Bakterien behandelt. Zusätzlich erhielten die Mäuse dreimal wöchentlich eine intravenöse Injektion von IPTG. Nach vier Wochen oder beim Erreichen eines Abbruchkriteriums wurden die Mäuse

euthanasiert, die Tumoren und Milzen explantiert, geschnitten und histochemisch mit c-Myc-Antikörpern gefärbt.

Im Tumorgewebe von Mäusen, die mit Vehicle- oder GLuc-Bakterien behandelt wurden, konnte kein c-Myc nachgewiesen werden (Abbildung 14A und B). Hingegen war im Tumorgewebe von Mäusen, die mit 2xTNF-Bakterien behandelt wurden, eine deutliche Färbung sichtbar (Abbildung 14C und D). Im Milzgewebe konnte keine eindeutige Färbung festgestellt werden (Abbildung 14E und F).

Damit konnten die Persistenz und die Expression des FimH-Displays der 2xTNF-Bakterien im Tumorgewebe, nicht jedoch in der Milz, nachgewiesen werden. Da Vehicle- und GLuc-Bakterien kein c-Myc exprimieren, war hier keine Färbung zu erwarten.

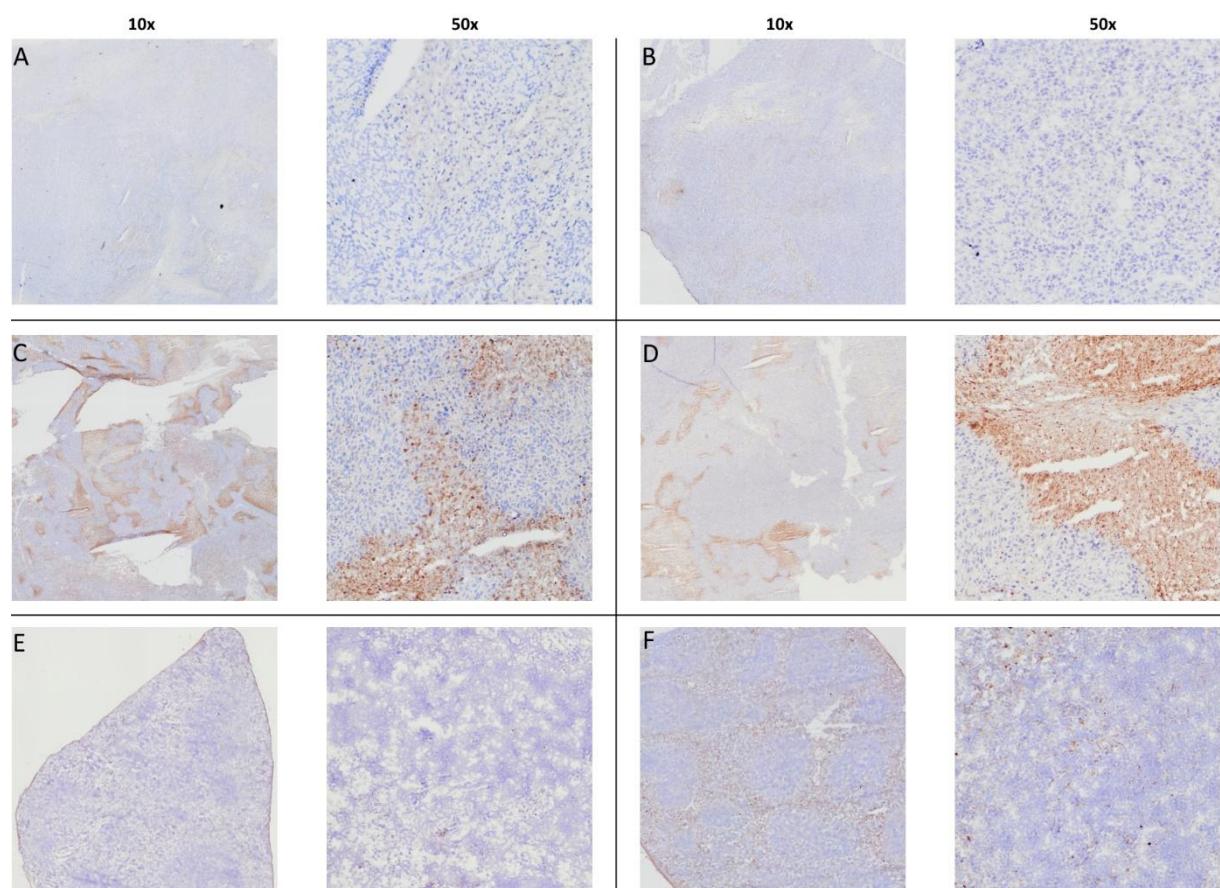


Abbildung 14 Histochemische Färbung von Tumor- und Milzgewebe mit c-Myc-Antikörpern in 10 und 50 facher Vergrößerung. Tumor (A-D) und Milzgewebe (E+F) von mit Bakterien behandelten Mäusen wurde geschnitten und über anti-c-Myc-HRP Antikörpern und DAB gefärbt. **A** zeigt Gewebe einer mit Vehicle-Bakterien behandelten Maus, **B** einer mit GLuc-Bakterien behandelter Maus. **C** und **D** zeigen je eine mit 2xTNF-Bakterien behandelte Maus. Hier zeigte sich eine Färbung von c-Myc und somit ein Nachweis der Konstrukte im Tumorgewebe. **E** und **F** zeigen Milzgewebe von mit 2xTNF-Bakterien behandelten Mäuse

4.3.3. Untersuchung des adaptiven Immunsystems

Seren von Mäusen aus dem ersten Mausversuch, die mit GLuc-Bakterien (n=3), 2xTNF-/GLuc-Bakterien (n=3) und 1xTNF-/GLuc-Bakterien (n=3) behandelt wurden, wurden gesammelt und mit Panc02-Zellen inkubiert, die anschließend auf die Bindung spezifischer Antikörper untersucht wurden. Als Negativkontrollen wurden Panc02-Zellen ohne Serum sowie MC38-Zellen genutzt. Eine Bindung muriner Antikörper an Panc02-Zellen, jedoch nicht an MC38-Zellen, wurde nachgewiesen (Abbildung 16A). In den Seren aller Tiere konnten gegen Panc02 gerichtete Antikörper nachgewiesen werden. Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 16B).

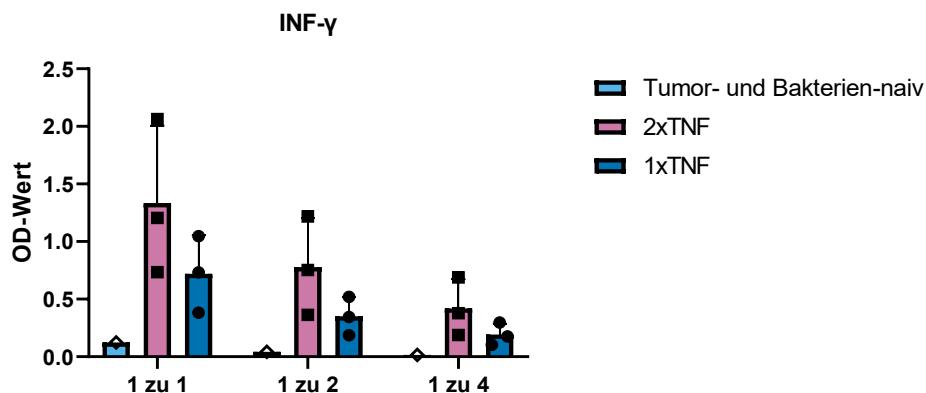


Abbildung 15 Untersuchung der T-Zell-Antwort: Milzen von je drei Versuchstieren der Gruppen 2xTNF+GLuc und 1xTNF+GLuc des Überlebensversuchs 1 wurden explantiert und die T-Zellen isoliert. Zusätzlich wurden T-Zellen einer Tumor und Bakterien naiven Maus isoliert. Die T-Zellen wurden in unterschiedlichen E:T-Verhältnissen für 24 Stunden mit Panc02-Zellen co-inkubiert und das Medium anschließend auf INF- γ analysiert. Dargestellt sind die OD-Werte des INF- γ -ELISAs. Es zeigte sich eine Dosis-abhängige INF- γ Sekretion für beide Gruppen, die über dem Wert der Kontrolle lag.

In einem zweiten Mausversuch wurden Seren von jeweils einer Maus vor und 14 Tage nach der Behandlung mit Vehicle-Bakterien, GLuc-Bakterien und PBS gesammelt. Bei den mit Bakterien behandelten Tieren zeigte sich eine Zunahme der durchschnittlichen Fluoreszenz nach der Behandlung, während das unbehandelte Tier eine leichte Abnahme aufwies (Abbildung 16C). Aufgrund der fehlenden Replikate war eine statistische Auswertung dieser Beobachtung nicht möglich.

Zudem wurden Milz-Zellen von Mäusen, die mit 2xTNF-/GLuc-Bakterien (n=3) und 1xTNF-/GLuc-Bakterien (n=3) behandelt wurden, isoliert und mit Panc02-Zellen co-inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände auf IFN- γ analysiert. Als Negativkontrolle dienten Milz-Zellen einer Maus, die weder mit Bakterien noch mit Panc02-Tumoren in Kontakt gekommen war. Zwischen den Gruppen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt (Abbildung 15).

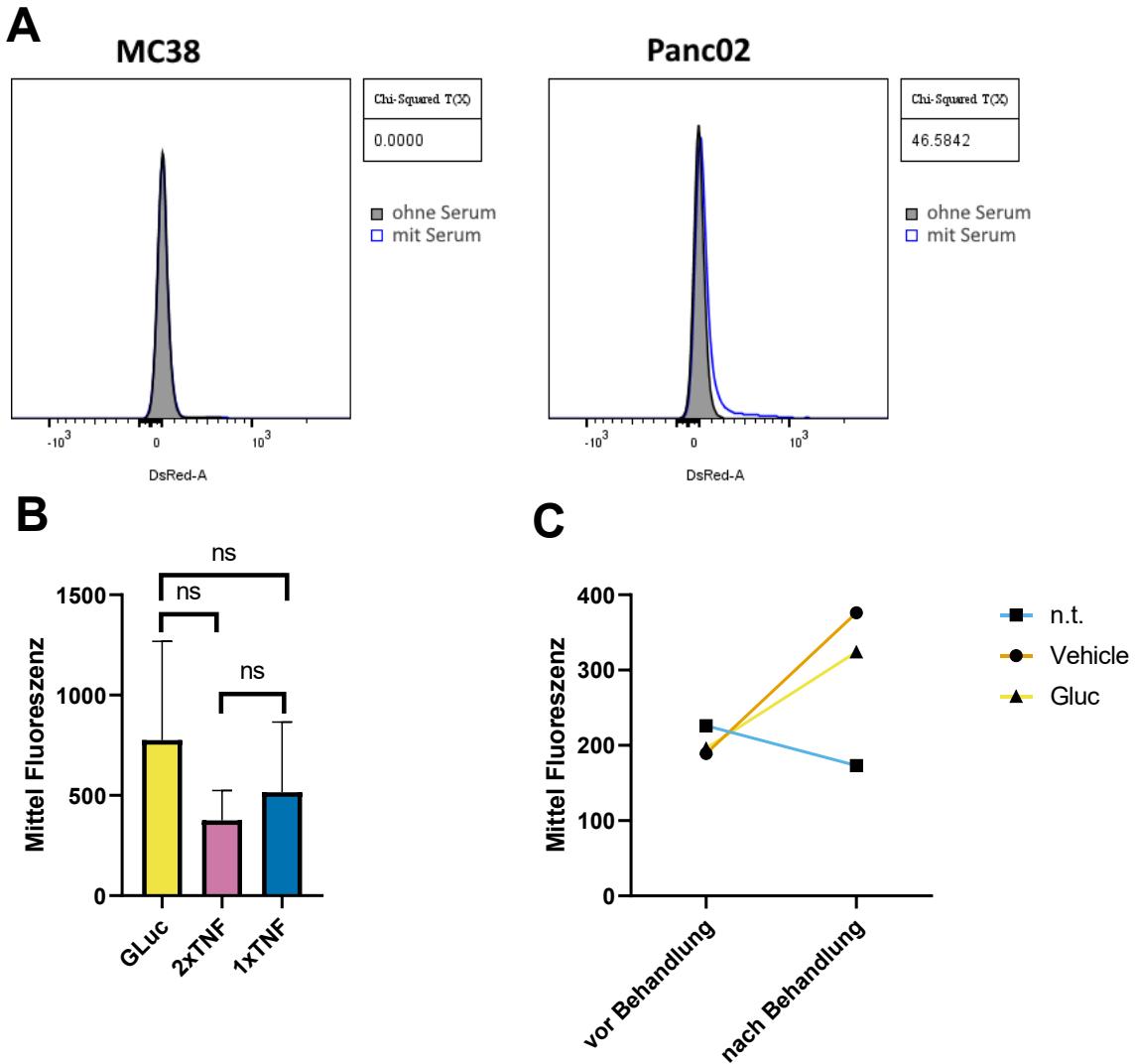


Abbildung 16 Untersuchung der B-Zell-Antwort **A**. Nachweis Panc02-spezifischer Antikörper im Serum: Panc02 und MC38-Zellen wurden mit Serum Panc02-Tumor tragender Mäuse inkubiert und anschließend mit anti-Mouse-IGG-PE Antikörpern gefärbt. Als Kontrolle wurde auch Zellen ohne vorherige Inkubation mit Serum gefärbt. Dargestellt sind Histogramme des DS-Red Werts, wobei je Zelllinie die Werte mit und ohne Serum gegenübergestellt sind. Für MC38-Zellen zeigte sich kein Unterschied der Verteilung, für Panc02-Zellen ließ sich für die Probe mit Serum eine Verschiebung beobachten. Dies weist eine Bindung von Antikörpern aus dem Serum an Panc02-, nicht aber MC38- Zellen nach. **B**. Vergleich der Antikörperbindung nach Bakterienbehandlung: Panc02-Zellen wurden mit Seren von je drei Versuchstieren der drei Gruppen des Überlebensversuchs 1 inkubiert und mit anti-Mouse-IGG-PE Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind die Mittleren DS-Red-Floureszenzwerte der drei Gruppen. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. **C**. Vergleich vor und nach Behandlung mit Bakterien. Serum von drei Mäuse mit Panc02-Tumoren wurde gewonnen. Eine Maus wurde mit Vehicle-Bakterien und Eine mit GLuc-Bakterien behandelt. Die dritte Maus wurde nicht behandelt. Nach einer Woche wurde erneut Serum gewonnen. Es zeigte sich eine Zunahme der Antikörperbindung für die mit Bakterien behandelten Mäuse und eine leichte Abnahme für die Unbehandelte.

4.3.4. Tumorinfiltration durch Zellen des Immunsystems

Mäusen wurden subkutan Pankreastumore implantiert, anschließend mit Vehicle-Bakterien (n=4), 2xTNF-Bakterien (n=5) oder PBS (n=3) behandelt. Nach 7 Tagen wurden die Tumoren explantiert und mittels FACS analysiert. Jeweils eine Probe pro Gruppe wurde aufgrund einer zu geringen Zellausbeute ausgeschlossen.

In allen analysierten Proben wurden CD3+ Zellen nachgewiesen. Bezuglich der Anzahl zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Zur Untersuchung des Aktivierungszustands wurden die CD3+ Zellen weiter auf die Expression von CD69 untersucht. In allen Gruppen zeigte sich eine höhere Zahl CD69-exprimierender Zellen im Vergleich zu CD69-negativen Zellen. Zwischen den Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Zur Unterscheidung zwischen naiven, aktivierten, zentralen Gedächtnis- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen wurden die Zellen anhand der CD62L- und CD44-Expression weiter typisiert. In der Population der CD69-positiven T-Zellen stellten die Effektor-T-Zellen (CD62L- CD44+) in allen Gruppen die größte Subpopulation dar. Bezuglich der Verteilung zeigten sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. In der Population der CD69-negativen Zellen stellten die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD62L- CD44+) die größte Subpopulation dar, gefolgt von den zentralen Gedächtnis-T-Zellen (CD62L+ CD44+). Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden.

Zusätzlich wurden die Zellen auf CD3 und anschließend auf CD4 und CD8 untersucht. Es konnten T-Helfer-Zellen (CD3+ CD4+) und T-Killer-Zellen (CD3+ CD8+) in allen analysierten Proben nachgewiesen werden. Zwischen den Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Zuletzt wurden die Proben auf NK-Zellen (NK1-1+), B-Zellen (CD19+) und Makrophagen (F4/80+) untersucht. Anhand der Marker CD80 und CD86 wurde der Aktivierungszustand der einzelnen Populationen analysiert. Es konnten in allen Proben NK-Zellen und in deutlich geringerem Ausmaß auch B-Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden. Zwischen den Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Bei schwer abgrenzbaren Populationen von CD80 und CD86 wurden die Mittelwerte der Fluoreszenz verglichen. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

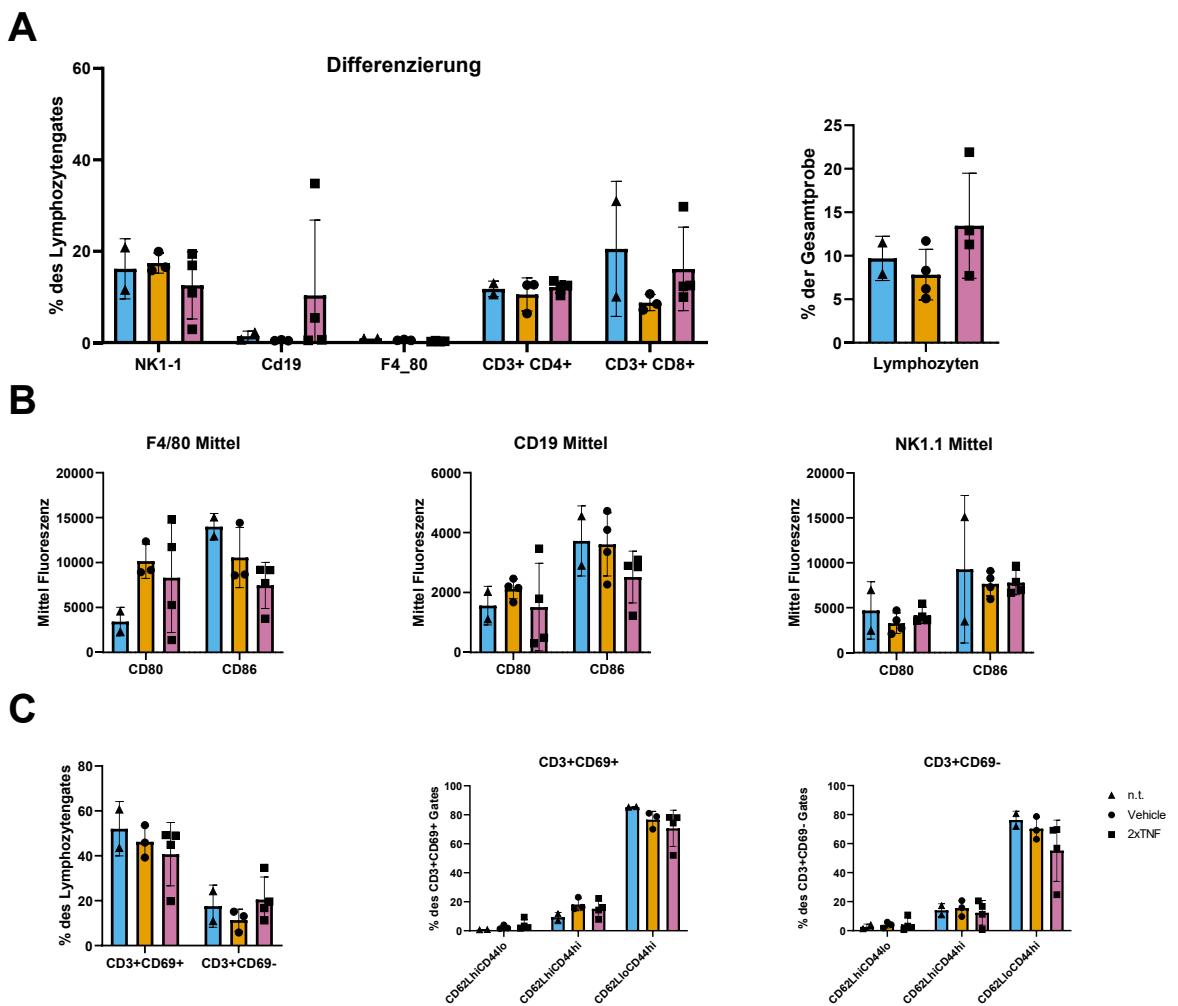


Abbildung 17 Infiltration des Tumorgewebes durch Zellen des Immunsystems: FACS-Analyse Tumorgewebes sieben Tage nach Behandlung mit PBS, Vehicle- oder 2xTNF-Bakterien A: Differenzierung der Zellen des Lymphozytengates: Dargestellt sind der Anteil des Lymphozytengates an der Gesamtprobe und der Anteil von NK-Zellen, Makrophagen, B-Zellen, T-Helfer-Zellen und T-Killer-Zellen des Lymphozytengates. B: Aktivierungszustand von NK- und B-Zellen sowie Makrophagen: Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenz für CD80 und CD86. Zwischen den Gruppen konnte für keine der Zellarten ein signifikanter Unterschied in der Aktivierung nachgewiesen werden. C: Aktivierung und weitere Phänotypisierung der T-Zellen: Dargestellt sind Anteil von aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen des Gates sowie Charakterisierung beider Populationen anhand von CD62L und CD44. Es wurden signifikant mehr CD69+ als CD69- Zellen nachgewiesen. Zwischen den Gruppen zeigten sich keine Unterschiede. Unabhängig vom CD69-Status war die Population der CD62 niedrig und CD44 hoch exprimierenden Zellen die Größte.

4.3.5. Zytokine im peripheren Blut

Mäusen wurden orthotop Pankreastumore implantiert. Nach Nachweis des Tumoranwachsens mittels Biolumineszenz Messung wurden die Mäuse mit PBS (n=2), Vehicle-Bakterien (n=3), GLuc-Bakterien (n=2) oder 2xTNF-Bakterien (n=3) behandelt. Unmittelbar vor der Behandlung und eine Woche danach wurden Serumproben entnommen. Die Proben wurden mittels 23-Plex auf IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und TNF untersucht. (Abbildung 18).

Eine Zunahme der Konzentration von IL-1 β und Eotaxin zwischen T0 und T1 wurde über alle Gruppen hinweg beobachtet, ohne dass ein Zusammenhang mit der Behandlung nachgewiesen werden konnte. Beim Vergleich der Zytokinspiegel vor und nach der Behandlung innerhalb der einzelnen Gruppen wurde für keines der Zytokine ein signifikanter Unterschied festgestellt. Ebenso zeigte der Vergleich der Zytokinspiegel zum Zeitpunkt T1 zwischen den Gruppen für keines der Zytokine signifikante Unterschiede.

Zusätzlich wurde für jede Maus die absolute Veränderung der Zytokinspiegel zwischen T0 und T1 berechnet. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für eines der Zytokine festgestellt (Tabelle 2).

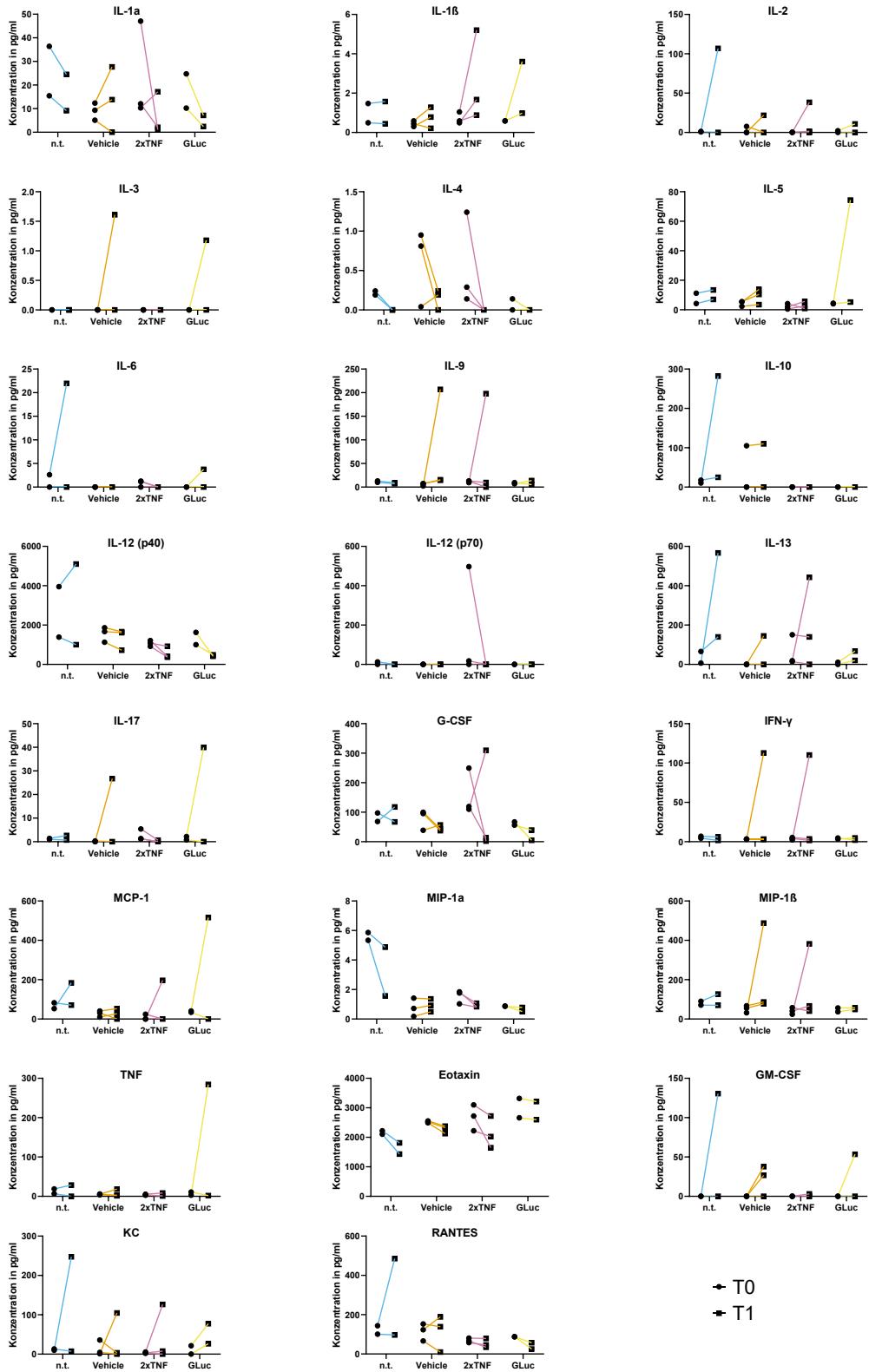


Abbildung 18 Zytokine vor und nach Behandlung mit verschiedenen Bakterien im peripheren Blut von Tumortragenden Mäusen. Mäuse mit orthotropem Panc02-Tumor wurden mit PBS, Vehicle-, GLuc- und 2xTNF-Bakterien behandelt. Unmittelbar vor und sieben Tage nach Behandlung wurden Serumproben gewonnen und mittels Multiplex auf 23 unterschiedliche Zytokine untersucht. Dargestellt sind die Werte für jede Maus nach Gruppe sortiert zum Zeitpunkt vor (T0) und nach (T1) Behandlung mit Bakterien oder PBS.

	Alle Gruppen T0 vs T1																
	n.t. T0 vs T1	Vehicle T0 vs T1	2xTNF T0 vs T1	GLuc T0 vs T1	Δ n.t. vs Δ Vehicle	Δ n.t. vs Δ 2xTNF	Δ n.t. vs Δ Gluc	Δ Vehicle vs Δ 2xTNF	Δ Vehicle vs Δ Gluc	T1: n.t. vs Vehicle	T1: n.t. vs 2xTNF	T1: n.t. vs Gluc	T1: Vehicle vs 2xTNF	T1: Vehicle vs Gluc	T1: 2xTNF vs GLuc		
IL-1alpha	0.172	0.190	0.493	0.403	0.234	0.131	0.688	0.601	0.305	0.108	0.839	0.806	0.395	0.346	0.506	0.377	0.752
IL-1beta	0.056	0.795	0.377	0.250	0.418	0.411	0.254	0.422	0.312	0.477	0.928	0.745	0.364	0.499	0.301	0.443	0.886
IL-2	0.154	0.504	0.641	0.402	0.500	0.532	0.592	0.531	0.615	0.965	0.561	0.546	0.588	0.533	0.707	0.843	0.608
IL-3	0.173	X	0.423	X	0.500	X	X	X	X	0.952	X	0.423	X	0.500	0.423	0.952	0.500
IL-4	0.025	0.074	0.273	0.247	0.500	0.511	0.426	0.261	0.839	0.332	0.292	0.189	X	X	0.189	0.189	X
IL-5	0.204	0.076	0.145	0.733	0.489	0.381	0.497	0.513	0.242	0.536	0.496	0.836	0.228	0.550	0.166	0.539	0.481
IL-6	0.320	0.500	X	0.184	0.500	X	0.474	0.566	X	X	0.381	0.500	0.500	0.558	X	0.500	0.500
IL-9	0.175	0.098	0.380	0.471	0.845	0.363	0.449	0.540	0.875	0.388	0.481	0.383	0.443	0.789	0.920	0.391	0.452
IL-10	0.720	0.988	0.423	X	X	0.856	X	X	X	X	X	X	0.605	0.428	0.428	0.423	0.423
IL-12 (p40)	0.140	0.705	0.164	0.113	0.243	0.575	0.446	0.325	0.268	0.297	0.481	0.554	0.438	0.425	0.111	0.099	0.591
IL-12 (p70)	0.120	0.499	0.423	0.287	X	0.495	0.889	X	0.283	X	X	0.423	X	X	0.423	0.423	X
IL-13	0.081	0.417	0.423	0.458	0.286	0.464	0.591	0.457	0.628	0.866	0.585	0.380	0.597	0.382	0.384	0.941	0.369
IL-17	0.238	0.616	0.430	0.176	0.513	0.453	0.127	0.522	0.337	0.707	0.473	0.503	0.361	0.528	0.433	0.681	0.504
Eotaxin	0.005	0.153	0.053	0.176	0.155	0.230	0.979	0.173	0.375	0.103	0.225	0.142	0.262	0.091	0.695	0.274	0.186
G-CSF	0.411	0.850	0.328	0.735	0.332	0.477	0.696	0.419	0.899	0.842	0.938	0.305	0.892	0.166	0.598	0.386	0.484
GM-CSF	0.090	0.500	0.195	0.423	0.500	0.623	0.505	0.662	0.208	0.879	0.512	0.623	0.505	0.662	0.208	0.879	0.512
IFN-gamma	0.190	0.301	0.426	0.445	0.821	0.407	0.426	0.662	0.973	0.420	0.439	0.432	0.437	0.873	0.983	0.427	0.432
KC	0.085	0.516	0.645	0.411	0.219	0.579	0.649	0.649	0.759	0.702	0.999	0.583	0.615	0.642	0.879	0.735	0.891
MCP-1	0.183	0.558	0.979	0.498	0.546	0.553	0.985	0.641	0.497	0.545	0.637	0.310	0.528	0.702	0.616	0.534	0.590
MIP-1alpha	0.107	0.337	0.305	0.104	0.364	0.318	0.425	0.362	0.053	0.168	0.218	0.393	0.394	0.361	0.946	0.404	0.260
MIP-1beta	0.121	0.520	0.371	0.410	0.479	0.415	0.471	0.653	0.828	0.386	0.430	0.474	0.619	0.354	0.772	0.348	0.421
RANTES	0.619	0.507	0.966	0.232	0.218	0.500	0.479	0.428	0.742	0.344	0.268	0.521	0.435	0.419	0.382	0.313	0.622
TNF-alpha	0.347	0.879	0.670	0.670	0.521	0.924	0.809	0.524	0.577	0.526	0.518	0.720	0.573	0.529	0.508	0.513	0.503

Tabelle 2: Statistische Auswertung des Versuchs in Abbildung 18: Es wurden T0 und T1 für alle Gruppen gemeinsam sowie für jede Gruppe einzeln mittels gepaarter T-Tests verglichen. Die absolute Änderung der Zytokinkonzentrationen wurde für jedes Tier berechnet und anschließend die Gruppen untereinander mittels ungepaarter T-Tests verglichen. Zuletzt wurde der T1-Wert der zwischen den Gruppen mittels ungepaarter T-Tests verglichen. Dargestellt sind die P-Werte der entsprechenden Tests. P-Werte kleiner 0,05 sind orange markiert. Fälle mit unzureichenden Daten zur Durchführung eines T-Test wurden mit einem Kreuz markiert.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Testung einer neuen bakterienbasierten Immuntherapie für das Pankreaskarzinom, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Das Konzept basierte auf den hochkonservierten TNF-a Peptiden P15 und P1516, die über das FimH-Display auf der Oberfläche von *E. coli* BL-21-Gold-Bakterien exprimiert werden sollten.

Zu Beginn wurden die Expressionskassetten entworfen und mittels molekularbiologischer Methoden der bakterielle pET11a Expressionsvektor erfolgreich in die Zielbakterien eingebbracht. Nach Induktion der Expression mittels IPTG wurde der Nachweis des Konstruktes mittels ELISA (Abbildung 5) durchgeführt. Die Testung der Bioaktivität wurde sowohl *in vitro* und anschließend *in vivo* durchgeführt.

5.1 2xTNF-Bakterien, nicht aber Vehicle-, 1xTNF- oder P1516-Bakterien führen zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs über den TNF-R

Lu et al. berichteten in ihrer Publikation zu den in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen, dass die den Sequenzen entsprechenden Proteine unabhängig von TNF-R1 ihre Wirkung entfalten.⁴⁸ Um zu prüfen, ob diese Beobachtung auch für die über das FimH-Display präsentierten Proteine gilt, wurde die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs in MyD88/TRIF-KO-Mäusen untersucht (Abbildung 7). Dieser Knockout verhindert die Aktivierung des Signalwegs durch LPS⁵¹. Wie erwartet wurde der Signalweg in den KO-Mäusen weder durch lösliches LPS noch durch Vehicle-, 1xTNF- oder P1516-Bakterien aktiviert. Neben löslichem TNF führte jedoch überraschenderweise auch die Behandlung mit 2xTNF-Bakterien zur Aktivierung des Signalwegs.

Da das Design der 2xTNF-Bakterien durch die Dopplung von P15 und das Zwischenschalten eines Glycin-Linkers als einziges von den in der Publikation von Lu et al. beschriebenen Sequenzen abweicht, vermuten wir, dass dadurch zufällig die Affinität zum TNF-R wiederhergestellt wurde.

5.2 TNF-Bakterien zeigen *in vitro* keinen zusätzlichen zytotoxischen Effekt auf Panc02-Zellen

Aufgrund der von Lu et al. beschriebenen direkten zytolytischen Wirkung der Fragmente P15 und P1516⁴⁸ wurden die zytotoxischen Eigenschaften der Bakterien überprüft. Hierzu wurden zuerst Überstände von Bakterienkulturen mit den Tumorzelllinien Panc02 und MC38 inkubiert und die Proliferation sowie die Stoffwechselaktivität analysiert.

Hier zeigte sich zwischen den Versuchsläufen eine große Varianz (Abbildung 9 C), sodass keine validen Schlussfolgerungen gezogen werden konnten. Ein Grund hierfür kann die

fehlende Quantifizierbarkeit der Vehicle- und GLuc-Kontrolle sein, die mangels cMyc im Überstand nicht mittels cMyc-ELISA quantifizierbar waren. Auch für die cMyc-enthaltenden Überstände war die Quantifizierung eher unzuverlässig, da kein FimH-cMyc Standard kommerziell verfügbar ist. Aufgrund dieser Limitationen wurde für die restliche Arbeit auf Experimente mit Bakterienkulturüberständen verzichtet.

Als nächstes wurde eine Co-Kultur von lebenden Bakterien und Panc02 Zellen durchgeführt (Abbildung 10). Hier konnte eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden, die sich jedoch nicht zwischen 2xTNF-Bakterien und Vehicle-Bakterien unterschied.

Eine mögliche Erklärung sind von BI21-Gold Bakterien produzierte Endotoxine⁵², die eine mögliche zusätzliche zytotoxische Wirkung der 2xTNF-Bakterien überlagern kann.

5.3 TNF-Bakterien zeigen *in vitro* keinen zusätzlichen aktivierenden Effekt auf humane PBMCs oder murine Makrophagen

Neben der direkten Zytolyse erhofften wir uns ebenfalls einen zusätzlichen immunstimulatorischen Effekt durch den Einsatz der TNF-Fragmente. Nachdem die spezifische Aktivierung von Makrophagen mit MyD88/TRIF-KO bereits gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss der Bakterien auf die Zytokinproduktion humaner PBMCs von gesunden Spendern untersucht (Abbildung 8).

Hier lösten sowohl Vehicle- als auch 2xTNF-Bakterien eine INF-γ- und TNF-Produktion aus, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Bakterien beobachtet wurde. IL2 wurde im Vergleich zu nicht behandelten Proben nicht vermehrt produziert. Diese Beobachtungen entsprechen der Reaktion von PBMCs auf LPS⁵³ in den ersten 24 Stunden.

Als nächstes untersuchten wir, ob die TNFR-Aktivierung durch 2xTNF-Bakterien den antitumoralen Effekt von Makrophagen auf Panc02 oder MC38 Zellen verstärkt. Dafür wurden murine Makrophagen mit Bakterien inkubiert und anschließend mit Tumorzellen co-inkubiert (Abbildung 11). Für MC38-Zellen konnte ein verstärkter zytotoxischer Effekt durch Makrophagen, die mit Bakterien inkubiert wurden, gezeigt werden. Dieser unterschied sich nicht zwischen Vehicle- und 2xTNF-Bakterien, und entspricht in etwa den Beobachtungen von Wei et al. in einem ähnlichen Experiment⁵⁴. Für Panc02-Zellen konnte kein verstärkter Effekt durch Inkubation mit Bakterien gezeigt werden. In einem unveröffentlichten Experiment konnten wir eine deutlich geringere Sensibilität von Panc02- im Vergleich zu MC38-Zellen auf lösliches TNF beobachten. Wir vermuten, dass die zusätzliche Zytotoxizität der Makrophagen nach Inkubation mit Bakterien TNF vermittelt ist und deshalb bei Panc02-Zellen nicht beobachtet wurde.

Insgesamt konnten wir *in vitro* nur bei MyD88/TRIF-KO Makrophagen eine zusätzliche biologische Funktion der 2xTNF-Bakterien gegenüber Vehicle-Bakterien nachweisen.

5.4 2xTNF-Bakterien verlängern Überleben von Panc02-Tumor tragenden Mäusen

Das hochkomplexe TME des PDAC lässt sich nur schwer *in vitro* nachbilden. Deshalb entschieden wir uns dazu, *in vivo* Versuche anzuschließen. Hierfür benutzen wir ein Mausmodell mit immunkompetenten Tieren und orthotropen Panc02-Tumoren.

Nach Anwachsen des Tumors wurden den Tieren Bakterien intraperitoneal gespritzt. Um das Wachstum der Bakterien verfolgen zu können, erhielten alle Tiere GLuc-Bakterien. Zusätzlich erhielten zwei weitere Gruppen 1xTNF- oder 2xTNF-Bakterien. Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben bei den zusätzlich mit TNF-Bakterien behandelten Mäusen im Vergleich zu den allein mit GLuc-Bakterien behandelten, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen 1xTNF- und 2xTNF-Bakterien (Abbildung 13) gab. Yoon et al. konnten mit Salmonellen, die rekombinantes TNF freisetzen, ähnliche Überlebensvorteile zeigen⁴¹.

5.5 I.p. Verabreichung von 2xTNF-Bakterien an Panc02-Tumor tragenden Mäuse ist sicher und führt zur Kolonisation des Tumors

Eine Limitation, die wir durch die Nutzung von Bakterien als Vektor für Therapeutika umgehen wollen, ist eine systemische Toxizität. Dafür ist es entscheidend, dass die Bakterien gezielt den Tumor besiedeln. Dieses Verhalten wurde unter anderem von Stritzker et al.²² beschrieben. Wir konnten immunhistochemisch das von den 2xTNF-Bakterien exprimierte Konstrukt im Tumor-, nicht aber im Milzgewebe der behandelten Mäuse nachweisen (Abbildung 14).

Weiter beobachteten wir bei den Mäusen makroskopisch keine Zeichen einer Entzündungsreaktion nach Verabreichung der Bakterien. Auch im Plasma konnten wir nach Bakteriengabe keine veränderten Zytokinlevel nachweisen (Abbildung 18).

Insgesamt schließen wir daraus, dass die Verabreichung von TNF-Bakterien in immunkompetenten Mäusen sicher ist. Diese Beobachtung passt zu denen anderer Forschenden, die ebenfalls mit vermehrungsfähigen Bakterien in murinen Modellen gearbeitet haben.

5.6 Mögliche Reaktion des Immunsystems

Da wir *in vitro* keinen zytotoxischen Effekt für die TNF-Bakterien zeigen konnten, erachteten wir eine veränderte Immunantwort als wahrscheinlichsten Grund für das verlängerte Überleben. Um diese Hypothese zu überprüfen, führten wir simple Tests mit aus dem Überlebensversuch gewonnenen Milzzellen sowie Serum durch. Für die Milzzellen konnten wir eine INF-γ Sekretion nach Reexposition mit Panc02-Zellen zeigen (Abbildung 15). Da keine Tiere der Kontrollgruppe bis zum Ende des Versuchs überlebten, fehlten frische Milzzellen dieser Gruppe, sodass die Aussagekraft dieser Beobachtung stark eingeschränkt ist.

Weiter wurde die B-Zell Antwort anhand von spezifischen Antikörpern im Serum untersucht. Hier konnten für alle Gruppen spezifische Antikörper nachgewiesen werden, allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 16 A+B). In einem zweiten Mausversuch konnten von drei Tieren Seren vor und nach der Behandlung mit Vehicle-, GLuc-Bakterien oder PBS gewonnen werden. Hier konnten Hinweise beobachtet werden, dass die Behandlung mit Bakterien mit einer verstärkten Antikörperproduktion einhergeht (Abbildung 16 C). Dies würde mit der bereits beschriebenen Funktion von FimH als Adjuvant⁵⁵ übereinstimmen. Hier benötigt es mehr Versuchstiere, um statistische Analysen zu ermöglichen.

Eine verstärkte Infiltration des Tumors durch CD8 positive T-Lymphozyten ist mit einem verbesserten Überleben assoziiert.^{56,57} Chen et al. zeigten für E.coli, die INF-γ freisetzen können, eine verstärkte Infiltration von Lebertumoren mit CD8 Zellen sowie eine erhöhte Zahl M1 Makrophagen.³⁷ In unserer FACS-Analyse konnten wir ebenso eine durchschnittlich höhere CD8-Infiltration in mit 2xTNF-Bakterien vorbehandelten Mäusen im Vergleich zu mit Vehicle-Bakterien Vorbehandelten beobachten (ca. 16 % vs. 8 %), allerdings war diese Beobachtung statistisch nicht signifikant (Abbildung 17). In Bezug auf die Differenzierung der Immunzellen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

In der Literatur wird TNF hier mit teils gegensätzlichen Eigenschaften beschrieben. So zeigten Dixit et al. beispielsweise eine Immunsuppression durch TNF-α vermittelte IL-33 Freisetzung⁵⁸, während Chopra et al. die Notwendigkeit von TNF-α und TNF-R1 für die Infiltration durch CD8-Zellen zeigten⁵⁹. Insgesamt konnten wir keine eindeutige Erklärung für das verlängerte Überleben ausmachen.

5.7 Limitationen dieser Arbeit

Der Gegenstand dieser Arbeit ist ein auf vermehrungsfähigen Bakterien basierender Therapieansatz. Damit gehen insbesondere im Vergleich zu herkömmlichen Arzneimitteln besondere Herausforderungen und Limitationen sowohl bei der *in vitro* als auch *in vivo* Testung einher.

5.7.1. Limitationen der *in vitro* Arbeit.

Die Biologie des PDAC ist, wie oben beschrieben, sehr komplex. Diese Komplexität lässt sich *in vitro* nicht nachbilden, sodass immer nur einzelne Komponenten untersucht werden konnten. Das Verhalten von Bakterien in diesem Umfeld kann stark vom Verhalten *in vivo* abweichen. Dies wurde beispielsweise von Stritzker et al. gezeigt, als sie eine von Kasinskas, Forbes et al. *in vitro* aufgestellte These zur Tumorinfiltration⁶⁰ *in vivo* eindrucksvoll widerlegen konnten.²⁶ Die im realen Tumor durch Nährstoffangebot, Immunzellen und andere Faktoren begrenzte Proliferation ist *in vitro* nicht gegeben, sodass eine künstliche Limitation des Wachstums durch Antibiotika erfolgen musste. Dies führt dazu, dass die *in vitro* genutzten

Bakterien-Konzentrationen stark von den *in vivo* vorherrschenden Konzentrationen abweichen können. Auch die *in vivo* vorhandene spezifische Verteilung der Bakterien innerhalb des Tumorgewebes²⁹ entfällt *in vitro*. In Kombination damit, dass die in dieser Arbeit verwendeten Vehicle-Bakterien Endotoxine und LPS freisetzen, ist das Bewerten der *in vitro* beobachteten Ergebnisse bezüglich Zytotoxizität und Immunaktivierung erschwert.

In Zukunft könnten die von den Bakterien präsentierten Proteine in eukaryotischen Zellen produziert werden. So könnte ein möglicher zusätzlicher, LPS und Endotoxin unabhängiger Effekt demaskiert werden.

5.7.2. Limitationen der *in vivo* Arbeit.

Durch das Verwenden von Mausmodellen können einige der *in vitro* vorhandenen Limitationen umgangen werden. Doch auch aus Mausmodellen gewonnene Erkenntnisse übersetzen sich nicht immer gut in klinischen Studien.³⁶

Die Anzahl der Mäuse und Käfige ist im Vergleich zur *in vitro* Arbeit stark begrenzt, Versuche brauchen mehr Zeit und sind aufwändiger. Da auch eine orale Aufnahme von E.coli zu Besiedlung des PDAC führen kann,²¹ können Versuchstiere nur käfigweise Bakterien-Interventionen zugeordnet werden.

Das in dieser Arbeit beobachtete verlängerte Überleben von mit 2xTNF-Bakterien behandelten Mäusen wurde nur im Vergleich zu Behandlung mit GLuc-Bakterien gezeigt. Ein zweiter Überlebensversuch, bei dem die Mäuse 2xTNF, Vehicle-, 1xTNF- oder GLuc-Bakterien oder PBS als Monotherapie erhielten, konnte aufgrund zu großer Varianz der durchschnittlichen Tumorgröße zwischen den Gruppen vor Behandlung nicht ausgewertet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchungen der Milzzellen und Antikörperkonzentration im Serum sind aufgrund fehlender Kontrollen von mit PBS oder Vehicle-Bakterien behandelten Tieren nicht statistisch belastbar. Hier benötigt es Versuche mit mehr Versuchstieren pro Gruppe sowie den Kontrollen.

Die mittels Durchflusszytometrie analysierte Tumorinfiltration wurde durch teils schlechte Qualität der Proben eingeschränkt. Hier könnte die gezielte Färbung von toten Zellen, beispielsweise mittels 7-Aminoactinomycin, helfen, falsch positive Färbungen von der Analyse auszuschließen.

5.8 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Erprobung einer neuen Immuntherapie auf der Grundlage genetisch veränderter Bakterien des Stammes E.coli untersucht. Zu diesem Zweck wurden von menschlichem TNF- α abgeleitete Fusionsproteine entwickelt und induzierbar in Bakterien exprimiert. Bakterien mit dem Konstrukt 2xTNF und 1xTNF verlängerten das Überleben von Mäusen mit syngenen und orthotopen Pankreaskarzinomen. Dies ist vergleichbar mit den veröffentlichten präklinischen Daten anderer bakterienvermittelter Immuntherapien. Die zugrundeliegenden Mechanismen konnten nicht aufgedeckt werden, da es bei der Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien auch zur Freisetzung von LPS und Endotoxine kommen kann, welche eine zusätzlich stimulierende Wirkung auf Immunzellen haben und so eine erhebliche Co-Aktivierung auslösen können. Es gibt jedoch Hinweise auf eine direkte Beeinflussung von Immunzellen durch rekombinante Proteine, obwohl dies aufgrund der Herstellungsmethode nicht eindeutig nachgewiesen werden kann. Um jedoch die Messung der Bioaktivität zu verbessern und eine Hintergrundaktivität durch mögliche prokaryotische Moleküle zu vermeiden, könnten die rekombinanten TNF- α -FimH-Proteine zukünftig auch in eukaryotischen Zellen hergestellt werden. Damit könnte ein möglicher Einfluss von LPS, Endotoxinen und weiterer störender Substanzen auf die Zielzellen verhindert werden. *In vivo* können die Versuche zur Tumorinfiltration mit mehr Tieren pro Gruppe sowie zusätzlichen Markern zur verbesserten Auswertbarkeit wiederholt werden. Falls sich so der Mechanismus für das verlängerte Überleben zeigen lässt, ist die Übertragung der Konstrukte in den E.coli Stamm Nissel1917 der nächste Schritt, sowie die orale Verabreichung der Bakterien anstatt der intraperitonealen Injektion. Langfristig ist die Testung der Bakterien in Kombination mit Chemo- und Immuntherapien geplant.

6. Literaturverzeichnis

- 1 European Cancer Information System. Estimates of cancer incidence and mortality in 2022. [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?0-0\\$1-AE27\\$2-All\\$4-1,2\\$3-All\\$6-0,85\\$5-2020,2020\\$7-8\\$CEstByCancer\\$X0_8-3\\$CEstRelativeCanc\\$X1_8-3\\$X1_9-AE27\\$CEstBySexByCancer\\$X2_8-3\\$X2_-1-1](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?0-0$1-AE27$2-All$4-1,2$3-All$6-0,85$5-2020,2020$7-8$CEstByCancer$X0_8-3$CEstRelativeCanc$X1_8-3$X1_9-AE27$CEstBySexByCancer$X2_8-3$X2_-1-1) (accessed Nov 26, 2024).
- 2 Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014; **74**: 2913–21. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- 3 Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022; **72**: 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>.
- 4 Martin-Perez E, Domínguez-Muñoz JE, Botella-Romero F, et al. Multidisciplinary consensus statement on the clinical management of patients with pancreatic cancer. *Clin Transl Oncol* 2020; **22**: 1963–75. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02350-6>
- 5 Schmidt-Hansen M, Berendse S, Hamilton W. Symptoms of Pancreatic Cancer in Primary Care: A Systematic Review. *Pancreas* 2016; **45**: 814–18. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000527>
- 6 Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* 2022; **163**: 386–402.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>.
- 7 Seufferlein T, Mayerle J, Boeck S, et al. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom – Version 3.1. *Z Gastroenterol* 2024; **62**: e874-e995. <https://doi.org/10.1055/a-2338-3533>
- 8 Sultana A, Smith CT, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Ghaneh P. Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 2607–15. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.2551>
- 9 Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2018; **379**: 2395–406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- 10 O'Reilly EM, Oh D-Y, Dhani N, et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2019; **5**: 1431–38. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1588>

- 11 Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, et al. Activity of Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial. *Gastroenterology* 2018; **155**: 29–32. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.03.029>.
- 12 Li J, Li W, Huang K, Zhang Y, Kupfer G, Zhao Q. Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward. *J Hematol Oncol* 2018; **11**: 22. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0568-6>
- 13 Herting CJ, Karpovsky I, Lesinski GB. The tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: current perspectives and future directions. *Cancer Metastasis Rev* 2021; **40**: 675–89. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09988-w>
- 14 Tape CJ, Ling S, Dimitriadi M, et al. Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocal. *Cell* 2016; **165**: 910–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.029>
- 15 Ullman NA, Burchard PR, Dunne RF, Linehan DC. Immunologic Strategies in Pancreatic Cancer: Making Cold Tumors Hot. *J Clin Oncol* 2022; **40**: 2789–805. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02616>
- 16 Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 2014; **25**: 719–34. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>.
- 17 Elyada E, Bolisetty M, Laise P, et al. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov* 2019; **9**: 1102–23. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0094>.
- 18 Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* 2015; **6**: 6744. <https://doi.org/10.1038/ncomms7744>
- 19 Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, et al. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell* 2012; **21**: 822–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.025>.
- 20 Dias Carvalho P, Guimarães CF, Cardoso AP, et al. KRAS Oncogenic Signaling Extends beyond Cancer Cells to Orchestrate the Microenvironment. *Cancer Res* 2018; **78**: 7–14. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2084>
- 21 Pushalkar S, Hundeyin M, Daley D, et al. The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression. *Cancer Discov* 2018; **8**: 403–16. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1134>
- 22 Stritzker J, Weibel S, Hill PJ, Oelschlaeger TA, Goebel W, Szalay AA. Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in live mice. *Int J Med Microbiol* 2007; **297**: 151–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.008>

- 23 Min J-J, Kim H-J, Park JH, et al. Noninvasive real-time imaging of tumors and metastases using tumor-targeting light-emitting Escherichia coli. *Mol Imaging Biol* 2008; **10**: 54–61. <https://doi.org/10.1007/s11307-007-0120-5>
- 24 Ganai S, Arenas RB, Sauer JP, Bentley B, Forbes NS. In tumors Salmonella migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis. *Cancer Gene Ther* 2011; **18**: 457–66. <https://doi.org/10.1038/cgt.2011.10>.
- 25 Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* 2017; **357**: 1156–60. <https://doi.org/10.1126/science.aah5043>
- 26 Stritzker J, Weibel S, Seubert C, et al. Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**: 449–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.02.004>
- 27 Quispe-Tintaya W, Chandra D, Jahangir A, et al. Nontoxic radioactive Listeria(at) is a highly effective therapy against metastatic pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 8668–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211287110>
- 28 Leschner S, Westphal K, Dietrich N, et al. Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF-alpha. *PLoS One* 2009; **4**: e6692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006692>
- 29 Galeano Niño JL, Wu H, LaCourse KD, et al. Effect of the intratumoral microbiota on spatial and cellular heterogeneity in cancer. *Nature* 2022; **611**: 810–17. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05435-0>
- 30 Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 2018; **359**: 91–97. <https://doi.org/10.1126/science.aan3706>
- 31 Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science* 2021; **371**: 595–602. <https://doi.org/10.1126/science.abf3363>
- 32 Riquelme E, Zhang Y, Zhang L, et al. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell* 2019; **178**: 795-806.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.008>
- 33 Cheng K, Zhao R, Li Y, et al. Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination via Plug-and-Display technology. *Nat Commun* 2021; **12**: 2041. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22308-8>
- 34 Kim OY, Park HT, Dinh NTH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. *Nat Commun* 2017; **8**: 626. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00729-8>

- 35 Fritz SE, Henson MS, Greengard E, et al. A phase I clinical study to evaluate safety of orally administered, genetically engineered *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for canine osteosarcoma. *Vet Med Sci* 2016; **2**: 179–90. <https://doi.org/10.1002/vms3.32>
- 36 Gniadek TJ, Augustin L, Schottel J, et al. A Phase I, Dose Escalation, Single Dose Trial of Oral Attenuated *Salmonella typhimurium* Containing Human IL-2 in Patients With Metastatic Gastrointestinal Cancers. *J Immunother* 2020; **43**: 217–21. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000325>
- 37 Chen Y, Du M, Yuan Z, Chen Z, Yan F. Spatiotemporal control of engineered bacteria to express interferon- γ by focused ultrasound for tumor immunotherapy. *Nat Commun* 2022; **13**: 4468. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31932-x>
- 38 Nuyts S, van Mellaert L, Theys J, et al. Radio-responsive recA promoter significantly increases TNFalpha production in recombinant clostridia after 2 Gy irradiation. *Gene Ther* 2001; **8**: 1197–201. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301499>
- 39 Samadi M, Majidzadeh-A K, Salehi M, et al. Engineered hypoxia-responding *Escherichia coli* carrying cardiac peptide genes, suppresses tumor growth, angiogenesis and metastasis in vivo. *J Biol Eng* 2021; **15**: 20. <https://doi.org/10.1186/s13036-021-00269-2>
- 40 Guo F, Das JK, Kobayashi KS, et al. Live attenuated bacterium limits cancer resistance to CAR-T therapy by remodeling the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* 2022; **10**. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003760>
- 41 Yoon WS, Chae YS, Hong J, Park YK. Antitumor therapeutic effects of a genetically engineered *Salmonella typhimurium* harboring TNF- α in mice. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; **89**: 1807–19. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3006-4>
- 42 Tchesnokova V, Aprikian P, Kisiela D, et al. Type 1 fimbrial adhesin FimH elicits an immune response that enhances cell adhesion of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2011; **79**: 3895–904. <https://doi.org/10.1128/IAI.05169-11>
- 43 Chmielewski M, Kuehle J, Chrobok D, Riet N, Hallek M, Abken H. FimH-based display of functional eukaryotic proteins on bacteria surfaces. *Sci Rep* 2019; **9**: 8410. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44883-z>
- 44 Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; **214**: 149–60. <https://doi.org/10.1002/path.2287>
- 45 Medler J, Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets* 2019; **23**: 295–307. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1586886>
- 46 Pasparakis M. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; **184**: 1397–411.

- 47 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; **114**: 181–90. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00521-X)
- 48 Lu W, Chen Q, Ying S, et al. Evolutionarily conserved primary TNF sequences relate to its primitive functions in cell death induction. *J Cell Sci* 2016; **129**: 108–20. <https://doi.org/10.1242/jcs.175463>
- 49 Androulidaki A, Wachsmuth L, Polykratis A, Pasparakis M. Differential role of MyD88 and TRIF signaling in myeloid cells in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *PLoS One* 2018; **13**: e0194048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194048>
- 50 Verstrepen L, Bekaert T, Chau T-L, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 2964–78. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8064-8>
- 51 Reynoso M, Hobbs S, Kolb AL, Matheny RW, Roberts BM. MyD88 and not TRIF knockout is sufficient to abolish LPS-induced inflammatory responses in bone-derived macrophages. *FEBS Lett* 2023; **597**: 1225–32. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14616>
- 52 Mamat U, Woodard RW, Wilke K, et al. Endotoxin-free protein production—ClearColi™ technology. *Nat Methods* 2013; **10**: 916. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.367>
- 53 Iwadou H, Morimoto Y, Iwagaki H, et al. Differential cytokine response in host defence mechanisms triggered by gram-negative and gram-positive bacteria, and the roles of gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor. *J Int Med Res* 2002; **30**: 99–108. <https://doi.org/10.1177/147323000203000201>
- 54 Wei B, Pan J, Yuan R, et al. Polarization of Tumor-Associated Macrophages by Nanoparticle-Loaded Escherichia coli Combined with Immunogenic Cell Death for Cancer Immunotherapy. *Nano Lett* 2021; **21**: 4231–40. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c00209>
- 55 Zhang W, Xu L, Park H-B, et al. Escherichia coli adhesion portion FimH functions as an adjuvant for cancer immunotherapy. *Nat Commun* 2020; **11**: 1187. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15030-4>
- 56 Gorchs L, Fernández-Moro C, Asplund E, et al. Exhausted Tumor-infiltrating CD39+CD103+ CD8+ T Cells Unveil Potential for Increased Survival in Human Pancreatic Cancer. *Cancer Res Commun* 2024; **4**: 460–74. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-23-0405>
- 57 Tushoski-Alemán GW, Herremans KM, Underwood PW, et al. Infiltration of CD3+ and CD8+ lymphocytes in association with inflammation and survival in pancreatic cancer. *PLoS One* 2024; **19**: e0297325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297325>

- 58 Dixit A, Sarver A, Zettervall J, et al. Targeting TNF- α -producing macrophages activates antitumor immunity in pancreatic cancer via IL-33 signaling. *JCI Insight* 2022; **7**.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.153242>
- 59 Chopra M, Lang I, Salzmann S, et al. Tumor necrosis factor induces tumor promoting and anti-tumoral effects on pancreatic cancer via TNFR1. *PLoS One* 2013; **8**: e75737.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075737>
- 60 Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res* 2007; **67**: 3201–09.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2618>

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des FimH-Displays ⁴³	15
Abbildung 2 Layout für die Tumorzelllinie-Bakterien Co-Kultur	30
Abbildung 3 Design der in dieser Arbeit verwendeten FimH-Displays.....	36
Abbildung 4 Gelelektrophorese des Restriktionsverdau.....	37
Abbildung 5 Nachweis von cMyc in Bakterienkulturüberständen	38
Abbildung 6 Stark vereinfachte Darstellung des NFkB-Signalwegs und MAPK-Signalwegs .	39
Abbildung 7 Untersuchung der Aktivierung des NFkB-Signalwegs	40
Abbildung 8 Zytokinproduktion humaner PBMCs.....	41
Abbildung 9 Proliferations- und Zytotoxassays mit Bakterienkulturübeständen	42
Abbildung 10 Zytotoxizität in Bakterien-Tumorzell-Ko-Kultur	43
Abbildung 11 Makrophagen-Co-Kultur.....	44
Abbildung 12 Übersicht über den Ablauf der in- und ex-Vivo Versuche	45
Abbildung 13 Überleben Panc02-Tumor tragende Mäuse nach Behandlung mit Bakterien ..	46
Abbildung 14 Histochemische Färbung von Tumor- und Milzgewebe.....	47
Abbildung 15 Untersuchung der T-Zell-Antwort	48
Abbildung 16 Untersuchung der B-Zell-Antwort.....	49
Abbildung 17 Infiltration des Tumorgewebes durch Zellen des Immunsystems	51
Abbildung 18 Zytokine im peripheren Blut	53

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der Verschiedenen Konstrukte (nach Lu et al.)	37
Tabelle 2: Statistische Auswertung des Versuchs in Abbildung 18	54

7.3. Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Konstrukte

Konstrukt	Sequenz
1xTNF	taatacgactcaataggaaatttgtgagcgataacaattccctctagaataattttgttaacttaagaaggagataaccatggtaggttattaccctgttgctgtactgctgtatggctggcgtaatgcctggtcactccaccacaccatcagccgcatgccgtctccaccagaccaaggtaacccctctccggggggggggtagtgggggtggaggatccgaacagaaaactgattagcagaagaagatctggagcaaaagttaatatccgaggaggacttagccgttagcggcttcgcctgtaaaaccgccaatggcaccgctatccctattggcggtggcagcgccaatgttatgtaaa

	<p>cctctgacttgcgtcgattttgtatgcgtcggggggcgagccatggaaaaacgccagaacgcggcc ttttacggttccggcccttgcgtggccttgcacatgttccgttatcccgtattctgtggataaccgtattacc gccttgagttagtgcgtacccgtcgcccgagccgaacgaccgagcgcagcagtcgtgagcggagaaagcg gaagagcgccgtatgcgtatccctacgcacgtgcggatattcacaccgcataatggcactctcagtaca atctgcgtatgcgtccatagccatgttaagccagtataactccgtatcgactgtgactgggtcatggctgcggccccac acccgccaacacccgctacgcgcctgacgggtgtcgatcccgatccgttacagacaagctgtgacc tctccggagctgcgtatgtcagagggtttcaccgtatccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaagctcatc agcgtggcgtgaagcgattcacagatgtgcgttcatccgcgtccagtcgtgagttctccagaagcgtaat gtctggctctgataaagcggccatgttaaggcggtttctgttggtcaactgatgcctccgttaaggggatt ctgttcatggggtaatgataccgtgaaacgagagaggatgtcgtacgcatacggtactgtatgatgacatgccc ggttactggaacgtgtgaggtaaacaactggcggtatggatgcggcggaccagagaaaaatcactcagg caatgccagcgctcgtaatacagatgttaggttccacaggtagccagcagcatccgtcgatgcagatccgga acataatggtcagggcgctgactccgcgttccagacttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgtt gctcaggcgcagacgttgcagcagcagtcgttccatccgcgtatcggtattcattctgtaaccagtaa ggcaaccccgccagcctagccgggtcccaacgcacaggagcagcatgcgcacccgtggcaggaccaa cgctgcccagatgcgcgcgtgcggctgctggagatggcgacgcgtatggatgttgcgaagggtgggt cgcattcacagttccgcagaattgttaggttcccaattctggatgttgcgtatccgttagcggccggcgtt ccattcaggtcgaggtggccggctccatgcaccgcacgcacgcgggagggcagacaaggatagggcgg cgcctacaatccatgccaacccgttccatgtgtccgcgaggcggataaatgcgcgtacgatcaggcgtcag tgatcgaagttaggctgtaagagccgcagcgtatccgttgcgttgcgtatgttgcgtcatctacccgtggac agcatggcctgcaacgcggcatccgtccgcggaaagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt cctcgcgtcgcaacgcgcagcaagacgttagccagcgcgtccgcgtccatgcggcgtataatggcctgc gccgaaacgttggtggcggaccagtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt gacaggccgtatcgtcgctccagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt gtcctacgagttgcgtataaagaagacagtataactgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt gagctgactgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt tgctgtcgctactgcccgttccagtcggaaacctgtcgccagtcgttgcgttgcgttgcgttgcgt ggagaggcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt accgcctggccctgagagagttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt gtggtaacggcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt cagcccgactcggtatggcgccatgcgcgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt cgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt ctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt cgctaacagcgcatggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt aaaataactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt cagcaatggcatccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt cggccgttacaggctcgacgcgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt</p>
--	--

	atcgaggaccgaaggagctaaccgcctttgcacaacatggggatcatgtactgcctgatcggtggaaacc ggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgtgcg caaactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagt caggaccactctgcgctggccctccggctggctggatttgctgataaaatctggagccggtagcgtgggtctc gcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctccgtatctgtagttatcacacgacggggagtcaggc aactatggatgaacgaaatagacagatgcgtgagataggcctactgattaagcattgtactgtcagaccaa gtttactcatatatacttttagattgattaaaacttcattttaaataaaaggatctaggtgaagatccctttgataatctcat gaccaaaaatccctaactgtgagttcgccactgagcgtcagacccctgtagaaaagatcaaaggatctctgag atcccttttctgcgctaactgtgctgcaaaacaaaaaccaccgctaccagcggtggttgcggatcaa gagctaccaactctttccgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaaatactgtcctctagtgtagcc tagttaggccaccactcaagaactctgttagcaccgcctacatcctgcctgctaattctgttaccagtggctgctg ccagtgccgataagtctgttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggcggct gaacgggggggtcgtcacacagcccagctggagcgaacgacccactacccgaaactgagataacctacagcgt gctatgagaaagcgccacgctccgaaggagaaaggcggacaggatccgtaagcggcagggtcgaa caggagagcgcacgaggagctccagggggaaacgcctggatcttatactgtcctgtggccaccc acttgagcgtcgatttgtatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttac ggttccctggcccttgctggcccttgctcacatgttccctgcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctt gagttagtgcataccgcctcgccgcagccaaacgaccgagcgcagcgtcgttagcgtgaggaaagcgg gcccgtatgcggatttccctacgcacatgtgcggatttcacaccgatataggcactctcagtaatctgt ctgtgcgcatagttaagccagtatacactccctatcgctacgtgactgggtcatggcgcgccccgacaccc ccaacacccgctgacgcgcctgacggctgtcgtcccgatccgcttacagacaagctgtaccgtctcc ggagctgcattgtcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcgttaaagctcatcagcgt ggcgtgaagcgattcacagatgtcgcctgtcatccgcgtccagctcgttagttctccagaagcgttaatgtcgg cttctgataaagcggccatgttaagggcggtttccctgttggactgtgcctccgtgtaaaggggattctgtca tggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggtactgtatgatgacatgcggcttact gaaacgttgtgaggtaaacaactggcgtatggatgcggcggaccagagaaaaactcactcagggtcaatgc cagcgcctcgtaatacagatgttaggttccacaggtagccagcagcatcctgcgtatgcgcgatccggaacataa tggcgcaggcgctgactccgcgttccagacttacgaaacacggaaacccgaaagaccattcatgttgtcag gtcgcagacgtttgcagcagcgtcgctcacgttcgcgtatcggtattctgtctaaccagtaaggcaa ccccccgcacccctagccgggtcctcaacgacagaggcagcatgcgcacccgtggccaggaccacgc cccgagatgcgcgcgtcggctggagatggcggacgcgtatgtcccaagggtgggttgcgcatt cacagttctccgcaagaattgatggctcaattctggagtggtgaatccgttagcgtggacatggccggcttccattc aggtcgaggtggcccgctccatgcaccgcacgcaacgcggggaggcagacaaggatagggcggcc acaatccatgccaacccgttccatgtgcgcgaggcggcataaatgcgcgtacgatcagcggccatgt gaagttaggctggtaaagagccgcagcgtatcctgttagctggatggcgtatccgttagcgtggacagcat ggcctgcacgcggccatccgcgtccgcggaaagcgtggacagaaatcataatggggaaaggccatccgc cgtcgcaacgcgcagcaagacgtagccagcgcgtccgcgcataatggcctgcttcgcgcga
--	---

	<p> gctgacagttgacgcgcaacggtagattccagcgaataacacggatcgtaggaggacttcgg cggtgagtctggattaacggcaaattatgcacgtaccggagggcaggtgactgcagggaatgtcaatcgattat tggcgtactttgttatcaataatgatcccgctctaacaagccgaaaggaagctgagttggctgctgccacc gctgagcaataactagcataaccctggggcctctaaacgggtctgaggggttttgcgaaaggaggaactat atccggatatcccgcaagaggcccggcagtagccgcataaccacgcctatgcctacagcatccagggtgacgg gccgaggatgacgatgagcgcatttagttacatcgcctgactgcgttagcaattactgtgataact accgcattaaagcttatcgatgataagctgtcaaacatgagaattctgaagacgaaaggcctgtgatgcct atttataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcactttcggggaaatgtgcgcggAACCC tattttttatttctaaatacattcaaaatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcctcaataatattgaa aaaggaagagatgatgatgatcaacattccgtgcgccttattccctttgcggcatttgccctgttttgcacc cagaaacgcgtggaaagtaaaagatgctgaagatcagttggcgcacgactgggtacatcgaactggatctca acagcggtaagatcctgagagtttcgcggcaagaacgtttccaatgatgagcactttaaagttctgtatgtgg cgccgtattatccgtgtgacgcggcaagagcaactcggcgcgcataactattctcagaatgactgg agtactcaccagtacagaaaagcatctacggatggcatgacagaattatgcagtgcgcataacca ttagtgcataactcgcggcaacttactctgacaacgcgtcgaggaccgaaggagctaccgcctttgcacaa catggggatcatgtaactcgcctgatcgtggaaaccggagctgaatgaaaggccataaccaacgcgacgcgt acaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcaactacttactctagctcc gcaacaattaatagactggatggaggcgataaagtgcaggaccactctgcgcctccggctggctgg tttattgctgataaatctggagccggtagcgtggctcgcgatcattgcagactggccagatggtaagcc ctcccgatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaaacgaaatagacatgcgt aggtgcctactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgataaaactt aattaaaaggatctaggtaagatccctttgataatctcatgacaaaatccctaactgagtttcgttccactgag cgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttgcgatcgttttgcgcgtatctgcgttgcacaaa aaaaccaccgcgtaccagcggtagtttgcggatcaagagctaccaactcttccgaaggtaactggctc cagagcgcagataccaaatactgtcctctagtgtagccgttaggcaccactcaagaactctgttagcacc ctacataccgcgtctgtaatccgttaccagtggctgcgcgtggcgtacgtgttaccgggttggactca agacgatagttaccggataaggcgcagcggcggctgaacgggggtcgtgcacacagccagctgg gaacgacactacccgaactgagataacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcggagctcc aggcggacaggatccgtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggagctccagg ggcgtatccctgattctgtggataaccgtattaccgccttgagtgagctgataccgc gagcgcagcggactgagtgagcggagaaagcggagcgcctgtgcgttaccgc atttcacaccgcataatgtgcactctcgttacatctgtatgcgcata cgctacgtactggcatggctgcgcggcgcacaccgc tccggcatccgttacagacaagctgtgaccgc aaacgcgcaggcagctgcgttaagctcatcagcgtggcgtga </p>
--	---

cgtccagctcgtagtttccagaagcgtaatgtctggctctgataaagcgggccatgttaagggcgttttcct
 gtttgtcaactgtgcctccgttaaggggattctgtcatggggtaatgataccgtaaacgagagaggat
 ctacgatacgggtactgtatgatgaacatgcccggtaactggacgttgaggtaacaactggcgatggat
 gcggcgggaccagagaaaaatcactcaggtaatgccagcgctcgtaatacagatgttaggttccacagg
 gttagccagcagcatcctgcgtgcagatccgaacataatggtcagggcgtgacttccgcgttccagactta
 cgaaacacgaaaccgaagaccattcatgttgtcaggtcgacacgtttcagcagcagtcgctcacgttc
 gctcgctatcggtattctgctaaccagtaaggcaaccccccagcctagccgggtcctaaccgacagga
 gcacgatcatgcgcaccgtggccaggacccaacgctgcccagatgcgcgcgtgcggctgtggagatggc
 ggacgcgtggatatgttgc当地aggggtgggtgcgcattcacagtctcccaagaattgatggctccaattctg
 gagtggtaatccgttagcgaggtggccggcttcattcaggtaggtggccggctccatgcaccgcgac
 caacgcgggaggcagacaaggtaatggcggcgcctacaatccatgccaaccgttccatgtgcgcgag
 gccgcataaatcgccgtacgatcagcgtccagtgtcaagttaggctggtaagagccgcagcgtatcc
 agctgtccctgtggcgatctacctgcctggacagcatggcctgcaacgcggcatccgatgcgcggaa
 gcgagaagaatcataatgggaaggccatccagcctgcgtgcgaacgcccagcaagacgttagccagcgc
 gtcggccgcataatggccgataatggcttcgcggaaacgtttggcgccggaccagtgcgaaggcttgc
 agcgagggcgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccatcgtcgctccagcgtaaagcggcc
 tcgcccggaaatgacccagagcgctgccccccaccggaaaggagactgactgggtgaaggctcaaggcatcg
 ggcacgatagtcatgcggccgcggccaccggaaaggagactgactgggtgaaggctcaaggcatcg
 gatcccggtgcctaattgactgatgacttacattaaattgcgttgcgtactgcccgttccagtcggaaacctgt
 cgtccagctgcattaaatgatggccaaacgcgcggggagaggcgggttgcgtattggcgccagggtggtttct
 ttaccaggtagacggcaacagctgattgccttcaccgcctggccctgagagatgtcagcaagcggcc
 gctgggttgcggcaggcggaaaatcctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gtcgtatccactaccgagatattccgcaccaacgcgcagccggactcgtaatggcgcgttgcgttgcgttgc
 ccatctgatcggttgcaccaggcatcgcatcgcatggggacatgcgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acatggcactccagtcgcctccgttccgtatcggtgaatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acgcagacgcgcggagacagaacttaatggccgcataacagcgcatcgatcggttgcgttgcgttgcgttgc
 tgctccacgcccagtcgcgtaccgttcatgggagaaaataataactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aaataacgcggaaacatttagtgcaggcagctccacagcaatggcatcgatcggttgcgttgcgttgcgttgc
 agcccactgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 caccaccacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ccagactggggggcaacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 attcagctccgcattcgccgttccactttccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acggctgtataagagacaccggcatactctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctctctccggcgctatcatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gcatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc

	gctcatgagccccgaagtggcgagcccgcattcccccattcgtatgtcgccgatataaggcgccagcaaccgcac ctgtggcgccggatgcggccacgcgtccggtagaggatcgagatctcgatcccgaaat
GLuc	taatacgaactcaactataggggaaattgtgagcggtacaataccctctagaataattttttaacttaagaagga gatataccatggtacgagtttaccctgtttgtactgtatgggtggtcggtaatgcctggtaatgaaacc aactgaaaacaatgaagattcaacattgttagctgttagctacaacccgtatctcgatgtgaccgt gtaaattggccggaaaaaaattaccacttgaggtactcaaagaatttggaaagccatgttaggaaagctggctgca ctagggatgtctgatgcctgcacacatcaagtgtacacccaaatgaagaagtttatccaggaagatgcca cacctatgaaggagacaaagaaagtgcacaggaggaataggagaggctattgtgacattccctgaaattctg ggttaaggatttggaaacccttggaaacaattcattgcacaagttgacactatgttagactgcacaactggatgcctca aaggctgccaatgtcaatgttctcattactcaagaaatggctgcacaaagatgtcaactttgttagcaaaat tcaaggccaagtggacaaaataaagggtgccgggtgatttcgcctgtaaaaccgccaatggcaccgtatccc tattggccgtggcagcgcacatgtttagttaaaccttgcgcggcgtgatgtggggcaaaacctggctgatct ttcgacgcaaatcttgcataacgattatccggaaaccattacagactatgtcactgcacacgaggctggctta tggccggcgttataattcgagaacggataagccgtggccgggtggcgtttattgacgcctgtgagcagtgcggc gggtggcgattaaagctggctattaattgcgttatttgcacagaccaactataacagcgatgattc cagtttgttggaaatattacgccaataatgttgggtggctactggcggctgcgtatgttctgctgtatgtcacc gttactctggactaccctggcgtttagtgcacattccttaccgttattgtcgaaaagccaaaacctgggttatta cctctccggcacaaccgcacatgcggcaactcgatttcacaataccgcgtgtttcacctgcacaggcgtcg gcgtacagtgcgcacggtacgattccagcgaataacacggatcgatgttctgctgtatgtcacc cggtgagtctggattaacggcaattatgcacgtaccggagggcaggtgactgcagggatgtcaatcgattat tggcgtacttttttatcaataatgtatccggctgtaacaaagccgaaaggaagctgagttggctgctgccacc gctgagcaataactcgatcccccatttggggcctctaaacgggtcttgggggttttgcgtggaaaggaggaactat atccggatcccgcaagaggccggcagtaccggcataaccaacgcctatgcctacagcatccagggtacgg gccaggatgcgtggcatttttgcgtttagatttcatacaccgtgcgtactgcgttagcaatttaactgtgatataact accgcattaaagcttatcgatgataagctgtcaacatgagaattctgaagacgaaaggccctgtatgcct attttataggttaatgtcatgataataatggttttagacgtcagggtggcactttcggggaaatgtgcgcggaaaccc tattgttttttctaaataatcattcaaatatgtatccgtcatgagacaataaccctgataatgttcaataatattgaa aaaggaagagtatgatgatcaacattccgtgcgccttattcccttttgcggcatttgcctcgttttgcacc cagaaacgcgtggtaaagtttgcggccatgcgtggatgcggcactttccaaatgtgagcactttaaagttctgtatgt acagcgtaagatccgtggatgcggcactttccgtgcgccttattcccttttgcggcatttgcctcgttttgcacc cgccgtattatccgtgtgcgcggcaagagcaactcggtgcgcatacactattctcagaatgcgttgcgt agtactcaccagtacagaaaagcatctacggatggcatgacagtaagagaattatgcgttgcgtccataacca tgagtgataacactgcggccaacttacttcgtacaacgcgttgcggaggaccgaaggagctaaccgcgttgc catggggatcatgtacttcgttgcgttgcggcatttgcggcatttgcctcgttttgcacc acaccacgtgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaacttactggcgtacttacttcgttgc gcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttcgtgcgtccgttccggctggctgg

tttattgctgataaaatctggagccggtgagcgtggtctcgccgtatcattgcagcactggggccagatggtaagcc
ctcccgtagtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagat
aggtgcctcactgattaaggcatggtaactgtcagaccagaatgttactcatatatacttttagattgattaaaacttcatttt
aattaaaaggatctaggtgaagatccctttgataatctcatgaccaaaatccctaacgttagtttcgttccactgag
cgtcagacccctagaaaaagatcaaaggatcttctgagatccctttctgcgctaactgctgctgcaaacaaa
aaaaccaccgctaccagcgggttttgcggatcaagagactaccactctttccgaaggtaactggcttag
cagagcgcagataccaaatactgtcctctagttagccgttaggccaccactcaagaactctgttagcaccgc
ctacatacctcgctgctaattctgttaccagtggctgctgccagtgccgataagtctgttaccgggttggactca
agacgatagttaccggataaggcgcagcggtcggctgaacgggggttcgtcacacagcccagctggagc
gaacgacctacaccgaactgagataccctacagcgttagttagaaagcgcacgcgttccgaaggagaa
aggcggacaggtatccgtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggagctccagggggaaa
cgccctggatcttatagtcctgtcgggttcgcaccctctgacttgagcgtcgatttgtatgctgtcagggggcg
gagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttacggttcgccttgcgccttgcacatgttcttgc
gcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgccttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaaacgacc
gagcgcagcagtcgtgactgagcggagaaagcggaaagagcgcctgatgcgttgcgtatttctcctacgcacatgtgcgg
atttcacaccgcataatgtgcactctcagtacaatctgtatgcgcatagttaagccagtataactccgtat
cgctacgtgactgggtcatggctgcggccggacacccgcacacccgcgtacgcgcctgacgggttgtctgc
tcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtcgcggagctgcgttgcagagggttcaccgtcatcacc
aaacgcgcaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggcgtgaagcgttgcacagatgtcgcctgttcatcc
cgccagctcggttagttccagaagcgttaatgtctggcttgcataaagcggccatgttaagggcggtttcc
gttggactgtgcctccgttaaggggattctgttcatggggtaatgataccgtgaaacgagagaggatg
ctcacgatacgggtactgtatgatgaaacatgcgggtactggacgttgagggtaaacaactggcggtatggat
gcggcgaccagagaaaaatcactcagggtcaatgcgcgttgcgttgcacagttccagactt
cgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgcgtcaggcgttgcagcgttgcacgcgttgcacgtt
gctcgctatcggtattctgtcaaccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
gcacgatcatgcgcaccgtggccaggacccaacgcgtcccgagatgcgcgcgtgcggctgtggagatgg
ggacgcgtatggatgttctgccaagggtgggttcgcattcacagtctccgcaagaattgttgcgttgcgttgcgtt
gagtggtaatccgttagcgggtgcgcggcttccattcaggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
caacgcggggaggcagacaaggatagggcgccctacaatccatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
gcggcataaatgcgtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
agctgtccctgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
gcgagaagaatcataatgggaaggccatccaggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
gtcggccatgcggcgataatggctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
agcgagggcggtcaagattccgaataccgcaagcgcacaggccatcgtcgcgttgcgttgcgttgcgtt
tcgcccggaaatgacccagagcgtccggcaccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
ggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt

