

Aus dem  
Pathologischen Institut  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen

**Die Rolle der MikroRNA Mir34a in Tumor-assoziierten Makrophagen  
beim Kolitis-assoziierten Kolorektalkarzinom**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Janine Anna König

aus  
Marktredwitz, Deutschland

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. Heiko Hermeking

Zweitgutachter: Prof. Dr. Vigo Heissmeyer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. September 2025



Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

König, Janine Anna

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Die Rolle der MikroRNA Mir34a in Tumor-assoziierten Makrophagen beim Kolitis-assoziierten  
Kolorektalkarzinom**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 19.09.2025

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

Janine König

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin/Doktorand

## Affidavit



Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



### Eidesstattliche Versicherung

König, Janine Anna

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Die Rolle der MikroRNA *Mir34a* in Tumor-assoziierten Makrophagen  
beim Kolitis-assoziierten Kolorektalkarzinom**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 19.09.2025

Ort, Datum

Janine König

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                   |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Affidavit .....</b>                                                                                            | <b>I</b>   |
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>                                                                                   | <b>II</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                                                | <b>III</b> |
| <b>Publikationsliste .....</b>                                                                                    | <b>IV</b>  |
| <b>1. Ihr Betrag zu den Veröffentlichungen .....</b>                                                              | <b>V</b>   |
| 1. Beitrag zu Paper I.....                                                                                        | V          |
| 2. Beitrag zu Paper II.....                                                                                       | V          |
| <b>2. Einleitung .....</b>                                                                                        | <b>1</b>   |
| 2.1 Krebs.....                                                                                                    | 1          |
| 2.1.1 Das Kolorektalkarzinom .....                                                                                | 3          |
| 2.1.2 Mausmodelle des Kolorektalkarzinoms .....                                                                   | 4          |
| 2.2 Das Immunsystem.....                                                                                          | 6          |
| 2.2.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem .....                                                              | 6          |
| 2.2.2 Die Tumormikroumgebung.....                                                                                 | 7          |
| 2.2.3 Die Rolle von Makrophagen bei Tumorerkrankungen .....                                                       | 10         |
| 2.3 Die Rolle des Koloniestimulierenden Faktor 1 Rezeptors (CSF1R) im<br>Zusammenhang mit Tumorerkrankungen ..... | 12         |
| 2.4 Die p53-induzierbare MikroRNA miR-34a .....                                                                   | 14         |
| 2.5 Ziele der Promotionsarbeit .....                                                                              | 16         |
| <b>3. Zusammenfassung .....</b>                                                                                   | <b>17</b>  |
| <b>4. Summary (English) .....</b>                                                                                 | <b>20</b>  |
| <b>5. Paper I.....</b>                                                                                            | <b>23</b>  |
| <b>6. Paper II.....</b>                                                                                           | <b>24</b>  |
| <b>7. Literaturverzeichnis .....</b>                                                                              | <b>25</b>  |
| <b>8. Danksagung.....</b>                                                                                         | <b>38</b>  |

## Abkürzungsverzeichnis

|             |                                                                                                                          |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AOM         | <u>A</u> zo <u>x</u> y <u>m</u> ethan                                                                                    |
| BMDMs       | <u>B</u> one- <u>m</u> arrow <u>d</u> erived <u>m</u> acrophages<br>aus dem Knochenmark stammende Makrophagen            |
| Csf1r/CSF1R | <u>C</u> olony- <u>s</u> timulating <u>F</u> actor <u>1</u> <u>r</u> eceptor<br>Kolonie-stimulierender Faktor 1 Rezeptor |
| Csf1/CSF1   | <u>C</u> olony- <u>s</u> timulating <u>F</u> actor <u>1</u><br>Kolonie-stimulierender Faktor 1                           |
| DSS         | <u>D</u> extran <u>s</u> odium <u>s</u> ulfate<br>Dextran-Natriumsulfat                                                  |
| KRK         | <u>K</u> olorektalk <u>a</u> rzin <u>o</u> m                                                                             |
| KAK         | <u>K</u> olitis- <u>a</u> ssoziiertes <u>K</u> olorektalkarzin <u>o</u> m                                                |
| miRNA       | <u>M</u> ikro <u>R</u> NA                                                                                                |
| RNA         | <u>R</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid<br>Ribonukleinsäure                                                            |
| ROS         | <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies<br>reaktive Sauerstoffspezies                                            |
| TAMs        | <u>T</u> umor- <u>a</u> ssoziierte <u>M</u> akrophagen                                                                   |
| TME         | <u>T</u> umor- <u>m</u> icro <u>e</u> nvironment<br>Tumor-Mikroumgebung                                                  |
| CU          | <u>C</u> olitis <u>u</u> lcerosa                                                                                         |

## Publikationsliste

1. *Csf1r* mediates enhancement of intestinal tumorigenesis caused by inactivation of *Mir34a*

Fangteng Liu, Nassim Bouznad, Markus Kaller, Xiaolong Shi, **Janine König**, Stephanie Jaeckel, Heiko Hermeking. *Csf1r* mediates enhancement of intestinal tumorigenesis caused by inactivation of *Mir34a*. International Journal of Biological Sciences. 2022 Aug 29;18(14):5415-5437. Doi: 10.7150/ijbs.75503.

2. Myeloid *Mir34a* suppresses colitis-associated colon cancer: characterization of mediators by single-cell RNA sequencing

**Janine König**, Matjaz Rokavec, Meryem Gülfem Öner-Ziegler, Ye Fei, Heiko Hermeking. Myeloid *Mir34a* suppresses colitis-associated colon cancer: characterization of mediators by single-cell RNA sequencing. Cell Death and Differentiation. 2025 Feb;32(2):225-241. Doi: 10.1038/s41418-024-01380-9. Epub 2024 Oct 18.

## 1. Ihr Betrag zu den Veröffentlichungen

### 1.1. Beitrag zu Paper I

Meine Beteiligung an dieser Veröffentlichung bestand darin, den durch PCR amplifizierten, murinen 3'-UTR der *Csf1r* mRNA, welche aus murinen Makrophagen des Knochenmarks isoliert wurde, in den pGL3-control-MCS Vektor zu klonieren und ihn durch Sequenzierung zu verifizieren. Des Weiteren wurde eine Mutation der sogenannten „seed-match“ Sequenz eingefügt und diese ebenfalls durch Sequenzierung verifiziert. Daraufhin habe ich *Csf1r* als *Mir34a* Ziel-mRNA in Mäusen mittels eines Reporter-Assays bestätigt. Zusätzlich habe ich eine qPCR-Analyse der *Csf1r*, *Snai1*, *Notch1* und *β-actin* mRNA-Expression in mit Kontroll- und *pre-miR-34* Oligonukleotiden transfizierten CT-26 Zellen durchgeführt. Die zu den Analysen zugehörigen Abbildungen wurden von mir vorbereitet und erstellt.

### 1.2. Beitrag zu Paper II

Als Erstautor dieser Veröffentlichung habe ich zu diesem Artikel beigetragen, indem ich Mäuse mit Deletion von *Csf1r* und/oder *Mir34a* in myeloischen Zellen durch Verpaarung der entsprechenden Mäuse hergestellt und charakterisiert habe. Diese wurden unter anderem für die Einzelzell-RNA-Sequenzanalyse, sowie für die Behandlung mit dem *Csf1r*-Inhibitor GW2580 verwendet. Ich habe diese Mäuse mit Azoxymethan (AOM) injiziert, Dextran-Natriumsulfat (*englisch*: dextran sodium sulfate – DSS) sowie den *Csf1r* Inhibitor GW2580 verabreicht und den Gesundheitszustand gemäß den Tierschutzrichtlinien und der behördlichen Genehmigung überwacht. Ich habe Organe von den von mir behandelten Mäusen isoliert, verarbeitet und die zugehörigen Analysen durchgeführt. Zusätzlich habe ich alle immunhistochemische Färbungen durchgeführt und diese analysiert. In Zusammenarbeit mit Dr. Matjaz Rokavec habe ich die Einzelzell-Suspensionen aus Kolitis-assoziierten Kolorektalkarzinomen (KAKs) hergestellt, welche für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung verwendet wurden. Dr. Matjaz Rokavec hat die bioinformatischen Analysen der Sequenzierungsergebnisse durchgeführt und die dazugehörigen Abbildungen erstellt. Darüber hinaus habe ich Makrophagen aus dem Knochenmark (*englisch*: bone-marrow derived macrophages – BMDMs) isoliert, kultiviert und diese mit Zytokinen behandelt. Zudem habe ich mit den BMDMs qPCR- und Western Blot Analysen, sowie modifizierte Boyden-

Chamber-Migrations- und Scratch-Assays in Ko-Kultur durchgeführt. Ich habe aktiv eigene Ideen eingebracht und damit zum Fortschreiten des Projekts beigetragen. Ich habe Literaturrecherche betrieben und den ersten Manuskriptentwurf einschließlich Abbildungen, Tabellen und ergänzendem Material vorbereitet. Das Manuskript wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Heiko Hermeking erstellt. Dr. Meryem Gülfem Öner-Ziegler hat die initialen Analysen der Mäuse, die in Abbildung 1 gezeigt werden, durchgeführt. Ye Fei hat isolierte BMDMs und HCT116 Zellen mit einem Stickstoffmonoxid-/NO-Donor behandelt und die entsprechenden qPCR-Analysen durchgeführt. Alle Autoren haben das finale Manuskript gelesen und korrigiert.

## 2. Einleitung

### 2.1 Krebs

Krebserkrankungen waren für fast 10 Millionen Todesfälle weltweit im Jahr 2022 verantwortlich und die Zahl der Neuerkrankungen lag weltweit bei 20 Millionen Fällen (Abbildung 1A - C) [1]. Während bei Männern Lungen-, Prostata- und Kolorektalkarzinome zu den drei am häufigsten diagnostizierten Krebsarten zählten, waren es bei Frauen Brustkrebs, gefolgt von Lungenkrebs und Kolorektalkarzinomen [1]. Betrachtet man die Mortalität, war die häufigste Todesursache, verursacht durch Tumorerkrankungen, bei Männern Lungenkrebs, gefolgt von Leberkrebs und Karzinomen des Kolons, während Frauen hauptsächlich durch Brust-, Lungen- und Dickdarmkrebs verstarben (Abbildung 1B und C) [1]. Ursache von malignen Neoplasien sind gestörte Zellfunktionen aufgrund genetischer und epigenetischer Veränderungen, die eine Transformation gesunder Zellen bewirken [2]. Physikalische [3, 4], chemische [5, 6] sowie biologische [7, 8] Umwelteinflüsse haben dabei, neben individuellen Faktoren wie genetischer Prädisposition, einen enormen Einfluss auf die Entwicklung der malignen Neoplasien [2].

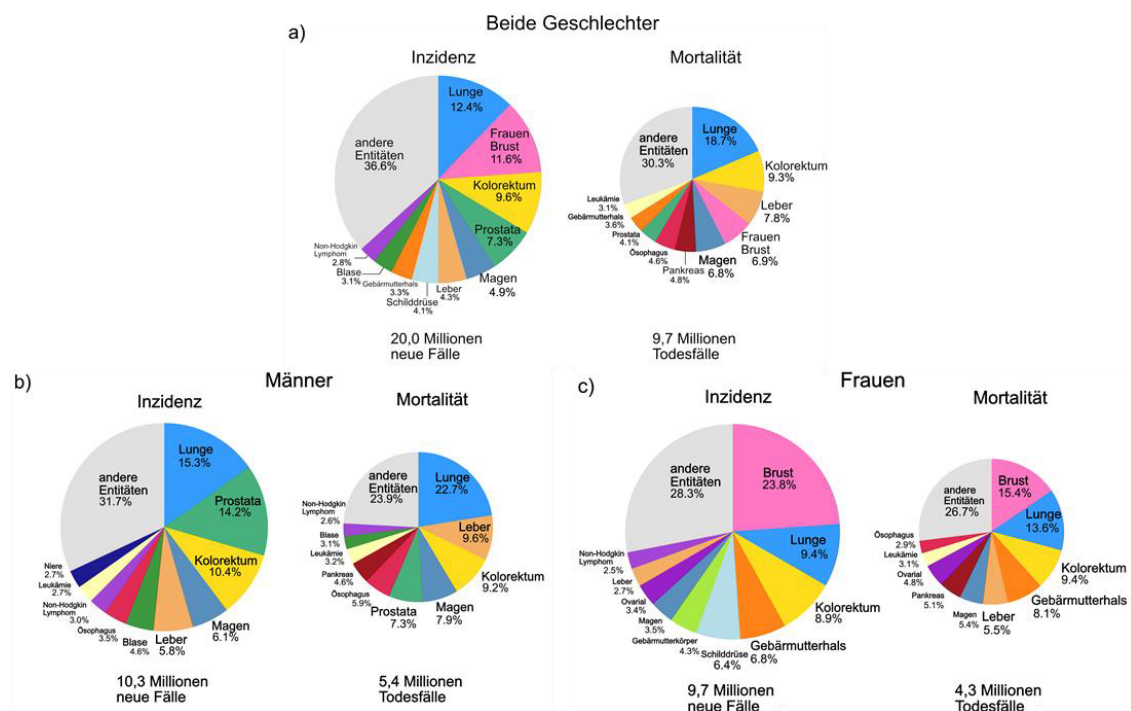


Abbildung 1 Weltweite Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen. Inzidenz und Mortalität der häufigsten Krebserkrankungen weltweit im Jahr 2022 für (A) beide Geschlechter (B) Männer und (C) Frauen. Abbildung übersetzt und angepasst aus [1].

Der Begriff „Krebs“ bezieht sich auf mehr als 100 verschiedene Entitäten und deren Subtypen, die in nahezu jedem Gewebe auftreten können. Normale, gesunde Körperzellen leben in einem Verband mit anderen Zellen, in welchem sie ihre Vermehrung - auch Proliferation genannt - gegenseitig kontrollieren. Tumorzellen hingegen umgehen diese Art der Proliferationskontrolle und zeichnen sich durch die erhöhte Fähigkeit zur Migration aus [9]. Tumorigenese ist ein mehrstufiger Prozess [10], dessen molekulare Grundlagen nach und nach entschlüsselt wurden [11, 12]. Fearon und Vogelstein beschrieben diesen Prozess im Mehrstufen-Modell des Kolorektalkarzinoms (KRK) erstmals im Jahr 1990 [13]. Im Jahre 2000 erfolgte seitens Hanahan und Weinberg eine Zusammenfassung der Charakteristika von Tumoren (*englisch*: hallmarks of cancer). Diese Eigenschaften beinhalten die Aktivierung von proliferativen Signalwegen, die Umgehung von Wachstumsinhibition, unbegrenzte Replikation, Induktion von Angiogenese und Befähigung zur Zellinvasion und Metastasierung [14]. 2011 und 2022 wurden diese Eigenschaften durch weitere Fähigkeiten von Tumoren ergänzt: Deregulierung des Zellmetabolismus, Unterdrückung der Immunantwort, Genominstabilität und Mutationen, sowie tumorfördernde Entzündung [15], phänotypische Plastizität, Zunahme seneszenten Zellen, nicht mutationsbedingte, epigenetische Umprogrammierung und ein polymorphes Mikrobiom [16].

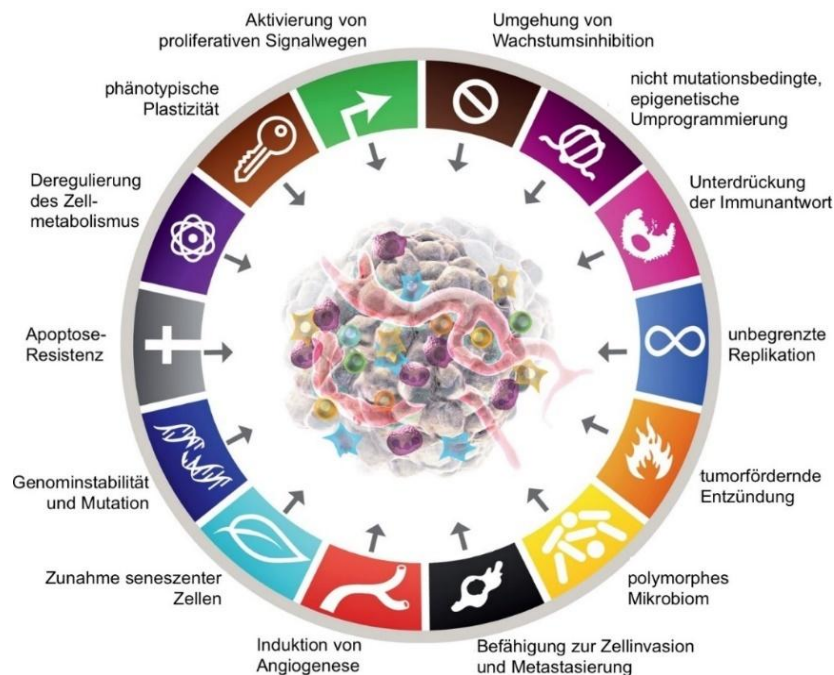


Abbildung 2 Charakteristika von Tumoren. Die 14 Merkmale während der Tumorentwicklung. Abbildung übersetzt aus [16].

### 2.1.1 Das Kolorektalkarzinom

Mit ungefähr 10% der weltweiten Krebs-Diagnosen im Jahr 2022 war das Kolorektalkarzinom (KRK) die dritthäufigste, diagnostizierte Krebserkrankung und der zweithäufigste Grund für das Versterben von Krebserkrankten (9,3%) beider Geschlechter [1]. Obwohl 20-30% der Patienten eine familiäre Geschichte haben entwickeln sich nur 5-10% der Kolorektalkarzinome aufgrund vererbter Mutationen [17-19], während 75% der Kolorektalkarzinome sporadisch auftreten [20]. Das Kolitis-assoziierte Kolorektalkarzinom (KAK) manifestiert sich dagegen als Komplikation einer vorangegangenen chronischen Entzündung, wie sie beispielsweise bei Colitis ulcerosa (CU) vorliegt [19, 21]. Vergleicht man das sporadische KRK mit dem KAK, zeigt das KAK multiple Läsionen [22], ist in seiner Histopathologie schwerwiegender [23], weist eine schlechtere Prognose auf [23, 24] und unterscheidet sich in seiner Pathogenese [21, 22, 25, 26]. Frühzeitiger Verlust von *TP53* gilt als eine Charakteristik von einem KAK mit entzündlichen Erkrankungen [27-29], während *TP53* Verlust beim sporadischen KRK erst in späten Stadien auftritt [28-30]. Die Mutationen, die an der Entstehung und Entwicklung des sporadischen KRK und des KAK beteiligt sind, sind generell ähnlich, allerdings scheinen sie in umgekehrter Reihenfolge aufzutreten [22]. Das sporadische KRK wird durch genetische und epigenetische Veränderungen hervorgerufen und beginnt mit der Inaktivierung des *APC* Gens [13, 31]. Letzteres führt zu Hyperproliferation der Epithelzellen, was sich im Anschluss durch frühe Adenome äußert. Zusätzliche Mutationen, wie die im *KRAS* Gen, fördern die Weiterentwicklung der Adenome. Mutationen des *p53* Gens treten hierbei im späten Stadium auf, wenn Karzinome invasiv werden [13, 31, 32]. Im Gegensatz dazu führen Entzündungsreaktionen beim KAK zu oxidativem Stress, welcher DNS-Schädigung induziert [33] und dadurch *p53* Mutationen als frühzeitiges Ereignis auslöst [27]. Weitere Mutationen führen zu höhergradigen Dysplasien und zu einem *APC* Funktionsverlust in späteren Stadien [33].

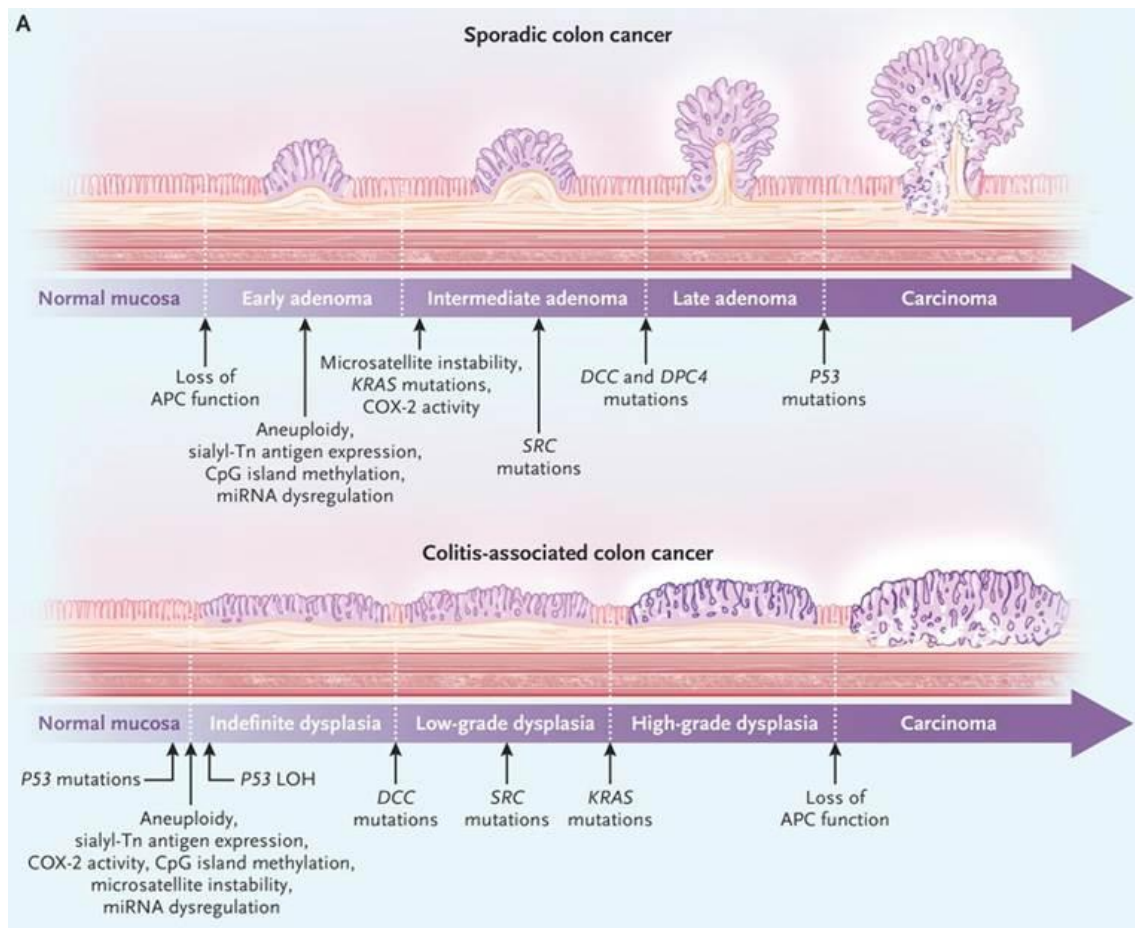


Abbildung 3. Mehrstufiger Prozess der Karzinom Entwicklung. Die schematische Darstellung zeigt den Verlauf der Entwicklung des sporadischen (oben) und des Kolitis-assoziierten (unten) Kolorektalkarzinoms inklusive der auftretenden Mutationen. Abbildung aus [33], Copyright Massachusetts Medical Society.

### 2.1.2 Mausmodelle des Kolorektalkarzinoms

Mausmodelle finden in der Forschung zur Entwicklung, Progression und potentiellen zukünftigen Therapiestrategien von Tumoren und anderen Erkrankungen häufig Anwendung. Abgesehen von gentechnisch erzeugten Veränderungen, die zur Tumorbildung führen, besteht die Möglichkeit das KRK oder KAK chemisch oder durch Injektionsmodelle zu induzieren [34].

#### Das $APC^{min}$ Mausmodell des erblichen Kolorektalkarzinoms

Zur Untersuchung des erblich bedingten Kolorektalkarzinoms (FAP) wird häufig das  $APC^{min}$ -Mausmodell verwendet [35, 36].  $APC$  ist ein Tumorsuppressorgen, das den kanonischen WNT-Signalweg unterdrückt, indem es den Abbau von  $\beta$ -Catenin fördert. Funktionsverlust von  $APC$  führt zu einer Ansammlung von  $\beta$ -Catenin und damit zu einer anhaltenden Aktivierung dieses Signalweges [34, 37-39]. Die  $APC^{min}$  Maus trägt eine trunkierende Keimbahnmutation in einem Allel

des *APC* Gens [40, 41]. *APC<sup>min/+</sup>*-Mäuse mit einem C57/6J (B6) - Hintergrund entwickeln mehr als 50 Adenome im gesamten Darmtrakt [40]. Die Überlebenszeit dieser Mäuse beträgt durchschnittlich etwa 120-180 Tage [40, 42].

### **Das Mausmodell des sporadischen Kolorektalkarzinoms**

Um bei genetisch veränderten oder durch Inzucht erzeugten Mäusen, die im Laufe ihres Lebens keine Tumore entwickeln, Darmkrebs auszulösen, werden Karzinogene, unter anderem Azoxymethan (AOM) [43], verwendet [34]. Die wiederholte Verabreichung chemischer Karzinogene führt zu Dickdarmkarzinomen. Darüber hinaus zeigt AOM im Vergleich zu anderen krebserzeugenden Substanzen, wie 1,2-Dimethylhydrazin (DMH), eine große Wirksamkeit und Stabilität während der Behandlung [44].

### **Das Mausmodell des Kolitis-assoziierten Kolorektalkarzinoms**

Der Einsatz von Dextran-Natriumsulfat (DSS) zur Induktion akuter und chronischer Entzündungen bei Mäusen wurde erstmals 1990 von Okayasu und Kollegen beschrieben. Dabei wurden unter anderem entzündliche Veränderungen sowie mehrfache Erosionen in der Dickdarmwand beobachtet [45]. DSS wird seither häufig zur Erzeugung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt [46, 47]. Auf welche Weise DSS Kolitis auslöst, ist noch nicht vollständig geklärt [48]. Einerseits wurde gezeigt, dass die Sulfatgruppen von DSS die Schleimschicht stören [49, 50], andererseits wurde beobachtet, dass die Epithelzellen geschädigt werden und es dadurch zu einer Schädigung der Epithelzell-Monoschicht kommt [51]. Beide Szenarien führen zu einer Beeinträchtigung der Barriereintegrität, die wiederum das Eindringen von Bakterien und anderen Darminhalten sowie DSS selbst in das darunter liegende Gewebe ermöglichen. Als Folge dessen, wird eine angeborene lymphoide Reaktion ausgelöst und Zytokine sowie Chemokine werden ausgeschüttet, die einen Zustrom von Makrophagen und Neutrophilen stimulieren [48]. Eine andere Studie legt nahe, dass DSS Komplexe mit mittelkettigen Fettsäuren (*englisch*: medium-chain fatty acids - MCFAs) des Dickdarmlumens bildet, welche dann mit den Kolonozytenmembranen verschmelzen [52]. Dieses Erkenntnis würde erklären, weshalb DSS-induzierte Kolitis vorrangig im Dickdarm lokalisiert ist [48]. Neufert und Kollegen beschreiben in ihrem Verabreichungsprotokoll, dass die Kombination des Karzinogens AOM mit

DSS die Bildung von Adenomen auslöst und die mit chronischer Kolitis verbundene Darmkrebsentwicklung abbildet, wie sie bei CU oder Morbus Crohn beobachtet wird [44].

## **2.2 Das Immunsystem**

Die körpereigene Abwehr von Erregern und Toxinen erfolgt über das Immunsystem, welches anpassungsfähig ist [53]. Die Variolation, bei der Pockenmaterial absichtlich auf eine andere Person übertragen wird, wird schon seit dem 15. Jahrhundert in China und dem Mittleren Osten praktiziert. Der zeitliche Beginn der wissenschaftlichen Immunologie wird jedoch Edward Jenner und seiner Forschung an der Pockenerkrankung zugeschrieben [53, 54]. Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato stießen ihrerseits auf eine „antitoxische Aktivität“, die wir heute als Antikörper kennen und die dem adaptiven Immunsystem, d.h. dem erworbenem Immunsystem, zugeordnet werden [55-57]. Das angeborene, innate Immunsystem war bereits zuvor durch die Entdeckung von Ilja Metchnikoff bekannt. Er beschrieb phagozytische Zellen - bekannt als Makrophagen - die Mikroorganismen aufnehmen und abtöten können und dazu jederzeit „aktiv und bereit“ wären [58, 59]. Ihren Ursprung haben die Zellen des Immunsystems fast ausschließlich im Knochenmark, wo sie heranreifen um dann im Blut oder Lymphsystem zu zirkulieren. Die Entwicklung der zellulären Bestandteile des Blutes beginnt mit den pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, die ebenfalls im Knochenmark zu lymphatischen und myeloischen Vorläuferzellen heranreifen. In der weiteren Entwicklung werden aus diesen Vorläuferzellen spezifischere Vorläuferzellen, wie beispielsweise Makrophagen-Vorläuferzellen, die zu Monozyten differenzieren, im Blut zirkulieren und schließlich im Gewebe als ausdifferenzierte Makrophagen ihre Aufgaben verrichten [60-62].

### **2.2.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem**

Während kommensale Mikroorganismen den Wirt nicht schädigen, sondern in Symbiose mit ihm leben, fügen andere Mikroorganismen den Zellen/dem Wirt Schäden zu [53]. Um sich vor den schädigenden Mikroorganismen, auch mit Krankheitserregern gleichzusetzen, zu schützen, gibt es drei Strategien. Als erste Abwehrlinie gilt es die Erreger durch anatomische [63, 64] und chemische [65,

66] Barrieren davon abzuhalten in den Körper einzudringen [67] oder durch Verhaltensänderung eine Exposition zu vermeiden [53]. Kommt es trotzdem zu einem Eindringen des Erregers, erfolgt die Abwehr, also die Dezimierung bis hin zur Beseitigung der Krankheitserreger. Die dritte Strategie umfasst die Toleranz, d.h. Reaktionen des Gewebes, die es ermöglichen einer Schädigung besser zu widerstehen [53]. Nach Durchbruch der ersten Barriere greifen weitere Bestandteile des angeborenen Immunsystems ein. Zunächst das Komplement, welches auch ohne spezifischen Antikörper angreifen kann und sowohl zur Reaktion des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems beiträgt [68, 69]. Zudem beginnt die zelluläre Abwehr des angeborenen Immunsystems, zu welchem Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen zählen [53]. Das adaptive Immunsystem wiederum besteht aus Lymphozyten, die in B-Zellen und T-Zellen unterteilt werden können [70]. Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche eine große Anzahl variabler Antigenrezeptoren [70, 71]. Diese Rezeptoren erkennen Antigene und binden diese. Liegen weitere Entzündungssignale vor, kommt es zu einer Immunreaktion [53]. Herauszustellen ist, dass das erworbene Immunsystem in der Lage ist, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln. Das bedeutet, sobald das Immunsystem einmal Kontakt mit einem Krankheitserreger hatte, erkennt es diesen bei erneutem Kontakt wieder und die Immunreaktion kann schneller und stärker ablaufen als zuvor. Dies wird auch als schützende Immunität bezeichnet [53, 70].

### 2.2.2 Die Tumormikroumgebung

Es ist mittlerweile bekannt, dass die Tumormikroumgebung (*englisch*: tumor-microenvironment - TME) eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung und -progression spielt [72]. Das TME setzt sich aus einer Vielzahl von Immunzellen zusammen, darunter T-Zellen [73-77] und B-Zellen [78, 79], die zum erworbenen Immunsystem zählen, sowie myeloische Immunzellen wie Makrophagen [80-82] oder Neutrophilen [83, 84], die Teil des angeborenen Immunsystems sind. Darüber hinaus umfasst es andere Stromazellen wie Tumor-assoziierte Fibroblasten (*englisch*: cancer-associated fibroblasts - CAFs) [85], Endothelzellen und andere Zelltypen, deren Anwesenheit und Anzahl von der Tumorlokalisation abhängig sind [72]. Aufgrund ihrer Rolle bei der Krebspathogenese stellen die verschiedenen Zelltypen innerhalb des TME attraktive therapeutische Ziele dar [86-89].

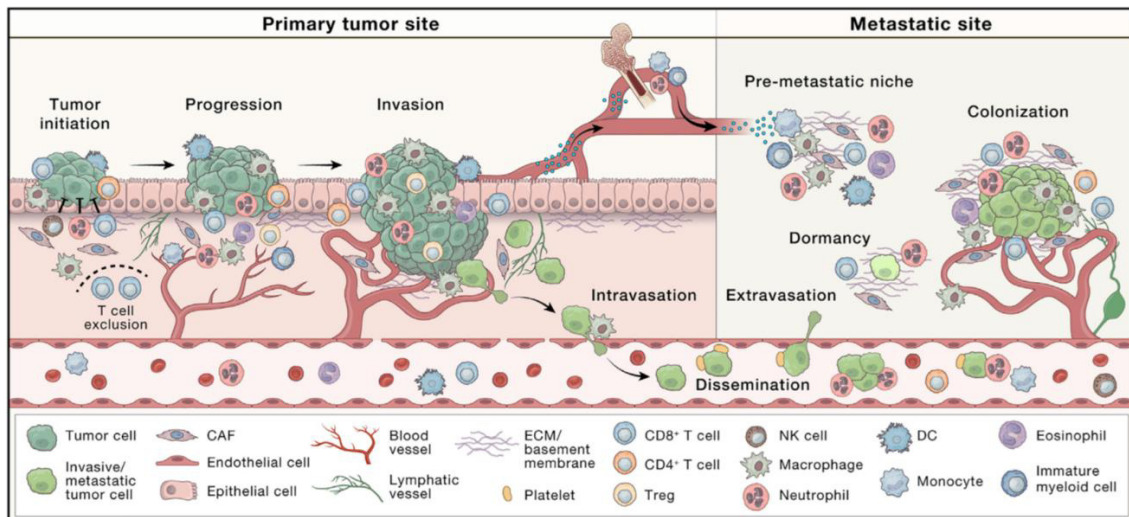


Abbildung 4. Tumorprogression und Metastasierung unter dem Einfluss der Tumormikroumgebung. Schematische Darstellung der Beteiligung der Hauptakteure des Tumorstromas während verschiedener Stadien der Tumorprogression und Metastasierung. Abbildung aus [72].

Krebszellen rekrutieren und programmieren Wirtszellen um, indem sie durch verschiedene Mechanismen wie Zell-Zell-Kontakte und parakrine Signale, die den interzellulären Dialog regulieren, das Gefäßsystem und die extrazelluläre Matrix (EZM) umgestalten [72, 90]. Ein bekanntes Beispiel für Zell-Zell-Kontaktinteraktionen ist der PD-L1/PD-1-Signalweg, bei dem Krebszellen und tumorassoziierte myeloische Zellen PD-L1 überexprimieren. PD-L1 interagiert folglich mit dem auf den Zellen des erworbenen Immunsystems befindlichen Rezeptor PD-1, was sich in einer Unterdrückung der Immunüberwachung äußert. Die Blockierung dieser Achse wurde bei vielen Krebsarten durch Immun-Checkpoint-Blockade (ICB) zur Standardbehandlung [72, 91]. Die parakrine Signalübertragung hingegen erfolgt durch die Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen als Reaktion auf krebsintrinsische Eigenschaften und zellulären Stress durch verschiedene Zelltypen im TME [72]. Auch die Freisetzung extrazellulärer Vesikel (EVs), einschließlich Exosomen, ist ein parakriner Mechanismus zur Veränderung der lokalen Umgebung [92] und kann zudem Auswirkungen über die primäre Tumorlokalisierung hinaus haben [72, 93]. Exemplarisch seien EVs genannt, welche von Krebszellen ausgeschüttet werden und eine hohe Menge an PD-L1 enthalten. Sie sind in der Lage, die T-Zell-Aktivierung zu unterdrücken, wodurch das Fortschreiten des Tumors sowie dessen Resistenz gegenüber einer Behandlung mit ICB gefördert wird [94, 95]. Ein weiteres Beispiel der TME-Modulierung zeigt, dass im Anfangsstadium von Lungenkrebs ein erhöhter Zustrom naiver T-Zellen beobachtet wurde, was darauf hindeutet, dass das Immunsystem

die veränderten Krebszellen detektierte. Im weiteren Verlauf führte das Fortschreiten der Läsionen zu einer Ansammlung aktivierter T-Zellen und myeloischer Zellen sowie einer Hochregulierung immunsuppressiver Gene [96]. In einem Brustkrebsmodell mit Funktionsverlust von *Brca1* und *p53* hingegen, war die immunsuppressive Umgebung durch die Ansammlung von T<sub>reg</sub>-Zellen und Makrophagen gekennzeichnet [97]. Chronisch entzündetes Gewebe weist demgegenüber Merkmale einer Th2-Typ Immunantwort sowie einer Akkumulation immunsuppressiver, myeloischer Zellen auf, die reaktive Sauerstoffspezies (*englisch*: reactive oxygen species - ROS), pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und pro-angiogenetische Mediatoren absondern. Diese verursachen beispielsweise Gewebeschäden, epitheliale Mutagenese, Immunsuppression und Matrixumbau und können folglich zur Krebsentstehung und -progression führen [98, 99]. Im Laufe des Tumorwachstums verändert sich auch die Tumormikroumgebung: Während zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen abnehmen, polarisieren immunsuppressive CD4<sup>+</sup>FoxP3-T<sub>reg</sub>-Zellen, regulatorische B-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Richtung einer zunehmenden Th2-Reaktion. Darüber hinaus werden myeloische Zellen, insbesondere Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) und Tumor-assoziierte Neutrophile (TANs) rekrutiert und passen sich in ihren phänotypischen Merkmalen entsprechend vorhandener inflammatorischer Signale aus dem TME an [72, 100-102]. Präklinische Mausmodelle zeigen, dass die Hemmung oder Neuprogrammierung dieser Zellen die Tumorprogression in verschiedenen Krebsarten beeinträchtigt [103-108] und die Chemo-, Radio- und Immuntherapie verbessert [108-112]. Des Weiteren tragen myeloische Zellen zur Umgestaltung der EZM bei, indem sie beispielsweise Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) oder Cathepsine sezernieren und somit die Tumorentstehung, Invasion und Therapieresistenz fördern [113-117]. Auch während des Migrations- und Invasionsprozesses fördern Signale des TME die phänotypische Veränderung von Krebszellen [72, 118, 119]. Beispielsweise produzierten myeloische Zellen und epitheliale Tumorzellen in einem HER2<sup>+</sup>-Brusttumor-Mausmodell CCL2, um CD206<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup>-Makrophagen zu rekrutieren. Diese CD206<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup>-Makrophagen induzierten eine EMT-ähnliche Reaktion und eine frühe Dissemination. Durch eine CSF1R-Hemmung wurden die Makrophagen dezimiert und der Effekt wurde umgekehrt [120].

Die vorliegenden Beispiele demonstrieren in ihrer Gesamtheit die Fähigkeit des TME das Fortschreiten, die Invasion und die Therapieresistenz des Tumors zu modulieren. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Mechanismen in verschiedenen Stadien der Tumorprogression sowie bei verschiedenen Tumorentitäten, aber auch bei Patienten mit der gleichen Primärtumor-Lokalisation variieren und sich unterscheiden können [72]. Dies verdeutlicht die Komplexität des Zusammenspiels zwischen Krebszellen und TME.

### **2.2.3 Die Rolle von Makrophagen bei Tumorerkrankungen**

Wie weiter oben erwähnt, besitzen myeloische Zellen Funktionen im angeborenen und adaptiven Immunsystem, um den Wirt vor Pathogenen und Toxinen zu schützen [53]. Darüber hinaus können Zellen des Immunsystems als externer Tumorsuppressor agieren und die Eliminierung neu transformierter Zellen bewirken [121-125]. Tumore verfügen jedoch über die Fähigkeit dieser Suppression und Eliminierung durch Zell-Zell-Kontakte und parakrine Signalwege zu entgehen [72, 90]. Auch die Makrophagen im TME spielen dabei eine große Rolle, da sie unter anderem Einfluss auf Prozesse wie Tumorentstehung, Invasion und Therapieresistenzen nehmen können [113-117]. Im Folgenden wird die Rolle der Makrophagen in Tumorerkrankungen an Beispielen aus der Literatur exemplarisch erläutert.

Zur Beschreibung der verschiedenen Funktionen von Makrophagen wurden die Begriffe „M1“ und „M2“, basierend auf der Th1 bzw. Th2 Immunantwort, als vereinfachte Nomenklatur etabliert [126]. Makrophagen, die in Richtung „M1“ polarisiert sind oder auch als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet werden, weisen Tumor-abtötende Eigenschaften auf, während „M2“-Makrophagen, die auch als alternativ aktivierte Makrophagen benannt werden, Tumor-fördernde Eigenschaften aufweisen [127-129]. Die polarisierten Makrophagen unterscheiden sich in ihrer Rezeptorexpression, Funktion und Chemokin- sowie Zytokinproduktion [130]. Während „M1“-Makrophagen hohe Mengen an iNOS/Nos2 produzieren, da der Argininstoffwechsel vorherrscht [131, 132], verwenden „M2“-Makrophagen überwiegend den Arginase-Stoffwechsel zur Bildung von Ornithin und Polyamiden [130, 133, 134]. Wie unter anderem von Qian und Pollard 2010 zusammengefasst, spielen Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression, indem sie beispielsweise Angiogenese stimulieren [135], Metastasierung fördern [74, 136] oder zu Therapieresistenzen beitragen können [137] [138].

In einer Studie zu Brustkrebs wurde *ex vivo* und *in vivo* gezeigt, dass „M2“-Makrophagen über die miR1587/IRF7-Achse zur Tumorzellproliferation und -migration beitragen, was diese Achse als therapeutische Zielstruktur nahelegt [139]. Eine weitere Studie zeigte, dass Exosomen, welche hohe Mengen an miR-301a-3p beinhalten und von Pankreastumorzellen unter hypoxischen Bedingungen ausgeschieden werden, Makrophagen in einen Tumor-fördernden „M2“ Phänotyp umwandeln, welcher wiederum die Migration und Invasion von Pankreastumorzellen fördert [140]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass aus Tumoren stammende Glutaminase-1-Mikrovesikel (GLS1) Makrophagen in Richtung „M2“ polarisieren, pro-angiogenetische Makrophagenfunktionen verbessern und den Glutaminstoffwechsel fördern, was zu einer Trastuzumab-Resistenz bei HER2-positivem Magenkrebs führte. Eine kombinierte Behandlung aus Anti-Angiogenese, Anti-Glutaminstoffwechsel und der Reprogrammierung von „M2“-Makrophagen zu „M1“-Makrophagen wurde daher von den Autoren als vorteilhafte Behandlungsstrategie bei dieser Krebsart vorgeschlagen [141]. Da in mehreren Studien gezeigt wurde, dass das Immunsystem die Entstehung und das Fortschreiten von Krebs beeinflusst [142] und gezeigt wurde, dass p53 den „M2“-Makrophagen-Phänotyp inhibieren kann [143], untersuchten He et al. die Rolle von p53 in myeloischen Zellen im *Apc<sup>Min/+</sup>*-Mausmodell [144]. Tatsächlich konnten sie zeigen, dass der myeloische Verlust von p53 zu erhöhten Konzentrationen von Entzündungsmediatoren führt und das Adenomwachstum bei *Apc<sup>Min/+</sup>*-Mäusen fördert, während eine Aktivierung von p53 in Makrophagen den gegenteiligen Effekt hat. Darüber hinaus beobachteten sie auch, dass die Aktivierung von p53 die Polarisierung von Makrophagen in Richtung eines „M2“-Phänotyps unterdrückt, was darauf hindeutet, dass p53 ein wichtiger, nicht-zellautonomer Inhibitor der Tumorentstehung sein kann [144]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Tumor-spezifische Verlust von p53 die Infiltration suppressiver Immunzellen durch eine verstärkte Chemokin- und Zytokin-Sekretion, unter anderem durch den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF; auch CSF1 genannt), erhöht und so die Destruktion durch Immunzellen verhindert [145]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass polarisierte Makrophagen einen signifikanten Einfluss auf die Progression von Tumoren haben können. Daher stellen Makrophagen im TME vielversprechende Zielstrukturen für neue Therapieansätze dar.

### 2.3 Die Rolle des Koloniestimulierenden Faktor 1 Rezeptors (CSF1R) im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen

Koloniestimulierender Faktor-1-Rezeptor (CSF1R), der auch unter den Bezeichnungen Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor-1-Rezeptor (M-CSF1R) und Differenzierungscluster 115 (CD115) bekannt ist, wurde kürzlich als direktes *miR-34a*-Zielgen identifiziert [146]. CSF1R wird auf einer Vielzahl von Zelltypen mit unterschiedlichen Expressionsniveaus exprimiert [147], unter anderem auf Monozyten und Gewebemakrophagen [148, 149], myeloischen dendritischen Zellen [150], Paneth-Zellen [151] und Dickdarmepithelzellen [147]. Neben CSF1 mit seinen drei Isoformen [152-156] wurde IL-34 als CSF1R Ligand charakterisiert [157]. Die Bindung der Liganden führt zu einer Homodimerisierung und Aktivierung von CSF1R durch Autophosphorylierung an sechs Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne [158]; [159, 160].

Wie bereits in Kapitel „2.2.2 Rolle der Makrophagen bei Tumorerkrankungen“ beschrieben, spielen Makrophagen eine große Rolle bei der Tumorprogression. Der CSF1-Rezeptor und sein Ligand CSF1 stellen vielversprechende Kandidaten für Anti-Tumor-Therapien dar, weshalb es bereits einige präklinische und klinische Studien gibt. In einem Modell des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC) wurde beobachtet, dass eine Blockade von Csf1r die Makrophagenreaktionen umprogrammiert, um produktive T-Zellreaktionen zu verstärken, indem T-Zell-Checkpoint-Moleküle wie PDL1 und CTLA4 hochreguliert werden. Die Kombination einer Blockade von Csf1r mit PD1- und CTLA4-Antagonisten führte zu dem Schluss, dass die Umprogrammierung myeloischer Zellen für eine Checkpoint-Inhibitor-basierte Immuntherapie von Vorteil sein könnte [161]. In einem anderen Modell wurde evident gemacht, dass Makrophagen die dominierende Zellpopulation im Stroma des menschlichen PDAC sowie in autochthonen Modellen darstellen und einen substanziellen Einfluss auf die Tumorerhaltung und T-Zell-Unterdrückung haben [162]. Die Verwendung eines Csf1r-Inhibitors führte zu einer Reduzierung der Tumorgroße und verlängerte die Überlebenszeit der Mäuse. Darüber hinaus zeigten Candido et al., dass die Inhibition des Csf1-Rezeptors die T-Zell-Immunantwort verstärken konnte und daher eine sinnvolle Behandlungsstrategie bei dieser Erkrankung sein könnte [162]. Die genetische Ablation von CSF1 führte zu einer Verringerung der Anzahl von CSF1R<sup>+</sup> TAMs. Die Wir-

kung auf das Tumorwachstum war jedoch aufgrund der kompensierenden Wirkung von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen begrenzt. Eine simultane Deletion von CSF1R<sup>+</sup> TAMs und Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen resultierte in einer erhöhten Einwanderung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Verbesserung ihrer Funktion und einem verringertem Tumorwachstum [163]. In einem Mausmodell des Glioblastoms führte die Inhibition von Csf1r zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens. Allerdings bildete sich in über 50% der Fälle ein Tumorrezidiv, in dem eine erhöhte Aktivität des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalweges beobachtet wurde, ausgelöst durch eine erhöhte Expression von IGF-1 in Makrophagen und des IGF-1R auf Tumorzellen. Die kombinierte Blockade von Csf1r und IGF-1R oder PI3K verlängerte das Überleben bei Rezidiven [164]. In einer Studie zu Morbus Crohn führte die Blockierung von Csf1r durch JNJ-40346527 zu einer Hemmung der Zunahme des Dickdarmgewichts und der Dickdarmlänge um etwa 50%, reduzierte den histopathologischen Score und die Anzahl von F4/80-positiven und CD3-positiven Zellen in Mäusen. Daher könnte der Inhibitor JNJ-40346527 für die Therapie entzündlicher Darmerkrankungen beim Menschen geeignet sein [165]. Lv et al. zeigten, dass die Behandlung humaner, M2-polarisierter BMDMs mit dem CSF1R-Inhibitor PBX17 zur Reprogrammierung in Richtung M1-polarisierter Makrophagen führt [166]. Durch Ko-Kultivierung humaner KRK-Organoiden mit M2 polarisierten Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigte die Forschungsgruppe des Weiteren, dass die Inhibition von CSF1R die Vitalität von KRK-Organoiden verringert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine CSF1R-Blockade die anti-tumorale-Immunantwort von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch eine erleichterte Reprogrammierung von pro-tumoralen „M2“ Makrophagen in Richtung anti-tumoralen „M1“ Makrophagen fördert [166]. Zusätzlich wurde durch die CSF1R-Inhibition die therapeutische Aktivität eines PD-1-spezifischen monoklonalen Antikörpers in subkutanen Xenograft-Mausmodellen von KRKs gesteigert, indem die Infiltration und Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in diesen Tumoren verbessert wurde [166]. Verschiedene niedermolekulare Wirkstoffe (*englisch*: small molecules) und monoklonale Antikörper befinden sich derzeit in der klinischen Entwicklung als Monotherapie oder in Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika oder anderen Immuntherapeutika [167]. Eine Phase-I/II-Studie beim klassischen Hodgkin-Lymphom zeigte beispielsweise, dass eine CSF1R Inhibition mit JNJ-40346527 zu

einer vollständigen Remission bei einem von 21 Patienten führte und bei 11 weiteren Patienten zu einer Stabilisierung des Krankheitsverlaufs. Diese Resultate lassen allerdings auf ein begrenztes Ansprechen der Monotherapie schließen [168]. Eine weitere Phase-Ia/b-Studie mit Emactuzumab, einem gegen CSF1R gerichteten monoklonalen Antikörper, ergab, dass die Behandlung alleine oder in Kombination mit dem Zytostatikum Paclitaxel bei der optimalen biologischen Dosis zu einem Plateau immunsuppressiver TAMs führt. In Summe ergab sich jedoch keine klinisch relevante Anti-Tumor-Aktivität für die Einzel- oder Kombinationsbehandlung [169]. Ein akzeptables Sicherheitsprofil sowie pharmakologische Aktivität wurde bei der Kombinationstherapie von Emactuzumab mit Selicrelumab, einem monoklonalen CD40-Antikörper, bei Patienten mit soliden Tumoren beobachtet. Diese Ergebnisse äußerten sich jedoch ebenfalls nicht in ausreichenden klinischen Reaktionen [170]. Obwohl es mehrere klinische Studien gibt, in denen die Monotherapie oder Kombinationstherapie bei verschiedenen Krebsarten untersucht wurde, zeigt sich die klinische Wirkung bisher in ungenügendem Ausmaß. Daher sind weitere präklinische Studien notwendig, um Verbesserungen für die klinische Anwendung zu erzielen [171].

## **2.4 Die p53-induzierbare MikroRNA *miR-34a***

MikroRNAs werden als endogene, konservierte Ribonukleinsäuren (*englisch*: ribonucleic acid - RNAs) mit einer Länge von etwa 19–24 Nukleotiden bezeichnet und wurden erstmals 1993 im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt und in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben [172]. MiRNA-kodierende Transkripte werden von der RNA-Polymerase-II transkribiert und erzeugen dabei eine haarnadelförmige Schleife, die die Pri-miRNAs enthält. Die Pri-miRNA wird im Nukleus von einem Multiproteinkomplex namens Mikroprozessor, der ein nukleares RNase-II-Enzym (Drosha) und ein RNA Bindungsprotein (DGCR8/Pasha) enthält, zu Vorläufer-miRNAs (Prä-miRs) verarbeitet [173-176]. Prä-MiRNAs werden im Anschluss, vermittelt durch Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert, in welchem eine weitere RNase-III (Dicer) die Prä-MiRNA in reife miRNA-Duplexe umwandelt, die aus zwei ca. 22 Nukleotid langen RNA-Molekülen besteht [177, 178]. Zur Bildung des RISC Ribonukleinkomplexes interagiert die RNase-III Dicer mit dem Protein PACT, das wiederum das Protein Argonaut2 (Ago2) rekrutiert [179-181]. Daraufhin wird einer der miRNA-Stränge abgebaut,

während der andere miRNA-Strang durch Sequenzkomplementarität an die Ziel-mRNA bindet und schließlich deren translationale Repression verursacht [182, 183].

*Mir-34a* und *miR-34b/c* sind zentrale Mediatoren der Tumorsuppression [184], da sie verschiedene Krebs-relevante biologische Prozesse, wie Proliferation [185], Invasion und Metastasierung inhibieren [186-188]. Sowohl *miR-34a* als auch *miR34b/c* wurden als direkte *p53*-Ziel-miRNAs beschrieben [189-192]. Mehrere umfassende Expressionsstudien zeigten, dass *miR-34a* die stärkste Induktion aller MikroRNAs durch *p53* aufweist [193]. Eine Inaktivierung von *miR-34a* resultiert allerdings weder alleine noch in Kombination mit einem aktivierten *c-Myc* Gen in einer Bildung von Tumoren bei Mäusen [194]. Zusätzliche genetische Veränderungen oder pro-tumorigene Einflüsse führen jedoch zu einer gesteigerten Tumorbildung und -progression in einem Mausmodell für Prostatakrebs. So konnte eine Kooperation zwischen *p53* und *miR-34a* nachgewiesen werden [195]. Darüber hinaus resultierte die Deletion von *miR-34a* in einer Verstärkung der Adenombildung im *APC<sup>min/+</sup>*-Mausmodell für vererbte Kolorektalkarzinome und in einer Reduktion der Überlebenszeit dieser Mäuse [196]. In murinen Kolitis-assoziierten Kolorektalkarzinomen führte *Mir34a*-Defizienz zu einem Fortschreiten der Tumorprogression und sogar zu invasiven KAKs, die durch die Muscularis mucosa drangen [188]. In murinen sporadischen Kolorektalkarzinomen wurde gezeigt, dass die simultane intestinale zellspezifische Inaktivierung von *Mir34a* und *p53* zu einem verstärkten Fortschreiten der Karzinome und zur Bildung von Lymphknotenmetastasen führt [197], während eine intestinal-zellspezifische Deletion von *p53* zum selben Untersuchungszeitpunkt lediglich in einer lokalen Invasivität resultiert [198]. Zudem sind MikroRNAs durch TME Modellierung an der Tumorprogression beteiligt [199, 200]. Mittlerweile wurde in einer Studie *ex vivo* aufgezeigt, dass die Expression von *miR-34* eine pro-tumorale „M2“ Polarisation unterdrückt und dadurch einen anti-tumoralen „M1“ Zustand vermittelt. Die Behandlung mit *Antago-miR-34a* hingegen förderte die pro-tumorale „M2“ Makrophagenpolarisation in dreifach-negativen Brustkrebszellen [201]. Eine weitere Studie an Magen-Tumorzellen zeigte eine inhibierende Rolle von *miR-34a* durch Inhibition von PD-L1 auf das Tumorstadium [202].

## 2.5 Ziele der Promotionsarbeit

In dieser Promotion wurden folgende Fragestellungen/Ziele bearbeitet:

- Verifizierung des Kolonie-stimulierenden Faktor 1 Rezeptors (CSF1R) als Ziel-mRNA von *Mir34a* in Mäusen
- Charakterisierung der Effekte einer myeloischen *Mir34a*-Defizienz in einem Mausmodell für Kolitis-assoziierten Darmkrebs durch Einzelzell-RNA-Sequenzierung
- Charakterisierung der Effekte einer genetischen Inaktivierung von *Csfr1* auf das Fortschreiten von Kolitis-assoziiertem Darmkrebs in Mäusen mit myeloischer *Mir34a*-Defizienz
- Charakterisierung der Effekte einer therapeutischen Csf1r-Inhibition auf das Fortschreiten von Kolitis-assoziiertem Darmkrebs in Mäusen mit myeloischer *Mir34a*-Defizienz

### 3. Zusammenfassung:

*Mir-34a* ist ein direktes Zielgen des Tumorsuppressors *p53*, welches bei Kolorektalkarzinomen häufig epigenetisch inaktiviert wird. Da die *in vivo* Rolle der *Mir34a/Csf1r*-Rückkopplungsschleife bisher unbekannt ist, bestätigten wir zunächst die Konservierung der Regulation von *Csf1r* durch *miR-34a* in Mäusen.

Um zu untersuchen, ob Auswirkungen einer *Mir34a*-Defizienz auf die Tumorprogression hauptsächlich durch *Mir34a*-defiziente Tumorzellen oder durch *Mir34a*-defiziente, myeloische Zellen verursacht werden, generierten wir Mäuse mit myeloischer Deletion (*Mir34a*<sup>ΔMye</sup>) sowie mit intestinal-epithelial spezifischer Deletion (*Mir34a*<sup>ΔIEC</sup>) von *Mir34a* und induzierten in diesen Kolitis-assoziierte Kolorektalkarzinome. Überraschenderweise zeigten Tumore in Mäusen mit myeloischer *Mir34a*-Defizienz eine erhöhte Invasivität im Vergleich zu denjenigen mit intestinal-epithelialer *Mir34a*-Defizienz, was auf eine tumorsuppressive Rolle von *Mir34a* sowohl in myeloischen als auch in intestinalen Zellen schließen lässt. Um die Auswirkung der *Mir34a*-Defizienz in myeloischen Zellen auf KAKs weiter zu charakterisieren, führten wir eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung durch. Dabei beobachteten wir in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup>-KAKs einen Anstieg von Neutrophilen und Makrophagen, der vermutlich auf eine erhöhte *Cxcr2*- und *Csf1r*-Signalübertragung zurückzuführen ist und eine Abnahme der epithelialen KAK-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-KAKs. Interessanterweise zeigte ein Subtyp von KAK-Zellen von Mäusen mit myeloischer *Mir34a*-Defizienz einen Anstieg von Entzündungssignalen mit teilweiser mesenchymaler Signatur, was schlussfolgern lässt, dass diese KAK-Zellen für eine verstärkte Migration und Invasion verantwortlich sein könnten. Die Subklassifizierung von Neutrophilen ergab einen Subtyp (TAN5), der hauptsächlich in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup>-KAKs vorkommt und einen Anstieg des IL6/STAT3-Signalweges sowie des reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-Signalweges aufweist. Darüber hinaus war die Expression von *Mmp9*, neben anderen *Mir34a*-Ziel-mRNAs, erhöht und könnte daher ein essentieller Faktor für die Tumorzellinvasion in myeloisch *Mir34a*-defizienten KAKs sein. Bei der Untersuchung der Makrophagen-Subtypen wurde eine Erhöhung der *Mrc1*<sup>+</sup>-Makrophagen und eine Abnahme der *Nos2*<sup>+</sup>-Makrophagen in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup>-KAKs beobachtet, was auf eine Verschiebung der Makrophagenpolarisierung in Richtung tumorfördernde Fähigkeiten aufgrund der myeloischen Defizienz von *Mir34a* hindeutet. Darüber hinaus

war in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup>-KAKs eine erhöhte Prävalenz des *Cdk8*<sup>+</sup>-Makrophagen-Subtyps festzustellen, welcher eine erhöhte Expression der mRNAs von Enzymen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind aufwies. Dies deutete ebenfalls auf eine erhöhte „M2“-Makrophagenpolarisierung hin. Zusätzlich waren 21 veröffentlichte und 32 potentielle, noch nicht veröffentlichte *Mir34a*-Ziel-mRNAs in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup>-Makrophagen hochreguliert. Fünf dieser hochregulierten, veröffentlichten *Mir34a*-Ziel-mRNAs, *Csf1r*, *Axl*, *Foxp1*, *Ccr1*, *Nampt* und *Tgfbr2*, wurden in mindestens 50% der Zellen exprimiert. Ihre Expression erwies sich im Makrophagen-Subtyp *Mrc1*<sup>+</sup> am höchsten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der myeloische Verlust von *Mir34a* zu einer Zunahme von Makrophagen mit pro-tumorigenen Fähigkeiten führt, vermutlich durch die Hochregulierung von Ziel-mRNAs wie *Csf1r* und *Axl*. Ein Vergleich von *Mir34a*-defizienten mit *Mir34a*-positiven BMDMs zeigte eine erhöhte Migration von *Mir34a*-defizienten BMDMs sowie eine verstärkte Migration von CT-26-Zellen bei Ko-Kultivierung mit BMDMs, die eine *Mir34a*-Defizienz aufwiesen. Als nächstes wurde die Hypothese untersucht, ob Stickstoffmonoxid/NO (*english*: nitric oxide) für die Induktion von *Mir34a* während einer Entzündungsreaktion verantwortlich sein könnte. Tatsächlich führt die NO-Behandlung von BMDMs zu einer *p53*-abhängigen Induktion der *pri-Mir34a*-Expression, was eine Erklärung dafür sein könnte, wie die myeloische *Mir34a*-Expression unter inflammatorischen Bedingungen induziert wird. Durch den Nachweis von M1- und M2-Markern in *Mir34a*-positiven und -defizienten BMDMs und KAKs wurde die Zunahme der tumorfördernden Makrophagen in KAKs mit myeloischem Verlust von *Mir34a* bestätigt. Diese Ergebnisse legten nahe, dass *Mir34a* die Migration und Invasion durch Suppression des tumorfördernden Phänotyps von Makrophagen verhindert. Der myeloische Verlust von *Mir34a* zeigte in verschiedenen Analysen erhöhte *Csf1r*-Expressionsniveaus auf, weshalb wir Mäuse mit gleichzeitiger heterozygoter und homozygoter myeloischer Deletion von *Csf1r* und *Mir34a* generiert und deren KAKs analysiert haben. Die Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte *Csf1r*-Expression ein wichtiger Mediator der *Mir34a*-Effekte ist und implizieren, dass *Mir34a* den tumorfördernden Phänotyp der Makrophagen und die KAK-Progression zumindest teilweise durch Unterdrückung der *Csf1r*-Expression hemmt. Aufgrund des erhöhten *Csf1r*-Expressionsniveaus in myeloischen *Mir34a*-defizienten KAKs und die Neutralisierung des

Effekts durch die gleichzeitige myeloische Deletion von *Csf1r* und *Mir34a* befassten wir uns als nächstes mit der Frage, ob die Inhibition von *Csf1r* für KAKs mit beeinträchtigter myeloischer *Mir34a*-Expression von Vorteil sein könnte. Die Ergebnisse zeigen, dass myeloisch *Mir34a*-defiziente KAKs verstärkt auf die Behandlung mit *Csf1r*-Inhibitoren reagieren, was teilweise mit den Beobachtungen bei den genetisch veränderten Mäusen übereinstimmte. Insgesamt liefert diese Studie Hinweise darauf, dass die myeloische *Mir34a* Expression den tumorfördernden Makrophagen-Phänotyp und damit die KAK-Progression zumindest teilweise durch Herabregulierung der *Csf1r*-Signalgebung hemmt. Darüber hinaus wurden in dieser Studie mehrere unveröffentlichte, potentielle *Mir34a*-Ziel-mRNAs identifiziert, die die KAK-Progression vorantreiben könnten. Die gezielte Beeinflussung dieser und weiterer Faktoren, die in myeloischen Zellen des TME dereguliert sind und in dieser Studie identifiziert wurden, könnte die KAK-Therapie in Zukunft verbessern.

#### 4. Summary (English):

The *Mir-34a* miRNA is encoded by a direct target gene of the tumor suppressor gene *p53* and is commonly epigenetically inactivated in colorectal cancers. As the *in vivo* role of the previously identified *Mir34a/Csf1r* feedback loop remained unknown, we first confirmed that *Csf1r* is a conserved *miR-34a* target mRNA in mice.

To investigate whether the effects of *Mir34a*-deficiency on tumor progression are driven mainly by *Mir34a*-deficient tumor cells or whether *Mir34a*-deficient myeloid cells are also involved, we generated mice with myeloid cell specific deletion (*Mir34a*<sup>ΔMye</sup>) and intestinal-epithelial cell specific deletion (*Mir34a*<sup>ΔIEC</sup>) of *Mir34a* and induced colitis-associated colorectal cancer (CAC) in these. Surprisingly, mice with myeloid *Mir34a*-deficiency showed enhanced invasiveness of CACs when compared to mice with intestinal-epithelial cell specific deficiency of *Mir34a* suggesting a tumor suppressive role of *Mir34a* in both - myeloid and intestinal cells. We performed single-cell RNA sequencing, to further characterize the effect of *Mir34a*-deficiency in myeloid cells on CACs. Thereby, we observed an elevation of neutrophils and macrophages in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup> CACs which presumably occurred due to increased *Cxcr2* and *Csf1r* signaling and a decrease in epithelial CAC cells when compared to wild-type CACs. Interestingly, CAC cells of myeloid *Mir34a*-deficient mice displayed an increase in inflammatory signaling with a partially mesenchymal signature suggesting that those CAC cells might be responsible for enhanced migration and invasion. Sub-clustering of neutrophils revealed a subtype (TAN5), which was primarily present in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup> CACs and showed an elevation of IL6/STAT3 signaling as well as reactive oxygen species (ROS) signaling. In addition, next to other *Mir34a* target mRNAs, *Mmp9* was elevated and could therefore also be an essential contributing factor to tumor cell invasiveness in myeloid *Mir34a*-deficient CACs. Examining the subtypes of macrophages, an elevation of *Mrc1*<sup>+</sup> macrophages and a decrease of *Nos2*<sup>+</sup> macrophages in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup> CACs was observed suggesting a shift of macrophage polarization towards pro-tumorigenic phenotype due to myeloid loss of *Mir34a*. In addition, in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup> CACs an increased prevalence of the subtype of *Cdk8*<sup>+</sup> macrophages was observed. These macrophages displayed an up-regulation of mRNAs encoding enzymes that are involved in oxidative phosphorylation also indicating an “M2” macrophage polarization. Additionally, 21 published and 32

potential, not yet published, *Mir34a* target mRNAs were upregulated in *Mir34a*<sup>ΔMye</sup> macrophages. Five of the upregulated, published *Mir34a* target mRNAs, *Csf1r*, *Axl*, *Foxp1*, *Ccr1*, *Nampt* and *Tgfb2*, were expressed in at least 50% of cells and their expression was highest in the macrophage subtype *Mrc1*<sup>+</sup>. These results indicate that myeloid loss of *Mir34a* leads to an elevation of macrophages with pro-tumorigenic abilities presumably by up-regulation of target mRNAs, such as *Csf1r* and *Axl*. By comparing *Mir34a*-deficient with *Mir34a*-proficient BMDMs, we observed increased migration of *Mir34a*-deficient BMDMs as well as enhanced CT-26 cell migration when co-cultured with *Mir34a*-deficient BMDMs. We next hypothesized that nitric oxide (NO) might also be responsible for the induction of *Mir34a* during inflammation. Indeed, NO-treatment of BMDMs led to induction of *pri-Mir34a* expression in a *p53*-dependent manner, providing an explanation of how myeloid *Mir34a* expression might be induced under physiological conditions. By mRNA analysis and immunohistochemical staining of M1- and M2-marker in *Mir34a*-proficient and -deficient BMDMs and CACs the increase of pro-tumoral macrophages in CACs with myeloid loss of *Mir34a* was confirmed and suggested that *Mir34a* may prevent migration and invasion by suppressing the pro-tumoral phenotype of macrophages. As with myeloid loss of *Mir34a* elevated *Csf1r* expression levels were detected by several approaches, we generated mice with concomitant, heterozygous as well as homozygous, myeloid deletion of *Csf1r* and *Mir34a* and analyzed their CACs. The results showed that the increased *Csf1r* expression is an important mediator of the effects of *Mir34a* inactivation and imply that *Mir34a* inhibits the pro-tumoral phenotype of macrophages and CAC progression at least in part by decreasing *Csf1r* expression. Due to the elevated *Csf1r* expression levels in myeloid *Mir34a*-deficient CACs and the reversed effect by concomitant myeloid deletion of *Csf1r* and *Mir34a*, we next addressed the question whether *Csf1r* inhibition might be beneficial for CACs with impaired myeloid *Mir34a* expression. The results demonstrate that myeloid *Mir34a*-deficient CACs are more sensitive to *Csf1r* inhibitor treatment. This was in partial agreement with the observations made in the genetically modified mice. Overall, this study provides evidence that myeloid *Mir34a* expression inhibits a pro-tumoral “M2” macrophage phenotype and thereby CAC progression, at least in part, by down regulation of *Csf1r* signaling. Furthermore, this study also identified several unpublished, potential *Mir34a* target mRNAs, which

---

are deregulated in myeloid cells of the TME and might drive CAC progression. Targeting these may improve CAC therapy in the future.

## 5. Paper I

### ***Csf1r* mediates enhancement of intestinal tumorigenesis caused by inactivation of *Mir34a***

F. Liu, N. Bouznad, M. Kaller, X. Shi, J. König, S. Jaeckel and H. Hermeking  
International Journal of Biological Sciences 2022 Vol. 18 Issue 14 Pages 5415-5437; DOI: 10.7150/ijbs.75503; <https://www.ijbs.com/v18p5415.htm>

## 6. Paper II

### **Myeloid *Mir34a* suppresses colitis-associated colon cancer: characterization of mediators by single-cell RNA sequencing**

J. König, M. Rokavec, M. G. Öner-Ziegler, Y. Fei and H. Hermeking

Cell Death and Differentiation. 2025 Feb;32(2):225-241. Doi: 10.1038/s41418-024-01380-9. Epub 2024 Oct 18.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2024. **74**(3): p. 229-263.
2. Lewandowska, A.M., et al., *Environmental risk factors for cancer - review paper*. Ann Agric Environ Med, 2019. **26**(1): p. 1-7.
3. Bhatia, S., et al., *High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group*. J Clin Oncol, 2003. **21**(23): p. 4386-94.
4. Burger, M., et al., *Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer*. Eur Urol, 2013. **63**(2): p. 234-41.
5. Ansell, P., et al., *Brain tumor signs and symptoms: analysis of primary health care records from the UKCCS*. Pediatrics, 2010. **125**(1): p. 112-9.
6. Kim, C.H., et al., *Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO)*. Int J Cancer, 2014. **135**(8): p. 1918-30.
7. Lajous, M., et al., *Folate, vitamin B(6), and vitamin B(12) intake and the risk of breast cancer among Mexican women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(3): p. 443-8.
8. Peterson, E., P. De, and R. Nuttall, *BMI, diet and female reproductive factors as risks for thyroid cancer: a systematic review*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29177.
9. Weinberg, R.A., *How cancer arises*. Sci Am, 1996. **275**(3): p. 62-70.
10. Foulds, L., *The natural history of cancer*. J Chronic Dis, 1958. **8**(1): p. 2-37.
11. Bishop, J.M., *The molecular genetics of cancer*. Science, 1987. **235**(4786): p. 305-11.
12. Weinberg, R.A., *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis*. Cancer Res, 1989. **49**(14): p. 3713-21.
13. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
15. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
16. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
17. Cannon-Albright, L.A., et al., *Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 533-7.
18. Cannon-Albright, L.A., et al., *Characteristics of familial colon cancer in a large population data base*. Cancer, 1989. **64**(9): p. 1971-5.

19. Rustgi, A.K., *The genetics of hereditary colon cancer*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2525-38.
20. Yamagishi, H., et al., *Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers*. Chin J Cancer, 2016. **35**: p. 4.
21. Zhang, M., et al., *Roles of macrophages on ulcerative colitis and colitis-associated colorectal cancer*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1103617.
22. Porter, R.J., et al., *Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer: Translational Risks from Mechanisms to Medicines*. J Crohns Colitis, 2021. **15**(12): p. 2131-2141.
23. Ou, B., et al., *Survival of Colorectal Cancer in Patients With or Without Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(3): p. 881-9.
24. Olén, O., et al., *Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study*. Lancet, 2020. **395**(10218): p. 123-131.
25. Watanabe, T., et al., *Ulcerative colitis-associated colorectal cancer shows a poorer survival than sporadic colorectal cancer: a nationwide Japanese study*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(3): p. 802-8.
26. Leowardi, C., et al., *Prognosis of Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Carcinoma Compared to Sporadic Colorectal Carcinoma: A Matched Pair Analysis*. Ann Surg Oncol, 2016. **23**(3): p. 870-6.
27. Brentnall, T.A., et al., *Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1994. **107**(2): p. 369-78.
28. Fleisher, A.S., et al., *Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4864-8.
29. Robles, A.I., et al., *Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers*. Gastroenterology, 2016. **150**(4): p. 931-43.
30. Yaeger, R., et al., *Genomic Alterations Observed in Colitis-Associated Cancers Are Distinct From Those Found in Sporadic Colorectal Cancers and Vary by Type of Inflammatory Bowel Disease*. Gastroenterology, 2016. **151**(2): p. 278-287.e6.
31. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-70.
32. Fearon, E.R., *Molecular genetics of colorectal cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 479-507.
33. Beaugerie, L. and S.H. Itzkowitz, *Cancers complicating inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2015. **372**(15): p. 1441-52.
34. Tong, Y., W. Yang, and H.P. Koeffler, *Mouse models of colorectal cancer*. Chin J Cancer, 2011. **30**(7): p. 450-62.
35. Moser, A.R., et al., *ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis*. Eur J Cancer, 1995. **31a**(7-8): p. 1061-4.

36. Ren, J., et al., *The application of Apc(Min/+) mouse model in colorectal tumor researches*. J Cancer Res Clin Oncol, 2019. **145**(5): p. 1111-1122.
37. Polakis, P., *The oncogenic activation of beta-catenin*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(1): p. 15-21.
38. McCart, A.E., N.K. Vickaryous, and A. Silver, *Apc mice: models, modifiers and mutants*. Pathol Res Pract, 2008. **204**(7): p. 479-90.
39. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.
40. Moser, A.R., H.C. Pitot, and W.F. Dove, *A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse*. Science, 1990. **247**(4940): p. 322-4.
41. Su, L.K., et al., *Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene*. Science, 1992. **256**(5057): p. 668-70.
42. Jaeckel, S., et al., *Ap4 is rate limiting for intestinal tumor formation by controlling the homeostasis of intestinal stem cells*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3573.
43. Nambiar, P.R., et al., *Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors*. Int J Oncol, 2003. **22**(1): p. 145-50.
44. Neufert, C., C. Becker, and M.F. Neurath, *An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression*. Nat Protoc, 2007. **2**(8): p. 1998-2004.
45. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
46. Kawada, M., A. Arihiro, and E. Mizoguchi, *Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(42): p. 5581-93.
47. Brtin, F., C.S. Mullins, and M. Linnebacher, *Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(13): p. 1394-1426.
48. Yang, C. and D. Merlin, *Unveiling Colitis: A Journey through the Dextran Sodium Sulfate-induced Model*. Inflamm Bowel Dis, 2024. **30**(5): p. 844-853.
49. Johansson, M.E., et al., *Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12238.
50. Eichele, D.D. and K.K. Kharbanda, *Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(33): p. 6016-6029.
51. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. Curr Protoc Immunol, 2014. **104**: p. 15.25.1-15.25.14.

52. Laroui, H., et al., *Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32084.
53. Murphy, K. and C. Weaver, *Grundbegriffe der Immunologie*, in *Janeway Immunologie*. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 3-46.
54. Smith, K.A., *Edward jenner and the small pox vaccine*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 21.
55. Gronski, P., F.R. Seiler, and H.G. Schwick, *Discovery of antitoxins and development of antibody preparations for clinical uses from 1890 to 1990*. Mol Immunol, 1991. **28**(12): p. 1321-32.
56. Llewelyn, M.B., R.E. Hawkins, and S.J. Russell, *Discovery of antibodies*. British Medical Journal, 1992. **305**(6864): p. 1269-1272.
57. Behring, E.v.K., Shibasaburo, *Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren*. Philipps-Universität Marburg, 2013.
58. Mechnikov, I.i.I.i., *Immunity in Infective Diseases*. Reviews of Infectious Diseases, 1988. **10**(1): p. 223-227.
59. Schmalstieg, F.C., Jr. and A.S. Goldman, *Ilya Ilich Metchnikoff (1845-1915) and Paul Ehrlich (1854-1915): the centennial of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine*. J Med Biogr, 2008. **16**(2): p. 96-103.
60. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
61. Traver, D., et al., *Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets*. Blood, 2001. **98**(3): p. 627-35.
62. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
63. Uberoi, A., et al., *Commensal microbiota regulates skin barrier function and repair via signaling through the aryl hydrocarbon receptor*. Cell Host Microbe, 2021. **29**(8): p. 1235-1248.e8.
64. Zheng, Y., et al., *Commensal Staphylococcus epidermidis contributes to skin barrier homeostasis by generating protective ceramides*. Cell Host Microbe, 2022. **30**(3): p. 301-313.e9.
65. Bomar, L., et al., *Corynebacterium accolens Releases Antipneumococcal Free Fatty Acids from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols*. mBio, 2016. **7**(1): p. e01725-15.
66. Ridaura, V.K., et al., *Contextual control of skin immunity and inflammation by Corynebacterium*. J Exp Med, 2018. **215**(3): p. 785-799.
67. Harris-Tryon, T.A. and E.A. Grice, *Microbiota and maintenance of skin barrier function*. Science, 2022. **376**(6596): p. 940-945.
68. Carroll, M.V. and R.B. Sim, *Complement in health and disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(12): p. 965-75.
69. Kareem, S., et al., *Complement: Functions, location and implications*. Immunology, 2023. **170**(2): p. 180-192.

70. Kamradt, T. and K. Ferrari-Kühne, *Das adaptive Immunsystem*. Dtsch Med Wochenschr, 2011. **136**(33): p. 1678-1683.
71. Wang, R., et al., *The interaction of innate immune and adaptive immune system*. MedComm, 2024. **5**(10): p. e714.
72. de Visser, K.E. and J.A. Joyce, *The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth*. Cancer Cell, 2023. **41**(3): p. 374-403.
73. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
74. DeNardo, D.G., et al., *CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages*. Cancer Cell, 2009. **16**(2): p. 91-102.
75. Ahrends, T., et al., *CD4(+) T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness*. Immunity, 2017. **47**(5): p. 848-861.e5.
76. Overacre-Delgoffe, A.E., et al., *Interferon- $\gamma$  Drives T(reg) Fragility to Promote Anti-tumor Immunity*. Cell, 2017. **169**(6): p. 1130-1141.e11.
77. Siddiqui, I., et al., *Intratumoral Tcf1(+)PD-1(+)CD8(+) T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy*. Immunity, 2019. **50**(1): p. 195-211.e10.
78. Olkhanud, P.B., et al., *Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells*. Cancer Res, 2011. **71**(10): p. 3505-15.
79. Wejksza, K., et al., *Cancer-produced metabolites of 5-lipoxygenase induce tumor-evoked regulatory B cells via peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* . J Immunol, 2013. **190**(6): p. 2575-84.
80. Movahedi, K., et al., *Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5728-39.
81. Mitchem, J.B., et al., *Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses*. Cancer Res, 2013. **73**(3): p. 1128-41.
82. Penny, H.L., et al., *Warburg metabolism in tumor-conditioned macrophages promotes metastasis in human pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncoimmunology, 2016. **5**(8): p. e1191731.
83. Coffelt, S.B., et al., *IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis*. Nature, 2015. **522**(7556): p. 345-348.
84. Schalper, K.A., et al., *Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors*. Nat Med, 2020. **26**(5): p. 688-692.
85. Olumi, A.F., et al., *Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium*. Cancer Res, 1999. **59**(19): p. 5002-11.

86. Damiano, J.S., et al., *Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1658-67.
87. He, Y., et al., *Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(11): p. 819-25.
88. Scott, A.M., et al., *A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(5): p. 1639-47.
89. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
90. Dominiak, A., et al., *Communication in the Cancer Microenvironment as a Target for Therapeutic Interventions*. Cancers (Basel), 2020. **12**(5).
91. Sharma, P., et al., *The Next Decade of Immune Checkpoint Therapy*. Cancer Discov, 2021. **11**(4): p. 838-857.
92. van Niel, G., et al., *Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022. **23**(5): p. 369-382.
93. Lucotti, S., et al., *Extracellular vesicles and particles impact the systemic landscape of cancer*. Embo j, 2022. **41**(18): p. e109288.
94. Chen, G., et al., *Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response*. Nature, 2018. **560**(7718): p. 382-386.
95. Poggio, M., et al., *Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory*. Cell, 2019. **177**(2): p. 414-427.e13.
96. Mascaux, C., et al., *Immune evasion before tumour invasion in early lung squamous carcinogenesis*. Nature, 2019. **571**(7766): p. 570-575.
97. Bach, K., et al., *Time-resolved single-cell analysis of Brca1 associated mammary tumorigenesis reveals aberrant differentiation of luminal progenitors*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1502.
98. Canli, Ö., et al., *Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis*. Cancer Cell, 2017. **32**(6): p. 869-883.e5.
99. Denk, D. and F.R. Greten, *Inflammation: the incubator of the tumor microenvironment*. Trends Cancer, 2022. **8**(11): p. 901-914.
100. Güç, E. and J.W. Pollard, *Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade*. Immunity, 2021. **54**(5): p. 885-902.
101. Pittet, M.J., O. Michielin, and D. Migliorini, *Clinical relevance of tumour-associated macrophages*. Nat Rev Clin Oncol, 2022. **19**(6): p. 402-421.
102. Quail, D.F., et al., *Neutrophil phenotypes and functions in cancer: A consensus statement*. J Exp Med, 2022. **219**(6).
103. Lin, E.Y., et al., *Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 727-40.

104. Pyonteck, S.M., et al., *CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1264-72.
105. Steele, C.W., et al., *CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2016. **29**(6): p. 832-845.
106. Olson, O.C., D.F. Quail, and J.A. Joyce, *Obesity and the tumor microenvironment*. Science, 2017. **358**(6367): p. 1130-1131.
107. Quail, D.F., et al., *Obesity alters the lung myeloid cell landscape to enhance breast cancer metastasis through IL5 and GM-CSF*. Nat Cell Biol, 2017. **19**(8): p. 974-987.
108. Bejarano, L., M.J.C. Jordão, and J.A. Joyce, *Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment*. Cancer Discov, 2021. **11**(4): p. 933-959.
109. DeNardo, D.G., et al., *Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy*. Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 54-67.
110. DeNardo, D.G. and B. Ruffell, *Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(6): p. 369-382.
111. Akkari, L., et al., *Dynamic changes in glioma macrophage populations after radiotherapy reveal CSF-1R inhibition as a strategy to overcome resistance*. Sci Transl Med, 2020. **12**(552).
112. Monteran, L., et al., *Chemotherapy-induced complement signaling modulates immunosuppression and metastatic relapse in breast cancer*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 5797.
113. Coussens, L.M., et al., *MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis*. Cell, 2000. **103**(3): p. 481-90.
114. Gocheva, V., et al., *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion*. Genes Dev, 2010. **24**(3): p. 241-55.
115. Akkari, L., et al., *Distinct functions of macrophage-derived and cancer cell-derived cathepsin Z combine to promote tumor malignancy via interactions with the extracellular matrix*. Genes Dev, 2014. **28**(19): p. 2134-50.
116. Olson, O.C. and J.A. Joyce, *Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(12): p. 712-29.
117. Maller, O., et al., *Tumour-associated macrophages drive stromal cell-dependent collagen crosslinking and stiffening to promote breast cancer aggression*. Nat Mater, 2021. **20**(4): p. 548-559.
118. Suarez-Carmona, M., et al., *EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression*. Mol Oncol, 2017. **11**(7): p. 805-823.
119. Kai, F., A.P. Drain, and V.M. Weaver, *The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey*. Dev Cell, 2019. **49**(3): p. 332-346.
120. Linde, N., et al., *Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 21.

121. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
122. Shankaran, V., et al., *IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
123. Corthay, A., et al., *Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 371-83.
124. DeNardo, D.G., P. Andreu, and L.M. Coussens, *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 309-16.
125. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
126. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
127. Mantovani, A., et al., *Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation*. Hum Immunol, 2009. **70**(5): p. 325-30.
128. Biswas, S.K., P. Allavena, and A. Mantovani, *Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(5): p. 585-600.
129. Noy, R. and J.W. Pollard, *Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 49-61.
130. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
131. Yeramian, A., et al., *Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 5918-24.
132. Rath, M., et al., *Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 532.
133. Munder, M., K. Eichmann, and M. Modolell, *Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype*. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5347-54.
134. Munder, M., et al., *Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3771-7.
135. Lin, E.Y., et al., *Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11238-46.
136. Qian, B., et al., *A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6562.

137. Zheng, Y., et al., *Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis*. Blood, 2009. **114**(17): p. 3625-8.
138. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
139. Tu, D., et al., *M2 macrophages contribute to cell proliferation and migration of breast cancer*. Cell Biol Int, 2021. **45**(4): p. 831-838.
140. Wang, X., et al., *Hypoxic Tumor-Derived Exosomal miR-301a Mediates M2 Macrophage Polarization via PTEN/PI3K $\gamma$  to Promote Pancreatic Cancer Metastasis*. Cancer Res, 2018. **78**(16): p. 4586-4598.
141. Hu, X., et al., *Glutamine metabolic microenvironment drives M2 macrophage polarization to mediate trastuzumab resistance in HER2-positive gastric cancer*. Cancer Commun (Lond), 2023. **43**(8): p. 909-937.
142. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
143. Li, L., et al., *A unique role for p53 in the regulation of M2 macrophage polarization*. Cell Death Differ, 2015. **22**(7): p. 1081-93.
144. He, X.Y., et al., *p53 in the Myeloid Lineage Modulates an Inflammatory Microenvironment Limiting Initiation and Invasion of Intestinal Tumors*. Cell Rep, 2015. **13**(5): p. 888-97.
145. Blagih, J., et al., *Cancer-Specific Loss of p53 Leads to a Modulation of Myeloid and T Cell Responses*. Cell Rep, 2020. **30**(2): p. 481-496.e6.
146. Shi, X., et al., *Characterization of a p53/miR-34a/CSF1R/STAT3 Feedback Loop in Colorectal Cancer*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020.
147. Stanley, E.R. and V. Chitu, *CSF-1 receptor signaling in myeloid cells*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(6).
148. Guilbert, L.J. and E.R. Stanley, *Specific interaction of murine colony-stimulating factor with mononuclear phagocytic cells*. J Cell Biol, 1980. **85**(1): p. 153-9.
149. Byrne, P.V., L.J. Guilbert, and E.R. Stanley, *Distribution of cells bearing receptors for a colony-stimulating factor (CSF-1) in murine tissues*. J Cell Biol, 1981. **91**(3 Pt 1): p. 848-53.
150. MacDonald, K.P., et al., *The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1399-405.
151. Huynh, D., et al., *Colony stimulating factor-1 dependence of paneth cell development in the mouse small intestine*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 136-44, 144.e1-3.
152. Rettenmier, C.W., et al., *Synthesis of membrane-bound colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and downmodulation of CSF-1 receptors in NIH 3T3 cells transformed by cotransfection of the human CSF-1 and c-fms (CSF-1 receptor) genes*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(7): p. 2378-87.

153. Suzu, S., et al., *Identification of a high molecular weight macrophage colony-stimulating factor as a glycosaminoglycan-containing species*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4345-8.
154. Price, L.K., et al., *The predominant form of secreted colony stimulating factor-1 is a proteoglycan*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2190-9.
155. Dai, X.M., et al., *Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient Csf1op/Csf1op mice by transgenic expression of cell surface CSF-1*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1114-23.
156. Nandi, S., et al., *Developmental and functional significance of the CSF-1 proteoglycan chondroitin sulfate chain*. Blood, 2006. **107**(2): p. 786-95.
157. Lin, H., et al., *Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome*. Science, 2008. **320**(5877): p. 807-11.
158. Mun, S.H., P.S.U. Park, and K.H. Park-Min, *The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond*. Exp Mol Med, 2020. **52**(8): p. 1239-1254.
159. Mancini, A., et al., *Identification of a second Grb2 binding site in the v-Fms tyrosine kinase*. Oncogene, 1997. **15**(13): p. 1565-72.
160. Yu, W., et al., *Macrophage proliferation is regulated through CSF-1 receptor tyrosines 544, 559, and 807*. J Biol Chem, 2012. **287**(17): p. 13694-704.
161. Zhu, Y., et al., *CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models*. Cancer Res, 2014. **74**(18): p. 5057-69.
162. Candido, J.B., et al., *CSF1R(+) Macrophages Sustain Pancreatic Tumor Growth through T Cell Suppression and Maintenance of Key Gene Programs that Define the Squamous Subtype*. Cell Rep, 2018. **23**(5): p. 1448-1460.
163. Gyori, D., et al., *Compensation between CSF1R+ macrophages and Foxp3+ Treg cells drives resistance to tumor immunotherapy*. JCI Insight, 2018. **3**(11).
164. Quail, D.F., et al., *The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas*. Science, 2016. **352**(6288): p. aad3018.
165. Manthey, C.L., et al., *The CSF-1-receptor inhibitor, JNJ-40346527 (PRV-6527), reduced inflammatory macrophage recruitment to the intestinal mucosa and suppressed murine T cell mediated colitis*. PLoS One, 2019. **14**(11): p. e0223918.
166. Lv, Q., et al., *CSF1R inhibition reprograms tumor-associated macrophages to potentiate anti-PD-1 therapy efficacy against colorectal cancer*. Pharmacol Res, 2024. **202**: p. 107126.
167. Cannarile, M.A., et al., *Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy*. J Immunother Cancer, 2017. **5**(1): p. 53.
168. von Tresckow, B., et al., *An Open-Label, Multicenter, Phase I/II Study of JNJ-40346527, a CSF-1R Inhibitor, in Patients with Relapsed or*

- Refractory Hodgkin Lymphoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(8): p. 1843-50.
169. Gomez-Roca, C.A., et al., *Phase I study of emactuzumab single agent or in combination with paclitaxel in patients with advanced/metastatic solid tumors reveals depletion of immunosuppressive M2-like macrophages*. Ann Oncol, 2019. **30**(8): p. 1381-1392.
170. Machiels, J.P., et al., *Phase Ib study of anti-CSF-1R antibody emactuzumab in combination with CD40 agonist selicrelumab in advanced solid tumor patients*. J Immunother Cancer, 2020. **8**(2).
171. Ordentlich, P., *Clinical evaluation of colony-stimulating factor 1 receptor inhibitors*. Semin Immunol, 2021. **54**: p. 101514.
172. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
173. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
174. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. Rna, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
175. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
176. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. Embo j, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
177. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
178. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. Rna, 2004. **10**(2): p. 185-91.
179. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
180. Saito, K., et al., *Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in Drosophila cells*. PLoS Biol, 2005. **3**(7): p. e235.
181. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. Embo j, 2006. **25**(3): p. 522-32.
182. Bushati, N. and S.M. Cohen, *microRNA functions*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 175-205.
183. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
184. Rokavec, M., et al., *The p53/miR-34 axis in development and disease*. J Mol Cell Biol, 2014. **6**(3): p. 214-30.
185. Pigazzi, M., et al., *miR-34b targets cyclic AMP-responsive element binding protein in acute myeloid leukemia*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2471-8.

186. Kaller, M., et al., *Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(8): p. M111.010462.
187. Siemens, H., et al., *Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness*. Oncotarget, 2013. **4**(9): p. 1399-415.
188. Rokavec, M., et al., *IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis*. J Clin Invest, 2014. **124**(4): p. 1853-67.
189. He, L., et al., *A microRNA component of the p53 tumour suppressor network*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1130-4.
190. Hermeking, H., *p53 enters the microRNA world*. Cancer Cell, 2007. **12**(5): p. 414-8.
191. Raver-Shapira, N., et al., *Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 731-43.
192. Tarasov, V., et al., *Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest*. Cell Cycle, 2007. **6**(13): p. 1586-93.
193. Hermeking, H., *MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(9): p. 613-26.
194. Concepcion, C.P., et al., *Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice*. PLoS Genet, 2012. **8**(7): p. e1002797.
195. Cheng, C.Y., et al., *miR-34 cooperates with p53 in suppression of prostate cancer by joint regulation of stem cell compartment*. Cell Rep, 2014. **6**(6): p. 1000-1007.
196. Jiang, L. and H. Hermeking, *miR-34a and miR-34b/c Suppress Intestinal Tumorigenesis*. Cancer Res, 2017. **77**(10): p. 2746-2758.
197. Öner, M.G., et al., *Combined Inactivation of TP53 and MIR34A Promotes Colorectal Cancer Development and Progression in Mice Via Increasing Levels of IL6R and PAI1*. Gastroenterology, 2018. **155**(6): p. 1868-1882.
198. Schwitalla, S., et al., *Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors*. Cancer Cell, 2013. **23**(1): p. 93-106.
199. Daveri, E., et al., *microRNAs Shape Myeloid Cell-Mediated Resistance to Cancer Immunotherapy*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**.
200. Liu, X., et al., *MicroRNAs/LncRNAs Modulate MDSCs in Tumor Microenvironment*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 772351.
201. Weng, Y.S., et al., *MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancer stemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 42.

- 
202. Yong, H., et al., *MiR-34a suppresses the proliferation and invasion of gastric cancer by modulating PDL1 in the immune microenvironment*. Mol Cell Probes, 2020. **53**: p. 101601.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Heiko Hermeking meinen aufrichtigsten Dank aussprechen. Er ermöglichte es mir, in seinem Labor und an diesem interessanten Projekt zu arbeiten. Mit seiner wissenschaftlichen Anleitung und Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit konnte ich meine experimentellen Techniken und mein wissenschaftliches Denken bei komplexen Forschungsfragen verbessern. Ohne seine Ratschläge und Anweisungen hätte ich dieses Projekt in dieser Form nicht verwirklichen können.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlichst bei Dr. Meryem Gülfem Öner-Ziegler für ihre Betreuung, ihr Feedback und die guten Gespräche zu Beginn meiner Reise als Doktorandin bedanken. Dr. Matjaz Rokavec danke ich sehr für seine Hilfe und Durchführung der bioinformatischen Analysen und die daraus resultierenden Diskussionen während des Projekts. Auch bei Ye Fei möchte ich mich für seine Unterstützung bedanken. Ursula Götz danke ich herzlichst für die technische Unterstützung während der gesamten Zeit.

Des Weiteren möchte ich meinen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen Dr. Markus Kaller, Dr. Fangteng Liu, Dr. Nassim Bouznad, Dr. Stephanie Jaeckel, Dr. Xiaolong Shi, Dr. Markus Winter, Dr. Jinjiang Chou, Dr. Chungfeng Liu, Dr. Zekai Huang, Dr. Wenjing Shi, Xiaoyan Chen, Yuyun Du und Yun Chen danken. Sie haben meine Zeit während der Promotion zu etwas Besonderem und Unvergesslichen gemacht.

Als nächstes möchte ich auch PD Dr. Peter Jung und seinen ehemaligen Arbeitsgruppenmitgliedern Dr. Cira Garcia De Durango, Dr. Vanessa Gerber, Dr. Sophie Boos and Dr. Leon Loevenich für die Diskussionen und die tolle Zeit im Labor danken.

Zudem möchte ich meine Dankbarkeit für die emotionale Unterstützung während dieser Reise zum Ausdruck bringen, welche ich von meinen Freunden, „Workout-Buddies“ und Trainern erfahren habe.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Ermutigung während dieser ganzen Zeit danken! Ich bin unendlich dankbar, eine so tolle Familie zu haben.