

**Die Rolle von RIP2 bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der  
Regulation der Metastasierung durch XIAP**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Sabrina Mersch**  
aus Solingen

Düsseldorf, Oktober 2017

aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Andreas Krieg

2. Prof. Dr. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2018

„Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht mit einem  
Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen.

Ein Plus an Wissen bedeutet ein Plus an Fragestellungen, und jede von ihnen wird immer  
wieder von neuen Fragestellungen abgelöst.“

Hermann Hesse

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das kolorektale Karzinom – Inzidenz und Pathogenese .....	1
1.2	Karzinogenese des Kolonkarzinoms .....	2
1.3	Die Histologie des Dickdarms .....	4
1.4	TNM-Klassifizierung und UICC-Stadien .....	4
1.5	Therapien des Kolonkarzinoms .....	6
1.6	Molekulare Mechanismen der Metastasierung.....	8
1.7	Inflammation als Promotor von Tumorentstehung und Metastasierung .....	10
1.8	Pattern Recognition Receptors – TLRs, NLRs und ihre Rolle bei der Tumorgenese.....	12
1.9	Die Funktion des X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein in inflammatorischen Signalwegen .....	15
1.10	Die Rezeptor-interagierende Serin-Threonin-Kinase 2 (RIP2) .....	17
1.11	Das TAK1-Binding Protein 1 (TAB1) im NOD-Signalweg.....	18
1.12	Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und seine Funktion in der Signalvermittlung .....	19
1.13	Chemokine und ihre Rolle in der Tumorgenese.....	21
1.14	Die Regulation der angeborenen Immunantwort durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und dem NOD-Signalweg .....	22
1.15	Zielsetzung dieser Arbeit .....	25
<b>2</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>27</b>
2.1	Zelllinien und Bakterienstämme .....	27
2.1.1	Zelllinie .....	27
2.1.2	Bakterienstämme .....	28
2.2	Liganden .....	28
2.3	Antibiotika .....	28
2.4	Verbrauchsmaterialien .....	28
2.5	Chemikalien .....	29
2.6	Medien, Puffer und Lösungen.....	29

2.6.1	Medien .....	29
2.6.2	LB-Medium .....	29
2.6.3	LB-Agar .....	29
2.6.4	Puffer .....	30
2.7	Färbelösung .....	32
2.8	Transfektionsreagenzien, Reaktionsmixe und Enzyme .....	32
2.8.1	Transfektionsreagenzien .....	32
2.8.2	cDNA-Synthese- und PCR-Lösungen.....	32
2.8.3	Enzyme .....	32
2.9	Größenstandards.....	32
2.9.1	DNA-Leiter .....	32
2.9.2	Protein-Leiter.....	33
2.10	Vektoren und Expressionskonstrukte .....	33
2.11	Antikörper.....	34
2.11.1	Western Blot.....	34
2.11.2	Immunhistochemie .....	35
2.12	Oligonukleotide .....	36
2.12.1	RealTime-PCR-Primer .....	36
2.12.2	PCR-Primer .....	37
2.12.3	Sequenzierprimer .....	37
2.13	Kit-Systeme.....	37
2.14	Laborgeräte .....	38
2.14.1	Thermocycler.....	38
2.14.2	Sterilbänke und Inkubatoren.....	38
2.14.3	Zentrifugen .....	38
2.14.4	Kühl- und Gefrierschränke .....	39
2.14.5	Heizblöcke und Wasserbäder .....	39
2.14.6	Waagen.....	39
2.14.7	Mikroskope.....	39
2.14.8	Sonstiges.....	39
2.15	Software .....	40

<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>41</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	41
3.1.1	DNA-Isolation aus Zellkultur.....	41
3.1.2	Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanen Karzinom-Zelllinien .....	41
3.1.3	Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel .....	42
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	43
3.1.5	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription .....	43
3.1.6	Messung der RNA-Expression mittels Real-Time PCR.....	44
3.1.7	Überprüfung der Bindungseffizienz erstmalig verwendeter Oligonukleotide in der qRT-PCR .....	45
3.1.8	Short-Tandem-Repeat (STR)-Analyse.....	46
3.1.9	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von RIP2 und TAB1 .....	46
3.1.10	Denaturierung und Wiedieranlagerung der PCR-Amplifikate.....	47
3.1.11	Fragmentierung erhaltener PCR-Produkte mittels Cel-I Assay .....	47
3.1.12	Durchführung einer PAGE-TBE-Gelelektrophorese und Bestimmung der Zinkfingernuklease-Aktivität .....	48
3.1.13	Agarose-Gelelektrophorese .....	48
3.1.14	Transformation von E. coli DH5 $\alpha$ .....	49
3.1.15	Isolierung von Plasmid-DNA durch Mini- bzw. Maxipräparation.....	49
3.1.16	Genexpressionsanalyse in der Zelllinie HCT116.....	50
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	51
3.2.1	Präparation von Proteinlysaten aus humanen Kolonkarzinom-Zelllinien .....	51
3.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	51
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	52
3.2.4	Western Blot.....	53
3.2.5	Immunbiologische Proteindetektion mittels ECL-System.....	54
3.2.6	Detektion der IL8-Sekretion von HCT116 Zellen mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	55
3.3	Zellbiologische Methoden .....	56
3.3.1	Passagieren von humanen Kolonkarzinom-Zelllinien .....	56
3.3.2	Gefrierkonservierung von humanen Zelllinien .....	57

3.3.3	Auftauen von Gefrierkulturen.....	57
3.3.4	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung .....	58
3.3.5	Titration der Puromycin-Konzentration zur Selektion von genetisch veränderten Zelllinien .....	58
3.3.6	PCR zur Detektion von Mycoplasmen in Zellkulturüberständen .....	59
3.3.7	DAPI-Färbung zur Detektion einer Mycoplasmenkontamination der Zellkultur.....	60
3.3.8	Einbringung von Fremd-DNA in humane Zelllinien.....	60
3.3.9	Generierung von genetischen Knock Outs mittels spezifischen Zinkfinger- Nukleasen .....	61
3.3.10	Sortieren von Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	64
3.3.11	Rekonstitution von RIP2 und TAB1 in Knock Out Zellen .....	65
3.3.12	Rekonstitution von RIP2 und TAB1 in Knock Out Zellen mit gleichzeitiger Überexpression von XIAP .....	66
3.3.13	Gewinnung von konditioniertem Medium.....	67
3.3.14	Bestimmung der Zellinvasivität mittels Matrigel Invasionskammer.....	67
3.3.15	Nachweis der NF- $\kappa$ B-Aktivität mittels Dual Luciferase-Reporter Assay.....	68
3.3.16	Behandlung der Zellkultur mit stimulierenden Agenzien .....	70
3.4	Immunhistochemische Methoden .....	71
3.4.1	Herstellung von Gewebeschnitten aus Tissue-Microarrays (TMAs) .....	71
3.4.2	Horseradish-Peroxidase (HRP)-Färbung von Paraffinschnitten .....	71
3.5	Statistik.....	73
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>75</b>
4.1	Die Korrelation der Expression von Proteinen des NOD-Signalwegs mit dem Gesamtüberleben von Patienten mit Kolonkarzinom .....	75
4.2	RNA-Expressionsanalyse mittels Microarray in stimulierten HCT116 WT und HCT116 XIAP <sup>-/-</sup> .....	87
4.3	Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR.....	90
4.4	clAP2-Expression in HCT116 WT und XIAP <sup>-/-</sup> -Klonen nach Stimulation des NOD-Signalwegs mittels MDP und DAP.....	92
4.5	Etablierung stabiler RIP2- und TAB- Knock Out Klone der Zelllinie HCT116 (SIB).....	93

4.6	Funktionelle Kontrolle der generierten HCT116 Knock Out Klone mittels Dual-Luciferase-Assay und quantitativer Real Time-PCR.....	96
4.7	Expressionskontrolle verschiedener NFκB-Zielgene mit Hilfe semiquantitativer RealTime-PCR.....	98
4.8	Nachweis der IL8-Sekretion in Knock Out Zellen nach MDP und DAP-Stimulation mittels ELISA .....	100
4.9	Rekonstitution von RIP2 und TAB1 in HCT116 Knock Out Klonen und Ermittlung der Auswirkungen auf die Aktivität der NF-κB-Zielgene in Abhängigkeit der Überexpression von XIAP.....	101
4.10	Vergleich der Invasionsfähigkeit zwischen Knock Out und wildtypischen Zellen im Boyden Chamber Assay .....	105
4.11	Generierung und Etablierung weiterer RIP2 <sup>-/-</sup> und TAB1 <sup>-/-</sup> -Klone .....	106
4.12	Funktionalitätskontrolle der neu generierten Klone nach MDP-Stimulation mittels qRT-PCR und Western Blot.....	109
4.13	Etablierung stabil XIAP-überexprimierender HCT116 Zellen und Untersuchung der XIAP-induzierten Invasion in Abhängigkeit von RIP2 und TAB1 mittels Boyden Chamber Assay .....	110
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>113</b>
5.1	Einfluss der Proteine des NOD-Signalwegs auf die Tumorprogression bei Kolonkarzinompatienten.....	114
5.2	Bestimmung der XIAP-abhängigen NF-κB-Zielgene nach Stimulation des NOD-Signalwegs in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien.....	116
5.3	Etablierung von genetischen RIP2 und TAB1-Knock Outs in der Zelllinie HCT116 .....	119
5.4	Nachweis der Spezifität des RIP2- bzw. TAB1-Knock Outs in HCT116 Kolonkarzinom-Zelllinien auf den NOD-Signalweg .....	120
5.5	Effekte des RIP2- und TAB1-Knock Outs auf die Signalweiterleitung innerhalb des NOD-Signalwegs und die damit verbundene Expression NF-κB-abhängiger Zielgene .....	121
5.6	Reaktivierungsversuche des NOD-Signalwegs durch die Rekonstitution von RIP2 und TAB1 .....	124
5.7	Auswirkungen des Knock Outs von RIP2 oder TAB1 auf die Invasionsfähigkeit der HCT116 Zelllinie .....	124
5.8	Schlussfolgerung.....	127

5.9	Ausblick.....	128
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>160</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>161</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
<b>A. dest</b>	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
APS	Ammonium-Persulfat
<b>BIR</b>	Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
bp	Basenpaar
<b>C(t)</b>	Cycle threshold
CARD	Caspase aktivierende und rekrutierende Domäne
CCL20	CC-chemokine ligand 20
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
ciAP2	cellular inhibitor of apoptosis 2
CIITA	MHC class II transcription activator
CXCL1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogen-Rezeptor (engl. estrogen receptor)
EtOH	Ethanol
<b>FAM</b>	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fötales Kälberserum
fw	forward
<b>g</b>	Beschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>h</b>	Stunden
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HET-E	incompatibility locus protein from Podospora anserina
HRP	Horserradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
iE-DAP	γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelinsäure
IgG	Immunglobulin G
IκB	NF-κB Inhibitor

IKK	I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplex
IL8	Interleukin 8
IRS	Immunreaktiver Score
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRK	Kolorektales Karzinom
LAR II	Luciferase Assay Reagent II
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich repeat
<b>M</b>	Molar
MDP	Muramyldipeptid
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
<b>NACHT</b>	Domäne bestehend aus NAIP, CIITA, HET-E und TEP1
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NG	Normalgewebe
ng	Nanogramm
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PAMP</b>	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	Progesteron-Rezeptor
PRR	Pattern Recognition Receptor
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
<b>RIN</b>	RNA Integritätsnummer
RING	Really Interesting New Gene-Domäne
RIP2	Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 2
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
rv	revers
<b>SDS</b>	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	short hairpin RNA
SIB	sibling
<b>Tab.</b>	Tabelle
TAB1	TAK1-bindendes Protein 1
TAL1	T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia Protein 1
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TaqMan	Hydrolyse-Sonde
TBS	Tris-buffered Saline
TBS-T	Tris-buffered Saline + Tween20
TP1	telomerase associated protein1
Tween20	Polysorbat 20, nichtionisches Tensid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Tumorgewebe
TMA	Tissue-Microarray
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
UICC	Union internationale contre le cancer
üN	über Nacht

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom – Inzidenz und Pathogenese

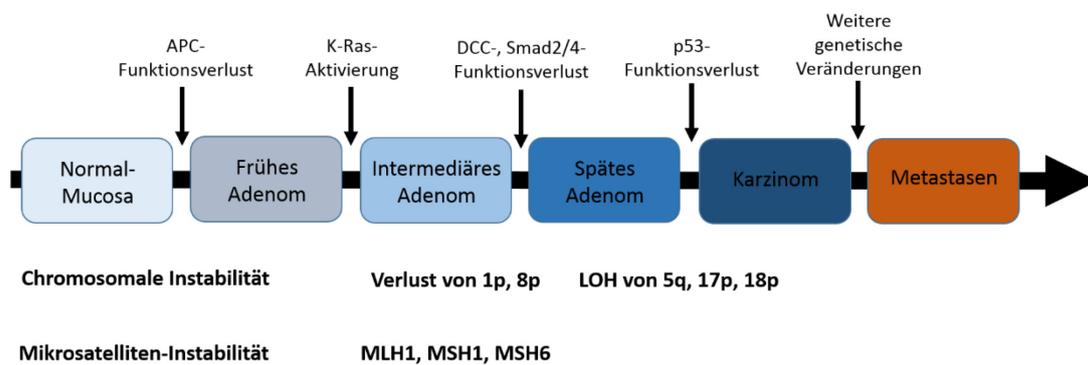
Krebs ist nach den Herz-Kreislauferkrankungen die häufigste Todesursache in Deutschland. Jährlich erkranken etwa 500.000 Menschen neu. Dabei ist Darmkrebs bei Männern als auch bei Frauen eine der drei häufigsten tumorösen Erkrankungen. Das Risiko einer Neuerkrankung steigt ab der fünften Lebensdekade, jedoch liegt das mittlere Erkrankungsalter bei Männern bei 72 Jahren, bei Frauen bei 75 Jahren. In den vergangenen Jahren hat sich die Mortalität aufgrund verbesserter Behandlungsmöglichkeiten und früherer Erkennung reduziert, so dass die heutige relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 63% liegt (ACS 2014, Kaatsch et al. 2015). So haben Patienten, bei denen die Erkrankung in einem frühen Stadium, in dem die Tumorzellen noch nicht metastasiert sind oder nur regionale Lymphknoten befallen haben, eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90% bzw. 71%. Die Rate sinkt rapide, wenn bereits eine Metastasierung in distante Gewebe eingesetzt hat (NCI 2006-2012).

Hauptursachen für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (KRK) können Tabakkonsum oder ein ungesunder Lebenswandel sein. Hierzu zählen eine ballaststoffarme Ernährung, sowie der übermäßige Konsum von rotem Fleisch und Alkohol. Auch Übergewicht und mangelnde Bewegung sind ein wichtiger Aspekt der Pathogenese. Daher wird in der S3-Leitlinie für das KRK empfohlen, präventiv auf eine ausgewogene Ernährung zu achten, Übergewicht zu vermeiden und sich sportlich zu betätigen (Pox et al. 2013).

Die hauptsächliche Todesursache einer Krebserkrankung ist jedoch bis heute die Entwicklung von Fernmetastasen auch Jahre nach der vollständigen Tumorentfernung (Fidler 1990). Ca. 35%-45% der Patienten mit einem Kolonkarzinom entwickeln innerhalb von fünf Jahren Fernmetastasen (Hofheinz et al. 2016), primär in der Leber, aber auch in anderen Organen wie Lunge, Peritoneum oder in den intra-abdominalen Lymphknoten (Wolpin et al. 2008).

## 1.2 Karzinogenese des Kolonkarzinoms

85% der KRK sind sporadische Karzinome und entstehen nach Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen (Strum 2016). Aus molekularbiologischer Sicht muss es zur Dysregulation mehrerer Faktoren kommen, bevor ein Tumor entsteht. Hierbei dient das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz als Grundlage zur Darstellung des Verlaufs der Tumorphorprogression und deren wichtigster Faktoren (Abb. 1) (Vogelstein et al. 1988, Fearon et al. 1990).



**Abb. 1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz.** Die Entwicklung eines Karzinoms erfolgt in mehreren Schritten unter Funktionsverlust oder Hyperaktivierung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Außerdem tragen der Erwerb von chromosomalen und Mikrosatelliten-Instabilität zur Tumorgenese bei. Abbildung modifiziert nach Kinzler und Vogelstein (Tanaka et al. 1991, Kinzler et al. 1996)

Fearon und Vogelstein stellten 1990 fest, dass der Verlust des *Adenomatose polyposis coli* (APC)-Tumorsuppressorgens zur Initiation der Karzinogenese führt. Da APC für die Stabilität des Spindelapparats verantwortlich ist und somit einen Einfluss auf die korrekte Separierung der Chromosomen während der Zellteilung besitzt, führt ein Verlust zu chromosomaler Instabilität in der betroffenen Zelle (Fodde et al. 2001) und begünstigt somit das Fortschreiten der Karzinogenese. In weiterer Folge kommt es zu mutationsbedingter Hyperaktivierung von Proto-Onkogenen wie *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), *phosphoinositide-3-kinase* (PI3KCA), *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog* (NRAS) und *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (BRAF) und zu inaktivierenden Mutationen in Tumorsuppressor-Genen wie p53, *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), *deleted in colorectal cancer* (DCC) und *SMAD family member 2/4* (Smad2 und 4). Die Mutationen dieser Gene treten in einem, teilweise Jahre andauernden Zeitraum sukzessive auf. Hier greift das sogenannte „Two-hit Konzept“, welches 1971 von Knudson postuliert wurde

(Knudson 1971, Koyama et al. 1999, Knudson 2001). Demzufolge verliert ein Allel des Gens durch chromosomale Instabilität (CIN), Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), CpG island methylator phenotype (CIMP) -Hypermethylierung oder defekte DNA mismatch Reparaturproteine (MMP) seine Funktionsfähigkeit. Ist in dem verbleibenden Allel bereits eine intrinsische, vererbte Mutation vorhanden, kommt es zur vollständigen Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens. Die chromosomale Instabilität in Karzinomzellen ist daher eine wichtige Komponente, die zur Tumorentwicklung beiträgt. 84% der sporadischen KRK weisen chromosomale Instabilitäten auf, die häufig durch somatic copy number alterations (SCNA) deutlich werden. Besonders häufig sind Deletionen der Chromosomenarme 17p und 18q vertreten. Mehr als 70% der Kolonkarzinome enthalten diese genetischen Veränderungen (Vogelstein et al. 1988, Tanaka et al. 1991) .

Lediglich 13-16% der sporadischen KRK besitzen hingegen eine Mikrosatelliten-Instabilität. Damit einhergehend sind defekte DNA mismatch repair Gene wie MLH1 und MSH2 (Muller et al. 2016). Eine MSI kommt primär in hereditären KRK vor. Hierbei sind insbesondere die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das Lynch Syndrom (LS) zu nennen. Auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn können Darmkrebs begünstigen.

Kürzlich entwickelten Uchi und Kollegen eine erweiterte Hypothese zur Entwicklung des Kolonkarzinoms. Sie zeigten, dass sogenannte Gründer-Mutationen wie die des APC-, KRAS- und FBWX7-Gens sowie die Änderung von DNA-Methylierungsmustern vom steigenden Alter der Patienten abhängig waren. Die lineare Akkumulation mehrerer dieser Mutationen lässt die Zellen zu einem Ursprungsklon („parental clone“) heranreifen. Ab diesem Punkt geschieht die Entwicklung der Tumorzellen nicht mehr linear wie im Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz dargestellt, sondern verzweigt durch eine neutrale Evolution somatischer Mutationen, was zu in Tumoren häufig beobachteter genetischer Heterogenität führt (Uchi et al. 2016).

Durch die so entstandenen Mutationen kommt es zur Verhinderung der Apoptose und verstärkter Proliferation. Die Tumorzellen beginnen Wachstumsfaktoren auszuschütten, die die Angiogenese induzieren. Durch das vermehrte Zellwachstum kommt es zu starker Raumforderung, die Zellen verlieren ihren epithelialen Charakter und die Zell-Zell-Kontakte

werden aufgelöst. Die Tumorzellen können nun invasiv in die umliegenden Gewebe eindringen. Im fortgeschrittenen Stadium der Tumorgenese kommt es dann zu Metastasenbildung (Hanahan et al. 2000).

### **1.3 Die Histologie des Dickdarms**

Der Dickdarm gliedert sich in mehrere Abschnitte. An den Blinddarm (Caecum) mit seinem Wurmfortsatz angrenzend liegt das Colon ascendens, das in das Colon transversum übergeht. Der darauffolgende absteigende Ast des Dickdarms (Colon descendens) geht in das Colon Sigmoidum über und endet mit dem Rektum (Mastdarm).

Der zelluläre Aufbau des Dickdarms besteht aus einem hochprismatischen Epithel mit vielen Becher- und vereinzelt endokrinen Zellen. Die Epithelzellen am Rande des Lumens tragen zur Vergrößerung ihrer Oberfläche einen Bürstensaum. Im Gegensatz zum Dünndarm gibt es hier keine Zotten, jedoch sehr viele Krypten. Die Hauptaufgabe des Dickdarms ist die Resorption von Wasser und die Schleimabsonderung. Der Schleim wird durch die Becherzellen produziert und wirkt als Gleitschleim für den Weitertransport der Nahrung und somit als Schutz des Darms vor mechanischen Verletzungen. Eine weitere Funktion übernimmt die Schleimschicht als Barriere gegen pathogene Bakterien. In ihrer äußeren Schicht leben dennoch kommensale Mikroorganismen (Kühnel 2008, Lüllmann-Rauch 2012).

Neue Zellen entstehen nur an der Kryptenbasis. Hier sind Stammzellen vorhanden, die sämtliche, für den Darmaufbau nötige Zellen bilden. Während ihrer Entwicklung wandern die neu entstandenen Zellen in Richtung des Darmlumens. Auf ihrem Weg differenzieren sie sich zu Colonozyten, Becherzellen und endokrinen Zellen. Am Oberflächenepithel angekommen sterben sie ab und werden in das Darmlumen abgestoßen (Weinberg 2007, Lüllmann-Rauch 2012).

### **1.4 TNM-Klassifizierung und UICC-Stadien**

Die Klassifikation von Tumoren erfolgt durch das histopathologische TNM-Modell, welches ursprünglich von Denoix zwischen 1943 und 1952 entwickelt wurde (Denoix 1950). Die UICC

(Union internationale contre le cancer) legte um 1950 dann die allgemein gültigen Richtlinien fest, die ständig aktualisiert werden und nach denen heute die Einteilung erfolgt (Tab. 1 und Tab. 2) (Ito et al. 2012). Die TNM-Klassifikation umfasst die klinische und histopathologische Charakterisierung der Krebserkrankung.

UICC-Stadium	TNM-Klassifikation		
	T	N	M
<b>0</b>	Tis	0	0
<b>I</b>	1,2	0	0
<b>IIA</b>	3	0	0
<b>IIB</b>	4a	0	0
<b>IIC</b>	4b	0	0
<b>III</b>	Jedes T	1,2	0
<b>IIIA</b>	1,2	1a	0
	1	2a	0
<b>IIIB</b>	3,4a	1	0
	2,3	2a	0
	1,2	2b	0
<b>IIIC</b>	4a	2a	0
	3,4b	2b	0
	4b	1,2	0
<b>IVA</b>	Jedes T	Jedes N	1a
<b>IVB</b>	Jedes T	Jedes N	1b

Tab. 1 UICC-Stadien und TNM-Klassifikation für das Kolon- und Rektumkarzinom (Tannapfel et al. 2010)

Dabei werden die Ausdehnung des Tumors in umliegendes Gewebe (T), eventuell vorhandene Lymphknotenmetastasen (N) sowie die gebildeten Fernmetastasen in distante Gewebe (M) bestimmt. Zusätzlich werden Ziffern hinzugefügt, die die Progression der Tumorerkrankung näher definieren. Auf der Grundlage der TNM-Klassifikation kann die Tumorerkrankung des Patienten in die UICC-Stadien eingeteilt werden (Wittekind et al. 2010).

<b>TNM</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor infiltriert Submucosa
<b>T2</b>	Tumor infiltriert die Muscularis propria
<b>T3</b>	Tumor infiltriert bis in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
<b>T4</b>	Tumor infiltriert Nachbarorgane und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
<b>T4a</b>	Tumor infiltriert Peritoneum
<b>T4b</b>	Tumor infiltriert oder grenzt an andere Organe oder Strukturen
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknoten befallen
<b>N1</b>	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
<b>N1a</b>	Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
<b>N1b</b>	Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen vorhanden
<b>M1</b>	Fernmetastasen vorhanden
<b>M1a</b>	Metastasen auf ein Organ oder eine Region beschränkt
<b>M1b</b>	Metastasen in mehr als einem Organ oder Region oder Peritoneum

Tab. 2 Abkürzungserklärung der TNM-Stadien des Kolonkarzinoms (Wittekind et al. 2010)

## 1.5 Therapien des Kolonkarzinoms

Die radikal-chirurgische Entfernung des Tumorgewebes ist zurzeit der Goldstandard in der kurativen Therapie des Kolonkarzinoms. Patienten mit Karzinomen der UICC-Stadien I und II besitzen sehr gute Überlebenschancen und eine vollständige Resektion des Tumors mit stadienadaptiertem Sicherheitsabstand ist häufig ausreichend für die vollständige Heilung (Boland et al. 2000, Majek et al. 2012). Bei den Rektumkarzinomen im Stadium II bis IV wird eine neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie empfohlen. Abhängig vom histopathologisch ermittelten UICC-Stadium wird bei den Kolonkarzinomen postoperativ eine adjuvante Chemotherapie oder eine spezifische Antikörpertherapie eingeleitet (Pox et al. 2013). Das häufigste angewandte Chemotherapeutikum gegen Kolonkarzinome ist 5-Fluorouracil (5-FU). Teilweise wird es in Kombination mit Leucovorin gegeben, das die 5-FU-

Aktivität unterstützt. Weiter genutzte Chemotherapeutika sind Oxaliplatin und Irinotecan (Wolpin et al. 2008).

Auf dem Vormarsch sind mittlerweile auch sogenannte „targeted therapy“ Agenzien für die Behandlung von metastasierten Karzinomen. Dies sind spezifische, auf individuell im Tumor exprimierte Proteine abgestimmte Antikörper oder kleine Moleküle. Sie besitzen antiangiogenetische, EGFR- oder VEGF-Rezeptor-inhibierende Effekte und wirken so auf die Proliferation oder das Überleben der Tumorzellen ein. Für den Erfolg der Therapie ist im Kolonkarzinom ein Wildtypstatus der RAS-Gene *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) und *NRAS* (neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog) entscheidend, da bei der Behandlung von Tumoren mit Mutationen in diesen Genen keine Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte und sogar eine Verschlechterung der Gesamtüberlebenszeit eintrat (Amado et al. 2008, Lievre et al. 2008, Cannon et al. 2015, Hofheinz et al. 2016). Aktuell gibt es sieben verschiedene monoklonale Antikörper, die für die Therapie von Patienten eingesetzt werden dürfen. Diese werden häufig in Kombination mit den herkömmlichen Chemotherapeutika 5-FU, Oxaliplatin oder Irinotecan verwendet. In vergleichenden Studien konnte gezeigt werden, dass sich die zusätzliche Gabe eines Antikörpers positiv auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirkte (Garrett et al. 2011, Petrelli et al. 2013, Stein et al. 2015).

Neben den EGFR-inhibierenden Antikörpern gibt es sogenannte Tyrosin-Kinase-Inhibitoren. Dies sind kleine Moleküle, die an die ATP-Bindestelle der katalytischen Domäne verschiedener Tyrosin-Kinasen binden und somit deren Aktivität inhibieren. Diese Inhibitoren sind in der Therapie bei einer Vielzahl von Tumorentitäten wirksam. Insbesondere werden sie für die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie und gastrointestinaler Stromatumore eingesetzt. Jedoch gibt es bisher keine wirksamen und klinisch zugelassenen Inhibitoren zur Behandlung des KKK. Viele der kleinen Moleküle befinden sich daher in klinischen Studien; darunter Imatinib, Erlotinib, Gefitinib und Sunitinib (Townsend et al. 2006, Fisher et al. 2008, Bajetta et al. 2009, Starling et al. 2012, Falchook et al. 2014, Pierobon et al. 2014).

Die aktuell angewandten Therapien dienen hauptsächlich der Bekämpfung des Primärtumors und sind somit an dessen Eigenschaften angepasst. Jedoch geht eine viel größere Gefahr von den später auftretenden Metastasen aus, die nicht nur im KHK die Hauptursache krebsbedingter Tode sind (NCI 2006-2012). Metastasen weisen häufig durch die Ansammlung weiterer, u.a. durch die Primärtherapie erworbener Mutationen veränderte genetische Eigenschaften auf und können somit nicht mit dem ursprünglichen Therapieansatz behandelt werden. Ein tiefergehendes Verständnis für die molekularenbiologischen Vorgänge während der Metastasierung ist daher für eine adäquate Therapie unabdingbar.

## **1.6 Molekulare Mechanismen der Metastasierung**

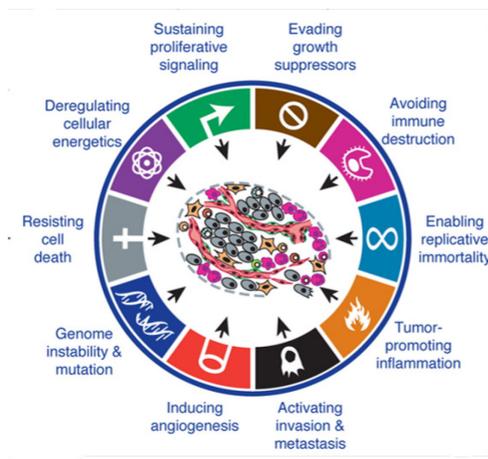
Für den Vorgang der Metastasierung gibt es zum aktuellen Zeitpunkt verschiedene Modelle. Das lineare Metastasierungsmodell postuliert die Metastasierung am Ende der Tumorentwicklung (Fearon et al. 1990). Im Gegensatz dazu besagt das Modell der parallelen Tumorentwicklung, dass bereits im Stadium eines benignen Tumors einzelne Tumorzellen in entfernte Organe migrieren können, um sich dort anzusiedeln und häufig noch Jahre nach der chirurgischen Beseitigung des Primärtumors Metastasen zu bilden. Es konnte gezeigt werden, dass Primärtumor und Metastasen häufig unterschiedliche genetische Mutationen aufweisen, was auf eine frühe Streuung der Tumorzellen hinweist (Klein 2009).

Ob eine Tumorzelle dann im Zielgewebe anwachsen kann, hängt nicht nur von ihren genetischen Mutationen ab, sondern auch welches Umfeld sie im Zielgewebe vorfindet (Seed-and-soil-Hypothese)(Paget 1989). Ewing und Kollegen erarbeiteten 1928 eine anatomisch-mechanistische Grundlage der Metastasenbildung, nach der das am nächsten am Primärtumor lokalisierte Organ Metastasen ausbildet, da sich die zirkulierenden Tumorzellen dort zuerst in den Kapillargefäßen ansammeln (Ewing 1928, Langley et al. 2011).

Leonard Weiss zeigte dann 1992 in einer Studie, dass die beiden vorgenannten Theorien nicht alleinstehend zu betrachten sind, sondern vielmehr zusammenwirken. Weiss bewies anhand von Autopsien, dass 66% der in seiner Studie entdeckten Metastasen durch den Blutfluss gesteuert wurden, 20% durch eine spezielle Mikroumgebung im Zielorgan und in 14% der Fälle konnten Abwehrreaktionen des umliegenden Gewebes gegen die Tumorzellen

len detektiert werden, sodass die dort entstandenen Metastasen kleiner waren als erwartet. Darüber hinaus scheint auch die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen, die andere Gewebe erreichen die Wahrscheinlichkeit einer Metastasenbildung zu erhöhen (Weiss 1992).

Der Prozess der Metastasierung ist sehr ineffizient. Aus weniger als 0,01% der im Körper zirkulierenden Tumorzellen entsteht eine Metastase (Fidler 1970, Langley et al. 2011). Damit es zu einer Metastasierung kommt, ist zunächst ein invasives Wachstum in das umgebende Gewebe vorausgesetzt. Dazu müssen die Krebszellen verschiedene Kriterien erfüllen, die Hanahan als die „Hallmarks of Cancer“ beschreibt (Hanahan et al. 2000, Hanahan et al. 2011) (Abb. 2):



**Abb. 2 Die Kennzeichen einer Krebszelle.** Eine Krebszelle entwickelt im Verlauf ihrer Entwicklung verschiedene Merkmale, die essentiell für ihre Entstehung sind. Dazu gehören der Erhalt der Expression proliferativer Signale, die Umgehung von Wachstumssuppressoren, sowie die Umgehung der Immunantwort, eine unendliche Teilungsfähigkeit, die Induktion von tumorfördernden Entzündungsreaktionen, die Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung, die Induktion von Angiogenese, genomischer Instabilität und Mutation, Apoptoseresistenz und die Deregulation zellulärer Energien. Abbildung modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2011 (Hanahan et al. 2011).

Eine Krebszelle entwickelt im Verlauf ihrer Entstehung Fähigkeiten, die sie von normalen somatischen Zellen unterscheidet. Dazu gehört die Ausbildung einer Apoptose-Resistenz, die Expression bestimmter Wachstumsfaktoren und die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen. Weiterhin erlangt die Tumorzelle die Fähigkeit sich unendlich zu teilen und zur Versorgung mit Nährstoffen Angiogenese zu induzieren. Es ist bislang nicht geklärt, ob alle Tumorzellen alle diese Faktoren besitzen müssen oder ob nur einige Faktoren ausreichen um die Invasion und Metastasierung voranzutreiben.

Eine weitere Entwicklung von Tumorzellen ist die Fähigkeit invasiv in das umliegende Gewebe einzuwachsen und Metastasen in weiter entfernten Organen anzusiedeln. Dazu ist eine veränderte Genexpression und der Vorgang der Epithelialen-Mesenchymalen-Transi-

tion (EMT) nötig, wodurch die epitheliale Zelle einen beweglichen, mesenchymalen Phänotyp annimmt (Nieto 2009). Durch die EMT kommt es in den jeweiligen Zellen zum Verlust epithelialer Marker wie etwa E-Cadherin und verschiedenen für die Zelladhäsion wichtigen Zytokinen. Dafür werden mesenchymale Marker wie N-Cadherin und Vimentin vermehrt exprimiert. Diese Veränderung führt zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten und einer erhöhten Mobilität der Zellen (Serrano-Gomez et al. 2016). Durch die enzymatische Degradation und den Umbau der extrazellulären Gewebematrix wird die Mobilität der Krebszelle weiter erhöht und führt gegebenenfalls durch eine aktive Bewegung der Krebszelle zur Intravasation der Zellen über die Basalmembran in die Lymph- oder Blutgefäße (Lamouille et al. 2014). Auch eine kavitäre Metastasierung über die in den Körperhöhlen enthaltenen Flüssigkeiten ist möglich (Böcker 2012).

In den Gefäßen sind die Krebszellen dem Angriff von Immunzellen ausgesetzt. Doch aufgrund der vielfältigen Mutationen, die die Krebszellen erworben haben, exprimieren sie häufig keine tumorspezifischen Oberflächenproteine, sezernieren für das Immunsystem supprimierende Zytokine oder präsentieren auf ihrer Oberfläche Marker weißer Blutkörperchen oder Rezeptoren, die die Aktivität der Immunantwort abschwächen. Durch diese Mechanismen kann die Tumorzelle nicht mehr vom Immunsystem erkannt und beseitigt werden. Die Zellen können sich so ungehindert in den Lymph- und Blutbahnen bewegen. Dieser Anpassungsprozess wird Immuneditoring, bzw. Immunescape genannt (Dunn et al. 2002, Bose et al. 2015). Die Extravasation, der Austritt der Tumorzellen aus den Gefäßen, erfolgt dann mittels sogenannter Invadopodien und ist ein sehr effizienter Prozess, der bis heute noch nicht genau verstanden ist (Chambers et al. 2002, Nguyen et al. 2009, Stoletov et al. 2010, Leong et al. 2014).

## **1.7 Inflammation als Promotor von Tumorentstehung und Metastasierung**

Das Immunsystem ist einerseits für die Bekämpfung und Eliminierung entarteter Zellen zuständig, kann aber auch das Tumorwachstum begünstigen. Etwa 25% aller Tumore entstehen durch eine chronische Entzündung (Hussain et al. 2007). Wird eine entartete Zelle entdeckt, so wird das angeborene Immunsystem aktiviert und in einer ersten Immunantwort

werden Mastzellen, basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen zur entsprechenden Stelle rekrutiert (Geering et al. 2013, Cardamone et al. 2016). Diese Zellen initiieren eine Entzündungsreaktion und schütten Chemokine, Zytokine und andere Botenstoffe aus, die weitere Makrophagen anlocken, die die entarteten Zellen letztendlich eliminieren. Werden diese Zellen jedoch nicht vollständig erfasst, so können Tumorzellen mit unterschiedlichsten Mutationen entstehen, die vom Immunsystem nicht mehr erkannt werden können und es kommt zu der in Kapitel 1.6 beschriebenen Immuneditionierung, bzw. zum Immunescape (Dunn et al. 2002, Bose et al. 2015, Teng et al. 2015).

Die von den Immunzellen sezernierten Zytokine stimulieren zwar die Bekämpfung der Tumorzellen, jedoch kann auch das den Tumor umgebende Gewebe beschädigt und das Mikromillieu für das Tumorwachstum optimiert werden, indem die extrazelluläre Matrix modifiziert und Angiogenese induziert wird. Diese Faktoren können das Tumorwachstum und die Invasivität der Tumorzellen unterstützen. Daher ist die Immunantwort nicht nur für die Bekämpfung von Tumorzellen verantwortlich, sondern kann gleichzeitig auch als Promotor des Tumorwachstums dienen (Mantovani et al. 1992, Balkwill et al. 2001). So weisen Patienten mit chronischen Entzündungen der Darmschleimhaut wie etwa bei der chronisch-entzündlichen Darmentzündung Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn ein erhöhtes Krebsrisiko auf (Bernstein et al. 2001, Eaden et al. 2001, Reynolds et al. 2017).

Ein weiterer Faktor der Tumorgenese ist der ständige Kontakt mit einer Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen der Darmflora. Ist die Darmschleimhaut nicht mehr intakt, so können die Mikroorganismen an die Zellen der Mukosa adhären und sogar in sie eindringen wodurch weitere Entzündungsreaktionen hervorgerufen werden (Swidsinski et al. 2009, Schwabe et al. 2013). Hinweise auf den Einfluss von Mikroben bei der Tumorgenese des Kolonkarzinoms wurden in den letzten Jahren vielfach publiziert (Shen et al. 2010, Sobhani et al. 2011, Zackular et al. 2013, Peters et al. 2016). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten eine erhöhte Expression der zur Familie der Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) gehörenden TLR-Rezeptoren aufweisen, die für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die damit verbundene vermehrte Ausschüttung von Zytokinen und anderen Mediatoren verantwortlich sind (Fukata et al. 2007, He et al. 2007,

Sato et al. 2009). Auch über die sogenannten NOD-Rezeptoren, die ebenfalls zur Familie der PRRs gehören, wird NF- $\kappa$ B im Zuge dieser Entzündungsreaktion aktiviert, was zu einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen führt (Ogura et al. 2001, Philpott et al. 2014).

## **1.8 Pattern Recognition Receptors – TLRs, NLRs und ihre Rolle bei der Tumorgenese**

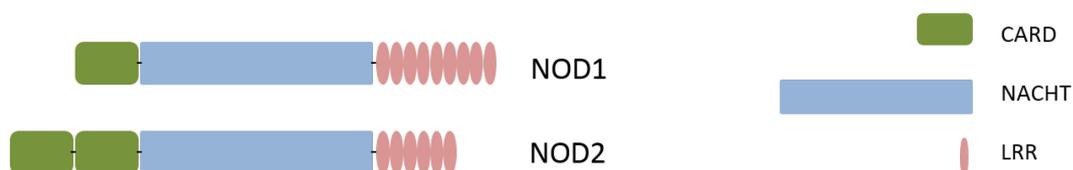
Die Rezeptoren, die zur Induktion einer ersten Immunantwort führen, sind die sogenannten Mustererkennungs-Rezeptoren (engl. Pattern Recognition Receptors, PRR). Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und erkennen Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), die sich auf den Oberflächen eindringender Bakterien, Viren und Pilze befinden. Diese Muster sind evolutionär konserviert und können als Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan (PGN), im Geißelprotein Flagellin oder als mikrobielle Nukleinsäuren auftreten (Chen et al. 2009). Des Weiteren werden von den PRRs sogenannte damage-associated molecular patterns (DAMPs) erkannt, die von gestressten oder sterbenden körpereigenen Zellen ausgehen und häufig durch chronische Entzündungen entstehen (Tang et al. 2012).

Die PRRs umfassen verschiedene Rezeptorklassen. Es wird zwischen membranständigen und zytoplasmatischen Rezeptoren unterschieden. Zu den membranständigen Rezeptoren gehören die C-Typ Lectin-Rezeptoren (CLRs) und die Toll-like Rezeptoren (TLR).

Die TLR-Familie kann in mehrere Unterfamilien aufgeteilt werden und ist die am stärksten untersuchte Rezeptorfamilie. Sie ist in den letzten Jahren besonders in den Fokus der Wissenschaft getreten, da die unterschiedlichen Rezeptoren der Familie nicht nur für die Homöostase im Darm zuständig sind, sondern auch inflammatorische Prozesse initiieren. Sie besitzen ein breites Erkennungsspektrum von Liganden, die hauptsächlich Bestandteile der Zellwände pathogener Bakterien und viraler Partikel sind (Abreu et al. 2003, Rakoff-Nahoum et al. 2004, Akira et al. 2006, Uematsu et al. 2006, Takeda et al. 2015). Nach der Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird u.a. die Zytokinausschüttung reguliert und somit die angeborene und adaptive Immunantwort angeregt. Eine Dysregulation kann da-

bei zu dauerhaften Entzündungsreaktionen und der damit einhergehenden möglichen Entstehung von Tumoren führen. So wurde u.a. in Zellen des Kolonkarzinoms eine vermehrte Expression verschiedener TLR-Rezeptoren nachgewiesen durch die eine Apoptoseresistenz und die Tumorprogression unterstützt werden (Lu et al. 2014, Tchorzewski et al. 2014). Die durch die TLR-Aktivität ausgeschütteten Zyto- und Chemokine können hier zur Initiation von Metastasierung und Angiogenese beitragen (vgl. auch Kapitel 1.13). Aus diesem Grund gelten die TLR-Rezeptoren als ein interessantes Ziel für mögliche Therapieansätze (Cario et al. 2000, Fukata et al. 2007, Grimm et al. 2010, Dunne et al. 2011).

Die mit den TLRs verwandten zytoplasmatisch lokalisierten sogenannten „nucleotide-binding and oligomerization domain containing (NOD)- Like Receptors“ (NLRs) besitzen eine ähnliche Funktion. Auch sie erkennen Bestandteile der Zellwände eindringender Bakterien. Die durch die NLR-Rezeptoren initiierte Signalkaskade stimuliert eine pro-inflammatorische Immunreaktion unter Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Zelladhäsionsmolekülen und Immunrezeptoren (Inohara et al. 2005, Mogensen 2009, Sahdo et al. 2013). Bis heute sind 22 Mitglieder der NLR-Familie bekannt (Proell et al. 2008). Eine Subfamilie der NLRs sind die NOD-Rezeptoren, wozu auch die in dieser Familie am besten charakterisierten Rezeptoren NOD1/CARD4 und NOD2/CARD15 gehören. NOD1 wurde erstmals 1999, NOD2 im Jahr 2001 beschrieben (Bertin et al. 1999, Ogura et al. 2001). Beide Rezeptoren bestehen aus einer zentralen NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) und TP1 (telomerase associated protein) (NACHT) Domäne, einer C-terminalen Leucin-reichen Region (engl. Leucin-rich repeat (LRR)-Region) sowie einer (bei NOD1) bzw. zwei (bei NOD2) Caspase rekrutierenden Domänen (engl. Caspase recruiting domain; CARD) (Abb. 3).



**Abb. 3 Proteinstruktur des NOD1- und NOD2-Rezeptors.** Beide besitzen eine NACHT-Domäne, sowie eine CARD-Domäne und neun LRRs (NOD1) bzw. zwei CARD-Domänen und sechs LRRs (NOD2). Abbildung modifiziert nach Saxena et al. (Saxena et al. 2014)

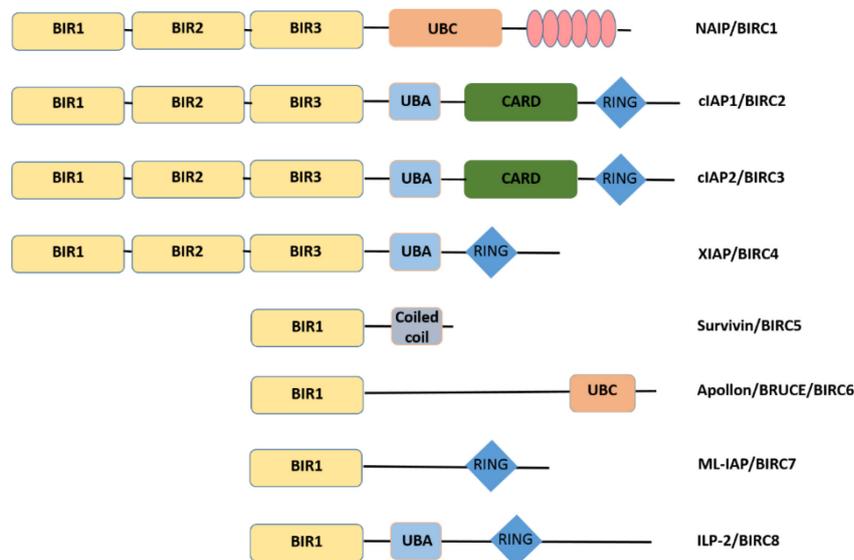
Während NOD1 ubiquitär in vielen verschiedenen Zellarten exprimiert wird, ist die Expression von NOD2 hauptsächlich auf hämatopoetische Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen sowie einige Epithelzellen beschränkt. Dazu zählen Zellen des Verdauungstrakts, des Lungen- und oralen Epithels (Ogura et al. 2001, Tada et al. 2005, Uehara et al. 2005, Uehara et al. 2007). Des Weiteren wurde eine Expression von NOD2 in Paneth Zellen nachgewiesen. Hier kommt der NOD1-Rezeptor nicht vor (Lala et al. 2003, Ogura et al. 2003).

Beide Rezeptoren erkennen Bestandteile der bakteriellen Zellwand: NOD1 bindet spezifisch an Dipeptid- $\gamma$ -D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), NOD2 an Muramyl-Dipeptid (MDP) (Girardin et al. 2003, Girardin et al. 2003). iE-DAP ist hierbei mehrheitlich ein Bestandteil gram negativer Bakterien, MDP sowohl in gram positiven als auch in gram negativen Bakterien vorhanden. Während die weiteren Rezeptoren der NLR-Klasse hauptsächlich Caspasen aktivieren, werden durch die Aktivität von NOD1 und NOD2 verstärkt proinflammatorische Gene exprimiert (Kanneganti et al. 2007). Eine Dysregulation der Rezeptoren kann daher zu einer permanenten Entzündungsreaktion führen und die Entstehung von Tumoren begünstigen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Polymorphismen in den NOD1- und NOD2-Genen zu chronischen Entzündungsreaktionen und zur Entstehung verschiedener Krebsarten führen können. Bekannt ist dieses Phänomen für eine Vielzahl unterschiedlicher Tumorentitäten wie Magen-, Brust- und Ovarialkarzinome sowie für kolorektale Karzinome (Hugot et al. 2001, Kutikhin 2011).

Aufgrund ihrer vorgenannten Eigenschaften, der funktionellen Ähnlichkeit zu den Toll-like Rezeptoren und nicht zuletzt durch die Entdeckung, dass das ursprünglich als anti-apoptisch wirkend eingestufte „Inhibitor of Apoptosis Protein“ XIAP, welches zudem als prognostischer Faktor im Kolonkarzinom gilt (Xiang et al. 2009), in die NOD-Signalkaskade involviert ist (Krieg et al. 2009), sind die NOD-Rezeptor-Signalwege ein interessanter Ansatzpunkt für onkologische Forschungsvorhaben im Kolonkarzinom.

## 1.9 Die Funktion des X-linked Inhibitor of Apoptosis Proteins in inflammatorischen Signalwegen

Die Proteine der sogenannten „Inhibitor of Apoptosis“-Protein (IAP)-Familie sind in der Induktion von Apoptose, Zellzykluskontrolle, inflammatorischen Prozessen und Immunität als auch bei der Zellmigration und der Regulation des Kupfer-Metabolismus involviert (Levkau et al. 2001, Burstein et al. 2004, Vaux et al. 2005, Mufti et al. 2006, Li et al. 2007, Dogan et al. 2008). Die IAP-Familie umfasst bisher acht beschriebene humane IAPs (Abb. 4). Dazu gehören „X-linked IAP“ (XIAP), die beiden Proteine „cellular IAP1/2“ (cIAP1, cIAP2), „NLR family apoptosis inhibitory protein“ (NAIP), Survivin, „BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme“ (BRUCE), „melanoma inhibitor of apoptosis protein“ (ML-IAP) und „Inhibitor of apoptosis-like Protein 2“ (ILP2). Diesen Proteinen sind baculovirus IAP Repeat (BIR)-Domänen, von denen jedes IAP mindestens eine und maximal drei besitzt, gemein. NAIP besitzt außerdem eine NACHT- sowie eine LRR-Domäne.



**Abb. 4 Schematische Darstellung der Proteine der humanen IAP-Familie.** Alle Proteine besitzen mindestens eine, maximal drei BIR-Domänen. NAIP besitzt zudem eine UBC- sowie eine LRR-Domäne und gehört damit auch zur Familie der PRRs. cIAP1 und cIAP2 besitzen neben drei BIR-Domänen eine UBA-, sowie eine CARD- und eine RING-Domäne. Strukturell sehr ähnlich ist XIAP, das drei BIR-Domänen, eine UBA- und eine RING-Domäne besitzt. Survivin, BRUCE, ML-IAP und ILP-2 besitzen jeweils eine BIR-Domäne. Survivin enthält des Weiteren eine *coiled coil* Struktur, BRUCE besitzt eine UBC-Domäne. ML-IAP besitzt neben der BIR-Domäne eine RING-Domäne und ILP-2 eine UBA- und eine RING-Domäne. BIR = baculo-repeat Domain, UBC = Ubiquitin-konjugierende Domäne, UBA = Ubiquitin-assoziierte Domäne, CARD = Caspase Aktivierende und Rekrutierende Domäne, RING = Really Interesting New Gene. Abbildung modifiziert nach de Almagro et al. (de Almagro et al. 2012)

Es bildet damit eine Unterfamilie der NLR-Rezeptor-Familie und ist direkt in die Vermittlung inflammatorischer Prozesse involviert.

XIAP, cIAP1, cIAP2, ML-IAP und ILP2 besitzen jeweils eine RING (Really Interesting New Gene)-Domäne, der eine E3-Ligase-Funktion zugesprochen wird, wodurch eine Autoubiquitinierung oder die Ubiquitinierung anderer Proteine vermittelt wird (Silke et al. 2014).

XIAP ist in dieser Gruppe das am besten beschriebene Protein. Es besitzt drei BIR-Domänen, eine ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) und eine RING-Domäne. Mit der BIR1-Domäne kann das TAK1-bindende Protein (TAB1) interagieren, so dass es zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch XIAP kommt. Auch der XIAP-Inhibitor ARTS bindet an dieser Domäne, inhibiert so die Interaktion mit TAB1 und führt XIAP der Degradation zu (Garrison et al. 2011). Kommt es jedoch an der BIR1- bzw. der BIR3-Domäne zur Interaktion mit dem ebenfalls der IAP-Familie angehörenden Survivin, wird XIAP stabilisiert und vor Ubiquitinierung und der damit einhergehenden proteasomalen Degradation geschützt (Dohi et al. 2004). An die BIR2-Domäne binden die Caspasen 3/7, die BIR3-Domäne kann mit Caspase 9 interagieren. Diese Caspasen sind Komponenten der intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Signalwege, die durch die Bindung mit XIAP inhibiert werden und die Apoptose somit nicht initiieren können. Mit den BIR2- und BIR3-Domänen kann ebenfalls der XIAP-Inhibitor Smac/DIABLO interagieren. Diese Interaktion führt zur vollständigen Inhibition von XIAP, zur Einleitung der Apoptose sowie der Blockade der BIR1-Domäne von XIAP. Hierdurch wird die Bindung von XIAP mit TAB1 ebenfalls gehemmt, wodurch eine TAB1-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht stattfinden kann (Lu et al. 2007). Ein weiterer Bindungspartner an der BIR2-Domäne ist RIP2 (Krieg et al. 2009). Dieses Protein ist wie TAB1 an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt.

Im Jahr 2009 konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass cIAP1, cIAP2 und XIAP bei der Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität innerhalb des NOD-Signalwegs eine bedeutende Rolle spielen (Bauler et al. 2008, Bertrand et al. 2009, Krieg et al. 2009). Krieg und Kollegen zeigten hier, dass XIAP im NOD-Signalweg als Plattform zur Rekrutierung von RIP2 und TAB1 dient (Krieg et al. 2009). Durch die Bindung dieser beiden Proteine kommen sie in direkte Nähe zueinander, wodurch die Interaktion und Aktivierung von NF- $\kappa$ B gewährleistet werden kann (Krieg et al. 2010).

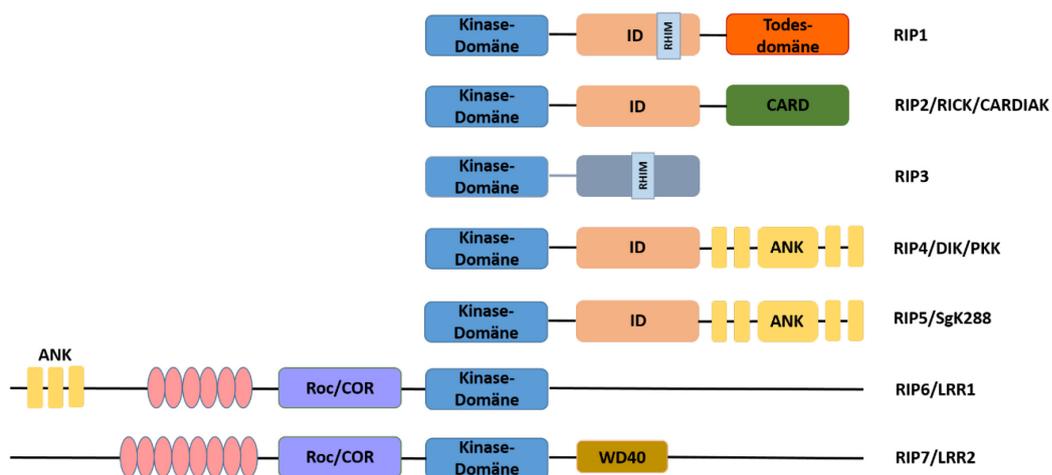
Auch beeinflusst XIAP die Tumorprogression und Zellmotilität. In vielen Tumorentitäten konnte eine verstärkte XIAP-Expression nachgewiesen werden, die u.a. durch die Entwicklung einer Chemoresistenz zu einer verschlechterten Prognose der Patienten führte (Nemoto et al. 2004, Ramp et al. 2004, Akyurek et al. 2006, Kluger et al. 2007, Nagi et al. 2007, Xu et al. 2014). In vitro und in vivo Versuche zeigten zudem, dass die verstärkte Expression von XIAP und dessen Interaktion mit Survivin die Motilität und Invasivität der Tumorzellen positiv beeinflusst und so die Metastasierung unterstützt (Dohi et al. 2007, Mehrotra et al. 2010, Liu et al. 2011, Liu et al. 2012).

### **1.10 Die Rezeptor-interagierende Serin-Threonin-Kinase 2 (RIP2)**

Die Rezeptor-interagierende Serin-Threonin-Kinase 2 (RIP2, RICK, CARDIAK) ist ein Protein aus der Familie der Rezeptor-interagierenden Proteine (RIP) (Inohara et al. 1998, McCarthy et al. 1998, Thome et al. 1998). Diese Familie umfasst insgesamt sieben Mitglieder, denen allen eine amino-terminale (N-terminale) Kinase-Domäne gemein ist. Die jeweiligen unterschiedlichen Domänen am carboxy-terminalen Ende (C-Terminus) bestimmen die verschiedenen Funktionen der Proteine (Zhang et al. 2010). Ausnahmen sind hier die Proteine RIP6 (LRRK1) und RIP7 (LRRK2), bei denen die Kinase-Domäne zentral gelegen ist und deren weitere funktionellen Domänen amino-terminal zu finden sind (Abb. 5). Während über die Funktionen von RIP4, RIP5, RIP6 und RIP7 bisher wenig bekannt ist, sind RIP1-3 sehr gut untersucht. Dabei ist RIP1 die am intensivsten untersuchte Kinase der Familie. Das Protein besitzt eine C-terminale Todesdomäne (engl. Death domain; DD), mit der es an verschiedene Todesrezeptoren binden kann. Des Weiteren interagiert RIP1 mit einer Vielzahl verschiedener Adapterproteine und Kinasen, so auch mit RIP3. Diese beiden Proteine bilden ein Nekrosom, das zur Nekroptose der Zelle führt (Festjens et al. 2007, Cho et al. 2009, He et al. 2009, Zhang et al. 2009).

RIP2 besitzt als einziges Protein der Familie eine C-terminale CAR-Domäne und ist an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, den MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 (Thome et al. 1998, Navas et al. 1999, Jacquet et al. 2008) sowie der Regulation der angeborenen Immunantwort innerhalb des NOD-Signalwegs beteiligt, durch den Zellzyklus, Proliferation und Apoptose beeinflusst werden (Chin et al. 2002, Kobayashi et al. 2002, Park et al. 2007). Die Regulation der oben

genannten MAP-Kinasen geschieht durch die Interaktion von RIP2 mit verschiedenen Mitgliedern der TNFR-assoziiierter-Faktoren (TRAF)-Familie wie TRAF1, TRAF5 und TRAF6 (McCarthy et al. 1998). Hingegen führt die Bindung von TRAF3 an RIP2 zur Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Cai et al. 2013). Ein weiterer Interaktionspartner ist der sogenannte „Thyroid Hormone Receptor Interactor 6“ (TRIP6), durch den es ebenfalls zur Aktivierung von ERK und NF- $\kappa$ B kommt (Li et al. 2005).



**Abb. 5 Schematische Darstellung der Proteine der RIP-Familie.** Den Proteinen ist eine Kinase-Domäne gemein, die bei allen Proteinen außer bei RIP6 und RIP7 N-terminal vorliegt. RIP1 besitzt am C-Terminus eine Todesdomäne, RIP2 eine CAR-Domäne. RIP1 und RIP3 besitzen ein RIP homotypisches Interaktionsmotiv (RHIM). RIP4, RIP5 und RIP6 besitzen mehrere Ankyrin Repeat (ANK) Domänen. Des Weiteren sind mehrere LRR-Motive in RIP6 und RIP7 zu finden. Diese beiden Proteine besitzen auch eine sogenannte „Ros of complex proteins/C-terminal of Roc (Roc/COR)-Domäne. RIP7 besitzt außerdem ein Tryptophan-Aspartamsäure Dipeptid (WD40)- Motiv am C-Terminus. Abbildung modifiziert nach Zhang et al. (Zhang et al. 2010)

Eine wichtige Rolle spielt RIP2 auch bei der Regulation der Immunantwort. Hier interagiert es mit den NOD-Rezeptoren NOD1 und NOD2 über die jeweiligen CAR-Domänen, ohne die die Kaskade des Signalwegs nicht fortgeführt werden kann. Wichtige Prozesse zur Signalweiterleitung sind die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von RIP2, die teilweise durch die Kinasefunktion des Proteins selbst vermittelt wird (Dorsch et al. 2006, Hasegawa et al. 2008, Tigno-Aranjuez et al. 2010, Yang et al. 2013).

### 1.11 Das TAK1-Binding Protein 1 (TAB1) im NOD-Signalweg

TAB1 ist ein Aktivatorprotein für die TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase 1 (TAK1/MAP3K7), die in den TGF-beta-, IL1-, WNT-1- und NOD-Signalwegen die NF- $\kappa$ B-Aktivierung induziert (Sakurai et

al. 1998). Der TAK1/TAB1-Komplex liegt im Zytoplasma vor und wird durch die Bindung von TAB2, einem weiteren Aktivatorprotein, zusätzlich stimuliert. TAK1 treibt nun die Degradation des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  voran.

Im Detail bindet TAB1 mit seiner C-terminal gelegenen Aktivierungsdomäne (AS437-504) an den N-Terminus des TAK1-Proteins, wodurch es zu einer Autophosphorylierung von TAK1 und der damit einhergehenden Aktivierung kommt (Shibuya et al. 1996, Kishimoto et al. 2000, Sakurai et al. 2000). TAB2, ein weiteres TAK1-Aktivatorprotein, interagiert mit der C-terminalen Domäne von TAK1, was ebenfalls zur Aktivierung der IKK-Kinase und NF- $\kappa$ B innerhalb des IL1-Signalwegs führt. TAB2 agiert hierbei als Adapterprotein, welches TRAF6 und den TAK1/TAB1-Komplex verbindet. (Takaesu et al. 2000). Durch die Aktivierung von TAK1 werden die NF- $\kappa$ B-Inhibitor-Proteine I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  degradiert, was zu einer nukleären Translokation von NF- $\kappa$ B führt (Sakurai et al. 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass das N-terminale Ende von TAB1 an die BIR1-Region eines XIAP-Dimers binden kann (Lu et al. 2007). XIAP dient hier als Bindeglied zwischen TAB1 und den sogenannten „Bone Morphogenetic Protein“ (BMP)-Rezeptoren Typ I und Typ II. Somit kann eine Verbindung zwischen den Rezeptoren und dem TAB1-TAK1-Komplex hergestellt werden, der eine Signalkaskade in Gang bringt (Yamaguchi et al. 1999), die den NF- $\kappa$ B und JNK-Signalweg aktiviert. Auch innerhalb des NOD-Signalwegs scheint TAB/TAK durch eine Brückenfunktion von XIAP in direkter Nähe zu anderen Proteinen gebracht zu werden (Krieg et al. 2010).

## **1.12 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und seine Funktion in der Signalvermittlung**

NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Aktivierung von mehr als 150 Zielgenen beteiligt ist (Mishra et al. 2013), die Immun- und Entzündungsreaktionen, das Zellwachstum und die Apoptose beeinflussen (Sha et al. 1995, Baldwin 2001, Dutta et al. 2006). Daher wird NF- $\kappa$ B als Zielstruktur in verschiedensten Signalwegen aktiviert.

Die NF- $\kappa$ B-Familie lässt sich in zwei Untergruppen einteilen: in die „Rel-Proteine“ (RelA/p65, RelB, c-Rel) und die NF- $\kappa$ B-Proteine (p105/p50 (NF- $\kappa$ B1) und p100/p52 (NF- $\kappa$ B2)) (Gilmore 2006). In der häufigsten Form liegt NF- $\kappa$ B als Heterodimer aus den Proteinen p50 und RelB vor. Abhängig von der Zellart bilden sich aber auch andere Dimere aus, da alle

Proteine, außer RelB, welches ausschließlich als Heterodimer auftritt, sowohl Hetero- als auch Homodimere ausbilden können (Bonizzi et al. 2004, Hayden et al. 2004). Allen Proteinen der Familie ist eine Rel-homologie-Domäne (RHD) gemein, mit der sie an DNA binden, dimerisieren oder mit verschiedenen NF- $\kappa$ B-Inhibitoren interagieren können (Baldwin 1996). Diese Inhibitoren (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$  oder I $\kappa$ Be) binden mit einer Ankyrin-Repeat-Domäne (ARD) an die RHD der NF- $\kappa$ B-Proteine (Oeckinghaus et al. 2009). Auch die NF- $\kappa$ B-Vorläuferproteine p105 und p100 besitzen eine ARD-Domäne und können somit ebenfalls zu den NF- $\kappa$ B-Inhibitoren gezählt werden (Rice et al. 1992, Mercurio et al. 1993, Naumann et al. 1993, Oeckinghaus et al. 2009). Durch die Bindung mit den Inhibitoren werden die nukleären Lokalisierungssequenzen (NLS) der NF- $\kappa$ B-Dimere maskiert, wodurch diese in einer nicht-aktiven Form im Zytoplasma der Zellen gehalten werden. Dabei besitzen die verschiedenen Inhibitoren Präferenzen für bestimmte NF- $\kappa$ B-Dimere. So bindet I $\kappa$ B $\alpha$  bevorzugt das p50/RelB-Dimer, I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  inhibieren präferiert c-Rel und p65-haltige-Dimere (Malek et al. 2003).

Die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade kann durch externe Stresssignale wie den Einfluss von bakteriellen oder viralen Partikeln, Chemikalien oder UV-Strahlung, aber auch durch die Freisetzung zellulärer Botenstoffe wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie oxidativen Stress der Zelle hervorgerufen werden (Baeuerle et al. 1994, Baldwin 1996). Es wird zwischen dem kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg unterschieden. Durch den kanonischen Signalweg wird u.a. die angeborene Immunantwort stimuliert. Dies geschieht, indem die NF- $\kappa$ B-Inhibitor-Proteine durch den I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplex phosphoryliert und in Folge dessen ubiquitiniert werden, was zu einer zügigen Degradation führt (Karin et al. 2000, Bonizzi et al. 2004). Damit wird das im Zytoplasma latent inaktiv vorliegende NF- $\kappa$ B-Dimer freigesetzt, so dass es nun in den Zellkern translozieren kann, an die Erkennungssequenz seiner Zielgene bindet und deren Transkription initiiert. Zielgene sind hierbei hauptsächlich Chemokine, Zytokine, Zelloberflächenrezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Immunmodulatoren (Pahl 1999, Tang et al. 2001).

Durch den nicht-kanonischen Signalweg wird die adaptive Immunantwort über verschiedene Rezeptorklassen wie CD40, TNFR2 und „Rezeptor Aktivator für NF- $\kappa$ B“ (RANK) stimuliert (Sun 2011). Dieser Prozess läuft über RelB und die Prozessierung von p100 zum p52-

Protein. Da die Proteine nicht bereits als inaktives Dimer im Zytoplasma vorliegen, ist die Aktivierung hier unabhängig von den NF- $\kappa$ B-Inhibitoren (NEMO-unabhängige Aktivierung) (Dejardin et al. 2002). Diese Form der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verläuft jedoch bedeutend langsamer als die des kanonischen Signalwegs und ist im Gegensatz zu diesem irreversibel (Shih et al. 2011).

NF- $\kappa$ B besitzt jedoch konträre Funktionen. Während es im Tumormikromillieu die Immunantwort stimuliert, werden innerhalb von Tumorzellen durch NF- $\kappa$ B anti-apoptotisch wirkende Zielgene aktiviert (Hoesel et al. 2013). Zudem werden durch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung Angiogenese sowie das Invasions- und Migrationsverhalten der Zellen gefördert, sodass eine in Tumoren oft beobachtete permanente NF- $\kappa$ B-Aktivität die Tumorentstehung und -progression begünstigt (Huang et al. 2001, Karin et al. 2002, Xiao et al. 2011).

### **1.13 Chemokine und ihre Rolle in der Tumorgenese**

Die Chemokine gehören zur Gruppe der Zytokine (Zlotnik et al. 2000). Werden sie sezerniert, kommt es zu chemotaktischen Reaktionen der umliegenden Zellen. Diese migrieren entlang des Konzentrationsgradienten und werden so zu den entsprechenden Zielstrukturen geleitet. So können beispielsweise Zellen des Immunsystems aktiviert und geleitet werden (Sokol et al. 2015).

Bislang gibt es 50 bekannte Chemokine, die in vier Familien aufgeteilt werden (Rollins 1997, Zlotnik et al. 2012). Die einzelnen Chemokine werden aufgrund ihres chemischen Aufbaus in CC-Chemokine, CXC-Chemokine sowie in C-Chemokine und CX<sub>3</sub>C-Chemokine unterschieden. Diese Familienbezeichnungen sind auf die Anordnung der vier konservierter Cystein-Aminosäuren innerhalb der Proteine zurückzuführen. Die Familie der CC-Chemokine besitzt somit zwei Cysteinreste, die direkt nebeneinander vorliegen. Hingegen befindet sich bei der CXC-Familie eine weitere Aminosäure zwischen diesen beiden konservierten Cysteinresten, die diese voneinander trennt. Die C-Familie besitzt lediglich einen konservierten Cysteinrest und die CX<sub>3</sub>C-Familie besitzt drei weitere Aminosäuren durch die die beiden ersten Cysteinreste separiert werden (Bacon et al. 2002). Weiterhin sind die Chemokine entsprechend ihrer Funktion in zwei Klassen aufgeteilt. So gibt es inflammatorisch und homeostatisch wirkende Chemokine (Zlotnik et al. 2000).

In den letzten Jahren wurde zudem deutlich, dass Chemokine eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielen (vgl. Tab. 3). Sie sind sowohl am Wachstum des Tumors, dessen Progression und Metastasierung sowie der Angiogenese beteiligt (Koch et al. 1992, Strieter et al. 1995, Tanaka et al. 2005, Wang et al. 2006). Auch sind sie bereits in vielen inflammatorischen Erkrankungen heraufreguliert (Mahida et al. 1992).

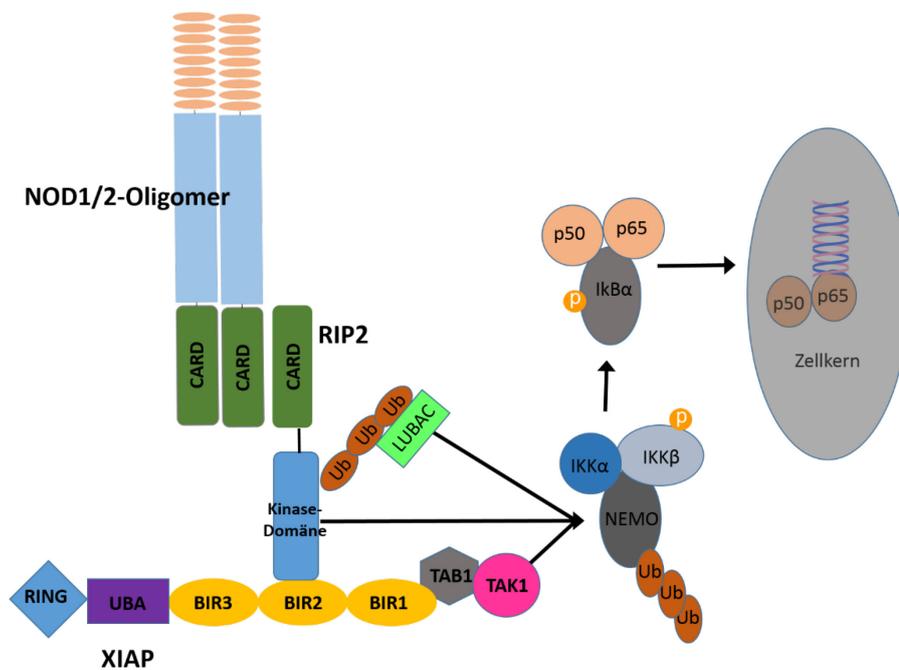
Funktion	Zytokine
<b>Angiogenese</b>	IL1, IL6, IL8, IL17a, CXCL1, CXCL12, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF
<b>Inflammation</b>	IL1, IL6, IL18, IL20, CXCL1, TNF $\alpha$
<b>Migration</b>	IL8, CXCL3, CCL20, MIF
<b>Proliferation</b>	IL2, IL4, IL5, IL11, IL23, CCL20

**Tab. 3 Übersicht der Funktionen einer Auswahl verschiedener Zytokine.** IL: Interleukin, TGF: transforming growth factor beta, TNF: Tumornekrosefaktor, GM-CSF: Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, MIF: Macrophage migration inhibitory factor, CCL: CC chemokine ligand, CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand. (Aharonov et al. 1993, Neufeld et al. 2006, Tato et al. 2008, Marsigliante et al. 2013)

### 1.14 Die Regulation der angeborenen Immunantwort durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und dem NOD-Signalweg

Nach der Ligandenbindung an die LRR-Region der NOD1 oder NOD2-Rezeptoren kommt es zu einer Konformationsänderung und der anschließenden NACHT-Domänen-vermittelten Oligomerisierung des jeweiligen Rezeptors (Inohara et al. 2005, Moreno et al. 2013). Hierdurch wird RIP2 an das Rezeptor-Oligomer rekrutiert und bindet mit seiner CARD an die CARD der Rezeptoren (Abb. 6). Dadurch kommt es zur Aktivierung der RIP2-Kinase-Domäne und zur Autophosphorylierung eines Tyrosins an der Position 474 (Y474) (Lecine et al. 2007, Tigno-Aranjuez et al. 2010) sowie zur Ubiquitinierung des Proteins über ein in der Ubiquitinkette vorhandenes Lysin an der Position 63 (K63). Diese wird durch die Ubiquitin-E3-Ligasen cIAP1, cIAP2 oder XIAP vermittelt (Bertrand et al. 2009, Bertrand et al. 2011, Damgaard et al. 2012). Die Bildung einer K63-Ubiquitinkette führt zur Rekrutierung des Linearen-Ubiquitinketten-Herstellungskomplex (engl. linear ubiquitin chain assembly complex; LUBAC)-Komplexes an RIP2 (Damgaard et al. 2012). Dieser ubiquitiniert RIP2 am N-terminalen Methionin (M1) und bildet somit eine sogenannte lineare Ubiquitinierung. Der LUBAC-Komplex besteht aus den Proteinen SHARPIN, heme-oxidized IRP2 ligase-1 (HOI-IL)

und HOIP und ist der einzige bisher bekannte E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der eine lineare Ubiquitinierung von Proteinen vermittelt (Tokunaga et al. 2012). Die Rekrutierung von LUBAC als auch der E3-Ligasen cIAP1, cIAP2 oder XIAP ist für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung essenziell. Durch die IAP-vermittelte K63-Ubiquitinierung von RIP2 wird zusätzlich der TAK/TAB-Komplex rekrutiert.



**Abb. 6 Schematische Darstellung des NOD-Signalwegs und der anschließenden NF $\kappa$ B-Aktivierung.** Der NOD1/2-Rezeptor oligomerisiert nach der Bindung des spezifischen Liganden und rekrutiert so RIP2 an seine CAR-Domäne. RIP2 wird autoubiquitiniert wodurch der LUBAC-Komplex, bestehend aus den Proteinen Sharpin, HOIL und HOIP binden kann. Des Weiteren wird XIAP an die Kinase-Domäne von RIP2 rekrutiert. Gleichzeitig bindet XIAP TAB1, welches im Komplex mit TAK1 vorliegt, an seiner BIR1-Domäne und fungiert so als Plattform um die beiden Proteine RIP2 und TAB1 in unmittelbare Nähe zueinander zu bringen. Durch die räumliche Nähe von LUBAC, RIP2 und dem TAB/TAK-Komplex kann der IKK-Komplex phosphoryliert und ubiquitiniert werden. Nun wird der NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  durch den aktiven IKK-Komplex phosphoryliert, was zu einer Freisetzung des NF $\kappa$ B-Moleküls führt. Dieses transloziert in den Zellkern und aktiviert verschiedene Zielgene. Modell modifiziert nach Mehrotra et al., Krieg und Reed und Damgaard et al. (Krieg et al. 2010, Mehrotra et al. 2010, Damgaard et al. 2012)

Dabei bindet TAB1 an die BIR1-Domäne von XIAP, während RIP2 an der BIR2-Domäne gebunden ist. Somit gelangt der TAK1/TAB1-Komplex in unmittelbare Nähe zum NOD/RIP2-Signalosom. Sind die IAPs cIAP1 und cIAP2 in die Signaltransduktion involviert, ist es wahrscheinlich, dass der TAK1/TAB1-Komplex an die Ubiquitinkette von RIP2 rekrutiert wird, da die BIR1-Domänen von cIAP1/2 den Komplex nicht binden (Hasegawa et al. 2008, Krieg et al. 2009, Krieg et al. 2010). TAK1 phosphoryliert den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK), der ebenfalls an die K63-Ubiquitinkette von RIP2 gebunden ist (Wu et al. 2006), was zu einer Aktivierung

des IKK führt. Der IKK besteht aus den Serin-Threonin Kinasen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie aus IKK $\gamma$ /NEMO. NEMO ist die regulatorische Untereinheit des IKK und wird nach der Phosphorylierung von IKK $\beta$  ubiquitiniert (Hinz et al. 2014). Der aktive IKK-Komplex phosphoryliert nun die NF- $\kappa$ B-Inhibitoren I $\kappa$ B, die dann anschließend polyubiquitiniert und degradiert werden, wodurch NF- $\kappa$ B freigesetzt wird und vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren kann. Dort bindet der Transkriptionsfaktor an verschiedene Zielgene, welche Einfluss auf die Zellproliferation, Apoptose, den Zellzyklus und die angeborene und adaptive Immunantwort nehmen.

### 1.15 Zielsetzung dieser Arbeit

Inflammatorische Prozesse des Körpers sind wichtige Faktoren bei der Tumorgenese und der Progression des Kolonkarzinoms. In den letzten Jahren haben sich die membranständigen sogenannten „Toll-like (TLR) Rezeptoren“ als interessante Ziele einer möglichen Behandlung herauskristallisiert, da sie nicht nur die Homöostase des Darmtrakts regulieren, sondern auch eine erste Immunantwort auf eindringende Bakterien initiieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die TLRs in Kolonkarzinomen häufig überexprimiert sind. Durch ihre Aktivität werden vermehrt Zytokine und Chemokine freigesetzt, die die Migration und Angiogenese der Zellen erhöhen. Die mit den TLR-Rezeptoren eng verwandten, zytosolisch vorliegenden NOD-Rezeptoren sind aufgrund ihrer ähnlichen Funktion ein weiteres Ziel wissenschaftlicher Untersuchungen. Im Gegensatz zu den TLRs gibt es hierfür jedoch bislang keine wesentlichen Daten im Kolonkarzinom. Untersuchungen zeigen, dass das Protein XIAP als Mitglied der Inhibitor of Apoptosis Protein-Familie ein wichtiger Mediator bei der Signaltransduktion innerhalb des NOD-Signalwegs ist und durch seine E3-Ligase-Funktion zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung beiträgt. XIAP ist zudem als Tumorpromotor bekannt und gilt als prognostischer Faktor im Kolonkarzinom. Aufgrund dessen ist die Untersuchung der XIAP-Funktion innerhalb des NOD-Signalwegs im Kolonkarzinom von besonderem Interesse. Vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass XIAP mit der Kinase RIP2 interagiert, die ihrerseits auch an der Signaltransduktion innerhalb der NOD-Signalkaskade beteiligt ist. Viele Details der Interaktion zwischen XIAP, RIP2 und dem Adapterprotein TAB1 sind bisher jedoch nicht ausreichend geklärt. So publizierten Lu und Kollegen im Jahr 2007 eine essentielle Funktion der Interaktion zwischen XIAP und TAB1 für die Signaltransduktion. Detaillierte Untersuchungen zum Einfluss der Interaktion zwischen XIAP und RIP2 auf die Signaltransduktion im NOD-Signalweg gibt es bisher jedoch wenige. Ziel dieser Arbeit war daher zunächst die Ermittlung einer möglichen prognostischen Bedeutung der im NOD-Signalweg beteiligten Proteine NOD1, NOD2, XIAP, RIP2 und TAB1 für das Kolonkarzinom unter Zuhilfenahme von histologischem Patientengewebe.

Des Weiteren sollte der Einfluss von XIAP mit dessen Interaktionspartner RIP2 auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B untersucht werden, da bisher nicht geklärt ist, ob die NF- $\kappa$ B-Aktivierung

und eine dadurch bedingte Invasion von Tumorzellen nicht nur von der Interaktion zwischen XIAP und TAB1, sondern auch von RIP2 abhängt.

Für die beschriebene Zielsetzung sollte zunächst ein RNA-Expressionsarray durchgeführt werden um XIAP-abhängige NF- $\kappa$ B-Zielgene zu ermitteln, die dann als „Read-Out-System“ für die weiteren Untersuchungen fungieren sollten. Weiterhin sollten verschiedene Knock Out Klone für die Gene RIP2 und TAB1 in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Klone sollte nun untersucht werden welchen Einfluss insbesondere RIP2, aber auch TAB1 auf die Invasivität der Zelllinie besaßen und ob eine Interaktion mit XIAP von essentieller Wichtigkeit war. Dies sollte durch unterschiedliche funktionelle in vitro-Versuche evaluiert werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Zelllinien und Bakterienstämme

#### 2.1.1 Zelllinie

Bezeichnung	Organismus	Herkunft	Ethnie	Quelle
Colo205	Homo sapiens	MAZ	Kaukasier	ECACC
Colo206F	Homo sapiens	MAZ	Kaukasier	DMSZ
HT29	Homo sapiens	PT	Kaukasier	ATCC
SW480	Homo sapiens	PT	Kaukasier	DMSZ
DLD-1 SIB	Homo sapiens	PT	unbekannt	B. Vogelstein
LoVo	Homo sapiens	LKM	Kaukasier	DMSZ
CaCO-2	Homo sapiens	PT	Kaukasier	DMSZ
HCT116 SIB	Homo sapiens	PT	Kaukasier	B. Vogelstein
HCT116 XIAP <sup>-/-</sup>	Homo sapiens	PT	Kaukasier	B. Vogelstein
HCT116 SIB RIP2 <sup>-/-</sup>	Homo sapiens	PT	Kaukasier	Knock out in dieser Arbeit generiert
HCT116 SIB TAB <sup>-/-</sup>	Homo sapiens	PT	Kaukasier	Knock out in dieser Arbeit generiert
HCT116 WT	Homo sapiens	PT	Kaukasier	PD Dr. C. Mahotka, Institut für Pathologie, Uniklinik Düsseldorf
HCT116 RIP2 <sup>-/-</sup>	Homo sapiens	PT	Kaukasier	Knock out in dieser Arbeit generiert
HCT116 TAB <sup>-/-</sup>	Homo sapiens	PT	Kaukasier	Knock out in dieser Arbeit generiert
NIH/3T3	Mus musculus			DMSZ

Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Zelllinien. MAZ= Maligne Aszites Flüssigkeit, PT= Primärtumor, LKM= Lymphknotenmetastasen, SIB = sibelin, ECACC= European Collection of Cell Cultures, ATCC= American Type Culture Collection, DMSZ= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

### 2.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<b>E. coli DH5<math>\alpha</math></b>	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Univ.-Prof. Dr. med. Pfeffer, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität

Tab. 5 Darstellung der verwendeten Bakterienstämme

### 2.2 Liganden

MDP (Muramyl-dipeptid)	Invivogen
iE-DAP (D-gamma-Glu-mDAP)	Invivogen
LPS aus E. coli 055:B5 (10 mg)	Sigma
Humanes TNF $\alpha$ (10 $\mu$ g)	Peprrotech

### 2.3 Antibiotika

Ampicillin [1mg/ml]	ThermoFisher
Geneticin/G418 [50mg/ml]	Gibco
Penicillin/Streptomycin [10000U/ml]	Millipore
Puromycin [10mg/ml]	Sigma

### 2.4 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

BD Bioscience (Heidelberg), Bio-Rad (München), Biozym (Hessisch Oldendorf), Braun (Melsungen), Corning (Wiesbaden), Eppendorf (Hamburg), Falcon/BD (Heidelberg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Merck Millipore (Darmstadt), Sarstedt (Nümbrecht), Starlab (Ahrensberg), ThermoFisher Scientific (Oberhausen), Whatman (Dassel), VWR (Darmstadt). Parafilm wurde von der Firma Bemis bezogen.

## 2.5 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders genannt, von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Bio-Rad und Millipore bezogen. Gel Red™ wurde von der Firma Biotium, cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-free von Roche bezogen.

## 2.6 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.6.1 Medien

1x RPMI 1640 + GlutaMAX™	Gibco
DMEM Medium + 4,5g/l Glukose + GlutaMAX™	Gibco
McCoy's 5A (Modified) Medium + 4,5g/l Glukose + GlutaMAX™	Gibco
Opti-MEM (Reduced Serum Medium)	Gibco
FBS (Fötales Kälberserum)	Gibco
DMSO	Sigma-Aldrich

### 2.6.2 LB-Medium

5 g/l Hefeextrakt	BD Biosciences
10 g/l Trypton	BD Biosciences
10 g/l Natriumchlorid	

### 2.6.3 LB-Agar

5 g/l Hefeextrakt	BD Biosciences
10 g/l Trypton	BD Biosciences
10 g/l Natriumchlorid	
8 g/l Agar	Sigma-Aldrich
1 l H <sub>2</sub> O	
100 µg/ml Ampicillin	Sigma-Aldrich

#### 2.6.4 Puffer

1xPBS

Gibco

Trypsin-EDTA (0,05%)

Gibco

RIPA-Puffer

Sigma-Aldrich

1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8

1,5 M Tris

Ad 1 l dH<sub>2</sub>O

pH 8,8 mit HCl einstellen

1,0 M Tris, pH 6,8

1,0 M Tris

Ad 1 l dH<sub>2</sub>O

pH 6,8 mit HCl einstellen

SDS-Lösung (10% (w/v))

1 g SDS-Pulver

Ad 10 ml dH<sub>2</sub>O

Ammoniumpersulfat-Lösung (10% (w/v))

1 g Ammoniumpersulfat-Pulver

Ad 10 ml dH<sub>2</sub>O

10x SDS-Elektrophoresepuffer

250 mM Tris

1,9 M Glycin

0,1% (w/v) SDS

## 10x Transferpuffer

192 mM Glycin

25 mM Tris

## 10x Tris-Buffered-Saline (TBS)

1,5 M NaCl

100 mM Tris/HCl (pH 7,5)

## 1x TBS-T-Puffer

10% 10x TBS

90% dH<sub>2</sub>O

0,01% (v/v) Tween 20

## Ponceau S-Lösung

0,5% (w/v) Ponceau S-Pulver

1% (v/v) Eisessig

Ad 500 ml dH<sub>2</sub>O

## 6x Laemmli-Puffer

100 mM Tris/HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA

12,5% (v/v) Glycerin

2% (w/v) SDS

2% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

0,1% (w/v) Bromphenolblau

## 5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)

50% TBE (10x)

50% dH<sub>2</sub>O

## 2.7 Färbelösung

GelRed™-Lösung (3%)

15 µl GelRed™ Stocklösung (10.000x)

50 ml dH<sub>2</sub>O

## 2.8 Transfektionsreagenzien, Reaktionsmixe und Enzyme

### 2.8.1 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine2000

ThermoFisher

### 2.8.2 cDNA-Synthese- und PCR-Lösungen

FastStart TaqMan Probe Master Mix

Roche

DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)

ThermoFisher Scientific

Protector RNase Inhibitor

Roche

dNTP-Mix (10mM)

Roche

Oligo-dT-Primer-Mix

Invitrogen

### 2.8.3 Enzyme

RNase-Free DNase Set

Qiagen

Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl)

Roche

Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> Polymerase

Roche

## 2.9 Größenstandards

### 2.9.1 DNA-Leiter

GeneRuler™ 50 bp Ladder

Fermentas

GeneRuler™ 100 bp Ladder

Fermentas

GeneRuler™ 1 kb Ladder

Fermentas

## 2.9.2 Protein-Leiter

Precision Plus Protein WesternC Standards

Bio-RAD

## 2.10 Vektoren und Expressionskonstrukte

Vektorrückrad	Gen	Beschreibung	Bezugsquelle
pcDNA-3-6myc	-NOD1	Expressionsplasmid für NOD1, enthält ein myc-Vektorrückrad	
pcDNA-3-6myc	-NOD2	Expressionsplasmid für NOD2, enthält ein myc-Vektorrückrad	
pcDNA-3-6myc	-XIAP	Expressionsplasmid für XIAP, enthält ein myc-Vektorrückrad	John C. Reed, Burnham In- stitute for Medical Re- search, La Jolla
pcDNA-3-6myc	-TAB1	Expressionsplasmid für TAB1 enthält ein myc-Vektorrückrad	
pcDNA-3-6myc	-Leervektor	myc-Vektorrückrad	
pEGFP-C2	-XIAP	Expressionsplasmid für XIAP, enthält ein EGFP-Vektorrückrad	
	-Leervektor	EGFP-Vektorrückrad	
pEBB-FLAG	-XIAP	Expressionsplasmid für XIAP, enthält einen FLAG-tag	
pCR3.V72-Met- VSV	-RIP2	Expressionsplasmid für RIP2, enthält einen VSV-tag	
pNFκB-LUC	NFκB-Luciferase	Expressionsplasmid, Einbringung eines Luciferase-gekoppelten NF-κBs in die Zelle	Clontech
pRL-TK	Thymidin-Kinase (Renilla)	Expressionsplasmid, Einbringung einer Thymidin-Kinase in die Zelle	Promega

<b>pZFN</b>	RIP2	Expressionsplasmid, enthält die Sequenz für die RIP2-spezifische Zinkfinger-Nuklease	Sigma-Aldrich
<b>pZFN</b>	TAB1	Expressionsplasmid, enthält die Sequenz für die TAB1-spezifische Zinkfinger-Nuklease	Sigma-Aldrich
<b>pUC57-Amp</b>	RIP2	Donor-Vektor, enthält eine mutierte Sequenz für RIP2 mit Triple-Stoppcodon, Ampicillin/Puromycin-Resistenz	GENEWIZ
<b>pUC57-Amp</b>	TAB1	Donor-Vektor, enthält eine mutierte Sequenz für TAB1 mit Triple-Stoppcodon, Ampicillin/Puromycin-Resistenz	GENEWIZ

Tab. 6 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Plasmid-DNA

## 2.11 Antikörper

### 2.11.1 Western Blot

#### 2.11.1.1 Primärantikörper

Antikörper	Masse [kD]	Wirt	Verdünnung	Puffer	Zeit	Firma
<b>cIAP2</b>	68	Kaninchen	1:1000	5% Milch + TBST-T	16-18 Std	Novus Biologicals
<b>GAPDH</b>	36	Maus	1:8000	5% Milch + TBST-T	40 Min	Abcam
<b>RIP2</b>	64	Maus	1:1000	5% Milch + TBST-T	16-18 Std	BD Biosciences

<b>TAB1</b>	55	Maus	1:1000	5% Milch + TBST-T	16-18 Std	Novus Biologi- cals
<b>XIAP, Klon 28</b>	57	Maus	1:1000	2,5% Milch + TBST-T	60 Min	BD Biosciences

Tab. 7 Übersicht der im Western Blot verwendeten Primärantikörper

### 2.11.1.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Klon	Wirt	Verdünnung	Firma
<b>Anti-Maus IgG-HRP</b>	Keine Angaben	Ziege	1/1000-1/8000	Sigma-Aldrich
<b>Anti-Kaninchen IgG-HRP</b>	Keine Angaben	Ziege	1/1000-1/8000	Cell Signalling

Tab. 8 Übersicht der im Western Blot verwendeten Sekundärantikörper

## 2.11.2 Immunhistochemie

### 2.11.2.1 Primärantikörper

Antikörper	Masse [kD]	Wirt	Verdünnung	Firma
<b>NOD1</b>	95	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
<b>NOD2</b>	110	Maus	1:25	Millipore
<b>RIP2</b>	64	Maus	1:1000	BD Biosciences
<b>TAB1</b>	55	Kaninchen	1:100	Abcam
<b>hILP/XIAP, Klon 48</b>	57	Maus	1:100	BD Biosciences

Tab. 9 Übersicht der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Primärantikörper

### 2.11.2.2 Isotypkontrollen

Antikörper	Klon	Wirt	Verdünnung	Firma
<b>Maus IgG2B</b>	MOPC-21	Maus	2 µg/ml	Sigma-Aldrich
<b>Kaninchen IgG</b>	X0903	Kaninchen	0,8 mg/ml	Dako

Tab. 10 Übersicht der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Sekundärantikörper

## 2.12 Oligonukleotide

### 2.12.1 RealTime-PCR-Primer

Name	Sequenz (5' – 3')	T <sub>m</sub>	TaqMan-Sonde	Amplikon (nt)
<b>NOD1 fw</b>	ATC CTG GAT GAA TGC AAA GG	59,0	48	88
<b>NOD1 rv</b>	CAG CCA GGG CGA GAT ACT T	60,0		
<b>RIP2 fw</b>	TCC ACT CTC AAC TGC AGG AA	59,0	64	62
<b>RIP2 rv</b>	GGA TCC ACT GCT GGG CTA	59,0		
<b>TAB1 fw</b>	ACC CTC TCC CTT GTC ATG C	60,0	81	110
<b>TAB1 rv</b>	GTT AAG GTC GGG CTT TGG T	59,0		
<b>XIAP fw</b>	ACT TTT GGG ACA TGG ATA TAC TCA G	59,7	68	91
<b>XIAP rv</b>	AGC ACT TTA CTT TAT CAC CTT CAC C	59,7		
<b>IL8 fw</b>	AGA CAG CAG GGC ACA CAA GC	59,0	72	119
<b>IL8 rv</b>	AGG AAG GCT GCC AAG AGA G	59,0		
<b>clAP2 fw</b>	AGA TGA AAA TGC AGA GTC ATC AAT	59,0	80	70
<b>clAP2 rv</b>	CAT GAT TGC ATC TT TGA ATG G	60,0		
<b>CCL20 fw</b>	GCT GCT TTG ATG TCA GTG CT	59,0	39	69
<b>CCL20 rv</b>	GCA GTC AAA GTT GCT TGC TG	59,0		
<b>CXCL1 fw</b>	TCC TGC ATC CCC CAT AGT TA	60,0	52	105
<b>CXCL1 rv</b>	CTT CAG GAA CAG CCA CCA GT	60,0		
<b>GAPDH fw</b>	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	60,0	60	66
<b>GAPDH rv</b>	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	60,0		

Tab. 11 Übersicht der in der Real Time PCR verwendeten Oligonukleotide. Fw = forward, rv = reverse

### 2.12.2 PCR-Primer

ZFN-Primer	Sequenz (5' – 3')	T <sub>m</sub>	Amplikon (nt)
RIP2 fw (Sigma) #1	CCA CCA TTC CCT ACC ACA AA	56,0	349
RIP2 rv (Sigma) #1	CTC CAG AGA AGC CTG TGC TC		
TAB1 fw (Sigma) #1	GCCTGCTAGGTTTTTGTTC	56,0	301
TAB1 rv (Sigma) #1	GTCGGTGTCTTTCCTTGCTT		

Tab. 12 Übersicht der in der PCR verwendeten Oligonukleotide. Fw = forward, rv = reverse

### 2.12.3 Sequenzierprimer

ZFN-Primer	Sequenz (5' – 3')	Bezugsquelle
T7 fw	TAATACGACTCACTATAGGG	GATC
SP6 fw	ATTTAGGTGACACTATAGAA	GATC
pEGFP_C2 fw	GATCACATGGTCCTGCTG	GATC
pEGFP_C2 rv	TTTAAAGCAAGTAAAACCTC	GATC
RIP2 fw	CCA CCA TTC CCT ACC ACA AA	Sigma-Aldrich
RIP2 rv	CTC CAG AGA AGC CTG TGC TC	Sigma-Aldrich
TAB1 fw	GCCTGCTAGGTTTTTGTTC	Sigma-Aldrich
TAB1 rv	GTCGGTGTCTTTCCTTGCTT	Sigma-Aldrich

Tab. 13 Übersicht der zur Sequenzierung verwendeten Primer. Fw = forward, rv = reverse

## 2.13 Kit-Systeme

Clarity Western ECL Substrate Kit

Bio-Rad

CompoZr® Custom Zinc Finger Nuclease (ZFN)

Sigma-Aldrich

Gel Extraction Kit	Qiagen
Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go! 2 <sup>nd</sup> generation Kit	eBioscience
Identifier-1 Kit	ABI
QIAamp DNA Blood & Tissue Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kits	Qiagen
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Promokine
PowerPlex® ESI-17 Kit	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Transgenomic SURVEYOR Kit	Integrated DNA Technologies
ZytoChem-Plus HRP-Kit, Broad Spectrum	ZytoMed

## 2.14 Laborgeräte

### 2.14.1 Thermocycler

C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
S1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
Chromo4 Real-Time PCR Detector	Bio-Rad

### 2.14.2 Sterilbänke und Inkubatoren

Brutschrank 6000	Heraeus Instruments
Sterilbank	Thermo Electron Corporation

### 2.14.3 Zentrifugen

PlateFuge	Benchmark
Micro6	Quick-Pak
MiniSpin®Plus	Eppendorf
Multifuge 4 KR	Heraeus Instruments
Universal 30RF	Hettich
5417R	Eppendorf
Centrifuge 5810R	Eppendorf

Fresco 17 Centrifuge

Thermo Heraeus

Megafuge 1.0R

Heraeus Instruments

LabDancer

VWR

#### **2.14.4 Kühl- und Gefrierschränke**

Comfort

Liebherr

Sparkfree Laboratory Freezer

Thermo Fisher

Premium Biofresh

Liebherr

#### **2.14.5 Heizblöcke und Wasserbäder**

Thermostatic Water bath WBS

Fried Electric

Wasserbad

NeoLab

#### **2.14.6 Waagen**

Analysewaage

Kern & Sohn GmbH

Feinwaage Voyager®Pro

Pro Ohaus

#### **2.14.7 Mikroskope**

Axiovert 200

Carl Zeiss

Axioplan-2 Imaging

Carl Zeiss

DMIL

Leica

#### **2.14.8 Sonstiges**

Autoklav

D-65 Systec

BioPhotometer

Eppendorf

Criterion Blotter™

Bio-Rad

Dispenser Pipetten

Eppendorf

Elektrophoresekammer GENEMate

Starlab

IKA Vortex Mixer

IKA Labortechnik

Magnetrührer

IKA Labortechnik

Mini-PROTEAN Elektrophorese System	Bio-Rad
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Brand
Orbitalschüttler	VELP Scientifica
pH-Meter 211	HANNA Instruments
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfen	Eppendorf; Integra Biosciences
Power Pac 300	Bio-Rad
PowerPac Basic	Bio-Rad
Stickstofftank	Cryotherm
Tecan Infinite M200 Spektrometer	Tecan
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Thermoblock	HLC
VersaDoc Imaging System MP 4000	Bio-Rad
Vortex Mixer	NeoLab

## 2.15 Software

GeneSpring GX Software, Version 10.5	Agilent
GraphPad Prism V5	GraphPad Software
i-control™ V1.9	Tecan
Quantity One V 4.5.0	Bio-Rad
Opticon Monitor V 3.1.32	Bio-Rad
Microsoft Office	Microsoft
SPSS Version 23	IBM
Universal Probe Library- System Assay Design	Roche

## **3 Methoden**

### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.1.1 DNA-Isolation aus Zellkultur**

Die DNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Für die DNA-Isolation wurden dazu etwa  $3 \times 10^6$  Zellen einer Kulturflasche durch eine Zentrifugation für 5 Minuten bei  $300 \times g$  und Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in  $200 \mu\text{l}$  DPBS (im Folgenden PBS genannt) resuspendiert. Anschließend wurden  $20 \mu\text{l}$  Proteinase K und nach kurzem Durchmischen weitere  $4 \mu\text{l}$  RNase [ $100 \text{ mg/ml}$ ] zur Probe zugegeben. Nach einer weiteren Durchmischung der Probe durch den Vortexmischer wurden  $200 \mu\text{l}$  des Denaturierungspuffers AL zugegeben, abermals stark gemischt und der Ansatz bei  $56^\circ\text{C}$  für 10 Minuten inkubiert. Die DNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von  $200 \mu\text{l}$  96%igem Ethanol und starkem Mischen. Die gesamte Lösung wurde nun auf die DNeasy Mini Säule gegeben und bei  $6000 \times g$  für eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und  $500 \mu\text{l}$  des Waschpuffers AW1 auf die Säule pipettiert. Es schloss sich eine Zentrifugation bei  $6000 \times g$  für eine Minute an. Nach Zugabe von  $500 \mu\text{l}$  des Puffers AW2 auf die Säule und einer weiteren Zentrifugation bei  $17.000 \times g$  für 3 Minuten, wurde der Durchfluss verworfen, die Säule in ein neues  $1,5 \text{ ml}$  Reaktionsgefäß überführt und die gebundene DNA mit  $100\text{-}200 \mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  für eine Minute bei RT inkubiert. Nach einer ein-minütigen Zentrifugation bei  $6000 \times g$  wurde die DNA-Konzentration des Eluats mit dem Tecan InfinteM200 bestimmt und die DNA bis zur Weiterverwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **3.1.2 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanen Karzinom-Zelllinien**

Für die Isolation von RNA wurden etwa  $5 \times 10^5$  Zellen verwendet. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde das Zellpellet in  $350 \mu\text{l}$  Lysepuffer aufgenommen und durch Aufziehen in einer  $1 \text{ ml}$  Spritze vollständig lysiert. Anschließend wurden  $350 \mu\text{l}$  70%igen Ethanols zugegeben, die Lösung vermischt und auf die RNA bindende „RNeasy“-Säule gegeben. Nach einer 15-sekündigen Zentrifugation bei  $8000 \times g$  wurde der Durchfluss ver-

worfen und 350 µl Bindungspuffer auf die Säule gegeben. Die Zentrifugation wurde wiederholt, der Durchfluss abermals verworfen und auf der Säule befindliche DNA mittels 15-minütigem DNase-Verdau (30 U) entfernt. Daraufhin wurden erneut 350 µl Bindepuffer auf die Säule gegeben und unter den Standardbedingungen zentrifugiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit je 500 µl Waschpuffer für 15 Sekunden bzw. 2 Minuten bei 8000 x g. Die Trocknung der Säule erfolgte mit einer Zentrifugation bei 17.000 x g für eine Minute. Anschließend wurde die RNA mit 40 µl dH<sub>2</sub>O aus der Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert und die Konzentration durch eine photometrische Messung mittels Tecan InfiniteM200 ermittelt.

### **3.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel erfolgte unter Zuhilfenahme des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurden die aufzureinigenden PCR-Amplifikate unter UV-Bestrahlung mit Hilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde gewogen und das dreifache Volumen (100 mg ≈ 100 µl) des Puffers QG zu einem Volumen des Gels gegeben. Die Probe wurde für 10 Minuten bei 50°C im Heizblock inkubiert und alle 2-3 Minuten auf dem Vortexmischer geschüttelt bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte. Dann wurde 1 Volumen Isopropanol zu jeder Probe zugegeben und vermischt. Die Lösung wurde auf eine QIAquick Säule gegeben und für 1 Minute bei 17.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden 500 µl QG-Puffer auf die Säule gegeben. Nach einer Zentrifugation von 1 Minute bei 17.000 x g wurde der Durchfluss abermals verworfen, 750 µl des Waschpuffers PE auf die Säule gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und die Säule erneut zentrifugiert. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die gebundene DNA mit 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben, für eine Minute bei RT inkubiert und wiederum für 1 Minute bei 17.000 x g zentrifugiert. Die Konzentrationsmessung erfolgte photometrisch.

### 3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die jeweiligen Konzentrationen von DNA- und RNA-Lösungen wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers (InfiniteM200, Tecan) ermittelt. Dazu wurde das Gerät zunächst mit destilliertem RNase- und DNase-freiem Wasser kalibriert. Anschließend wurden 1,5 µl der Nukleinsäure-Lösungen auf die Messfelder des Gerätes gegeben und die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei sollten die erhaltenen Werte im linearen Bereich zwischen 0,5 und 1 liegen. Proteine lassen sich bei einer Wellenlänge von 280 nm, Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm detektieren. Durch die Berechnung des Quotienten konnte so die Reinheit der Nukleinsäure-Probe ermittelt werden. Der Quotient  $OD_{260/280}$  sollte bei 1,8 für DNA-Proben, bei 1,9 für RNA-Proben liegen.

### 3.1.5 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde eingesetzt um aus isolierter RNA komplementäre DNA (cDNA) herzustellen. Hierzu wurde das Enzym Transcriptor Reverse Transkriptase (Roche) verwendet. Die reverse Transkription wurde nach dem Standardprotokoll der Firma Roche durchgeführt. Pro Ansatz wurden 2 µg Matrizen-RNA verwendet. Das Restvolumen wurde mit destilliertem RNase- und DNase-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 0,5 µg „oligo (dT)“-Primer eingesetzt. Der Ansatz wurde nach kurzem Durchmischen für zehn Minuten bei 65°C inkubiert um lineare RNA-Einzelstränge zu garantieren und die Bindung der Oligonukleotide zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz mit folgendem Reaktionsmix und einem Gesamtvolumen von 20 µl komplettiert:

4 µl Transcriptor RT Reaction Buffer (5x)

20 nmol dNTP-Mix [je 10mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP]

20 U RNase Inhibitor [40 U/µl]

10 U M-MuLV Reverse Transkriptase [20 U/µl]

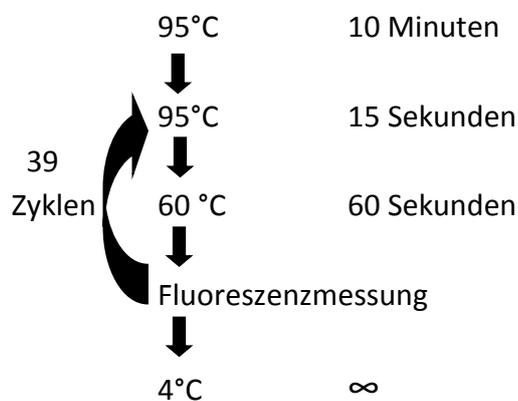
Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe von RNA mitgeführt. Nach kurzer Durchmischung und Zentrifugation wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 55°C inkubiert.

Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte anschließend durch eine 5-minütige Inkubation bei 85°C. Die entstandene cDNA konnte bei -20°C gelagert werden.

### 3.1.6 Messung der RNA-Expression mittels Real-Time PCR

Zur quantitativen Bestimmung der RNA-Expression wurde die Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierbei wurden TaqMan-Sonden der Firma Roche verwendet. TaqMan-Sonden besitzen an ihrem 3'-Ende einen Reporter-FAM-Fluoreszenzfarbstoff, an ihrem 5'-Ende einen sogenannten Quencher. Die direkte Nähe des Quenchers zum Reporter neutralisiert die Fluoreszenz des FAM-Farbstoffs. Nachdem die Sonde während des PCR-Laufs eingebaut wurde, spaltet die Taq-Polymerase mittels ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität den Quencher ab und die Fluoreszenz des Reporter-FAM-Farbstoffes kann gemessen werden. Dabei ist die Fluoreszenz proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produkts.

Zur Durchführung der RealTime PCR wurde der FastStart TaqMan Probe Master Mix und die entsprechenden Sonden von Roche verwendet. Pro Ansatz wurden 12,5 µl des 2-fach konzentrierten Master Mixes, 2,5 pmol der jeweiligen Sonde sowie jeweils 2,5 pmol 5'-3' und 3'-5'-Primer eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 25 µl und wurde mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Je nach zu untersuchender RNA wurden 10 bis 100 ng cDNA eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide können der Tab. 11 entnommen werden. Als interne Kontrolle diente GAPDH. Die qRT-PCRs wurden als Triplikate im 96-well-Format durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten eine „No Template“ Kontrolle, die den Reaktionsmix ohne cDNA enthielt, sowie eine „No Amplification“ Kontrolle, in die während der cDNA-Synthese keine RNA zugegeben worden war. Die qPCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:



Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode nach Livak (Livak et al. 2001). Hierbei wurde die n-fache Expression der Ziel-RNA in Relation zur Expression eines in derselben Probe vorhanden sogenannten Housekeeping-Gens ermittelt. Dabei waren

$$\Delta\Delta Ct = ((Ct_{(\text{Zielgen})} - Ct_{(\text{MW Zielgen})}) - (Ct_{(\text{Referenzgen})} - Ct_{(\text{MW Referenzgen})}))$$

### 3.1.7 Überprüfung der Bindungseffizienz erstmalig verwendeter Oligonukleotide in der qRT-PCR

Um die effiziente Bindung neuer qPCR-Primer zu testen, wurden Effizienzkurven hergestellt. Dazu wurde die cDNA aller im Projekt genutzter Proben zusammengeführt und eine Standardkonzentration von 100 ng/ $\mu$ l angesetzt. Diese wurde dann in Verdünnungen von 1/10 bis auf eine Konzentration von 0,0001 ng/ $\mu$ l herabgesetzt und mit einem Volumen von 2,5  $\mu$ l in die qPCR-Reaktionen eingesetzt. Der Reaktionsmix wurde pro Ansatz aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

12,5 $\mu$ l	FastStart TaqMan Probe Master Mix (2x)
2,5 pmol	der jeweiligen Primer-spezifischen Sonde sowie jeweils
2,5 pmol	5'-3'-Primer
2,5 pmol	3'-5'-Primer
2,5 $\mu$ l	cDNA
Ad 25 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O

Die Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Ansätze mit 0  $\mu$ g cDNA. Die PCR-Konditionen folgten dem Standardprotokoll wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Erstellung einer Geraden aus den ermittelten Ct-Werten der einzelnen cDNA-Verdünnungsstufen und der Ermittlung ihrer Steigung. Die Effizienz (E) der Primer wurde dann mit folgender Formel berechnet, wobei  $R^2$  der Korrelationskoeffizient ist und X die Steigung anzeigt:

$$E = 10^{\left(\frac{R^2}{x}\right)}$$

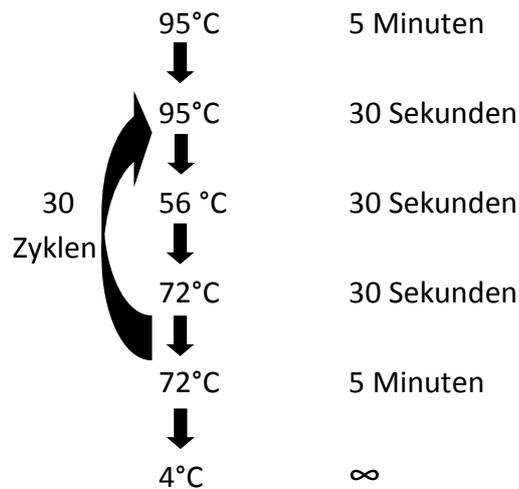
$R^2$  sollte  $> 0,98$  sein, die Effizienz im besten Fall bei einem Wert von 2 liegen, also eine Verdopplung des PCR-Produkts pro Zyklus anzeigen. Bis zu einer Effizienz von 1,8 wurden die Primer dann für den Einsatz in den unterschiedlichen Versuchen freigegeben.

### **3.1.8 Short-Tandem-Repeat (STR)-Analyse**

Um die korrekte Identität der verwendeten Zelllinien zu gewährleisten und Kreuzkontaminationen mit anderen Zelllinien auszuschließen, wurden STR-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden das Identifier-1 Kit der Firma ABI und das PowerPlex® ESI-17 Kit der Firma Promega mit insgesamt 16 zu untersuchenden Systemen verwendet. Die STR-Analysen wurden in Kooperation mit PD Dr. med. Wolfgang Huckenbeck am Institut für Rechtsmedizin der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt.

### **3.1.9 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von RIP2 und TAB1**

Die Gesamt-DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Standardprotokoll wie unter 3.1.1 beschrieben aus den unterschiedlichen Zellkulturen isoliert und in 50  $\mu$ l A. dest aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem Standardprotokoll (Kapitel 3.1.4). Anschließend wurde die DNA in eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, in der RIP2 bzw. TAB1 amplifiziert wurden. Für die PCR-Reaktion wurde das Roche Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> PCR System (Roche) verwendet. 200 ng DNA wurden auf ein Gesamtvolumen von 36,5  $\mu$ l mit A. dest aufgefüllt. Der PCR Master Mix bestand aus 10  $\mu$ l 5 x PCR-Puffer, 10 nmol dNTPs, 2,5 U High Fidelity Polymerase und je 25 pmol 5'->3' und 3' -> 5' RIP2- bzw. TAB1-Primer. Die Sequenzen sind der Tab. 12 zu entnehmen. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:



### 3.1.10 Denaturierung und Wiederanlagerung der PCR-Amplifikate

10 µl des Reaktionsgemischs aus der PCR wurden in ein neues PCR-Gefäß überführt, die darin enthaltenen PCR-Amplifikate wurden denaturiert und durch langsame Temperaturabkühlung wieder aneinandergelagert. Die Denaturierung und Wiederanlagerung erfolgte durch folgendes PCR-Protokoll:

95°C	10 Minuten
95°C bis 85°C	-2°C/Sek
85°C bis 25°C	-0,1°C/Sek
4°C	∞

Durch dieses Vorgehen entstanden Heteroduplexe aus wildtypischen und mit Basenmodifikationen mutierten DNA-Fragmenten (vgl. Abb. 7).

### 3.1.11 Fragmentierung erhaltener PCR-Produkte mittels Cel-I Assay

Der Cel-I Assay (Transgenomic SURVEYOR® Mutation Detection Kit, Transgenomic) wurde zur Fragmentierung der erhaltenen PCR-Produkte genutzt. Es besteht aus dem Enzym Nuclease S und einem Enhancer. Beide Komponenten wurden zu den denaturierten und wieder aneinander angelagerten PCR-Amplifikaten gegeben. Die durch die während der Wiederanlagerung der PCR-Amplifikate entstandenen „Blasen“ wurden hier als Erkennungsstellen genutzt. Hier wurden die Amplifikate dann durch die Nuclease S gespalten wodurch

es zu DNA-Fragmenten spezifischer Längen kam. Es wurden jeweils 1 µl Nuklease S und 1 µl Enhancer zu der PCR-Reaktion zugegeben und für 40 Minuten bei 42°C inkubiert.

### **3.1.12 Durchführung einer PAGE-TBE-Gelelektrophorese und Bestimmung der Zinkfinger-nuklease-Aktivität**

Zur Bestimmung der Zinkfinger-nuklease-Aktivität wurden 8 µl des Reaktionsansatzes aus dem Cel-I Assay auf ein 10%iges PAGE-TBE-Gel aufgetragen. Dazu wurden die Proben zuvor mit 2 µl DNA-Ladepuffer vermischt.

#### PAGE-TBE-Gel (10%ig)

A. dest	5,6 ml
30% Acrylamid/Bis	4,0 ml
5xTBE	2,4 ml
10% APS	0,2 ml
TEMED	0,01 ml

Der Gellauf wurde im Mini-PROTEAN Elektrophorese System von Bio-Rad mit einer Spannung von 80 V und 30 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurden die Banden durch die Inkubation des Gels in einer 3%igen Gel-Red-Lösung für 30 Minuten bei RT gefärbt und durch UV-Bestrahlung im VersaDoc 4000 System von Bio-Rad ausgewertet. Das wildtypische DNA-Amplifikat für RIP2 besaß eine Länge von 349 bp. Waren Mutationen durch die Zinkfinger-Nukleasen entstanden, so wurden DNA-Fragmente mit 210 bp und 139 bp Länge auf dem Gel erkennbar. DieTAB1-Amplifikate besaßen Längen von 301 bp, 175 bp und 126 bp.

### **3.1.13 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurden entsprechend der erwarteten Produktgröße 1-2%ige Agarosegele hergestellt. Zur Sichtbarmachung der Banden wurde Gel Red™ in das Gel gegeben. Dieses interkaliert in die DNA und macht sie unter UV-Bestrahlung sichtbar. 6 µl der PCR-Probe und 2 µl DNA-Ladepuffer wurden vermischt und in die Taschen des Gels

pipettiert. Zusätzlich wurden Größenstandards von Fermentas aufgetragen („50 bp Ladder“, „100 bp Ladder“ oder „1 kb Ladder“). Je nach Größe des Gels wurde eine Spannung zwischen 80 und 110 Volt für ca. 1 Stunde angelegt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Bestrahlung mit dem VersaDoc 4000 System von Bio-Rad.

#### **3.1.14 Transformation von E. coli DH5 $\alpha$**

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde diese in der Bakterienart E. coli transformiert. Nach der Kultivierungszeit über Nacht wurden die Bakterien geerntet, aufgeschlossen und die Plasmid-DNA aufgereinigt.

Zur Transformation wurden kompetente E. coli-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  verwendet. Die Zellen wurden durch die Medizinische Mikrobiologie, Universität Düsseldorf, kompetent gemacht und zur Verfügung gestellt. Zu 1  $\mu$ g verdünnter Plasmid-DNA wurden 50  $\mu$ l Bakteriensuspension gegeben. Die Suspension wurde vermischt und 20 Minuten im Eisbad inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten im Eisbad abgekühlt. Dann wurden 500  $\mu$ l LB-Medium ohne Selektionsmarker hinzugegeben und die Zellen für 1 Stunde bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Anschließend wurden 100 – 200  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf bereits vorgewärmten LB-Agarplatten, supplementiert mit Ampicillin [10 $\mu$ g/ml], ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### **3.1.15 Isolierung von Plasmid-DNA durch Mini- bzw. Maxipräparation**

Eine Einzelkolonie der über Nacht auf Selektionsagar gewachsenen Kolonien wurde entnommen und zur Anreicherung in 5 ml Selektionsmedium überführt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C wurde diese Vorkultur in 200 ml Selektionsmedium überführt und vermehrt. Die in E. coli DH5 $\alpha$  transformierte und vervielfältigte Plasmid-DNA wurde wahlweise mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Mini- oder Maxipräparationskits nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) extrahiert und aufgereinigt. Diese Kits wirken nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, bei dem ein mit RNase A versetzter NaOH/SDS-Puffer die bakteriellen Zellen lysiert und Nukleinsäuren und Proteine denaturiert. Anschließend wird die Plasmid-

DNA an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden. Proteine, RNA und andere Verunreinigungen werden abgewaschen. Anschließend wird die an die Säule gebundene DNA mittels eines Puffers mit erhöhtem pH-Wert eluiert. Durch anschließende Zugabe von Isopropanol wird die DNA präzipitiert. Danach wird die DNA mit 70% Ethanol gereinigt und in destilliertem Wasser aufgenommen. Das Volumen richtete sich nach der Größe des erhaltenen DNA-Pellets und betrug 150 bis 400  $\mu$ l.

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma GATC durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Sequenzierprimer sind in Tab. 13 aufgeführt.

### **3.1.16 Genexpressionsanalyse in der Zelllinie HCT116**

Um einen Überblick über differentiell regulierte Gene in HCT116 Wildtyp- und XIAP<sup>-/-</sup>-Zellen zu erhalten, wurde ein RNA-Genexpressions-Array durchgeführt. Dazu wurden zunächst Zellen der beiden Klone mit MDP bzw. iE-DAP stimuliert. Als Negativkontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Für die Stimulation wurden 500.000 Zellen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 20  $\mu$ g/ml MDP bzw. iE-DAP für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) wie unter 3.1.2 beschrieben, isoliert. Die erfolgreiche Stimulation der Zellen wurde durch eine qRT-PCR für eine IL8-Expression verifiziert. Im Anschluss wurde RNA mit einer Konzentration von 10 ng/ $\mu$ l zur weiteren Analyse an Dr. René Deenen, Biologisch-medizinische Forschungszentrum Düsseldorf (BMFZ), übergeben. Die RNA-Integrität (engl. RNA integrity number, RIN) wurde für die einzelnen Proben mit Hilfe des „Agilent 2100 Bioanalyzers“ bestimmt. Die RIN-Werte besitzen eine Skala von 1 bis 10, wobei 1 stark degradierte und 10 vollständig intakte RNA beschreibt. Ausschließlich Proben mit Werten zwischen 8 und 10 wurden für den Expressionsarray verwendet. Die Synthese der benötigten cRNA, sowie die Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Proben erfolgte nach Angaben des Herstellers (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Low Input Quick Amp Labeling, Vers. 6.5, Agilent). Die durch die Vorbehandlung entstandene cRNA wurde nun nach einem Fragmentierungsschritt auf die Oligonukleotid Microarrays hybridisiert (Agilent Human 8x60K High Density Oligonukleotide Microarrays). Alle Arrays konnten durch eine Qualitätskontrolle zu weiteren Analysen

zugelassen werden, wodurch sich für jede Versuchskondition jeweils vier Replikate ergaben. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte dann mittels „GeneSpring GX Software“, Version 10.5 (Agilent). Die Rohdaten wurden Quantil-normalisiert und die Proben paarweise verglichen:

HCT116 XIAP<sup>-/-</sup> vs. HCT116 WT (SIB)

HCT116 XIAP<sup>-/-</sup> MDP-behandelt vs. HCT116 WT (SIB) MDP-behandelt

HCT116 XIAP<sup>-/-</sup> DAP-behandelt vs. HCT116 WT (SIB) DAP-behandelt

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Welch-Tests und einem Cut-off von 0,05.

## **3.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.1 Präparation von Proteinlysaten aus humanen Kolonkarzinom-Zelllinien**

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zelllinien bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Die Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet und mittels Zentrifugation bei 110 x g und vier Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 mL PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Zentrifugation wiederholt und das PBS vollständig vom Pellet entfernt. Die Zellen wurden je nach Menge in 100-400 µl, mit Proteinase-Inhibitoren komplettiertem RIPA-Puffer aufgenommen. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation im Eisbad, während der das Lysat jede fünf Minuten resuspendiert wurde. Bei der anschließenden 30-minütigen Zentrifugation bei 17.000 x g für 30 Minuten bei 4°C wurde der Zelldebris pelletiert. Das Proteinlysat im Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Färbung bestimmt. Die Lagerung nicht verwendeter Proteinlysate fand bei -80°C statt. Waren die Proteinproben bereits durch Erhitzung denaturiert, konnten sie bei -20°C aufbewahrt werden.

### **3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Färbemethode nach Bradford wird zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen genutzt. Hierbei nutzt man den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250, der an die basischen Seitenketten von Proteinen bindet. Dadurch verschiebt sich dessen Absorption von 465 nm

auf 595 nm. Dies ermöglicht es, gebundenen von nicht gebundenem Farbstoff zu unterscheiden.

Zur Proteinmessung wurde das Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio-Rad) im Verhältnis 1/5 mit A. dest verdünnt. Davon wurden 998 µl in eine Küvette gegeben und mit 2 µl Proteinlysate vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation konnte mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf) die Absorption des gebundenen Coomassie-Farbstoffes bei 595 nm gemessen werden.

Um die unbekannte Proteinkonzentration einer Probe bestimmen zu können, wurde zunächst eine Eichgerade angelegt, die mit definierten BSA-Konzentrationen (1- 20 µg/ml) erstellt wurde.

### **3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine SDS-PAGE mit 5%igen Sammel- und 10%igen Trenngelen verwendet. Die Prozentigkeit der Trenngele richtete sich nach der Größe der zu detektierenden Proteine. Die verwendeten Proteinproben bestanden aus 15-25 µg Gesamtproteinlysate das mit 6-fach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt und auf 18-36 µL Gesamtvolumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Anschließend wurden die Proben bei 95°C für 5 Minuten erhitzt, so dass die Proteine in denaturierter, linearer Form vorlagen. Durch das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol wurden Disulfidbrücken reduziert und die Proteine in ihrer denaturierten Form erhalten. Durch das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene SDS wurde die Eigenladung der Proteine neutralisiert, so dass die Proteine während der Elektrophorese ausschließlich in Abhängigkeit ihrer molekularen Größe linear aufgetrennt wurden. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel geschah wie in den folgenden Tabellen dargestellt:

Sammelgel (5%ig):

A. dest	68% (v/v)	2,7 ml
30% Acrylamid/Bis	17% (v/v)	0,67 ml
1,0 M Tris pH 6,8	125 Mm	0,5 ml
10% SDS	0,1% (w/v)	0,04 ml
10% APS	0,1% (w/v)	0,04 ml
TEMED	0,01% (w/v)	0,004 ml

Trenngel (10%ig):

A. dest	25% (v/v)	4,0 ml
30% Acrylamid/Bis	30% (v/v)	3,3 ml
1,0 M Tris pH 6,8	375 Mm	2,5 ml
10% SDS	0,1% (w/v)	0,1 ml
10% APS	0,1% (w/v)	0,1 ml
TEMED	0,0001% (v/v)	0,004 ml

**3.2.4 Western Blot**

Beim Western Blot werden die Proteine durch das Anlegen einer elektrischen Spannung vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Dort werden sie durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen gebunden und immobilisiert. Die Anordnung der Proteine auf dem Gel wird auf die Membran übernommen. Zur Übertragung wurden die mit Transferpuffer getränkte Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Whatman) und das SDS-Gel zwischen jeweils zwei ebenfalls getränkte Filterpapiere (Whatman) in eine sogenannte „Blottingkassette“ gelegt. Die Kassette wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer überführt. In dieser Arbeit wurde dazu das Criterion Blotter Set von Bio-Rad genutzt. Der Übertragungsvorgang der Proteine auf die Membran dauerte bei einer konstanten Spannung von 100 V eine Stunde. Dabei wurden die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode auf die Membran übertragen. Die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran wurde mittels Ponceau-Rot-Färbung überprüft.

Dazu wurden die Membranen für zwei Minuten in der Färbelösung inkubiert und anschließend teilweise mit A. dest entfärbt, bis ausschließlich die Proteinbanden zu erkennen waren. Die vollständige Entfärbung geschah durch die Zugabe von TBS-T für mehrere Minuten.

### **3.2.5 Immunbiologische Proteindetektion mittels ECL-System**

Die immunbiologische Detektion von Proteinen erfolgte auf der Nitrocellulose-Membran, wozu für die zu detektierenden Proteine spezifische Primärantikörper genutzt wurden, die in Tab. 7 aufgeführt sind. Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. horseradish peroxidase) gekoppelt (Tab. 8). Um unspezifische Bindungen durch die Antikörper auf der Membran abzudecken wurde diese 60 Minuten in einer Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blockierlösung bestand je nach verwendetem Antikörper aus 5% BSA (w/v), oder 3% bzw. 5% (w/v) Milchpulver gelöst in TBS-T. Anschließend wurde der entsprechende Primärantikörper in drei Millilitern der Blockierlösung verdünnt und die Membran damit je nach Protokoll bei Raumtemperatur oder bei 4°C inkubiert. Die Antikörper-spezifischen Konditionen sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran zweimal 5 Minuten mit dem TBS-T-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Teil der Membran, der den Größenstandard beinhaltete von den Proben abgetrennt und in ein neues Gefäß überführt. Zu der Membran mit dem Größenstandard wurden 3 ml Blockierlösung mit zusätzlich 1 µl Strep-Tactin-HRP Konjugat (Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate, Bio-Rad) zugefügt, welches zur Sichtbarmachung der Banden verwendet wurde. Die Membranen mit gebundenen Proteinproben wurden für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper in der bereits zuvor gewählten Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen nochmals für 5 und 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und die Proteine anschließend detektiert. Die Proteindetektion erfolgte mit dem Clarity Western ECL Substrate Kit von Bio-Rad. Die beiden im Kit enthaltenen Komponenten, eine Luminollösung und eine Peroxidaselösung, wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und dann für zwei bis fünf Minuten auf die Membran gegeben. Durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte

Meerrettich-Peroxidase wurde das Luminol oxidiert, wodurch Lumineszenz entstand, die mit Hilfe des VersaDoc 4000 Systems von Bio-Rad detektiert werden konnte.

### **3.2.6 Detektion der IL8-Sekretion von HCT116 Zellen mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Zur Messung der IL8-Sekretion in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 wurde zunächst der Zellkulturüberstand der zu untersuchenden Zelllinien aus der Kultur entnommen und bei 100 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofort bei -80°C bis zur Weiterverwendung gelagert. Zur Detektion von IL8 wurde dann das IL8 ELISA Ready-SET-go! Kit der zweiten Generation von e-Bioscience verwendet. Es wurde mit der sogenannten Sandwich-Methode gearbeitet. Dazu wurden zunächst die Vertiefungen einer 96-well-Zellkulturplatte mit 100 µl eines ersten Antikörpers (engl. „Capture antibody“) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen mit jeweils 250 µl Waschpuffer, bestehend aus PBS + 0,05% Tween20 fünfmal gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden dann mit 200 µl vom Hersteller vorgefertigter Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde anschließend entfernt und die Vertiefungen fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Zunächst wurde nun ein Konzentrationsgradient eines IL-8-Standards in die Vertiefungen gegeben, dessen höchste Konzentration 250 ng/ml betrug. Die weiteren Verdünnungen waren zweifach und reichten bis 1,95 ng/ml. Des Weiteren wurden jeweils 100 µl des zu untersuchenden Zellkulturüberstands als Triplikate in die Vertiefungen gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde IL8 von den „Capture“-Antikörpern gebunden. Anschließend wurden die Standards und Proben aus den Vertiefungen entfernt und diese wiederum fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. 100 µl Detektions-Antikörper wurden dann in die Vertiefungen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Waschvorgänge wurden wiederholt und 100 µl eines Avidin-HRP-Reagenzes in die Vertiefungen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Reagenz entfernt und die Vertiefungen siebenmal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Um die Färbereaktion zu veranlassen wurden 100 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Lösung in die Vertiefungen gegeben und für 15 Minuten

bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 50  $\mu\text{l}$  1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zu den Vertiefungen gegeben. Die entstandene Lumineszenz wurde dann bei 450 nm im Luminometer (Tecan infiniteM200) gemessen. Die Referenzwellenlänge lag bei 570 nm. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Ermittlung der Differenz zwischen Mess- und Referenzdaten. Aus den jeweiligen Triplikaten wurde der Mittelwert gebildet. Aus den gemessenen Standards wurde nun eine Gerade erstellt und die IL8-Konzentration aus der Verrechnung der ermittelten Probenwerte (x) mit den Werten von Steigung (y) und Achsenabschnitt (z) der Standardgerade bestimmt:

$$\text{IL8-Konzentration [pg/ml]} = (x-z)/y$$

### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Passagieren von humanen Kolonkarzinom-Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die adhärennten Kolonkarzinom-Zelllinien HCT116, DLD-1, HT29, CaCO<sub>2</sub>, SW480 und LoVo, sowie die semi-adhärennten Kolonkarzinom-Zelllinien Colo205 und Colo206F verwendet (vgl. Tab. 4). Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurde außerdem die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 kultiviert. Die genutzten Zelllinien wurden mit 170  $\mu\text{l}$  Medium/ $\text{cm}^2$  Kulturflasche kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zelllinien einmal in PBS gewaschen und mit 40-80  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  Wachstumsfläche Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO) von der Kultivierungsfläche abgelöst. Der Vorgang wurde durch Zugabe der gleichen Menge Medium neutralisiert. Durch zweimaliges Passagieren der Zellen pro Woche konnten die Zellen permanent in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten werden.

HCT116 und DLD-1 wurden in McCoy's 5A-Medium + GlutaMAX™, komplettiert mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin, die weiteren Kolonkarzinom-Zelllinien in RPMI 1640-Medium + GlutaMAX™ + 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin gehalten. Zur Kultivierung der Zelllinie NIH/3T3 wurde DMEM + GlutaMAX™ mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

Während der Generierung der verschiedenen HCT116 Knock Out Klone wurde zusätzlich Puromycin mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml als Selektionsmarker zum Kulturmedium gegeben.

Die Kultivierung aller verwendeter Zelllinien erfolgte bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt.

### **3.3.2 Gefrierkonservierung von humanen Zelllinien**

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zelllinien wurden diese gefrierkonserviert und bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Hierzu wurden die Zellen wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben, durch Trypsinierung von ihrer Wachstumsfläche abgelöst und in ein 15 ml Polystyrenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 110 x g für 4 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet in Gefriermedium aufgenommen. Dieses bestand aus 90% FBS und 10% DMSO. Pro Gefrieransatz wurde das Zellpellet in 1 ml Gefriermedium aufgenommen und in ein Gefrier Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in ein Kühlgefäß überführt und sofort bei -80°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Lagerung überführt.

### **3.3.3 Auftauen von Gefrierkulturen**

In ein 15 ml Reaktionsgefäß wurden 5 ml den Zellen entsprechendes Medium vorgelegt. Die gefrorenen Zellen wurden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend zügig in das jeweilige Reaktionsgefäß überführt. Um das im Gefriermedium vorhandene DMSO zu entfernen wurden die Zellen 10 Minuten bei 110 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellpellets in 5 ml frischem Medium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Dieses Volumen wurde nun in eine Zellkulturflasche (25cm<sup>2</sup>) überführt und auf 10 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Kultivierung geschah unter Standardbedingungen über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt um verbliebende DMSO-Rückstände und abgestorbene Zellen aus der Zellkultur zu entfernen.

### 3.3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung

Die Lebendzellzahl wurde durch Trypanblau-Färbung der Zellen und anschließender lichtmikroskopischer Auszählung ermittelt. Der verwendete Farbstoff färbt tote und sterbende Zellen blau an, da diese ihre Membranundurchlässigkeit verlieren und der Farbstoff somit in die Zelle eindringen kann. Vitale Zellen hingegen erscheinen im Mikroskop weiß. Für die Zählung wurde ein Aliquot aus der Zellsuspension entnommen und je nach Zellmenge im Verhältnis 1/4 bis 1/10 mit Trypanblau verdünnt. Anschließend wurden ca. 10 µl der Suspension in die Zählkammer eingebracht. Die vitalen, ungefärbten Zellen konnten nun in den vier Großquadraten einer Neubauer-Zählkammer gezählt werden. Die Zellzahl konnte anschließend mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Zellen/ml} = \left(\frac{n}{4}\right) * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerfaktor}$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} * \text{Gesamtvolumen}$$

Hierbei ist „n“ die Menge der gezählten Zellen, die Zahl 4 steht für die Anzahl der gezählten Großquadrate. Der Verdünnungsfaktor ergibt sich aus der hergestellten Verdünnung der Zellen mit Trypanblau. Der Kammerfaktor ergibt sich aus der Fläche eines Großquadrates (1 mm<sup>2</sup>), dessen Tiefe von 0,1 mm und einem sich daraus ergebenden Volumen von 0,1 µl.

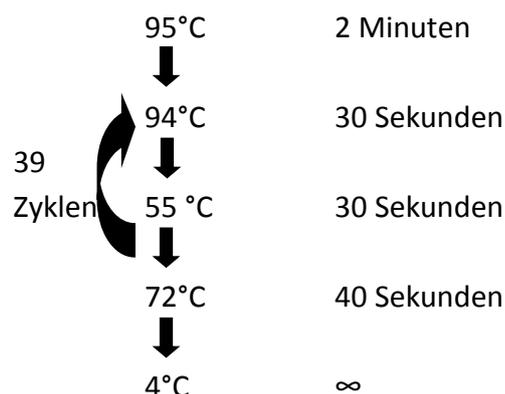
### 3.3.5 Titration der Puromycin-Konzentration zur Selektion von genetisch veränderten Zelllinien

Die Selektion von Zelllinien mit Puromycin-haltigem Medium setzte eine Titration der korrekten Selektionskonzentration voraus. Hierzu wurden 80.000 Zellen der Linie HCT116 in 24-Lochplatten ausgesät, sodass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 80% aufwiesen. Das Standardmedium wurde dann durch je 1 ml Selektionsmedium pro Vertiefung ersetzt. Die Puromycin-Konzentrationen lagen zwischen 1 µg/ml und 10 µg/ml. Nach jeweils 24 Stunden wurde die Menge lebender Zellen anhand ihrer Konfluenz prozentual bestimmt. Für weitere Versuche wurde die niedrigste Konzentration gewählt, bei der 100% der Zellen nach 48 Stunden abgestorben waren.

### 3.3.6 PCR zur Detektion von Mycoplasmen in Zellkulturüberständen

In regelmäßigen Abständen wurden die kultivierten Zelllinien auf Mycoplasmenbefall getestet. Dazu wurde das PCR Mycoplasma Test Kit I/C von Promokine verwendet. Durch die im Reaktionsansatz enthaltenen Primer wird in einer PCR-Reaktion die 16S-rRNA potentiell enthaltener Mycoplasmen-DNA amplifiziert, wodurch eine nicht sichtbare Infektion identifiziert werden kann.

Zur Durchführung der PCR wurde 1 ml des Zellkulturüberstands in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand wiederum vollständig entfernt und das erhaltene Pellet in 100 µl DNase-freiem Wasser aufgenommen. Der Ansatz wurde nun für 10 Minuten bei 95°C gekocht. Die PCR-Komponenten wie Primer, dNTPs und Hot-Start Taq Polymerase lagen in den mitgelieferten PCR-Reaktionsgefäßen in lyophilisierter Form vor und wurden mit 23 µl Rehydratisierungspuffer aus dem Kit gelöst. Anschließend wurden 2 µl der Probe zu den Reaktionsansätzen hinzugegeben. Mit den mitgelieferten lyophilisierten Positiv- bzw. Negativkontrollen wurde in gleicher Weise verfahren. Anstelle der Probe wurden hier jeweils 2 µl DNA-freies Wasser zugefügt. Die DNA-Amplifikation erfolgte nach nachstehendem Schema:



Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Bandengröße der Positivkontrolle betrug 270 Basenpaare, die der Negativkontrolle 479 Basenpaare.

### **3.3.7 DAPI-Färbung zur Detektion einer Mycoplasmenkontamination der Zellkultur**

Um die Ergebnisse der Mycoplasmen-PCR zu verifizieren, wurde ein Teil der kultivierten Zellen mit DAPI angefärbt. DAPI interkaliert mit der DNA und macht somit nicht nur die Kerne der kultivierten Zellen, sondern auch die der Mycoplasmen unter Fluoreszenzlicht sichtbar. Für die Färbung wurde ein steriles Deckglas in eine 6-well-Vertiefung gelegt und 500.000 Zellen ausgesät. Diese wurden bis zu einer 100%igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium aus den Schalen abgenommen und die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml PBS für 5 Minuten gewaschen. Dann wurde das PBS entfernt und 1 ml 3,7%ige Formaldehyd-Lösung in die Vertiefung pipettiert. Die Zellen wurden damit 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Lösung abgenommen und abermals zwei Waschschriffe mit PBS angeschlossen wurden. Das PBS wurde anschließend entfernt und 2 ml DAPI-Lösung (0,2 µg/ml in SSC) auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten unter Lichtausschluss. Nun wurde die DAPI-Lösung wieder entfernt und ein 5-minütiger Waschschriff mit PBS angeschlossen. Das PBS wurde dann vollständig entfernt und die Zellen auf dem Deckglas mit Vectashield auf einem Objektträger fixiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Axioplan (Zeiss) unter Fluoreszenzlicht.

### **3.3.8 Einbringung von Fremd-DNA in humane Zelllinien**

#### **3.3.8.1 Transiente Transfektion**

Durch eine transiente Transfektion erfolgt die Aufnahme von DNA oder RNA in die lebende Zelle für eine bestimmte Zeitspanne. Hierzu gibt es verschiedene Methoden. In dieser Arbeit wurde die Lipofektion verwendet. Dabei wurde die gewünschte einzubringende Nukleinsäure in einem Lipidtropfen aufgenommen und durch die Zellmembran transportiert. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine2000 von Invitrogen verwendet und die Transfektion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für eine Transfektion in einem 24-well-Format mit einer Wachstumsfläche von 2 cm<sup>2</sup> wurden 100.000 Zellen ausgesät, so dass die Konfluenz nach 24 Stunden 90% betrug. Das Kulturmedium wurde entfernt und 500 µl frisches Medium ohne Antibiotikazusatz zugegeben. Je 50 µl serumfreies Transfektionsmedium, sogenanntes Opti-MEM (GIBCO), wurden in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. In eines der Gefäße wurde eine Gesamtmenge von 0,8 µg Plasmid-DNA pipettiert,

in das zweite Gefäß 2,0 µl Lipofectamine2000. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Suspension, die das Transfektionsreagenz enthielt, in das Gefäß mit der DNA-Lösung überführt und vorsichtig durch auf- und abpipettieren gemischt. Nach einer weiteren Inkubation von 20 Minuten bei RT wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu der Zellkultur gegeben. Nach 4-6 Stunden wurde ein Mediumswechsel durchgeführt, bei dem wieder das Standardmedium mit Antibiotikasupplement benutzt werden konnte. Für Transfektionsansätze in größeren oder kleineren Maßstäben wurden DNA-Menge und Lipofectamine2000 nach den Angaben des Herstellers angepasst.

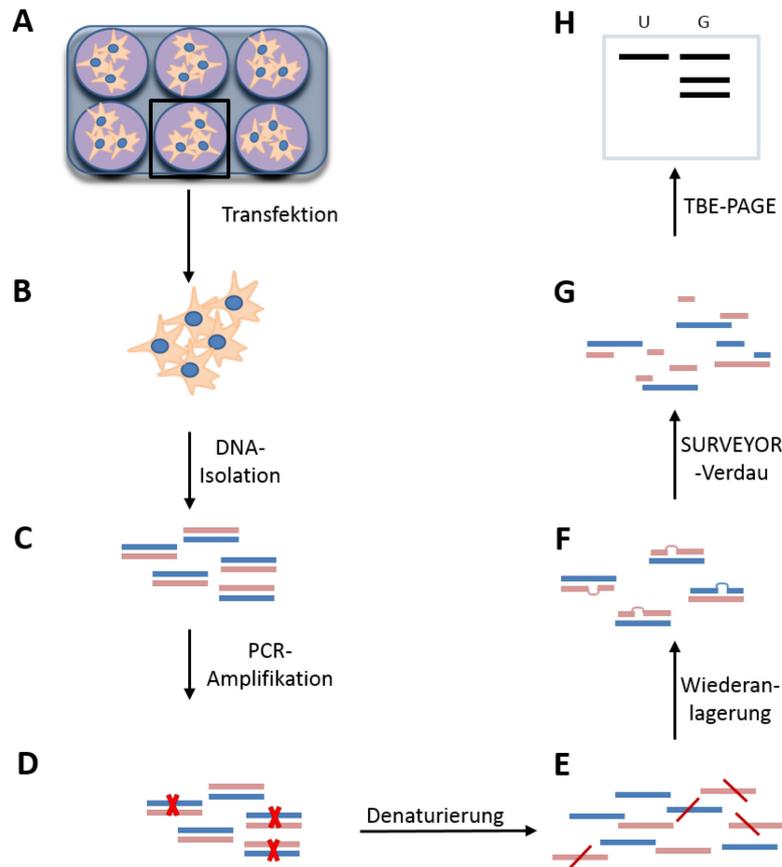
### **3.3.8.2 Stabile Transfektion von Plasmid-DNA mittels Lipofektion**

Für die stabile Transfektion der Plasmid-DNA in die Zelllinie HCT116 wurde mit demselben Protokoll wie unter 3.3.8.1 beschrieben gearbeitet. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die erfolgreich transfizierten Zellen mit 1 mg/ml Genetecin/G418 selektioniert. Die Selektion wurde für die Dauer von 5 Tagen durchgeführt um den stabilen Einbau der Plasmid-DNA zu gewährleisten. Die Expression der Plasmid-DNA wurde anschließend mittels qRT-PCR und Western Blot nachgewiesen.

### **3.3.9 Generierung von genetischen Knock Outs mittels spezifischen Zinkfinger-Nukleasen**

Zur Generierung von genetischen Knock Outs wurden Zinkfinger-Nukleasen der Firma Sigma-Aldrich genutzt. Die Zinkfinger-Nukleasen bestehen aus vier bis sechs Zinkfingermotiven und einer Endonuklease-Domäne der FokI-Nuklease aus dem Flavobacterium okeanoicoites. Mit den Zinkfingermotiven werden spezifische Sequenzen aus 12-18 Basen erkannt, die die 5-7 Basenpaare lange Schnittstelle flankieren. Die FokI-Nuklease wurde zudem modifiziert, sodass sie ausschließlich als Heterodimer aktiv wird. Daher wird immer ein Paar der ZFN-Nukleasen für die DNA-Spaltung benötigt, wodurch der Vorgang spezifischer wird. Innerhalb von etwa drei Tagen geschieht die Modifikation des Gens. Die Enzyme werden mittels Transfektion in Form von Plasmid-DNA oder mRNA in die Zielzelle eingebracht, wo sie dann exprimiert werden. mRNA bietet den Vorteil, dass sie bereits im Zytoplasma trans-

latiert wird, während Plasmid-DNA zunächst in den Nukleus gelangen muss um transkribiert zu werden. Der Vorteil einer Plasmid-Transfektion liegt in der dauerhafteren Expression von mRNA und ist somit für Zelllinien interessant, in denen geringe



**Abb. 7 Darstellung des Nachweisprinzips erfolgreicher Genmutationen durch Zinkfingernukleasen.** (A) Zunächst werden Zellen einer Zellkultur mit den ZFN transfiziert. (B) Anschließend wird die GesamtdNA isoliert und durch eine (C) PCR-Reaktion amplifiziert. (D) Die PCR-Produkte bestehen aus wildtypischen und mutierten (X) Sequenzen. (F) Nach einem Denaturierungsschritt liegen die PCR-Produkte einzelsträngig vor. (F) Anschließend lagern sie sich zu Doppelsträngen zusammen, wobei es zur Paarung von wildtypischen und mutierten Sequenzen kommen kann. Die dadurch entstandenen Blasen werden nun von einem (G) Cel-I-Enzym erkannt und an diesen Positionen geschnitten. Dadurch entstehen charakteristische DNA-Fragmente, die sich auf einem (H) TBE-Gel nachweisen lassen und die Aktivität der ZFN in den Zellen bestätigen. U = ungeschnitten, G = geschnitten. Darstellung modifiziert nach Technical Bulletin CompoZr Custom ZFN, Sigma-Aldrich

Aktivitätsraten der Zinkfinger-Nukleasen beobachtet werden. Die mRNA-Transfektion bietet sich für Zelllinien an, in denen der CMV-Promotor, den die ZFN-Plasmide enthalten, nicht sehr aktiv ist. Zusätzlich zu den ZFN kann ein sogenannter Donor-Vektor transfiziert werden. Dieser Vektor kann Selektionsmarker wie GFP oder eine Antibiotikaresistenz enthalten, besitzt aber hauptsächlich eine zu der ZFN-Schnittstelle komplementäre Sequenz,

die an ein bis zwei Positionen verändert ist. Nachdem das Zielgen durch die Nukleasen geschnitten und ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB) generiert wurde, kann die Donorsequenz als Template für die DNA-Reparatur dienen und in das Gen eingebaut werden. Die Nutzung eines Donor-Vektors soll so die Effizienz für Genmutationen verbessern. Im Falle einer korrekten DNA-Reparatur durch die Reparaturmechanismen der nicht-homologen Endverknüpfung (engl. NHEJ) oder der homologen Rekombination (HR) können dennoch Mutationen durch den Einbau der Donorvorlage generiert werden. Bei der NHEJ werden die freien DNA-Enden ohne Zuhilfenahme einer Vorlage miteinander verbunden, wodurch die Reparatur sehr fehleranfällig ist. Während der homologen Rekombination wird die DNA mit Hilfe einer DNA-Vorlage aus dem Schwesterchromosom repariert. Dieser Reparaturmechanismus ist sehr viel genauer, dennoch können fehlerhafte Sequenzen entstehen. Durch die Mutationen kommt es zumeist zu einer Leserasterverschiebung durch Baseninsertionen oder -deletionen wodurch keine intakte mRNA bzw. Protein mehr gebildet werden können.

Für die Herstellung von RIP2- bzw. TAB1-Knock Out Zellen wurde die Zelllinie HCT116 (SIB) genutzt. 500.000 Zellen wurden in eine 6-well Schale ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium durch 2 ml Zellkulturmedium angereichert mit 10% FBS und ohne Penicillin/Streptomycin ersetzt. Pro Transfektionsansatz wurden 250 µl des Transfektionsmediums OptiMEM vorgelegt. Es wurde eine DNA-Gesamtmenge von 4 µg transfiziert. Dazu wurde Lipofectamine2000 (ThermoFisher) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA-Gesamtmenge setzte sich aus der unterschiedlichen Plasmid-DNA zusammen. In den ersten Transfektionsansatz wurden jeweils 1,3 µg der Plasmid-DNA „ZFN1“ und „ZFN2“ sowie des Donor-Vektors eingesetzt. In einen weiteren Ansatz wurden 4 µg Donorvektor, sowie 5 µl mRNA (≈ 2 µg mRNA pro ZFN) transfiziert. Für die Kontrollansätze wurden die Zellen mit 4 µg pEGFP-C2, mit 4 µg Donorvektor allein transfiziert oder es wurde nur das Transfektionsreagenz zugegeben. Fünf Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen über Nacht unter Standardkonditionen kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Teil der Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen überführt, der Rest pelletiert und für eine DNA-Isolation bei -20°C aufbewahrt. Weitere 24 Stunden später wurde Puromycin (2 µg/ml) als Selektionsmarker

zu der Zellkultur gegeben. Nur Zellen, in denen das Donorplasmid exprimiert wurde, waren Puromycin-resistent. Die Kontrollzellen, die mit pEGFP-C2 transfiziert waren oder nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden, starben nach zwei bis drei Tagen. Nachdem die Kontrollzellen abgestorben waren, wurde aus den überlebenden Zellen wiederum ein Pellet für die DNA-Isolation bei -80°C eingelagert.

Die DNA-Isolierung erfolgte wie unter 3.1.1 beschrieben. Anschließend wurden in einer PCR-Reaktion RIP2 und TAB1 mittels spezifischer Primer (vgl. Tab. 12) amplifiziert (Kap. 3.1.9). Anschließend kam es zu einer Denaturierung und Wiederanlagerung der PCR-Amplifikate (Kapitel 3.1.10) und einem Nuclease S-Verdau, der die PCR-Amplifikate in Fragmente spezifischer Größe teilte (Kapitel 3.1.11). Konnte so nachgewiesen werden, dass die ZFN aktiv waren, wurde eine Einzelzellablage mittels Durchflusszytometrie, wie unter Kapitel 3.3.10 beschrieben, durchgeführt. Eine einzelne Zelle wurde hier in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte mit 80 µl Kulturmedium ausgebracht und darin kultiviert bis eine Kolonie entstand. Anschließend wurden die Zellen in eine 24-Lochplatte überführt. Ein Teil dieser Zellen wurde dann für die DNA-Isolierung eingefroren, der andere Teil weiterkultiviert und anschließend als Gefrierkultur gelagert.

Die Gene von Interesse (hier RIP2 und TAB1) aus diesen Einzelzellen wurden durch eine PCR amplifiziert und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (Kap. 3.1.13). Die entsprechende DNA-Bande wurde dann mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben aufgereinigt und an die Firma GATC zur Sequenzierung verschickt. Hierbei wurden die von der Firma Sigma-Aldrich synthetisierten und im ZFN-Kit mitgelieferten Primer verwendet.

### **3.3.10 Sortieren von Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)**

Zur Vorbereitung auf die Sortierung wurden 100.000 Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und mittels eines 45µm Sterilfilters (Merck Millipore) vereinzelt. Anschließend wurden im Filter verbliebene Zellen mit weiteren 500 µl PBS ausgespült.

Die Sortierung der transfizierten Zellen wurde durch Frau Raba im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) des Universitätsklinikums mit Hilfe des MoFlo XDP Geräts von Beckman Coulter durchgeführt. Es wurden Einzelzellen in 96-Lochplatten

mit 80 µl Zellkulturmedium abgelegt und dort bis zur Bildung von Kolonien unter Standardbedingungen kultiviert.

### 3.3.11 Rekonstitution von RIP2 und TAB1 in Knock Out Zellen

Zur Rekonstitution von RIP2 bzw. TAB1 in den entsprechenden Knock Out Klonen wurden die Plasmide pcDNA-3-6myc-TAB1 (myc-TAB1) und pCR3.V72-Met-VSV-RIP2 (VSV-RIP2) mittels Lipofektion nach dem Standardprotokoll in die entsprechenden Knock Out Klone transfiziert. Als mock-Kontrolle diente das Plasmid pcDNA-3-6myc-Leervektor (myc-LV). Zunächst wurde durch die Transfektion verschiedener Plasmid-Mengen die optimale DNA-Menge titriert, die zu einer dem Wildtyp ähnlichen Expression von RIP2 und TAB1 führte. Hierzu wurden 100.000 Zellen der Zelllinien HCT116 WT (SIB), HCT116 (SIB) RIP2<sup>-/-</sup>, HCT116 (SIB) TAB1<sup>-/-</sup> und HCT116 XIAP<sup>-/-</sup> in ein 24 well Format ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine2000 wie unter Kapitel 3.3.8.1 beschrieben. Es wurden 10, 25, 75, 100 und 200 ng VSV-RIP2- oder myc-TAB1-Plasmid-DNA in die Zellen transfiziert. Um die zu transfizierende Gesamtmenge von 800 ng DNA pro Transfektionsansatz zu vervollständigen, wurde der myc-LV co-transfiziert. Als Negativkontrolle wurden jeweils 800 ng myc-LV-Plasmid in die verschiedenen Klone transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 350 µl Lyse-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen lysiert und die RNA nach Angaben des Herstellers wie in Kapitel 3.1.2 isoliert. Nun wurden 2 µg RNA und cDNA umgeschrieben und hiervon 50 ng in die Real Time PCR-Reaktion eingesetzt. Diese wurde nach dem Standardvorgehen wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben durchgeführt. Um die Rekonstitution von RIP2 und TAB1 zu untersuchen, wurden die jeweils entsprechenden Primer genutzt. Die Sequenzen und die dazugehörigen TaqMan-Sonden sind der Tab. 11 zu entnehmen.

### 3.3.12 Rekonstitution von RIP2 und TAB1 in Knock Out Zellen mit gleichzeitiger Überexpression von XIAP

Um den Einfluss der Interaktion von RIP2 und TAB1 mit XIAP darzustellen, wurden HCT116 WT (SIB), HCT116 (SIB) RIP2<sup>-/-</sup>, HCT116 (SIB) TAB1<sup>-/-</sup> und HCT116 XIAP<sup>-/-</sup> im 24 well-Plattenformat mit 600 ng des pEBB-FLAG-XIAP-Vektor (FLAG-XIAP) transfiziert. Dies führte zu einer XIAP-Überexpression in den Zellen. Gleichzeitig wurden in den RIP2<sup>-/-</sup>-Zellen RIP2 mittels Transfektion von 75 ng und 100 ng VSV-RIP2-Plasmid-DNA rekonstituiert. In TAB1<sup>-/-</sup>-Zellen wurden 10 ng und 25 ng des myc-TAB1-Plasmids zur Rekonstitution eingesetzt. Als Kontrollen dienten jeweils Zellen in denen statt des FLAG-XIAP-Plasmids das myc-Leervektor-Plasmid transfiziert wurde, sowie Zellen jedes Klons in denen ausschließlich das myc-Leervektor-Plasmid ohne die Rekonstitution von RIP2 oder TAB1 exprimiert wurde. Als Positivkontrolle diente die HCT116 (SIB) WT Zelllinie, sowie als Negativkontrolle der HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>-Klon. Die gesamte zu transfizierende DNA-Menge betrug 800 ng. Differenzen zwischen dieser Menge und den Plasmidmengen wurde durch Transfektion mit dem myc-Leervektor ausgeglichen. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen vom Zellkulturmedium befreit, gewaschen und in 350 µl des Lysepuffers aus dem RNeasy Mini Kit von Qiagen aufgelöst und die RNA isoliert. Wie unter Kapitel 3.1.5 beschrieben wurde nun aus 2 µg RNA cDNA synthetisiert und die Proben in einer Real Time PCR-Reaktion bezüglich der RIP2-, XIAP- und TAB1-Expression analysiert.

Um den Einfluss der Rekonstitution und XIAP-Überexpression auf die NF-κB-Aktivität zu überprüfen, wurde ein Dual Luciferase Assay (Promega) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Weitere Details sind dem Kapitel 3.3.15 zu entnehmen. Hierzu wurden die 20.000 Zellen in vierfach Ansätzen in 96 well Zellkulturplatten ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Hierzu wurden pro well 50 ng des Reporterplasmids pNF-κB-LUC (Clontech) und 5 ng des Renilla-Luciferase-Plasmids pRL-TK (Promega) pro well eingesetzt. Des Weiteren wurden die Mengen des VSV-RIP2-, myc-TAB1-, FLAG-XIAP- und myc-LV-Plasmide herabskaliert, sodass 19, bzw. 25 ng VSV-RIP2-Plasmid, 2,5, bzw. 6,3 ng myc-TAB1-Plasmid, sowie 120 ng FLAG-XIAP transfiziert wurde. Die Differenz zur zu transfizierenden Gesamt-

DNA-Menge von 200 ng wurde abermals mit dem myc-Leervektor ausgeglichen. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte nach 24 Stunden dem Standardprotokoll entsprechend.

### **3.3.13 Gewinnung von konditioniertem Medium**

Als konditioniertes Medium wird der Zellkulturüberstand einer Zelllinie bezeichnet. Neben den Komponenten, die sich standardisiert im Zellkulturmedium befinden, beinhaltet konditioniertes Medium daher verschiedene Stoffwechselprodukte der darin wachsenden Zelllinie, beispielsweise Wachstumsfaktoren. Es kann in verschiedenen Versuchen als Chemoattraktant für andere Zelllinien eingesetzt werden. Zur Gewinnung des konditionierten Mediums wurde die Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 unter Standardbedingungen in einer Zellkulturflasche mit einer Fläche von 75 cm<sup>2</sup> ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90% im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und durch frisches ersetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt und mittels eines 45 µm Sterilfilters filtriert. Bis zur Verwendung, maximal aber drei Tage, wurde das konditionierte Medium bei 4°C gelagert.

### **3.3.14 Bestimmung der Zellinvasivität mittels Matrigel Invasionskammer**

Das Invasionspotential der verschiedenen Zelllinien wurde mit Hilfe eines Invasionsassays bestimmt. Der auf dem Boyden-Kammer-System basierende Versuchsaufbau beruht auf zwei mit Medium gefüllten Kammern. In der oberen Kammer befindet sich eine definierte Anzahl von Zellen, die eine Matrigelmatrix durchwachsen müssen. Die Fähigkeit die Matrix zu durchqueren setzt ein invasives Potential der untersuchten Zelllinie voraus. In dieser Arbeit wurden Corning<sup>®</sup> BioCoat<sup>™</sup> Matrigel<sup>®</sup> Invasion Chamber Assays der Firma BD Biosciences mit einer Porengröße von 8 µm genutzt. Der Versuch wurde in einem 24-well-Format durchgeführt. Da die Platten bei -20°C gelagert wurden, mussten sie zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Um die Matrigelmatrix anschließend zu rehydrieren, wurden 500 µl serumfreies McCoy's 5A Medium (Gibco) in die freien Vertiefungen pipetiert und die Filtereinsätze eingehängt. Nun wurden weitere 500 µl in jeden Einsatz pipetiert und die Platte für zwei Stunden bei 37°C im Inkubator ruhen gelassen. Anschließend

wurde das serumfreie Medium aus den Einsätzen entfernt und diese in mit 750 µl konditioniertem NIH/3T3-Zellkulturmedium befüllten 24-well-Vertiefungen gehängt. Das konditionierte Medium im unteren Teil der wells diente hierbei als Chemoattraktant für die Tumorzellen. Diese wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in serumfreiem Medium kultiviert und somit ausgehungert. In die Filtereinsätze wurden 25.000 Zellen in 500 µl McCoy's 5A-Medium supplementiert mit 0,25% BSA ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert. Anschließend wurden die Filtereinsätze entnommen, das enthaltene Medium entfernt und die Zellen für 10 Minuten in 100%igem Methanol bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurden die Einsätze in PBS gewaschen und die Zellkerne für zwei Minuten mit einer DAPI-Lösung [200ng/ml] gefärbt. Nach einem anschließenden Waschschrift mit PBS wurde das Matrigel mit einem Wattestäbchen von der Filtermembran entfernt, diese herausgeschnitten und auf einem Objektträger mit Vectashield konserviert. Die dauerhafte Lagerung erfolge bei 4°C unter Lichtausschluss. Zur Ergebnisauswertung wurden die Zellen der gesamten Membran mit dem Axioplan2-Mikroskop (Zeiss) bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt.

### **3.3.15 Nachweis der NF-κB-Aktivität mittels Dual Luciferase-Reporter Assay**

Das Prinzip des Dual Luciferase Reporter Assays (DLR) beruht auf der Messung der Biolumineszenz zweier Luciferasen, die zuvor durch transiente Transfektion in die zu testende Zellkultur eingebracht wurden. Die sogenannte Firefly-Luciferase stammt aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*). Diese ist an ein Zielprotein, hier NF-κB, gekoppelt welches durch Transfektion eines DNA-Vektors in die Zellen eingebracht wird. Zur Auswertung wird das sogenannte LAR II-Reagenz zu den Proben gegeben. In diesem Reagenz ist das Luciferase-spezifische Substrat enthalten welches durch die Luciferase umgesetzt wird. Die entstandene Biolumineszenz kann mittels Luminometer (Tecan infinite<sup>®</sup> 200) gemessen werden. Als interne Kontrolle wird eine weitere Luciferase co-transfiziert. Diese entstammt der Korallenart *Renilla reniformis*. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft benötigen beide Luciferasen verschiedene Substrate, sodass ihre Aktivität unabhängig voneinander induziert werden kann. Die Aktivität der *Renilla*-Luciferase wird durch das Stop&Glo-Reagenz des DLR-Kits initiiert. Durch das Reagenz wird gleichzeitig die zuvor gemessene Aktivität der

Firefly-Luciferase gestoppt. Nach der Messung können die Werte der Renilla-Luciferase zur Normalisierung der Messdaten herangezogen werden, sodass Schwankungen innerhalb der einzelnen Proben, etwa durch unterschiedliche Zellvitalität oder Transfektionseffizienz minimiert werden können.

Für die durchgeführten Versuche wurden zunächst je 20.000 Zellen in die benötigte Anzahl 96-well-Platten ausgesät. Anschließend wurden die Zellen über Nacht unter den normalen Kulturbedingungen gehalten. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann mit einer Gesamt-DNA-Menge von 200 ng nach dem Lipofectamine2000 Standardprotokoll transfiziert (siehe Kapitel 3.3.8.1). Im Einzelnen wurden 50 ng des Reporterplasmids pNF- $\kappa$ B-LUC (Clontech) und 5 ng des Renilla-Luciferase-Plasmids pRL-TK (Promega) sowie 145 ng des gewünschten Zielplasmids oder eines Leervektors eingesetzt. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium vollständig mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und 25  $\mu$ l eines 1-fachen Lysepuffers aus dem DLR-Assay-Kit in jedes well gegeben. Die Kulturplatte wurde mit Parafilm abgedichtet und bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 3000 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert.

Währenddessen wurden die Substrat-Reagenzien für den Assay vorbereitet. Dazu wurde nach dem Standardprotokoll von Promega vorgegangen: Die einzelnen Komponenten wurden aufgetaut und auf Raumtemperatur eingestellt. Das LAR II-Substrat in Tablettenform wurde anschließend in 10 ml LAR II-Puffer aufgelöst, das Stop&Glo-Substrat mit 10 ml Stop&Glo-Puffer vermischt und jeweils in lichtundurchlässigen Gefäßen aufbewahrt.

Die Messungen wurden mit einem Tecan Infinite<sup>®</sup>200 durchgeführt. Zunächst wurden die Pumpenschläuche des Gerätes mit 3 ml 70%igen Ethanol und nachfolgend mit 3 ml destilliertem Wasser gesäubert. Dann wurden die Pumpen mit den beiden benötigten Puffern LAR II bzw. Stop&Glo gefüllt. Die Lumineszenz wurde mit folgenden Parametern gemessen:

#### **Well-weise Messung**

<b>Kanal A</b>	Injizieren	(Standard)
<b>Volumen</b>	100	$\mu$ l
<b>Geschwindigkeit</b>	200	$\mu$ l/sec
<b>Nachfüllgeschwindigkeit</b>	100	$\mu$ l/sec

<b>Warten (Zeit)</b>	00:00:02
<b>Lumineszenz</b>	Label1

<b>Kanal B</b>	Injizieren	(Standard)
<b>Volumen</b>	100	µl
<b>Geschwindigkeit</b>	200	µl/sec
<b>Nachfüllgeschwindigkeit</b>	100	µl/sec
<b>Warten (Zeit)</b>	00:00:02	
<b>Lumineszenz</b>	Label1	

## 2 Labels

<b>Modus</b>		Lumineszenz
<b>Label1: Abschwächung</b>		NONE
<b>Label1: Integrationszeit</b>	10000	ms
<b>Ruhezeit</b>	0	ms
<b>Label2: Abschwächung</b>		NONE
<b>Label2: Integrationszeit</b>	10000	ms
<b>Ruhezeit:</b>	0	ms

Aus den gemessenen Werten von Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität wurden die Verhältnisse gebildet. Die Messungen wurden als Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.

Zur Kontrolle wurden parallel Zellen in 24 Loch Platten nach gleichem Schema transfiziert und mittels Western Blot und qPCR ausgewertet.

### **3.3.16 Behandlung der Zellkultur mit stimulierenden Agenzien**

Zur Verifizierung der funktionellen Aktivität der verschiedenen Knock Outs, wurden die Zelllinien HCT116 WT (SIB), HCT116 WT, HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>, HCT116 RIP2<sup>-/-</sup> und HCT116 TAB1<sup>-/-</sup> mit Muramyl-dipeptid (MDP), Diaminopimelinsäure (iE-DAP) und TNFα behandelt.

MDP und iE-DAP wurden mit Endkonzentrationen von 20µg/ml eingesetzt, TNFα mit einer Endkonzentration von 20 ng/µl.

Für das Ansetzen der Stocklösungen wurden MDP [10 mg/ml], iE-DAP [10 mg/ml], und TNFα [0,1 µg/µl] in sterilem dH<sub>2</sub>O rehydratisiert. Alle Arbeitslösungen wurden mit sterilem Zellkulturmedium + FCS und Penicillin/Streptomycin-Zusatz hergestellt.

Die Inkubationsdauer von MDP und iE-DAP mit den Zelllinien lag, wenn nicht anders angegeben, bei 3 Stunden für RNA-Expressionsexperimente und bei 12 und 24 Stunden für Untersuchungen der Proteinexpression. TNFα wurde jeweils für 0, 30, 60 und 360 Minuten mit den Zelllinien inkubiert bevor eine RNA-Isolation durchgeführt wurde.

### **3.4 Immunhistochemische Methoden**

#### **3.4.1 Herstellung von Gewebeschnitten aus Tissue-Microarrays (TMAs)**

Für den immunhistochemischen Nachweis der Proteinexpression im Tumorgewebe wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte von Präparaten aus Kolonkarzinom und Normalmucosa des Kolons angefertigt. Die Gewebe lagen in Form von TMAs vor, die im Labor der Chirurgischen Forschung bereits vorhanden waren. Die Schnitte wurden über Nacht bei 56°C auf Objektträgern fixiert und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **3.4.2 Horseradish-Peroxidase (HRP)-Färbung von Paraffinschnitten**

Das Prinzip der HRP-Färbung beruht auf der Bindung spezifischer Antikörper an das gewünschte Protein im untersuchten Gewebe. Ein sekundärer, mit HRP-gekoppelter Antikörper bindet an den Primärantikörper. In einer chemischen Reaktion der Peroxidase mit dem zugegebenen Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kommt es zur Entwicklung eines bräunlichen Farbstoffes, der somit das Protein indirekt anfärbt.

Die Färbung wurde mit Hilfe des ZytoChem-Plus HRP-Kits, Broad Spectrum nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden die zu färbenden Präparate aufgetaut, mit Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Demaskierung erfolgte für 30 Minuten bei 800 Watt in der Mikrowelle. Dazu wurden die Schnitte vollständig mit einem Natrium-Citrat-Puffer, pH 6.0 bedeckt. Anschließend wurden die Präparate

für 20 Minuten in dem Puffer stehend bei Raumtemperatur abgekühlt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden nun ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte wurden für 5 Minuten in PBS + 0,1% Tween20 überführt, anschließend abgetrocknet und das Gewebe mit einem Fettstift „Super Pap Pen Mini“ umrandet. Die endogene Peroxidase wurde durch Inkubation der Schnitte mit 3,0%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 10 Minuten inhibiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS + Tween20 wurden unspezifische Bindungsstellen mittels einer im Kit enthaltenden Blockierlösung für 10 Minuten blockiert und der Primärantikörper nach zweimaligem Waschen für 60 Minuten inkubiert (die verwendeten Antikörper und entsprechende Verdünnungen können den Tabellen 8 und 9 entnommen werden). Nach zweimaligem Waschen wurde der Sekundärantikörper für 15 Minuten inkubiert und die Waschschrritte anschließend wiederholt. Das Enzymkonjugat wurde dann für einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert. Es folgten zwei Waschschrritte und die Zugabe des DAB Substrates für 5-15 Minuten im Dunkeln. Die Proben wurden für 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen worauf eine Kernfärbung mit Mayers Hämalaun folgte. Dazu wurden die Präparate 15 Sekunden mit dem Farbstoff gefärbt und danach für 15 Minuten fließend gewässert. Nach der Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und eine 2-minütige Inkubation in Xylol wurden die Schnitte in Corbit eingefasst und unter dem Abzug getrocknet. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit dem DM IL LED-Durchlichtmikroskop von Leica. Die einzelnen Gewebestanden wurden nach dem sogenannten Immunreaktiven Score (IRS) bewertet. Dazu wurde sowohl die Intensität der Färbung sowie die Fläche bei der Bewertung berücksichtigt (Remmele et al. 1987).

Färbe- Intensität Prozentsatz positiver Zellen	Keine Farbreaktion = 0 Punkte	Schwache Farbreaktion = 1 Punkt	Mäßige Farbreaktion = 2 Punkte	Starke Farbreaktion = 3 Punkte
Keine positiven Zellkerne = 0 Punkte	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
<10% positive Zellkerne = 1 Punkt	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10-50% positive Zellkerne = 2 Punkte	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51-80% positive Zellkerne = 3 Punkte	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
>80% positive Zellkerne = 4 Punkte	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Tab. 14 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (Remmele et al. 1987)

### 3.5 Statistik

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Tests wurden unter Zuhilfenahme des Programms Graph Pad Prism V5 und SPSS vs. 23 durchgeführt. Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Experimente in drei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Dazu wurde ein t-Test angewandt.

Die statistische Auswertung der Proteinexpression in Tumor- und Normalgewebe erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Für die Analyse des Gesamtüberlebens wurden Kaplan-Meier-Kurven angefertigt und mit Hilfe des log-Rang- (Mantel Cox) Tests ausgewertet. Die univariaten und multivariaten Überlebensanalysen wurden mittels Cox-Regressionstest evaluiert. In die multivariate Analyse wurden ausschließlich die Faktoren eingesetzt, die bereits eine Signifikanz in den univariaten Analysen aufwiesen. Die Ergebnisse wurden als Hazard Ratio (HR) mit den dazugehörigen Konfidenzintervallen (KI) dargestellt. Das Gesamtüberleben wurde als Zeit von der Operation bis zur letzten Beobachtung oder dem Tod definiert. Patienten, die innerhalb eines Monats nach der Operation verstarben oder Rezidive oder Metastasen aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Als starke Proteinexpression wurden IRS-Werte von  $\geq 3$  definiert. Eine niedrige Proteinexpression lag somit bei IRS-

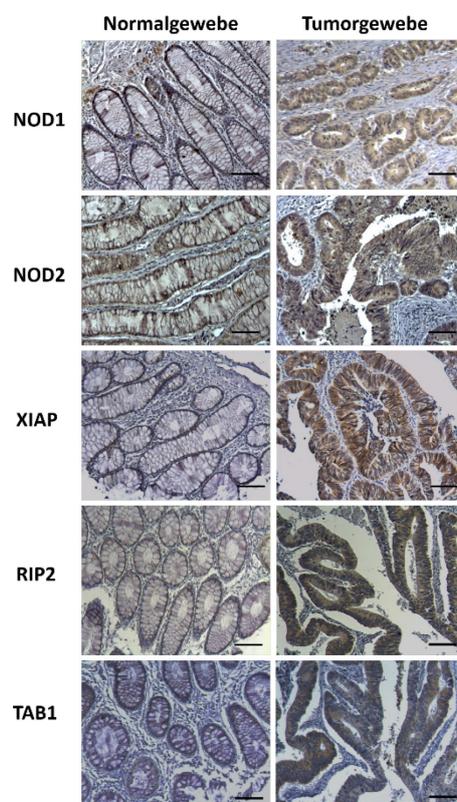
Werten  $< 3$  vor. Für die klinikopathologischen Analysen wurde der Fishers-Exact-Test (two-tailed) angewendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Korrelation der Expression von Proteinen des NOD-Signalwegs mit dem Gesamtüberleben von Patienten mit Kolonkarzinom

Um die Bedeutung der NLRs als weitere Mitglieder der PRR-Familie für die Tumorphysion zu evaluieren, wurde der NOD-Signalweg mit seinen Komponenten NOD1, NOD2, RIP2, XIAP und TAB1 durch immunhistologische Färbungen an Tumor- und Normalgeweben an einem Kollektiv von insgesamt 273 Kolonkarzinom-Patienten untersucht.

Bei der Evaluierung der Färbungen wurde zudem zwischen der Proteinexpression im Tumorzentrum und der Invasionsfront unterschieden. Hierfür waren jeweils zwei Stanzeln pro Patient vorhanden. Die Auswertung geschah mittels Bestimmung der Färbungsintensität und der Ermittlung des IRS (Immunreaktiver Score) - Wertes. Abb. 8 stellt repräsentative Färbungen der unterschiedlichen Proteine dar. Gezeigt werden Normal- und Tumorgewebe.



**Abb. 8** Repräsentative Abbildungen der immunhistologischen TMA-Färbungen für die untersuchten Proteine in Tumor- und Normalgewebe. Die Abbildungen stellen die Präparate in 10-facher Vergrößerung dar. Skalierung: 100 µm

Die differentielle Expression der verschiedenen Proteine des NOD-Signalwegs im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe wurde anhand des vorgenannten Patientenkollektivs untersucht. Die Anzahl der auswertbaren Patientenproben für die Analysen des jeweiligen Proteins ist in Tabelle 15 dargestellt.

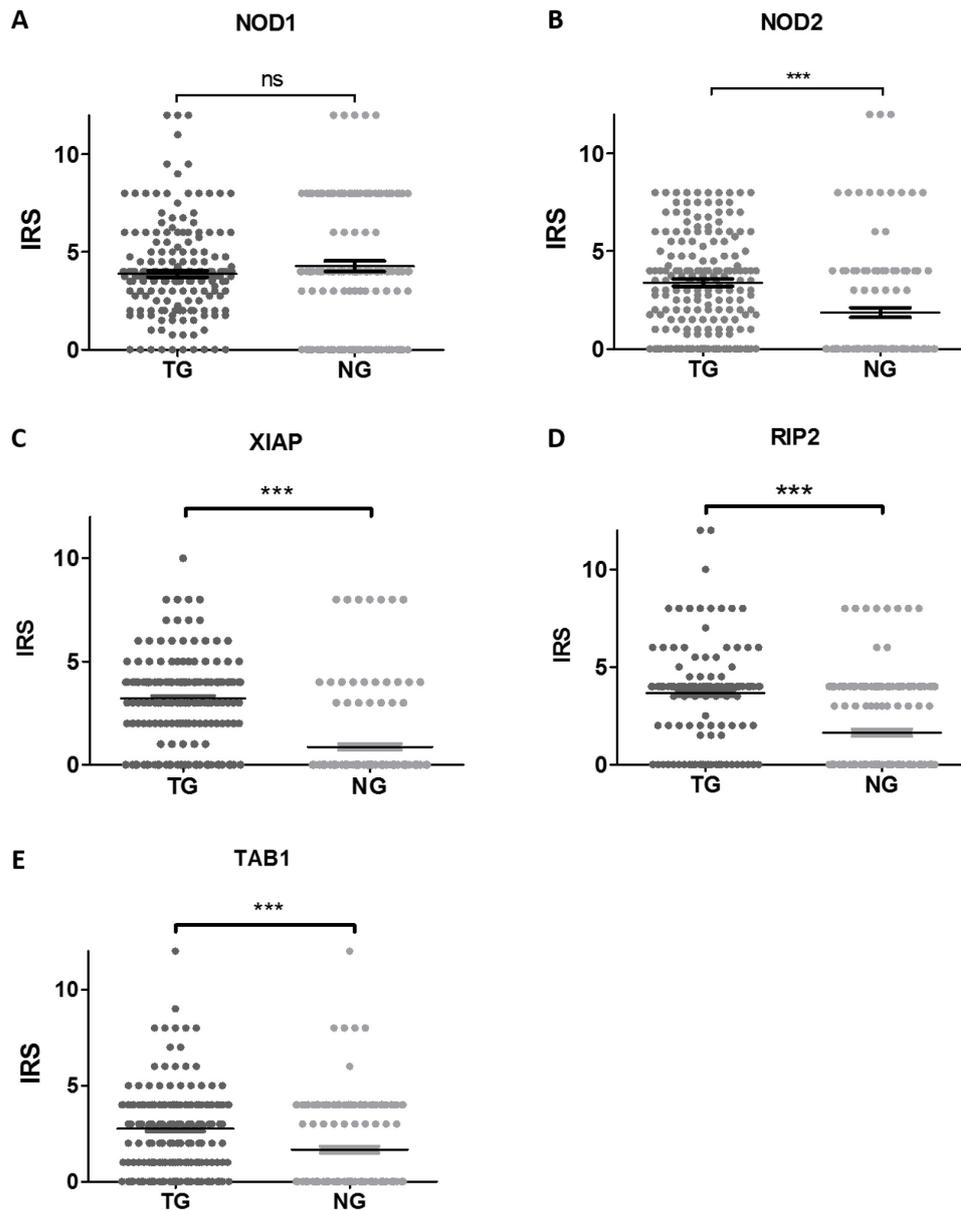
Protein	Anzahl Tumorgewebe	Anzahl Normalgewebe
<b>NOD1</b>	204	134
<b>NOD2</b>	193	134
<b>XIAP</b>	246	181
<b>RIP2</b>	176	176
<b>TAB1</b>	169	169

Tab. 15 Übersicht über die Anzahl der auswertbaren Patientenproben für die Analyse der Proteinexpression in Tumor- vs. Normalgewebe.

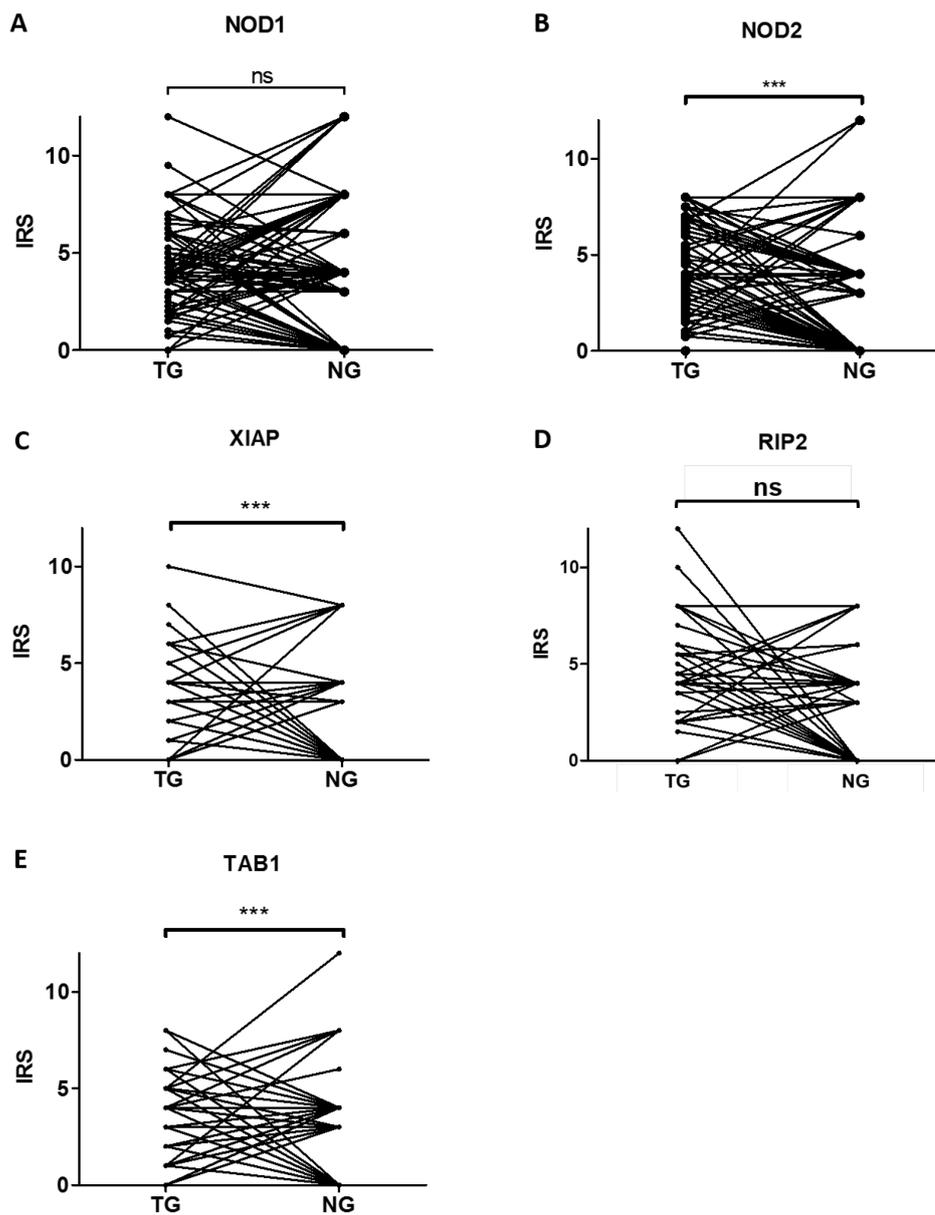
Die erhaltenen Daten wurden in einer allgemeinen vergleichenden (Abb. 9) sowie in einer gepaarten Expressionsanalyse (Abb. 10) ausgewertet. Hier wurde deutlich, dass die Expression des NOD2-Rezeptors sowie die von XIAP, RIP2 und TAB1 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erhöht waren (alle  $p = <0,001$ ) (Abb. 9 B-E). So lag der Median der NOD2-Expression im Tumorgewebe bei einem IRS-Wert von 3,4. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Normalgewebe ein medianer NOD2 IRS-Wert von 1,9. Die Gewebeproben in denen RIP2 angefärbt wurde, wiesen einen IRS-Wert von 3,7 im Tumorgewebe, und einen IRS-Wert von 1,6 im Normalgewebe auf.

Die Auswertung von TAB1 ergab hier einen IRS-Wert von 1,7. Demgegenüber wurde in den untersuchten Tumoren ein medianer IRS-Wert von 2,8 ermittelt. Besonders deutlich waren die Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgeweben bei der Analyse der XIAP-Expression. Hier lagen die IRS-Werte im Median des Tumorgewebes bei 3,2; im Normalgewebe bei einem IRS von 0,9. Allein die NOD1-Rezeptorexpression wies keine signifikant unterschiedliche Wert auf (Abb. 9A). Die erhaltenen Ergebnisse wurden im Sinne einer gepaarten Analyse auch im direkten Vergleich der verschiedenen Gewebe jeweils eines Patienten verifiziert (Abb. 10). Auch in dieser Analyse zeigte sich eine signifikant verstärkte

Expression von NOD2, XIAP und TAB1 im Tumorgewebe (alle  $p = <0,001$ ) (Abb. 10B, C, F). Hingegen konnten die Ergebnisse der allgemeinen Analyse von Tumor- und Normalgewebe für die RIP2-Expression in der gepaarten Analyse nicht wiederholt werden. Hier lag keine signifikant erhöhte RIP2-Expression im Tumor- im Vergleich zum Normalgewebe vor (Abb. 10 D).



**Abb. 9. Vergleich der Expressionsstärke der im NOD-Signalweg wichtigen Proteine in Tumor- und Normalgewebe.** Vergleich der Expressionen im gesamten Kollektiv (A) NOD1, (B) NOD2, (C) XIAP, (D) RIP2 und (E) TAB1. IRS = Immunreaktiver Score, TG = Tumorgewebe, NG = Normalgewebe. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane.  $p=0,05$ . Patienten mit Fernmetastasen und/oder mindestens einem Rezidiv wurden von der Bewertung ausgeschlossen.



**Abb. 10** Gepaarte Analyse der Expressionsstärke der im NOD-Signalweg wichtigen Proteine in Tumor- und Normalgewebe. (A) NOD1, (B) NOD2, (C) XIAP, (D) RIP2 und (E) TAB1). IRS = Immunreaktiver Score, TG = Tumorgewebe, NG = Normalgewebe. Dargestellt sind die Mediane.  $p = 0,05$ . Patienten mit mindestens einer Fernmetastase und/oder mindestens einem Rezidiv wurden von der Bewertung ausgeschlossen.

Für die Überlebensanalysen des gewählten Kollektivs galten folgende klinikopathologische Parameter: Das mediane Alter lag bei 70 Jahren. Dabei waren 131 (48%) Patienten 70 Jahre alt oder jünger, 141 (52%) Patienten wiesen ein höheres Alter auf. In die Analysen einbezogen wurden 155 männliche (43%) und 117 weibliche (57%) Patienten. Die Tumore wurden bei 194 Patienten (71%) in die T-Stadien 3 und 4 eingeordnet. 112 Patienten (41%) wiesen Lymphknotenmetastasen auf. Im gesamten Kollektiv befand sich ein Patient, der Fernmetastasen besaß. Alle weiteren Patienten zeigten diesbezüglich einen negativen Befund (99,6%). 226 Tumore (83%) wurden als G1 oder G2-Stadium definiert. 159 Tumore wurden den UICC-Stadien I oder II (58%) zugewiesen, 113 Tumore den UICC-Stadien III und IV (41%).

Variablen	Anzahl [n]	Anteil [%]
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	155	43
Weiblich	117	57
<b>Alter (Median)</b>		
≤ 70 Jahre	131	48
> 70 Jahre	141	52
<b>T-Stadium</b>		
T1+T2	79	29
T3+T4	194	71
<b>Lymphknotenmetastasen</b>		
Negativ	161	59
Positiv	112	41
<b>Systemische Metastasierung</b>		
negativ	272	99,6
positiv	1	0,4
<b>Grading</b>		
G1+G2	226	83
G3	46	17
<b>UICC</b>		
I+II	159	58
III + IV	113	41

Tab. 16 Klinisch-pathologische Variablen des untersuchten Patientenkollektivs

Die Tab. 16 stellt die Charakterisierung des Patientenkollektivs in einer Übersicht dar. Für die Überlebensanalysen wurden Patienten aus der Untersuchung ausgeschlossen, die Rezidive (n = 9 Patienten) oder Fernmetastasen (n = 1 Patient) aufwiesen oder innerhalb eines Monats nach der durchgeführten Operation verstarben (n=7 Patienten). Die Auswertung der Färbung der im NOD-Signalweg beteiligten Proteine geschah mittels Ermittlung des Immunreaktiven Scores (IRS). Der Schwellenwert für eine starke Färbung wurde bei einem IRS-Wert von  $\geq 3$  definiert. Niedrigere Werte galten somit als schwache Proteinexpression.

Die Korrelation der Proteinexpression mit den klinikopathologischen Parametern zeigte einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten NOD1-Expression und dem Geschlecht der Patienten ( $p = 0,01$ ) auf (Tab. 17). Weitere signifikante Korrelationen konnten für NOD1 nicht erkannt werden. Eine starke NOD2-Expression korrelierte mit gut und mäßig differenzierten Tumoren der G-Stufen 1 und 2 ( $p = 0,05$ ) (Tab. 18). Diese Beobachtung galt nur für die Proteinexpression im Tumorzentrum. An der Invasionsfront wurden diese Ergebnisse nicht erzielt.

Die klinikopathologische Korrelation mit der Expression von XIAP im Tumorzentrum zeigte signifikante Werte bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,02$ ) sowie in erhöhten UICC-Stadien III und IV ( $p = 0,03$ ) (Tab. 19). Die RIP2-Expression korrelierte mit dem Geschlecht der Patienten ( $p = 0,0002$ ) (Tab. 20). Die TAB1-Expression korrelierte mit keinem der untersuchten Parameter (Tab. 21).

Variablen	NOD1 (Tumorzentrum)			NOD1 (Invasionsfront)		
	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>						
Männlich	36 (74%)	75 (52%)	<b>0,01</b>	26 (28%)	79 (45%)	0,06
Weiblich	13 (27%)	69 (48%)		10 (72%)	66 (54%)	
<b>T-Stadium</b>						
T1+T2	13 (24%)	36 (25%)	1,00	7 (19%)	33 (23%)	0,82
T3+T4	37 (76%)	107 (74%)		29 (81%)	112 (77%)	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						
Negativ	29 (59%)	83 (58%)	1,00	23 (64%)	80 (55%)	0,45
Positiv	20 (41%)	60 (42%)		13 (36%)	65 (45%)	
<b>Grading</b>						
G1+G2	41 (84%)	121 (84%)	0,82	31 (86%)	118 (81%)	0,63
G3	8 (16%)	21 (15%)		5 (14%)	26 (18%)	
<b>UICC</b>						
I+II	29 (59%)	81 (56%)	0,87	22 (61%)	80 (55%)	0,45
III+IV	20 (41%)	61 (42%)		13 (36%)	65 (45%)	

Tab. 17 Analyse der klinikopathologischen Daten unter Einbeziehung der NOD1-Rezeptorexpression im Tumorzentrum und der Invasionsfront. Statistische Berechnung mittels Fisher's Exact Test,  $p=0,05$

Variablen	NOD2 (Tumorzentrum)			NOD2 (Invasionsfront)		
	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>						
Männlich	47 (60%)	61 (58%)	0,88	42 (35%)	58 (45%)	0,20
Weiblich	31 (40%)	44 (42%)		23 (65%)	49 (54%)	
<b>T-Stadium</b>						
T1+T2	23 (29%)	28 (27%)	0,74	22 (34%)	25 (23%)	0,16
T3+T4	55 (71%)	77 (73%)		43 (66%)	82 (76%)	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						
Negativ	47 (60%)	67 (64%)	0,65	39 (60%)	65 (60%)	1,00
Positiv	31 (40%)	38 (36%)		26 (40%)	42 (39%)	
<b>Grading</b>						
G1+G2	62 (79%)	94 (90%)	<b>0,05</b>	52 (80%)	94 (87%)	0,13
G3	16 (51%)	10 (10%)		13 (20%)	12 (11%)	
<b>UICC</b>						
I+II	47 (60%)	65 (62%)	0,76	39 (60%)	64 (59%)	1,00
III+IV	31 (40%)	39 (37%)		26 (40%)	42 (39%)	

Tab. 18 Analyse der klinikopathologischen Daten unter Einbeziehung der NOD2-Rezeptorexpression im Tumorzentrum und der Invasionsfront. Statistische Berechnung mittels Fisher's Exact Test,  $p=0,05$

Variablen	XIAP (Tumorzentrum)			XIAP (Invasionsfront)		
	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>						
Männlich	45 (61%)	73 (56%)	0,07	35 (60%)	103 (59%)	1,0
Weiblich	29 (39%)	80 (44%)		23 (40%)	70 (41%)	
<b>T-Stadium</b>						
T1+T2	27 (36%)	45 (25%)	0,09	19 (33%)	45 (26%)	0,32
T3+T4	47 (64%)	134 (75%)		39 (67%)	128 (74%)	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						
Negativ	53 (72%)	98 (54%)	<b>0,02</b>	39 (67%)	96 (55%)	0,13
Positiv	21 (28%)	81 (45%)		19 (33%)	77 (44%)	
<b>Grading</b>						
G1+G2	64 (87%)	149 (83%)	0,70	47 (81%)	147 (85%)	0,41
G3	10 (14%)	29 (16%)		11 (19%)	25 (14%)	
<b>UICC</b>						
I+II	51 (69%)	98 (54%)	<b>0,03</b>	38 (66%)	96 (55%)	0,16
III+IV	22 (30%)	81 (45%)		19 (33%)	77 (44%)	

Tab. 19 Analyse der klinikopathologischen Daten unter Einbeziehung der XIAP-Expression im Tumorzentrum und der Invasionsfront. Statistische Berechnung mittels Fisher's Exact Test, p=0,05

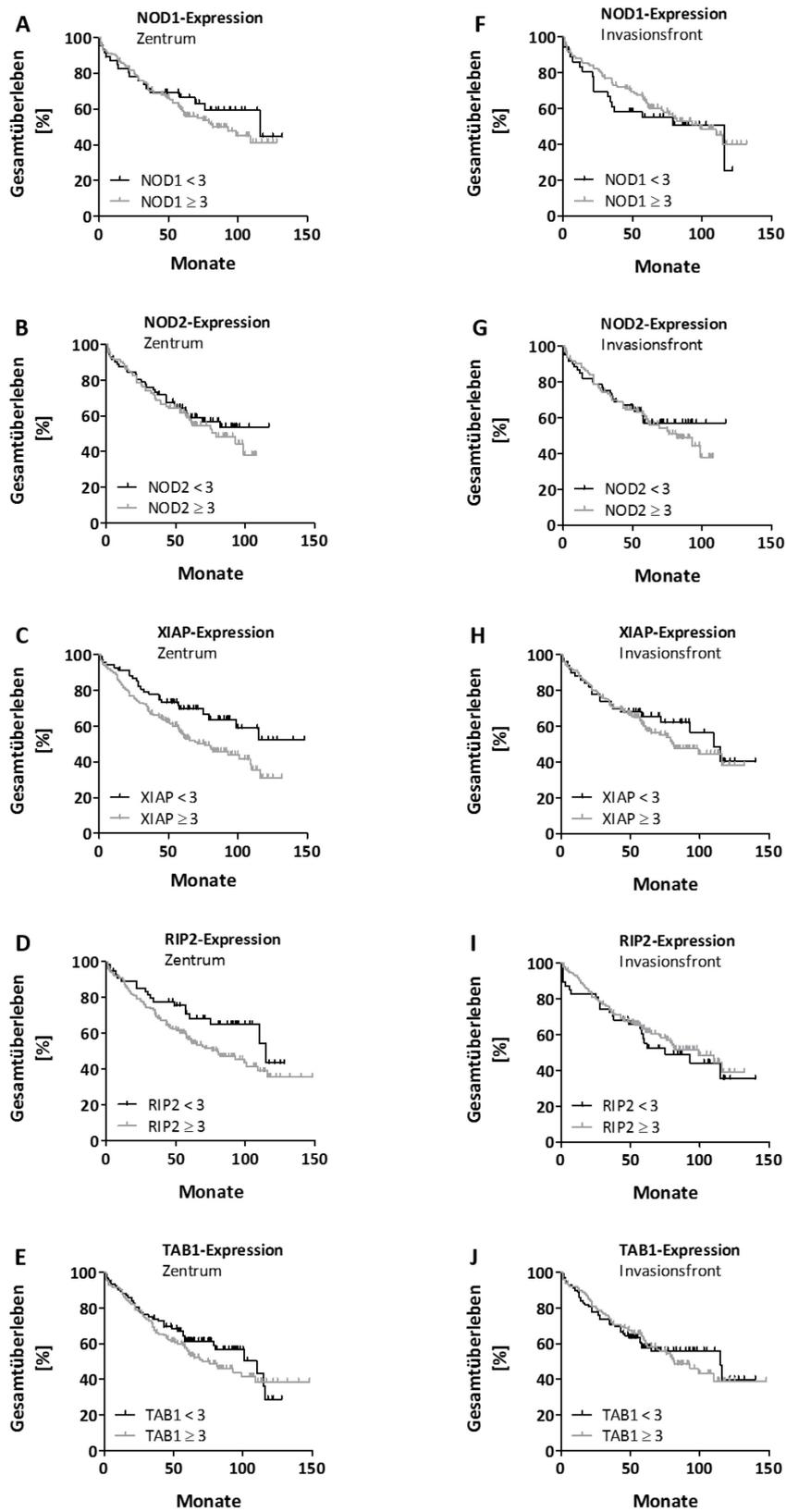
Variablen	RIP2 (Tumorzentrum)			RIP2 (Invasionsfront)		
	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>						
Männlich	28 (47%)	114 (60%)	<b>0,0002</b>	29 (56%)	106 (61%)	<b>0,0002</b>
Weiblich	32 (53%)	76 (40%)		23 (44%)	68 (39%)	
<b>T-Stadium</b>						
T1+T2	13 (22%)	60 (32%)	0,15	12 (23%)	50 (29%)	0,48
T3+T4	47 (78%)	129 (68%)		40 (77%)	124 (71%)	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						
Negativ	33 (55%)	116 (61%)	0,45	30 (58%)	106 (61%)	0,75
Positiv	27 (45%)	73 (38%)		22 (42%)	68 (39%)	
<b>Grading</b>						
G1+G2	50 (83%)	158 (83%)	1,0	43 (83%)	150 (86%)	0,51
G3	10 (17%)	31 (16%)		9 (17%)	24 (14%)	
<b>UICC</b>						
I+II	33 (55%)	114 (60%)	0,45	29 (56%)	106 (61%)	0,63
III+IV	27 (45%)	74 (39%)		22 (42%)	68 (39%)	

Tab. 20 Analyse der klinikopathologischen Daten unter Einbeziehung der RIP2-Expression im Tumorzentrum und der Invasionsfront. Statistische Berechnung mittels Fisher's Exact Test, p=0,05

Variablen	TAB1 (Tumorzentrum)			TAB1 (Invasionsfront)		
	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert	Niedrig (IRS < 3)	Hoch (IRS ≥ 3)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>						
Männlich	61 (41%)	83 (43%)	0,79	62 (43%)	66 (43%)	1,00
Weiblich	42 (59%)	62 (57%)		46 (57%)	49 (57%)	
<b>T-Stadium</b>						
T1+T2	28 (27%)	43 (30%)	0,57	31 (29%)	31 (27%)	0,88
T3+T4	75 (73%)	101(70%)		77 (71%)	83 (72%)	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						
Negativ	60 (58%)	87 (60%)	0,79	60 (56%)	74 (64%)	0,17
Positiv	43 (42%)	57 (39%)		48 (44%)	40 (35%)	
<b>Grading</b>						
G1+G2	88 (85%)	120 (83%)	0,86	93 (86%)	94 (81%)	0,58
G3	15 (15%)	23 (16%)		15 (14%)	19 (17%)	
<b>UICC</b>						
I+II	60 (58%)	86 (59%)	0,79	59 (55%)	74 (64%)	0,17
III+IV	43 (42%)	57 (39%)		48 (44%)	40 (35%)	

**Tab. 21** Analyse der klinikopathologischen Daten unter Einbeziehung der TAB1-Expression im Tumorzentrum und der Invasionsfront. Statistische Berechnung mittels Fisher's Exact Test,  $p=0,05$

Die anschließende Korrelation der Gesamtüberlebenszeit mit der Proteinexpression von NOD1, NOD2, XIAP, RIP2 oder TAB1 zeigte eine signifikante Verschlechterung des Gesamtüberlebens bei einer erhöhten Expression von XIAP ( $p = 0,013$ ) oder RIP2 ( $p = 0,053$ ) im Tumorzentrum (Abb. 11 C + D). Jedoch konnten signifikante Unterschiede ausschließlich hier gefunden werden, nicht aber an der Invasionsfront der Tumore (XIAP:  $p = 0,37$ , RIP2:  $p = 0,774$ ) (Abb. 11 H + I). Eine verstärkte Expression der NOD-Rezeptoren NOD1 und NOD2 sowie von TAB1 war weder im Tumorzentrum noch in der Invasionsfront mit einer Veränderung der Gesamtüberlebenszeit assoziiert (Abb. 11).



**Abb. 11** Relation zwischen der Gesamtüberlebensdauer von Patienten mit Kolonkarzinom und der Expressionsstärke der NOD-Rezeptoren NOD1 (A + F) und NOD2 (B + G) sowie XIAP (C + H), RIP2 (D + I) und TAB1 (E + J). Expression im Tumorzentrum (A-E) und Expression in der Invasionsfront (F - J). Die Gesamtüberlebensdauer ist in Prozent dargestellt, die Zeit in Monaten

Die durchgeführte univariate Analyse mit allen zur Verfügung stehenden Parametern des Kollektivs (Tab. 22) zeigte einen signifikanten Einfluss verschiedener Faktoren auf das Gesamtüberleben der Patienten. Dabei korrelierten das Lebensalter des Patienten signifikant mit dem Gesamtüberleben ( $p = <0,001$ ). Auffällig war hier, dass die Patienten  $\leq 70$  Jahren durchschnittlich schneller verstarben als Patienten, die das 70. Lebensjahr bereits überschritten hatten. Auch das Vorhandensein von Tumoren mit hohen T- und N-Stadien führte zu einer signifikanten Verminderung des medianen Überlebens. Dieses lag bei Patienten mit Tumoren der T-Stadien 1 und 2 bei 58 Monaten, in höheren Stadien bei 53 Monaten ( $p = 0,012$ ). Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen war ebenfalls mit einer Reduktion der Überlebenszeit assoziiert ( $p = <0,001$ ). Lag ein schlecht- (G3-Stadium) oder undifferenzierter (G4-Stadium) Tumor vor, war die mediane Überlebensdauer mit 32 Monaten, gegenüber den 57 Monaten bei gut und mäßig differenzierten Tumoren, deutlich reduziert ( $p = 0,001$ ). Ebenfalls bedeutete ein hohes UICC-Stadium eine verminderte mediane Überlebensdauer: von 62 Monaten in UICC I und UICC II-Stadien auf 39 Monate in den UICC Stadien III und IV ( $p = <0,001$ ). Das Geschlecht besaß hingegen keinen Einfluss auf die Überlebensdauer der Patienten.

Eine vermehrte XIAP-Expression im Tumorzentrum führte in dem hier vorliegenden Kollektiv zu einer Verkürzung der Überlebenszeit um sieben Monate ( $p = 0,013$ ). In der Invasionsfront konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Ähnlich wie bei XIAP nahm die RIP2-Expression im Tumorzentrum Einfluss auf das Überleben ( $p = 0,053$ ), während die RIP2-Expression an der Invasionsfront keinen signifikanten Einfluss aufwies ( $p = 0,774$ ). Auch die Expression der Proteine TAB1 und der Rezeptorproteine NOD1 und NOD2 zeigten keine signifikanten Veränderungen für das Überleben der Patienten auf (Tab. 22).

Eine weiterführende multivariate Analyse, in die alle univariat signifikanten Faktoren einfließen, bestätigte neben den klinisch-pathologischen Faktoren (Alter, G- und N-Stadien) XIAP als unabhängigen prognostischen Faktor im dem hier untersuchten Kollektiv ( $p = 0,028$ ).

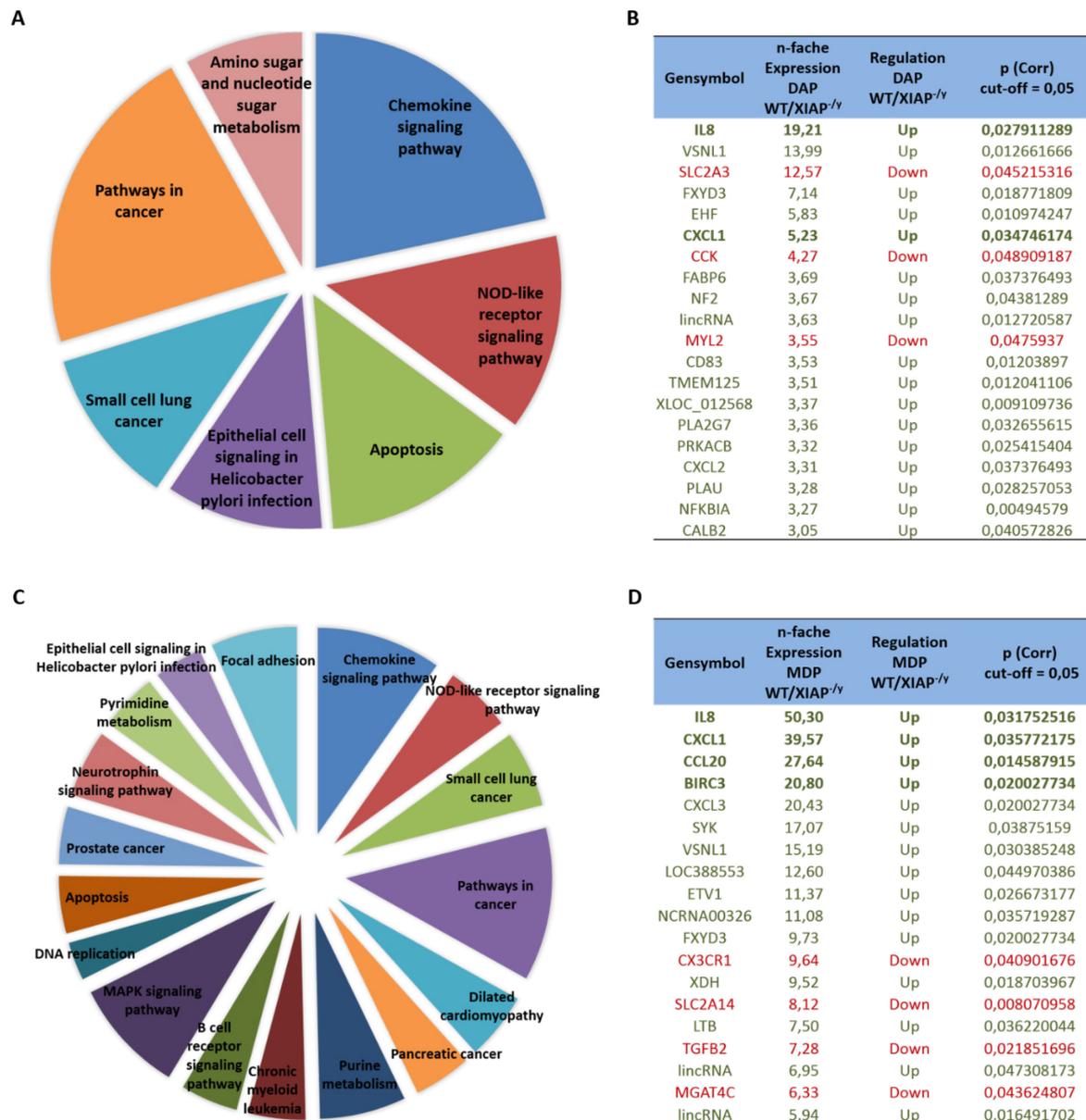
Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	Medianes Überleben (Monate)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
<b>medianes Alter</b> ≤70 J. vs. > 70 J.	<b>63 vs. 77</b>	<b>&lt;0,001</b>	3,031 (1,988-4,542)	<0,001
Geschlecht	n.s.	0,636	-	n.e.
<b>T-Stadien</b> T1/2 vs. T3/4	<b>58 vs. 53</b>	<b>0,012</b>	-	n.s.
<b>N-Stadien</b> N0 vs. N	<b>62 vs. 43</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,151 (1,451-3,188)	<0,001
<b>G-Stadien</b> 1/2 vs. 3/4	<b>57 vs. 32</b>	<b>0,001</b>	2,026 (1,277-3,214)	0,003
<b>UICC-Stadien</b> I/II vs III	<b>62 vs. 39</b>	<b>&lt;0,001</b>	-	n.s.
<b>XIAP</b> Zentrum	<b>58 vs. 51</b>	<b>0,013</b>	1,696 (1,058-2,721)	0,028
XIAP Invasionsfront	n.s.	0,370	-	n.e.
<b>RIP2</b> Zentrum	<b>57 vs. 53</b>	<b>0,053</b>	n.s.	n.s.
RIP2 Invasionsfront	n.s.	0,774	-	n.e.
TAB1 Zentrum	n.s.	0,270	-	n.e.
TAB1 Invasionsfront	n.s.	0,649	-	n.e.
NOD1 Zentrum	n.s.	0,246	-	n.e.
NOD1 Invasionsfront	n.s.	0,694	-	n.e.
NOD2 Zentrum	n.s.	0,736	-	n.e.
NOD2 Invasionsfront	n.s.	0,637	-	n.e.

**Tab. 22 Überlebensanalyse der Patienten des vorliegenden Kollektivs in uni- und multivariater Analyse.** Für die Stärke der Proteinexpression lag der Schwellenwert bei einem IRS von  $\geq 3$ . p = 0,05; n.s. = nicht signifikant; n.e. = nicht in die Analyse eingesetzt. HR = Hazard Ratio (Relatives Risiko), CI = Confidence Intervall, Fett: in univariater Analyse signifikant

## 4.2 RNA-Expressionsanalyse mittels Microarray in stimulierten HCT116 WT und HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>

Die immunhistologischen Ergebnisse zeigten eine starke Expression der Komponenten des NOD-Signalwegs im Kolonkarzinom. Insbesondere zeigte die Stärke der Expression von XIAP und RIP2 eine Relevanz für das Überleben der Patienten. XIAP wurde dabei als prognostisch relevanter Faktor bestätigt. Da seine Rolle als Apoptoseinhibitor und Induktor der Metastasierung in Tumoren bereits bekannt ist, sollten die immunhistologischen Ergebnisse als nächstes auf molekularer Ebene weiter untersucht werden. Um einen ersten Gesamtüberblick über eine XIAP-abhängige Regulation des NOD-Signalwegs in Bezug auf krebisrelevante Gene im Kolonkarzinom zu erhalten, wurde ein RNA-Microarray durchgeführt. Dazu wurden zunächst XIAP<sup>-/-</sup>-Klone und wildtypische Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 (Cummins et al. 2004) mit den NOD-Rezeptor-Liganden iE-DAP ( $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diamino-Pimelinsäure) bzw. MDP (Muramyl-dipeptid) für drei Stunden stimuliert, die RNA isoliert und mittels RNA Integritätsnummer (RIN) qualitativ bewertet. Bei der Auswertung der erhaltenen Arraydaten wurde das Verhältnis der jeweiligen RNA von XIAP<sup>-/-</sup> zu wildtypischen Zellen ermittelt. Dabei zeigte der Wert 1 die basale Genexpression an. Werte darüber wiesen auf eine Überexpression des jeweiligen Gens in Zellen mit XIAP<sup>-/-</sup> hin, kleinere Werte zeigten eine Herabregulation an. Die verglichenen Zellen unterschieden sich ausschließlich in dem genetischen Knock Out von XIAP. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die detektierte differentielle Expression verschiedener Gene nach der Stimulation in XIAP-Abhängigkeit reguliert wurde. Die Abbildungen 11A und C zeigen eine Übersicht über die durch die Stimulation aktivierten Signalwege. Insbesondere wurden Chemo-kin-abhängige Signalwege, sowie Apoptose-induzierende und NOD-Rezeptor ähnliche Signalwege in Abhängigkeit von XIAP stimuliert. Die Stimulation von HCT116 mittels MDP betraf im Gegensatz zu iE-DAP-stimulierten Zellen eine Vielzahl weiterer Signalwege (Abb. 12C). Insgesamt wurden durch die Stimulation der Zellen mit MDP 379 Gene differentiell reguliert. Davon wurden 195 Gene herauf- und 184 Gene in Abhängigkeit von XIAP herabreguliert. Durch die DAP-Stimulation wurden insgesamt 205 Gene differentiell reguliert, davon wurden 104 Gene herauf- und 101 Gene herabreguliert.

Von besonderem Interesse waren für diese Arbeit die Gene, die mit Tumorwachstum, Proliferation, Metastasierung und Migration assoziiert werden. Abbildungen 11B und D zeigen die zwanzig, durch iE-DAP (im Folgenden „DAP“ genannt) bzw. MDP-Stimulation am stärksten regulierten Gene. Hierzu zählen insbesondere nach MDP-Stimulation verschiedene Zytokine und das Transkript des Inhibitor of Apoptosis-Gens *BIRC3/cIAP2*. Aufgrund der starken differentiellen Regulation und ihrer Funktion in den für dieses Projekt interessanten Bereichen, wurden die Gene *IL8*, *CXCL1*, *CCL20* und *BIRC3/cIAP2* für die weiteren Analysen ausgewählt. Die Expression von *IL8* stieg im Wildtyp nach DAP-Stimulation um das 19,2-fache ( $p = 0,028$ ), nach MDP-Stimulation sogar um das 50,3-fache ( $p = 0,032$ ). Die Expression von *CXCL1* war 5,2- ( $p = 0,035$ , DAP) bzw. 39,6-fach ( $p = 0,036$ , MDP) erhöht. *CCL20* zeigte eine vermehrte Expression um das 27,6-fache nach MPD-Stimulation ( $p = 0,015$ ), während die *BIRC3/cIAP2*-Expression nach MDP-Stimulation um das 20,8-fache ( $p = 0,02$ ) erhöht war.

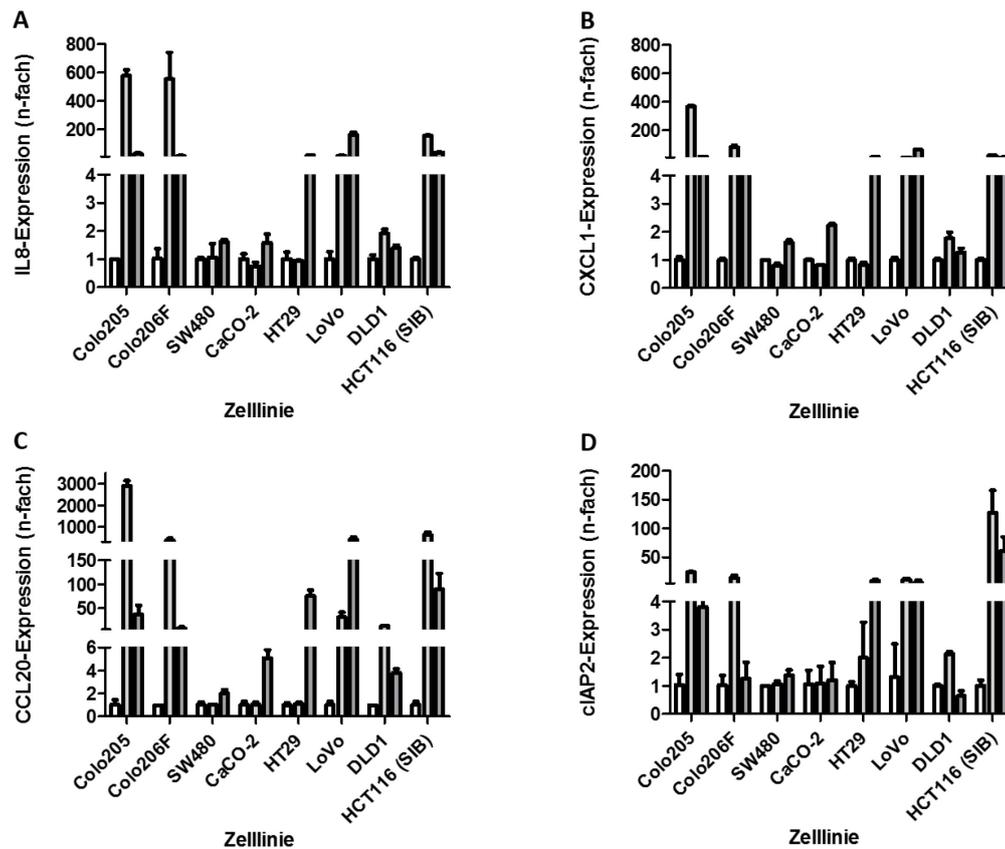


**Abb. 12 Expression differenziell regulierter Gene in Abhängigkeit von XIAP nach Stimulation mit DAP (A + B) bzw. MDP (C+D).** Übersicht über XIAP-abhängige regulierte Signalwege nach (A) DAP- und (C) MDP-Stimulation von HCT116-Zellen. (B) Tabelle der stärksten differenziell regulierten Gene nach DAP-Stimulation. (D) Tabelle mit den 20 am stärksten von der differentiellen Regulation betroffenen Genen nach MDP-Stimulation. Grün: Heraufregulierte Gene. Rot: Herabregulierte Gene. Fett: Ausgewählte Zielgene. Die Tabellen stellen die Gensymbole, deren n-fache differentielle Expression, die Herauf- oder Herabregulation sowie die Signifikanz der Ergebnisse (p=0,05) dar.

### 4.3 Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR

Die Expression der ausgewählten Zielgene IL8, CXCL1, CCL20 und *BIRC3/cIAP2* wurde mittels qRT-PCR in einem Panel verschiedener Kolonkarzinom-Zelllinien validiert. Dazu wurden die semi-adhären Zellen Colo205, Colo206F, sowie die adhären Zellen SW480, CaCO-2, HT29, LoVo, DLD-1 (SIB) und HCT116 (SIB) mit MDP bzw. DAP für jeweils drei Stunden behandelt. Der Zusatz „SIB“ bei den Zellen DLD-1 und HCT116 weist auf das Vorhandensein eines zufällig in das Genom inserierten mock-Vektors hin. Diese Klone dienen als Negativkontrollen für die entsprechenden XIAP<sup>-/-</sup>-Klone.

Nach der Behandlung der Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Expression der Zielgene nach einer cDNA-Synthese durch eine semi-quantitative Real-Time-PCR analysiert. Hierbei zeigte sich, dass alle acht getesteten Zelllinien auf die Stimulationen reagierten und die Expression der untersuchten Zielgene nach der Stimulation durch die NOD-Liganden DAP und MDP erhöht waren. Die Zelllinien SW480, CaCO-2 und HT29 zeigten im Gegensatz zu den weiteren untersuchten Zelllinien allein nach DAP-Stimulation eine verstärkte Expression von IL8, CXCL1 und CCL20. Eine differentielle Regulierung von *cIAP2* konnte hier nur bei der Zelllinie HT29 beobachtet werden. Am stärksten reagierten die Zelllinien Colo205, Colo206F, LoVo, HT29 und HCT116 (SIB) auf die Stimulation durch den jeweiligen Liganden: Die IL8-Expression in den semiadhären Zellen Colo205 und Colo206F war nach MDP-Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Zelllinie um das 600-fache erhöht. Auch stieg die Expression des Zytokins CXCL1 in Colo205 um das 360-fache, in Colo206F um das 80-fache an. Auch die Expression von CCL20 (3000-, bzw. 400-fach) sowie die *cIAP2*-Expression (24-, bzw. 14-fach) waren stark erhöht. Die RNA-Expression nach DAP-Stimulation war in diesen Zelllinien nicht so stark ausgeprägt, zeigte aber die gleichen Tendenzen (Abb. 13). Ein deutlicher Unterschied konnte bei der *cIAP2*-Expression in der Zelllinie Colo206F (Abb. 13D) detektiert werden. Hier war die Expression nach MDP-Stimulation stark erhöht, während die DAP-Stimulation zu keiner vermehrten Expression führte (Abb. 13).

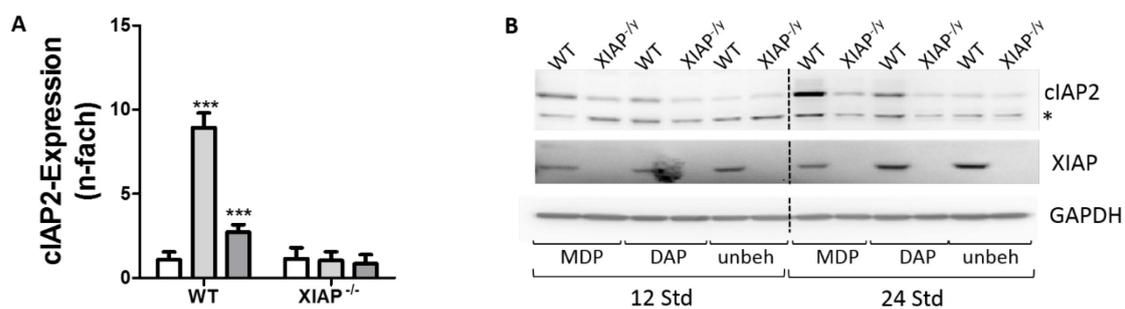


**Abb. 13 Validierung der Daten des Microarrays auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR.** Expression verschiedener XIAP-abhängiger Zielgene des NOD-Signalwegs in acht verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien: (A) IL8; (B) CXCL1; (C) CCL20; (D) cIAP2. Weiß: unstimuliert, hellgrau: MDP-stimuliert, dunkelgrau: DAP-stimuliert

Die adhärenen Zelllinien LoVo, HT29 und HCT116 (SIB) zeigten im Vergleich zu den semi-adhärenen Zelllinien Colo205 und Colo206F eine moderatere Expression der untersuchten Gene nach der Stimulation. Dennoch zeigten sich starke Expressionsunterschiede nach der Stimulation mit MDP oder DAP innerhalb der einzelnen Zelllinien. Die Expression von IL8, CXCL1 und CCL20 war in Zellen der Linie LoVo nach der Stimulation mit DAP stärker ausgeprägt als nach der Stimulation mit MDP, während die Expression der untersuchten Zielgene in der Linie HCT116 (SIB) nach der MDP-Stimulation besonders stark anstieg (Abb. 13). Diese Zelllinie zeigte in den hier dargestellten Versuchen im Vergleich mit den anderen untersuchten Zelllinien insgesamt die stärkste Reaktion auf die Stimulation mit DAP und MDP.

#### 4.4 cIAP2-Expression in HCT116 WT und XIAP<sup>-/-</sup>-Klonen nach Stimulation des NOD-Signalwegs mittels MDP und DAP

In Kapitel 4.3 konnte gezeigt werden, dass cIAP2 in HCT116 (SIB) nach Stimulation mit den NOD-Rezeptor-Liganden stark exprimiert wird. Die Expression war nach MDP-Stimulation im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen 127-fach und nach DAP-Stimulation 61-fach erhöht. Um nun die XIAP-abhängige Expression von cIAP2 in dieser Zelllinie darzustellen, wurden HCT116 WT (SIB) und XIAP<sup>-/-</sup> Klone für drei Stunden mit MDP bzw. DAP stimuliert. Hierbei zeigte eine Quantifizierung der mRNA- sowie der Protein-Expression mittels qRT-PCR und Western Blot, dass sich die cIAP2-Expression in den stimulierten Wildtyp-Zellen signifikant erhöhte, in den Knock Out-Zellen jedoch keine signifikante Veränderung in Bezug auf den unbehandelten Wildtyp auftrat. (Abb. 14).



**Abb. 14 cIAP2-Expression** auf (A) RNA- und (B) Proteinebene nach MDP und DAP-Stimulation nach 3 (RNA) bzw. 12 und 24 Stunden (Proteine) in HCT116 WT und XIAP<sup>-/-</sup>. HCT116 WT und XIAP<sup>-/-</sup> wurden mit MDP und DAP stimuliert. Nach drei Stunden Inkubation wurde die RNA, nach 24 Stunden wurden die Proteine der Zellen isoliert und mittels qRT-PCR und Western Blot die cIAP2-Expression bestimmt. Die qRT-PCR wurde mit einer Häufigkeit von n=3 durchgeführt, der Western Blot mit n=1. (A) weiß: unbehandelt, hellgrau: MDP-stimuliert, dunkelgrau: DAP-stimuliert. (B) \*= unspezifische Bande, unbeh = unbehandelte Probe, DAP = iE-DAP

So war die RNA-Expression von cIAP2 nach der Stimulation mit MDP um das 8,93-fache, nach Stimulation mit DAP um das 2,72-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Hingegen konnte kein signifikanter Anstieg der cIAP2-Expression nach der Stimulation des XIAP<sup>-/-</sup>-Klons im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 14A). Der Proteinnachweis mittels Western Blot unterstützte diese Ergebnisse. Hier konnte ein Anstieg von cIAP2 auf Proteinebene nach 12 und nach 24-stündiger Inkubation mit MDP und DAP in wildtypischen HCT116-Zellen nachgewiesen werden. Dabei waren die beobachteten Effekte nach 24 Stunden am deutlichsten zu erkennen (Abb. 14B).

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen demnach sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine gleiche cIAP2-Expression in unstimulierten HCT116 Wildtyp und XIAP<sup>-/-</sup>-Zellen. Erst eine Stimulation des NOD-Signalwegs mittels MDP oder DAP führte ausschließlich in wildtypischen Zellen zu einer Zunahme von cIAP2-RNA und -Protein. Diese Beobachtungen verdeutlichen abermals die Sensitivität der Zelllinie HCT116 hinsichtlich der Stimulation mit MDP bzw. DAP.

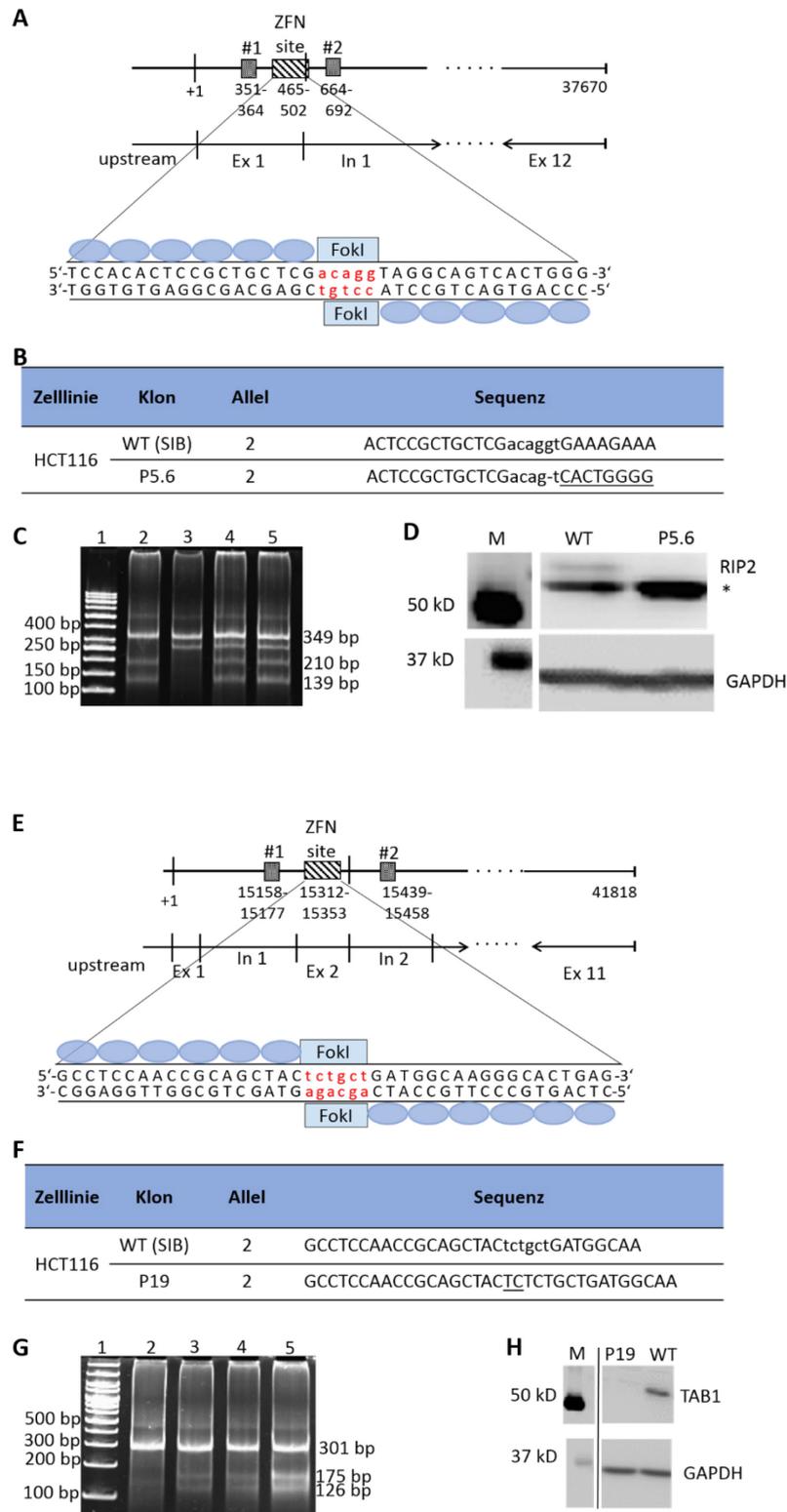
#### **4.5 Etablierung stabiler RIP2- und TAB- Knock Out Klone der Zelllinie HCT116 (SIB)**

Wie XIAP, so sind auch RIP2 und TAB1 von zentraler funktioneller Bedeutung innerhalb der NOD-Signalkaskade. Um die potentielle Funktion dieser Proteine für die Aktivierung des NOD-Signalwegs im Rahmen der Tumorprogression darzustellen, wurden mittels der Zinkfinger-Nuklease (ZFN)-Technologie spezifische, geninaktivierende Mutationen in das RIP2- bzw. TAB1-Gen der Zelllinie HCT116 (SIB) eingefügt. Die Abbildung 15A zeigt die spezifische FokI-Nuklease-Schnittstelle mit der Erkennungssequenz *acagg* und ihre Lokalisation am Ende des Exons 1 innerhalb des RIP2-Gens. Flankiert wird die Nuklease von 5-6 Zinkfingerproteinen. Jedes dieser Proteine erkennt eine zuvor definierte Sequenz von drei Basenpaaren und spezifiziert somit die Bindung des ZFN-Komplexes. Zur Aktivierung der Nuklease muss diese zunächst ein Heterodimer bilden. Daher sind zwei ZFN-Proteine für die Spaltung des DNA-Doppelstrangs notwendig. Die Aktivität der ZFN wurde mittels PCR von genomischer DNA und anschließend enzymatischem Verdau überprüft (Abb. 15C). Die standardisierte Positivkontrolle (Spur 2) wies wie zu erwarten drei DNA-Banden der Größen 349 bp, 210 bp und 139 bp auf. Wildtypische DNA aus der Zelllinie HCT116 (SIB) (Spur 3) zeigt zwei Banden der Größen 349 bp und 250 bp. Die DNAs aus mit ZFN-mRNA (Spur 4) bzw. mit ZFN-Plasmid-DNA (Spur 5) transfizierten Zellen zeigen jeweils alle vier Banden, wodurch die Aktivität der ZFN in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Durch den Einsatz der ZFN konnte ein homozygoter RIP2 Knock Out (<sup>-/-</sup>) Klon generiert werden (Abb. 15B). Der Klon P5.6 enthält eine Deletion eines Guanins am Ende von Exon 1.

Hierdurch entstand eine Leserasterverschiebung, die die Translation des RIP2-Proteins verhindert. Im Western Blot ist in wildtypischen Proteinlysaten eine spezifische RIP2-Bande zu erkennen, wobei im Knock Out Klon nur eine unspezifische Proteinbande sichtbar ist (Abb. 15D).

Abb. 15E zeigt die Lokalisation und die Erkennungssequenz der TAB1-spezifischen ZFN. Diese befindet sich in Exon 2 des Gens. Die Basenfolge der Schnittsequenz dieser ZFN lautet *tctgct*. Auch hier konnte die Aktivität der ZFN mittels PCR und enzymatischer DNA-Spaltung nachgewiesen werden (Abb. 15G). Die PCR-Fragmentlängen lagen hier bei 301 bp für das wildtypische Produkt und bei 175 bp bzw. 126 bp für die gespaltenen DNA-Fragmente.

Durch die ZFN-Aktivität konnte ebenfalls ein  $TAB1^{-/-}$ -Klon generiert werden. Der Klon P19 enthält eine homozygote Insertion von zwei Basen (Abb. 15F), was zu einer Leserasterverschiebung führt und die Bildung eines intakten Proteins nicht mehr möglich macht. In der Proteinexpressionskontrolle (Abb. 15H) ist nur im wildtypischen Proteinlysat eine spezifische TAB1-Bande erkennbar. Im Knock Out Klon konnte hingegen keine TAB1-Bande mehr detektiert werden.



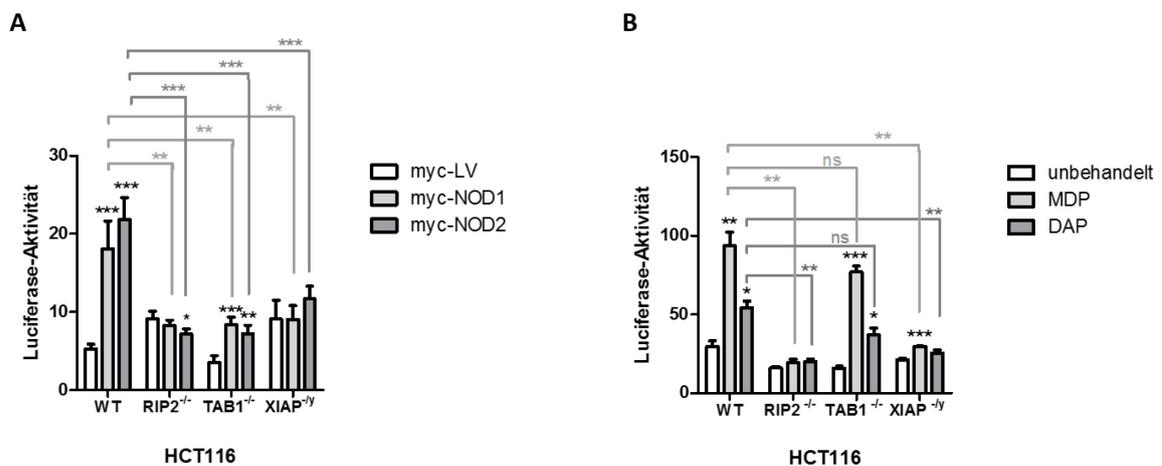
**Abb. 15 Schema der Generierung von genetischen Knock Out Klonen der Zelllinien HCT116.** Darstellung des genetischen RIP2 (A-D) bzw. TAB1-Knock Outs (E-H) in der Zelllinie HCT116. Schematische Darstellung der Nuklease-Schnittstellen (rot), sowie deren Sequenzveränderungen (B + F) innerhalb der verschiedenen Klone. Nachweis der ZFN-Nuklease-Aktivität mittels PCR (C + G). Der Knock Out wurde zudem auf Proteinebene mittels Western Blot verifiziert (D + H). (C): 1= DNA-Leiter, 2 = Positivkontrolle, 3= HCT116 WT, 4= ZFN-mRNA + Donor, 5 = ZFN-Plasmide + Donor (G): 1= DNA-Leiter, 2 = HCT116, 3= Positivkontrolle WT, 4= ZFN-mRNA + Donor, 5 = ZFN-Plasmide + Donor. unterstrichen: inserierte Basen

#### 4.6 Funktionelle Kontrolle der generierten HCT116 Knock Out Klone mittels Dual-Luciferase-Assay und quantitativer Real Time-PCR

Um die Funktionalität der generierten HCT116 (SIB) RIP2<sup>-/-</sup> - und HCT116 (SIB) TAB1<sup>-/-</sup> -Klone zu überprüfen, wurde der NOD-Signalweg in den Zellen wie in den zuvor durchgeführten Versuchen mittels MDP und DAP stimuliert. Die Aktivität des im Signalweg stromabwärts von RIP2 und TAB1 liegenden NFκB wurde dann unter Verwendung des Dual-Luciferase-Assays (Promega) gemessen. Zusätzlich zu den verschiedenen Luciferase-Plasmiden wurden in einem ersten Versuch die NOD-Rezeptoren NOD1 und NOD2 mittels Lipofektion in die verschiedenen Zellklone eingebracht und dort überexprimiert. Abb. 16A zeigt in wildtypischen HCT116 eine starke Luciferase-Aktivität nach der Überexpression des NOD1- ( $p = 0,004$ ) bzw. NOD2-Rezeptors ( $p = < 0,0001$ ). Als Negativkontrolle diente der HCT116 XIAP<sup>-/-</sup> Klon, da die NFκB-Aktivierung in diesem Signalweg nur in Abhängigkeit und dem Vorhandensein von XIAP geschehen kann. Bei einem XIAP-Verlust kann somit keine Aktivität induziert werden. Die erhaltenen Daten zeigten, dass es bei einem Knock Out von RIP2 ähnlich wie beim XIAP Knock Out zu keiner erhöhten Luciferase-Aktivität kam. In Zellen mit TAB1 Knock Out konnte hingegen eine signifikant erhöhte Luciferase-Aktivität um das 8,3-fache nach MDP-Stimulation ( $p = 0,0003$ ) und um das 7,2-fache nach DAP-Stimulation ( $p = 0,0022$ ) im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen werden. Im Vergleich mit der äquivalenten Behandlung im Wildtyp war die Luciferase-Aktivität der TAB1<sup>-/-</sup>-Zellen dennoch signifikant vermindert (NOD1:  $p = 0,0018$ ; NOD2:  $p = < 0,0001$ ).

In einem nächsten Schritt wurden die verschiedenen Klone mit den spezifischen NOD-Liganden MDP und DAP stimuliert (Abb. 16B). Auch hier zeigte sich eine starke Luciferase-Aktivität in wildtypischen Zellen. Diese verstärkte sich nach MDP-Stimulation um das 93,6-fache ( $p = 0,0024$ ), nach DAP-Stimulation um das 54,1-fache ( $p = 0,0129$ ). Hingegen konnte für den RIP2<sup>-/-</sup>-Klon im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Zellen sowohl nach MDP- ( $p = 0,2054$ ) als auch nach DAP-Stimulation ( $p = 0,0954$ ) keine vermehrte Luciferase-Aktivität erkannt werden. Die Stimulation in den TAB1<sup>-/-</sup>-Klonen durch MDP bzw. DAP zeigte eine signifikant verstärkte Luciferase-Aktivität im Vergleich zu entsprechenden unbehandelten Klonen. Hier stieg die Aktivität nach MDP-Stimulation um das 76,9-fache

( $p = 0,0001$ ), nach DAP-Stimulation um das 37-fache ( $p = 0,0105$ ) an. Diese Beobachtungen entsprechen den durch die NOD-Rezeptor-Überexpression enthaltenen Ergebnissen.

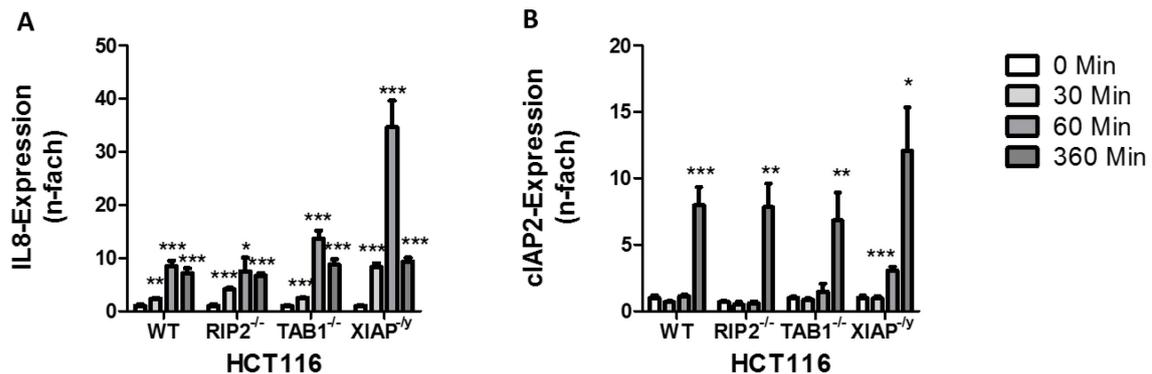


**Abb. 16 Luciferase-Aktivität nach (A) Überexpression von myc-NOD1 und myc-NOD2 sowie nach (B) MDP- und DAP-Stimulation.** (A) Die verschiedenen Knock Out Zellen wurden zunächst mit einem Luciferase gebundenen NF- $\kappa$ B-Plasmid und einer Renilla-Luciferase transfiziert. Zusätzlich wurden myc-NOD1 bzw. myc-NOD2-Plasmide transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität mittels Dual-Luciferase-Reporter-Assay bestimmt. (B) Die Knock Out Zellen wurden wie in (A) mit NF- $\kappa$ B-gekoppelter Luciferase und der Renilla-Luciferase transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 20  $\mu$ g/ml MDP bzw. iE-DAP behandelt. Weitere 24 Stunden später wurde die Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Dargestellt sind die absolut gemessenen Werte inkl. der Standardabweichungen. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie HCT116 WT (SIB).  $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant

Insgesamt hatte die Stimulation der NOD-Signalwege durch die receptorspezifischen Liganden MDP und DAP einen stärkeren Aktivierungseffekt als die Überexpression der Rezeptoren selbst. Dieser lag in wildtypischen Zellen nach MDP-Stimulation bei 93,54-facher, nach DAP-Stimulation bei 54,18-facher Aktivität. Hingegen erreichte die Luciferase-Aktivität nach der Überexpression der Rezeptoren Werte von 18,09 nach NOD1-Überexpression und einen Wert von 21,83 nach NOD2-Überexpression. Daher wurde die Stimulation des NOD-Signalwegs in den weiteren Versuchen ausschließlich durch die Zellstimulation mittels Liganden durchgeführt.

Weiterhin sollte die funktionelle Spezifität der genetischen Knock Outs für den NOD-Signalweg dargestellt werden. Dazu wurden die RIP2<sup>-/-</sup>, TAB1<sup>-/-</sup> und XIAP<sup>-/-</sup>-Klone, sowie die wildtypische HCT116 (SIB) Zelllinie mit 20 ng/ml Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) über Zeiträume von 0, 30, 60 und 360 Minuten stimuliert. Durch TNF $\alpha$  wird NF- $\kappa$ B über den TNF-Rezeptor-Signalweg aktiviert und ist somit unabhängig von der im NOD-Signalweg wirken-

den RIP2-TAB1-XIAP-Achse. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>-Zellen nach der Zugabe von TNF $\alpha$  unabhängig von XIAP stimuliert werden konnte (Krieg et al. 2009). Daher wurde in diesen Versuchen der XIAP<sup>-/-</sup>-Klon als Positivkontrolle mitgeführt. Nach der Stimulation wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und die Expression der NF- $\kappa$ B-Zielgene IL8- und cIAP2 durch eine qRT-PCR-Reaktion bestimmt.



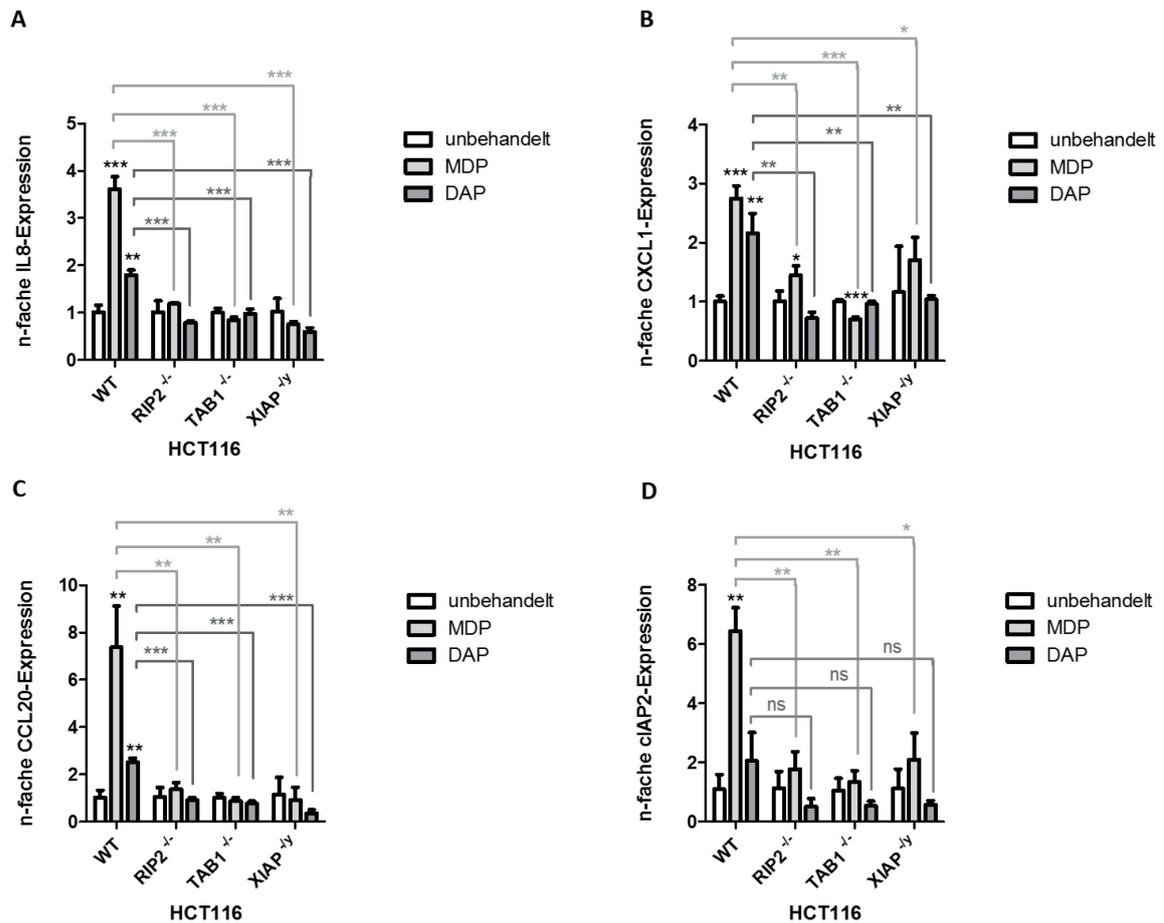
**Abb. 17 Nachweis der Spezifität der verschiedenen Knock Outs für die NOD-Signalwege.** Die verschiedenen Zellen wurde durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  stimuliert und die Gesamt-RNA nach 0, 30, 60 und 360 Minuten isoliert. Mittels qRT-PCR wurden dann die IL8- und cIAP2-Expression als indirekter Marker für die NF- $\kappa$ B-Aktivität nachgewiesen. (A) IL8- und (B) cIAP2-Expression nach TNF $\alpha$ -Stimulation. Für die statistischen Berechnungen wurden die Werte der jeweils unbehandelten Klone als Referenz genutzt.

Dabei zeigte sich, dass die Expression in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer anstieg. Die jeweils stärkste IL8-Expression in den verschiedenen Klonen war bereits nach 30-minütiger TNF $\alpha$ -Stimulation erreicht (Abb. 17A), die maximale Expression von cIAP2 nach 360-minütiger Stimulation (Abb. 17B). Dabei wiesen die Expressionswerte der verschiedenen Knock Out Klone keine signifikanten Unterschiede zur wildtypischen Expression auf.

#### 4.7 Expressionskontrolle verschiedener NF $\kappa$ B-Zielgene mit Hilfe semi-quantitativer RealTime-PCR

Durch die Aktivierung von NF $\kappa$ B innerhalb des NOD-Signalwegs werden verschiedenste Zielgene exprimiert (vgl. Kapitel 4.2). Um den vollständigen Ablauf des NOD-Signalwegs in den etablierten RIP2- und TAB1-Knock Out Klonen und Wildtypen nach MDP- und DAP-Stimulation zu untersuchen, wurde die Expression von IL8, CXCL1, CCL20 und cIAP2 mittels

qRT-PCR untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Klone mit MDP und DAP erneut stimuliert. Die Daten zeigten einen Anstieg der Expression der Zytokine IL8 (Abb. 18A), CXCL1 (Abb. 18B) und CCL20 (Abb. 18C) sowie des Inhibitor of Apoptosis Proteins cIAP2 (Abb. 18D) in stimulierten wildtypischen HCT116.



**Abb. 18 RNA-Expression der NF- $\kappa$ B-Zielgene (A) IL8, (B) CXCL1, (C) CCL20 und (D) cIAP2.** Die verschiedenen Knock Out Klone sowie die wildtypische Zelllinie wurden mit MDP bzw. iE-DAP für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert und die Expression der verschiedenen NF- $\kappa$ B-Zielgene mittels qRT-PCR bestimmt. Die Berechnungen bezogen sich auf die unbehandelte Probe des jeweiligen Klons. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung.

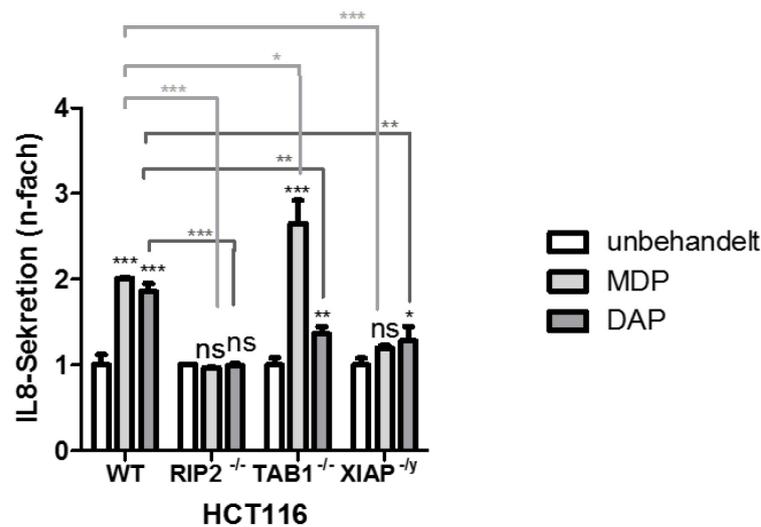
Im Detail stieg die IL8-Expression nach MDP-Stimulation um das 3,61-fache ( $p = 0,0001$ ) an, die CXCL1-Expression um das 2,8-fache ( $p = 0,0002$ ). CCL20 wurde um das 7,6-fache stärker exprimiert ( $p = 0,0034$ ), cIAP2 um das 6,44-fache ( $p = 0,0024$ ). Nach DAP-Stimulation war die IL8-Expression im HCT116 Wildtyp um das 1,8-fache ( $p = 0,0018$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Die CXCL1-Expression steigerte sich auf die 2,16-fache Expression ( $p = 0,0043$ ) und eine um das 2,52-fache Erhöhung der Expression wurde für CCL20 ermittelt ( $p = 0,0015$ ). Die cIAP2-Expression war hier verdoppelt ( $p = 0,2007$ ).

In HCT116 RIP2<sup>-/-</sup>-Zellen konnte nach MDP-Stimulation eine leicht erhöhte CXCL1-Expression festgestellt werden, die hier um das 0,5-fache ( $p = 0,0335$ ) gestiegen war. Die Expression der anderen untersuchten Zielgene konnte durch die Stimulationen nicht gesteigert werden. In den TAB1<sup>-/-</sup> - und XIAP<sup>-/-</sup> – Klonen konnten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Expressionsraten im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen gefunden werden. Zudem waren die Expressionsraten der verschiedenen Knock Out Klone im Vergleich zu denen der wildtypischen Zelllinie insgesamt signifikant vermindert (Abb. 18A-C). Allein die cIAP2-Expression in DAP-stimulierten wildtypischen Zellen und Knock Out Klonen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 18D).

#### **4.8 Nachweis der IL8-Sekretion in Knock Out Zellen nach MDP und DAP-Stimulation mittels ELISA**

Das Zytokin IL8 wird von Zellen sekretiert und befindet sich in der Zellkultur im Nährmedium. Als weiteren Nachweis zur Auswirkung der RIP2-, TAB1 und XIAP-Knock Outs auf die Signalweiterleitung und NF $\kappa$ B-Aktivierung innerhalb des NOD-Signalwegs, wurde die IL8-Sekretion dieser verschiedenen HCT116 Klone unter Zuhilfenahme der ELISA-Methode untersucht. Hierzu wurden die Zellkulturüberstände der zuvor mit 20  $\mu$ g/ml MDP bzw. DAP-behandelten Zellen verwendet. Wie die graphische Darstellung der n-fachen IL8-Sekretion durch ein Balkendiagramm zeigt, war die IL8-Konzentration im Zellkulturüberstand der wildtypischen Zelllinie nach MDP- bzw. DAP-Stimulation 2- bzw. 1,8-fach erhöht (Abb. 19). Im Gegensatz dazu konnte im RIP2<sup>-/-</sup>-Klon keine vermehrte IL8-Sekretion nachgewiesen werden. Die IL8-Sekretion des TAB1<sup>-/-</sup>-Klons war nach MDP-Stimulation um das 2,7-fache erhöht, nach DAP-Stimulation um das 1,4-fache. Der als Negativkontrolle genutzte HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>-Klon zeigte eine minimale Reaktion auf die Stimulationen.

Im Vergleich zum entsprechenden wildtypischen Ansatz war die Stärke der IL8-Sekretion in den RIP2<sup>-/-</sup> und XIAP<sup>-/-</sup>-Klonen verringert, nach MDP-Stimulation zeigte sich eine schwach signifikante 1,2-fache Erhöhung der IL8-Konzentration im Zellkulturüberstand des TAB1<sup>-/-</sup>-Klons im Vergleich zur wildtypischen Zelllinie.



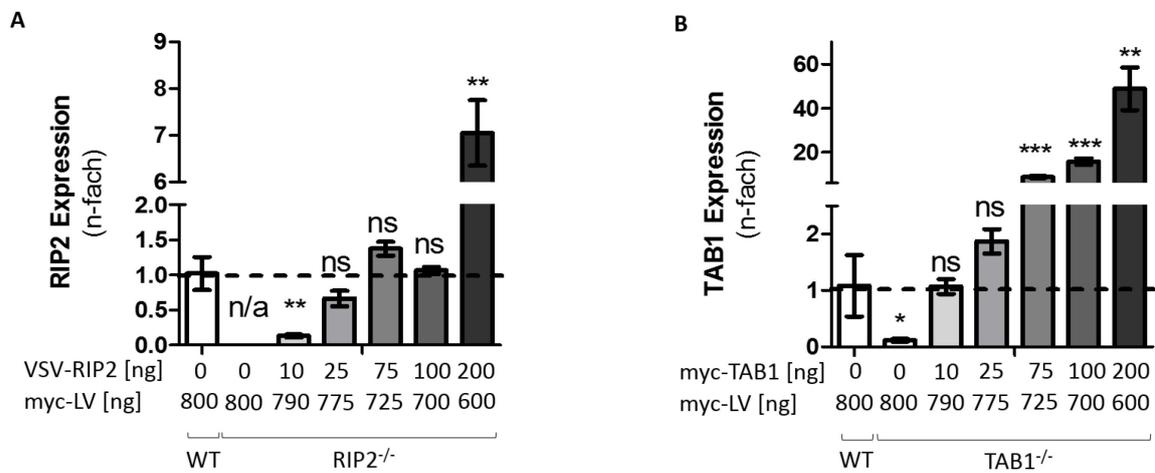
**Abb. 19 IL8-Sekretion von Knock Out Zellen nach Stimulation mit MDP bzw. iE-DAP.** Zellkulturüberstände wurden nach 24-stündiger MDP-bzw. DAP-Stimulation abgenommen, der Zelldebris herabzentrifugiert und die IL-8 Konzentration mittels ELISA bestimmt.  $p < 0,05$ . ns = nicht signifikant

#### 4.9 Rekonstitution von RIP2 und TAB1 in HCT116 Knock Out Klonen und Ermittlung der Auswirkungen auf die Aktivität der NF- $\kappa$ B-Zielgene in Abhängigkeit der Überexpression von XIAP

In den in diesem Kapitel dargestellten Versuchen sollte nun untersucht werden ob nicht nur, wie von Lu und Kollegen beschrieben, die Interaktion von XIAP mit TAB1 für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B vonnöten ist (Lu et al. 2007), sondern auch die Interaktion von RIP2 mit XIAP eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B spielt.

Für diese Versuche sollte als Positivkontrolle eine RIP2- bzw. TAB1-Rekonstitution in den jeweiligen Knock Out Klonen genutzt werden. Dafür wurden zunächst in Vorversuchen RIP2 und TAB1 in den entsprechenden RIP2- und TAB1-Knock out Zellen mittels Transfektion auf ein wildtypisches Level rekonstituiert. Zur Bestimmung der zu transfizierenden Plasmid-Menge wurden 10 – 200 ng des VSV-RIP2- bzw. des myc-TAB1-Plasmids in die RIP2<sup>-/-</sup> und TAB1<sup>-/-</sup>-Klone transfiziert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und die RNA-Level von RIP2 (Abb. 20A) bzw. TAB1 (Abb. 20B) mittels qRT-PCR bestimmt. Als Referenz diente hier der nur mit einem Leervektor transfizierte HCT116 Wildtyp. Abbildung 20 A stellt die RIP2-Expression dar und zeigt, dass für eine Rekonstitution von RIP2 auf das

Wildtypniveau 25 bis 100 ng Plasmid-DNA transfiziert werden mussten. Um TAB1 zu rekonstituieren waren 10 bis 25 ng DNA ausreichend.

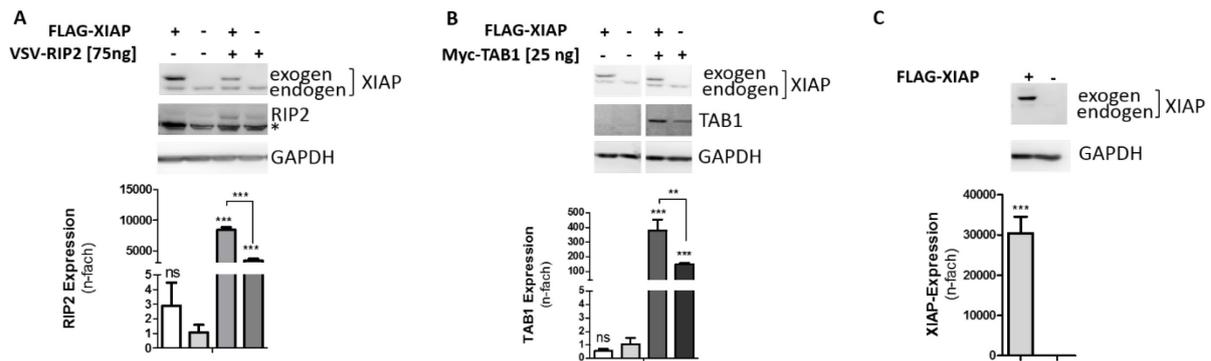


**Abb. 20 Rekonstitution von (A) RIP2 und (B) TAB1 in Knock Out Klonen der Zelllinie HCT116.** Es wurden verschiedene Mengen der RIP2 bzw. TAB1-Plasmid-DNA transfiziert um die optimale DNA-Menge zu bestimmen, bei der die entsprechende mRNA wieder auf einem wildtypischen Niveau exprimiert wird. Es wurde eine Gesamt-DNA-Menge von 800 ng eingesetzt. Die Ziel-DNA wurde in Mengen von 10; 25; 75; 100 und 200 ng transfiziert. Die Differenz wurde durch einen mock-Vektor (myc-LV) ausgeglichen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode nach Livak et al. (Livak et al. 2001), n=1

Aufgrund dieser Vorversuche wurden die zu verwendenden Plasmid-DNA-Mengen auf 75 ng für die Rekonstitution von RIP2 und auf 25 ng für die Rekonstitution von TAB1 in den entsprechenden Knock Out Klonen festgelegt.

Um den Einfluss der Interaktion zwischen XIAP und RIP2 sowie zwischen XIAP und TAB1 bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu überprüfen, wurden parallel zur Rekonstitution der Knock Outs 600 ng einer XIAP-Plasmid-DNA cotransfiziert. Dies führte zu einer starken XIAP-Überexpression in den jeweiligen Zellen, die auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen wurde (Abb. 21). Die Expression der rekonstituierten Proteine RIP2 (Abb. 21 A), TAB1 (Abb. 21 B) und XIAP (Abb. 21 C) wurden sowohl mittels qRT-PCR als auch mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft.

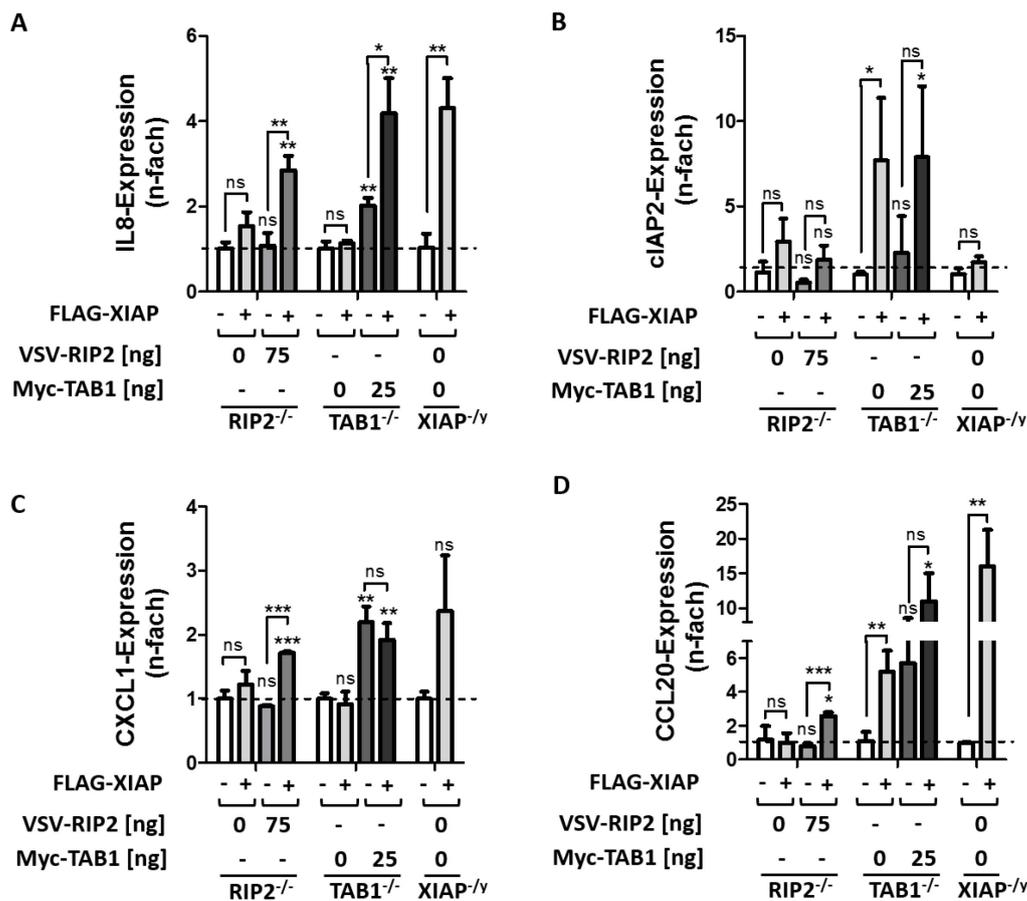
Um die RIP2- bzw. TAB1-Abhängigkeit der XIAP-induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung quantitativ zu verifizieren, wurde die Expression der NF- $\kappa$ B-Zielgene IL8, cIAP2, CXCL1, und CCL20 mittels qRT-PCR bestimmt.



**Abb. 21 Rekonstitution von RIP2 bzw. TAB1 und gleichzeitige Überexpression von XIAP in HCT116-Zellen.** (A) Expressionskontrolle von (A) RIP2 in HCT116 RIP2<sup>-/-</sup>, (B) TAB1 in HCT116 TAB1<sup>-/-</sup>, und (C) XIAP in HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>, sowie die Expressionskontrolle der XIAP-Überexpression in den jeweiligen Zellen auf Protein- und RNA-Ebene. Die qRT-PCR-Ergebnisse wurden mit Hilfe der 2<sup>-ΔΔCT</sup>-Methode ausgewertet und zeigen die n-fache Expression in Bezug auf die jeweils unbehandelten Zellen. p = 0,05

Die Expression von IL8 (Abb. 22A) konnte nach der Rekonstitution von RIP2 bzw. von TAB1 und gleichzeitiger XIAP-Überexpression stimuliert werden. Im rekonstituierten RIP2<sup>-/-</sup>-Klon mit XIAP-Überexpression stieg die IL8-Expression um das 2,85-fache (p = 0,001), nach der Rekonstitution von TAB1 war sie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen um das 4,18-fache (p = 0,003) erhöht. Die alleinige XIAP-Überexpression führte in den verschiedenen Knock Out Klonen zu keinem signifikanten Anstieg der IL8-Expression im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Zellen.

Auch die verstärkte Expression von CXCL1 (Abb. 22C) konnte nur in Kombination mit einer XIAP-Überexpression und der Rekonstitution von RIP2 (1,72-fach, p = 0,0006) detektiert werden. Ferner zeigten die Ergebnisse, dass das Vorhandensein von TAB1 in den Zellen für die CXCL1-Expression nötig war. Hierbei war auffällig, dass die alleinige Rekonstitution zu einem signifikanten Anstieg der CXCL1-Expression führte (p = 0,001). Die gleichzeitige Überexpression von XIAP in den Zellen führte zu keinem weiteren Anstieg der CXCL1-Expression (p = 0,004).



**Abb. 22 RNA-Expression der XIAP-abhängigen NFκB-Zielgene nach Rekonstitution und paralleler XIAP-Überexpression.** (A) IL8, (B) cIAP2, (C) CXCL1, (D) CCL20, (E) IκBα. Die n-fache Expression der mRNA wurde mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ermittelt.  $p=0,05$

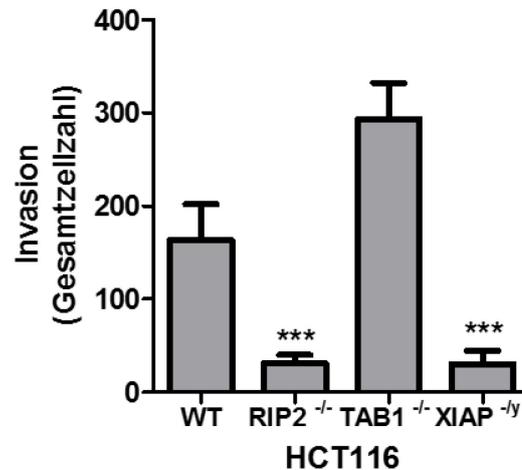
Der Einfluss der Interaktion zwischen RIP2 und XIAP wurde weiterhin durch die Messung der CCL20-Expression (Abb. 22D) unterstützt. Hier zeigte sich eine signifikante Steigerung der Genexpression erst nach der RIP2-Rekonstitution und gleichzeitiger XIAP-Überexpression. Diese war um das 2,58-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht ( $p = 0,043$ ). Im TAB1<sup>-/-</sup>-Klon war jedoch bereits die alleinige XIAP-Überexpression ausreichend um die CCL20-Expression zu stimulieren und um das 5,19-fache zu erhöhen ( $p = 0,014$ ). Eine ähnlich starke Erhöhung gab es auch nach der Rekonstitution von TAB1 ohne zusätzliche XIAP-Stimulation (5,7-fach,  $p = 0,053$ ).

Bei der Kontrolle der cIAP2-Expression (Abb. 22B) im RIP2<sup>-/-</sup>-Klon konnte keine signifikant verstärkte Expression nach der Rekonstitution von RIP2 und gleichzeitiger XIAP-Überexpression festgestellt werden. Im TAB1<sup>-/-</sup>-Klon kam es hingegen bereits nach alleiniger XIAP-

Überexpression ohne TAB1-Rekonstitution zu einer starken cIAP2-Expression (7,69-fache Expression,  $p = 0,035$ ). Die zusätzliche Rekonstitution von TAB1 zeigt jedoch keinen weiteren verstärkenden Effekt auf die cIAP2-Expression (7,89-fache Expression,  $p = 0,046$ ). Aufgrund der hohen Standardabweichungen während dieser Messung kann keine definitive Aussage über den Effekt gemacht, sondern nur eine Tendenz festgestellt werden.

#### **4.10 Vergleich der Invasionsfähigkeit zwischen Knock Out und wildtypischen Zellen im Boyden Chamber Assay**

Da durch XIAP über eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B Metastasierung induziert wird (Mehrotra et al. 2010) und die vorliegende Arbeit zeigen konnte, dass XIAP-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung von RIP2 und teilweise von TAB1 abhängig war, sollte nun die Invasionsfähigkeit des RIP2<sup>-/-</sup> Klons bzw. TAB1<sup>-/-</sup>-Klons mit der Invasivität des HCT116 (SIB) Wildtyps verglichen werden. Dazu wurde ein Boyden-Chamber-basierter Invasionsassay durchgeführt. Für jeden Klon wurden drei Invasionskammern in jeweils drei unabhängigen Versuchen ausgewertet und anschließend die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Hierbei zeigte sich, dass die Invasivität bei Zellen mit RIP2 Knock Out deutlich reduziert war. Die Anzahl der wildtypischen invadierten Zellen lag im Mittel bei 163, die des RIP2<sup>-/-</sup>-Klons bei 29 ( $p = 0,0006$ ). Für die TAB1<sup>-/-</sup>-Zellen konnte in keinem Versuch eine verminderte Invasionsfähigkeit beobachtet werden. Im dargestellten Versuch lag die Anzahl invadierter Zellen bei 259 (Mittelwert) ( $p = 0,0722$ ) (Abb. 23). Hier gab es keinen signifikanten Unterschied zur wildtypischen Kontrolle. Als Negativkontrolle diente der HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>-Klon. Hier lag die Anzahl der invadierten Zellen im Mittel bei 44 Zellen ( $p = 0,0007$ ).



**Abb. 23 Überprüfung der Invasionsfähigkeit von HCT116 nach einem genetischen Knock Out von RIP2, TAB1 oder XIAP.** Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und die invadierten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Invasion des RIP2<sup>-/-</sup>-Klons war signifikant reduziert ( $p = 0,0006$ ). Hingegen wies der TAB1<sup>-/-</sup>-Klon keinen signifikanten Unterschied zur wildtypischen Zelllinie auf ( $p = 0,0722$ ). Auch die Invasivität des XIAP<sup>-/-</sup>-Klons war im Vergleich zur wildtypischen Zelllinie signifikant reduziert ( $p = 0,0007$ ). Es wurden jeweils drei Invasionskammern pro Zelllinie eingesetzt.

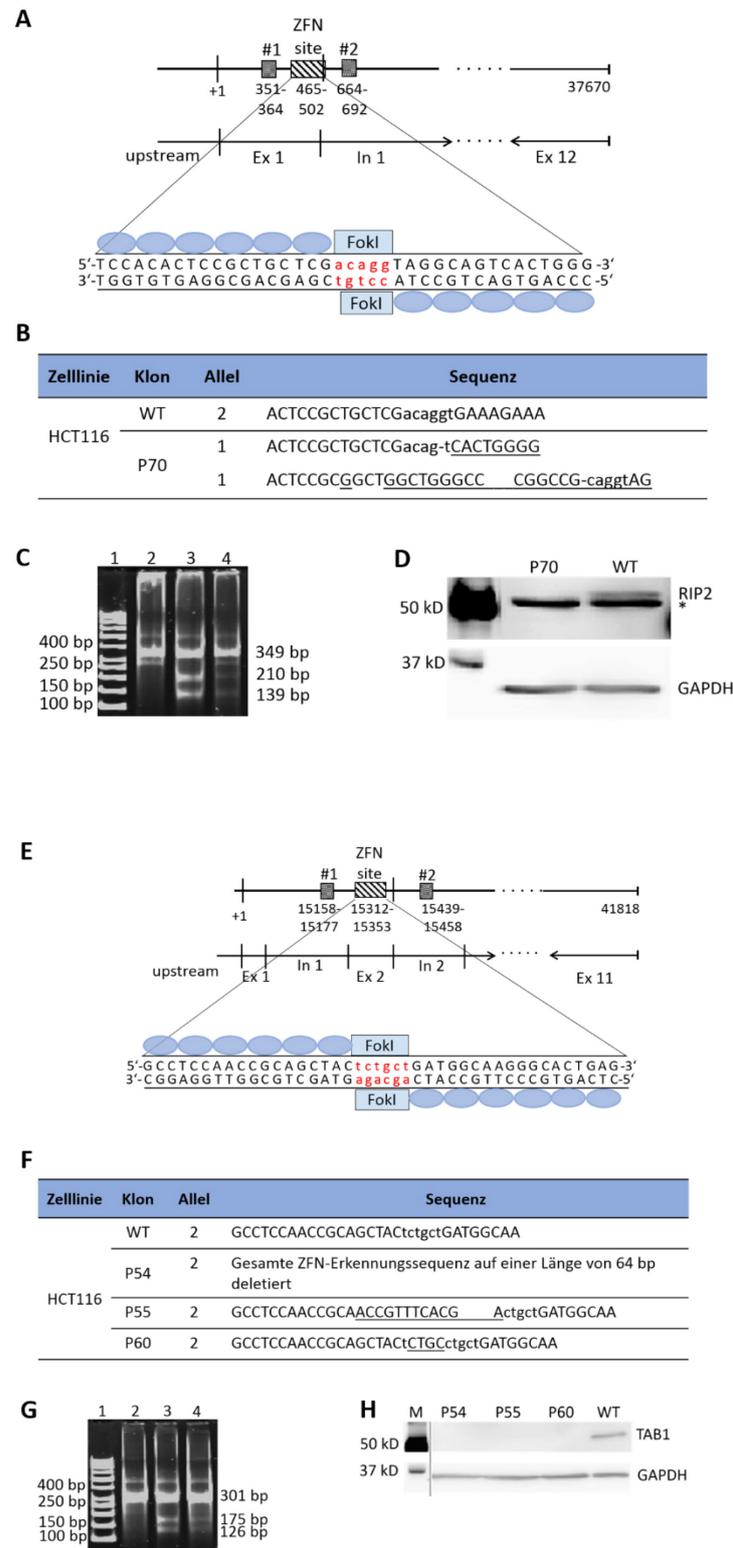
#### 4.11 Generierung und Etablierung weiterer RIP2<sup>-/-</sup>- und TAB1<sup>-/-</sup>-Klone

Um die Interaktion zwischen XIAP und RIP2 sowie TAB1 zu untersuchen, musste für die folgenden Versuche eine stabile XIAP-Überexpression in HCT116 Knock Out Klonen hergestellt werden. Die bisher verwendeten RIP2<sup>-/-</sup> und TAB1<sup>-/-</sup> Klone P5.6 bzw. P19 besaßen aus einer früheren Behandlung eine Neomycin-Resistenz. Diese ist bei der stabilen Transfektion des Vektors pEBB-FLAG-XIAP jedoch nötig um eine Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen vornehmen zu können. Daher mussten neue RIP2- und TAB1-Knock Out Klone generiert werden, die keine bereits vorhandene Neomycin-Resistenz besaßen. Die Zelllinie HCT116 WT wurde mit der Plasmid-DNA für RIP2 bzw. TAB1-spezifische ZFN transfiziert (Abb. 24A + E). Die Generierung der Knock Out Klone erfolgte dann wie in Kapitel 3.3.9 beschrieben. Die Aktivitätskontrolle der ZFN wurde durch den CEL-I-Verdau überprüft und fiel positiv für alle Nukleasen aus (Abb. 24C + F).

Nach der Einzelzellablage standen folgende Klone für weitere Versuche zur Verfügung: Der RIP2<sup>-/-</sup>-Klon P70, sowie die TAB1<sup>-/-</sup>-Klone P54, P55 und P60.

Der RIP2<sup>-/-</sup>-Klon besaß zwei verschiedene Mutationen: Ein Allel enthielt eine Deletion eines Guanins in der ZFN-Schnittstelle (Abb. 24B). Dies war die gleiche Mutation, die der zuvor generierte Knock Out Klon P5.6 aufwies. Durch diese Mutation konnte keine intakte mRNA gebildet werden, da die dort vorhandene Spleißdonorstelle nicht mehr intakt war. Das zweite Allel besaß eine Insertion eines Teils des cotransfizierten Donor-Vektors. Diese 166 bp lange Sequenz beinhaltete ein 87 bp langes Segment des wildtypischen RIP2 Gens, sowie ein 79 bp langes Segment des sich anschließenden Donor-Vektor-Rückgrats. Hier wurde eine mRNA transkribiert, jedoch kein Protein translatiert (Abb. 24D).

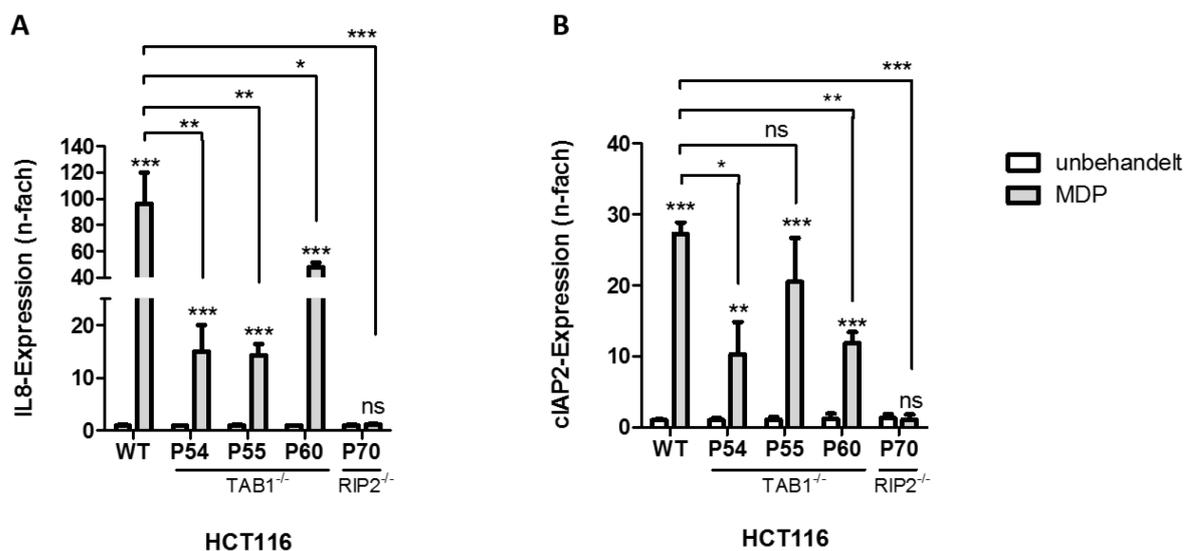
Der TAB1<sup>-/-</sup>-Klon P54 besaß eine homozygote Deletion von 64 Basenpaaren innerhalb des Exons 2. Hierdurch konnte ausschließlich eine verkürzte mRNA gebildet werden. TAB1<sup>-/-</sup>-Klon P55 enthielt eine Insertion eines großen DNA-Fragments aus dem cotransfizierten Donor-Vektor-Rückgrats. In die Gensequenz des TAB1<sup>-/-</sup> Klons P60 wurden vier Basenpaare innerhalb der Schnittsequenz der ZFN inseriert, was zu einer Leserasterverschiebung führte (Abb. 24F). Alle TAB1<sup>-/-</sup>-Klone bildeten eine mRNA, aus der jedoch keine Proteinsequenz entstehen konnte (Abb. 24H).



**Abb. 24 Schema der Generierung von genetischen Knock Out Klonen der Zelllinien HCT116.** Darstellung des genetischen RIP2- (A-D) bzw. TAB1- (E-H) Knock Outs in HCT116. (A+E) Schematische Darstellung der RIP2 bzw. TAB1-spezifischen Nuklease-Schnittstellen, sowie deren Sequenzveränderungen (B+F) innerhalb der verschiedenen Klone. (C+G) Nachweis der ZFN-Nuklease-Aktivität mittels Cell-Verdau und anschließender PCR. 1= DNA-Leiter, 2 = HCT116, 3= Positivkontrolle WT, 4= ZFN-Plasmid-DNA + Donor. (D+H) Der Knock Out wurde zudem auf Proteinebene mittels Western Blot verifiziert.

#### 4.12 Funktionalitätskontrolle der neu generierten Klone nach MDP-Stimulation mittels qRT-PCR und Western Blot

Die Funktionalität der generierten Knock Outs wurde mittels qRT-PCR überprüft. Die verschiedenen Klone sowie die wildtypische Zelllinie wurden für 3 Stunden mit MDP stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus jedem Ansatz isoliert. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der NF $\kappa$ B-Zielgene IL8 und cIAP2 untersucht. Es zeigte sich, dass die IL8-Expression nach MDP-Stimulation in wildtypischen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um das 96-fache anstieg. Im Gegensatz dazu blieb die IL8-Expression im RIP2<sup>-/-</sup>-Klon P70 nach MDP-Stimulation aus ( $p = 0,0004$ ). In den TAB1<sup>-/-</sup>-Klonen P54 und P55 stieg die IL8-Expression nach Stimulation um das 15,05- ( $p = 0,0014$ ) bzw. 14,27-fache ( $p = 0,0007$ ) an. Im TAB1<sup>-/-</sup>-Klon P60 war die IL8-Menge nach MDP-Zugabe 47,92-fach ( $p = 0,0066$ ) erhöht. Im Vergleich zur IL8-Expression im Wildtyp war die Expression nach MDP-Stimulation in allen Knock Out Klonen signifikant vermindert (Abb. 25A).

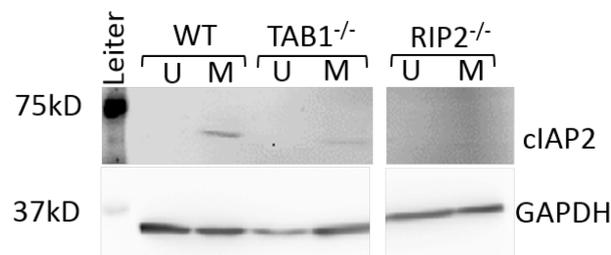


**Abb. 25 Expressionskontrolle der NF- $\kappa$ B-Zielgene IL8 und cIAP2 in neu generierten HCT116 Knock Out Zellen.** Die verschiedenen Klone (TAB1<sup>-/-</sup>-Klone P54, P55, P60 und RIP2<sup>-/-</sup>-Klon P70) wurden für drei Stunden mit MDP stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Expression von (A) IL8 und (B) cIAP2 mittels qRT-PCR bestimmt. Als Positivkontrolle diente die wildtypische HCT116 Zelllinie.

Ähnliche Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigten sich für cIAP2. Hier war die RNA-Expression in wildtypischen HCT116 nach MDP-Stimulation 27,25-fach ( $p < 0,0001$ ) erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte der RIP2 Knock Out keine Expressionssteigerung von cIAP2 ( $p = 0,0001$ ). Die cIAP2-Expression in den verschiedenen TAB1<sup>-/-</sup>-Klonen zeigte hingegen

eine Erhöhung um das 10,28- bis 20,47-fache, die jedoch weiterhin unterhalb der des Wildtyps lag (Abb. 25B). Aufgrund der hohen Standardabweichung in den  $TAB1^{-/-}$ -Klonen P54 und P55 war die cIAP2-Expression hier im Vergleich zu den behandelten wildtypischen Zellen nicht bzw. schwach signifikant vermindert (Klon P54:  $p = 0,0167$ ; Klon P55:  $p = 0,2463$ ).

Um die Inaktivierung des NOD-Signalwegs durch die verschiedenen Gen-Knock Outs auch auf Proteinlevel nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Für die weiteren Versuche wurden der  $RIP2^{-/-}$ -Klon P70 und der  $TAB1^{-/-}$ -Klon P55 ausgewählt, da diese Klone auf RNA-Ebene die geringste Stimulationsfähigkeit zeigten. Ein Western Blot mit Proteinlysaten der Klone  $RIP2^{-/-}$  P70 und  $TAB1^{-/-}$  P55 zum Nachweis der cIAP2-Expression auf Proteinlevel bestätigte die verminderte cIAP2-Expression nach einer MDP-Stimulation der Zellen. Dieses Ergebnis bestätigte die bereits auf RNA-Ebene nachgewiesene Aktivität der genetischen Knock Outs. Als Positivkontrolle wurden hier wieder Proteinlysate des HCT116 Wildtyps mitgeführt (Abb. 26).

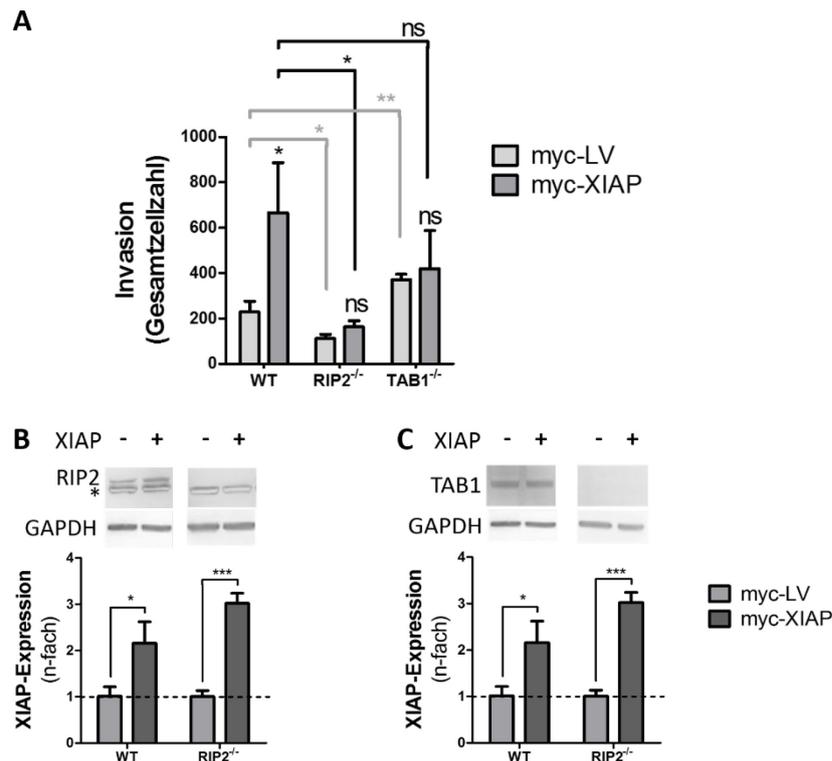


**Abb. 26 Expressionskontrolle von cIAP2 auf Proteinebene in Knock Out Klonen.** Es wurden jeweils 20  $\mu$ g der Proteinlysate der wildtypischen HCT116 Zelllinie, sowie des  $TAB1^{-/-}$ -Klon P55 und des  $RIP2^{-/-}$ -Klons P70 auf das Proteingel aufgetragen. U = unbehandelt, M = MDP-behandelt

#### 4.13 Etablierung stabil XIAP-überexprimierender HCT116 Zellen und Untersuchung der XIAP-induzierten Invasion in Abhängigkeit von RIP2 und TAB1 mittels Boyden Chamber Assay

Zur stabilen Überexpression von XIAP wurden die Zelllinien HCT116 WT, HCT116  $RIP2^{-/-}$ -Klon P70 und HCT116  $TAB1^{-/-}$ -Klon P55 mit dem der pcDNA3.1-6myc-XIAP-Plasmid (myc-XIAP) nach der Standardmethode transfiziert. Als mock-Kontrolle wurde der pcDNA3.1-6myc-Leervektor (LV) transfiziert. Um die Bedeutung der für die Invasion von Tumorzellen

benötigten Interaktion zwischen RIP2 und XIAP bzw. zwischen TAB1 und XIAP darzustellen, wurden die transfizierten Knock Out Klone sowie die wildtypischen Zellen in einen Invasionsassay eingebracht. Als Kontrolle dienten die jeweils mit einem Leervektor transfizierten Zellen. Die Experimente zeigten, dass die stabile Überexpression von XIAP in wildtypischen Zellen zu einem signifikanten und starken Anstieg des Invasionspotenzials führte (Abb. 27A).



**Abb. 27 XIAP-abhängige Invasivität von HCT116 WT, sowie RIP2<sup>-/-</sup> und TAB1<sup>-/-</sup> Klonen im Boyden-Chamber-Invasion-Assay System.** (A) Gesamtzellzahl der invadierten Zellen. Die Zellkerne der invadierten Zellen wurden mittels DAPI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 20-fachen Vergrößerung ausgezählt. Es wurde jeweils die gesamte Filtermembran ausgezählt. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen. (B+C) XIAP-Expressionskontrolle mittels qRT-PCR und Proteinexpressionskontrolle von RIP2 (B) und TAB1 (C) mittels Western Blot Analyse. Western Blot: \* = unspezifische Bande, qRT-PCR: Signifikanz  $p = 0,05$

Im Mittel invadierten 229 mit dem Leervektor transfizierte Zellendurch die Membran des Assays. Nach Überexpression von XIAP stieg die Zahl auf 666 invadierte Zellen. Damit stieg die Zahl der invadierten Zellen um das 2,91-fache ( $p = 0,0005$ ) an. Hingegen konnte in RIP2-Knock Out Zellen kein signifikanter Anstieg der Invasivität nach XIAP-Überexpression bestimmt werden. Hier waren im Mittel 112 mit Leervektor transfizierte Zellen und 163 Zellen

mit XIAP-Überexpression invadiert. Auch war die Gesamtzellmenge im Vergleich zu der entsprechenden wildtypischen Kontrolle signifikant verringert. Zellen mit TAB1 Knock Out besaßen interessanterweise ein größeres Invasionspotenzial als die wildtypische Kontrolle, jedoch konnte die Zahl invadierter Zellen durch eine XIAP-Überexpression nicht mehr signifikant gesteigert werden (370 zu 418 invadierte Zellen). Die Abbildungen Abb. 27B + C stellen die XIAP-Expression zum Zeitpunkt der Durchführung des Invasionsassays dar. So war XIAP im Wildtyp 2,2-fach ( $p = 0,0169$ ) überexprimiert. Im RIP2<sup>-/-</sup>-Klon war XIAP 3-fach ( $p = 0,0002$ ), im TAB1<sup>-/-</sup>-Klon 1,7-fach ( $p = 0,0095$ ) im Vergleich zur entsprechenden Leervektor-Kontrolle exprimiert. Die Knock Out Kontrollen auf Proteinebene zeigt keine Proteinexpression von RIP2 und TAB1 in den entsprechenden Klonen.

## 5 Diskussion

Darmkrebs ist die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Europa und den USA (NCI 2006-2012, ACS 2014, Kaatsch et al. 2015). Während frühe Stadien des Kolonkarzinoms gut durch eine vollständige Resektion des Tumors behandelt werden können, ist die Behandlung bereits metastasierter Tumore kompliziert, da weiterhin auch noch Jahre nach der erfolgreichen Resektion des Primärtumors Rezidive und Metastasen entstehen können, welche die Haupttodesursache der Patienten mit der Diagnose Kolonkarzinom sind (Fidler 1990). In der Regel werden neben der chirurgischen Resektion systemische Therapien wie eine Radio- oder Chemotherapie angewandt (Pox et al. 2013). In den letzten Jahren hat die Verwendung spezifischer, gegen den Tumor gerichteter Antikörper oder spezieller Inhibitormoleküle, sogenannte „Small Molecule“-Inhibitoren, größere Bedeutung bei der Behandlung der Patienten mit unterschiedlichsten Tumorentitäten gewonnen (Silver et al. 2009, Hojjat-Farsangi 2014, Mulet-Margalef et al. 2016). Diese Inhibitoren greifen in die Signalwege der Tumorzellen ein und können so die Tumorprogression vermindern. Jedoch gibt es bis heute keine zugelassenen Small Molecule Inhibitoren für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms. Um solche molekularen Zielstrukturen zu identifizieren, ist zunächst unbedingt eine detaillierte Untersuchung der im Tumor ablaufenden Signalwege, die die Progression und Metastasierung regulieren, nötig.

Im Kolonkarzinom besitzen die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) eine wichtige Funktion bei der Regulation der angeborenen Immunantwort. Sie erkennen pathogen-assoziierte molekulare Muster auf den Oberflächen eindringender Bakterien oder Viren und stimulieren eine erste Immunreaktion durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Takeuchi et al. 2010). Die nun sezernierten Chemokine und proinflammatorischen Zytokine fördern neben der Bekämpfung der Eindringlinge die Angiogenese, Migration und Proliferation der betroffenen Zellen, wodurch es zur Entstehung von Tumoren kommen kann. Während der letzten Jahre konnte die Bedeutung der TLRs als Onkogene des Kolonkarzinoms manifestiert werden (Tanaka et al. 2005, Cammarota et al. 2010).

Eine weitere Proteingruppe, die sogenannten „Inhibitor of Apoptosis Proteine“ (IAP) spielen ebenfalls eine unerwartete Rolle in entzündlichen Prozessen. Die Proteine cIAP1 und

clAP2 sowie das X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) besitzen nicht nur einen regulatorischen Einfluss auf die Apoptose, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. So fungiert XIAP beispielsweise als E3-Ligase innerhalb des NOD-Signalwegs. Die sogenannten NOD-Rezeptoren sind eng verwandt mit den TLRs und liegen zytosolisch vor. Es konnte gezeigt werden, dass XIAP innerhalb des NOD-Signalwegs zur Signaltransduktion und der damit einhergehenden NF- $\kappa$ B-Aktivierung benötigt wird (Yamaguchi et al. 1999, Hofer-Warbinek et al. 2000, Krieg et al. 2009). Da XIAP auch als prognostischer Faktor im Kolonkarzinom gilt, ist die Untersuchung des NOD-Signalwegs innerhalb dieser Tumorentität von besonderem Interesse.

Um die Relevanz der ebenfalls in diesem Signalweg involvierten Proteine RIP2 und TAB1 im Zusammenspiel mit XIAP auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B speziell im Kolonkarzinom detailliert zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit zunächst die Expression der im NOD-Signalweg beteiligten Proteine in Gewebeproben von Patienten mit Kolonkarzinom überprüft. Die Proteinexpression wurde im Anschluss mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten korreliert und Proteinexpressionsstärken zwischen Tumor- und Normalgewebe verglichen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden dann die molekularen Mechanismen der XIAP-vermittelten Signaltransduktion innerhalb des NOD-Signalwegs mittels genetischer Knock Outs in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 detailliert untersucht um einen möglichen Angriffspunkt für therapeutische Maßnahmen des Kolonkarzinoms zu evaluieren.

## **5.1 Einfluss der Proteine des NOD-Signalwegs auf die Tumorprogression bei Kolonkarzinompatienten**

Um den Einfluss der NOD-Rezeptoren NOD1 und NOD2 auf die Progression maligner Tumoren des Kolons zu untersuchen, wurden zunächst immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Liu und Kollegen zeigten durch die Analyse einer Datenbank des Onlineportals „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA), dass beide Rezeptoren in Kolonkarzinomen verstärkt exprimiert wurden. Jedoch konnten sie diese Beobachtung bei der Analyse einer eigenen FFPE-Kohorte nicht verifizieren (Liu et al. 2015). Auch in der hier vorliegenden Arbeit zeigte die immunhistochemische Färbung von Tumor- und Normalgewebeproben von 273 Kolonkarzinom-Patienten eine signifikant erhöhte Expression des NOD2-Rezeptors

( $p = 0,0001$ ) im Tumorgewebe im Vergleich zu den untersuchten Normalgeweben (Abb. 9 B). Dieses Ergebnis wurde auch im direkten Vergleich der Gewebeproben jeweils eines Patienten unterstützt ( $p = 0,0001$ ) (Abb. 10 B). Jedoch besaß die Expressionsstärke des NOD2-Rezeptors keinen Einfluss auf die Gesamtüberlebensdauer der Patienten des untersuchten Kollektivs (Abb. 11). Auch die Expression des NOD1-Rezeptors sowie des TAB1-Proteins zeigten keine prognostische Relevanz auf. Gleichzeitig konnte für NOD1 keine verstärkte Rezeptorexpression in tumorösem Gewebe beobachtet werden, die TAB1-Expression in Tumorgewebe war hingegen signifikant erhöht (Abb. 9 + Abb. 10).

Der Vergleich der Stärke der RIP2-Expression im Tumor- und Normalgewebe zeigte deutlich, dass RIP2 in Tumorzellen verstärkt exprimiert wird und zudem einen Einfluss auf das Überleben der Patienten besitzt. Patienten mit einer geringen RIP2-Expression wiesen im Durchschnitt ein verlängertes Überleben um vier Monate auf (Tab. 22). Eine Studie unter Einbeziehung der Daten des „Cancer Genome Atlas“ und öffentlich zugänglicher Expressionsarray-Daten aus trippel-negativen Brustkrebsproben konnte ebenfalls den negativen Effekt einer starken RIP2-Expression auf das progressionsfreie Überleben nachweisen. Jedoch konnten die Autoren hier keine signifikanten Korrelationen bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten in Verbindung mit einer verstärkten Expression von RIP2 im Mammakarzinom erkennen (Singel et al. 2014).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte insbesondere für die XIAP-Expression im Tumorzentrum, nicht aber für die der Invasionsfront, ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,013$ ) in der Stärke der Proteinexpression in Korrelation mit dem Gesamtüberleben erkannt werden (Abb. 11). Ähnliche Beobachtungen machte die Gruppe um Xiang in Patientenproben kolorektaler Karzinome. Auch sie konnte eine Korrelation zwischen einer starken XIAP-Expression und der Gesamtüberlebensrate der erkrankten Patienten nachweisen (Xiang et al. 2009). 2011 zeigten Lee und Kollegen zudem, dass eine hohe XIAP-Expression in Zellen des Kolonkarzinoms mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben vergesellschaftet war ( $p=0,041$ ). Jedoch konnte hier kein Einfluss einer verstärkten XIAP-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten erkannt werden (Lee 2011). Des Weiteren gibt es eine Vielzahl wissenschaftlicher Untersuchungen, die die in der hier vorliegenden Dissertationsschrift gemachten Beobachtungen bezüglich der erhöhten XIAP-Expression in tumorösem

Gewebe und dem Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten unterstützen. Dabei finden sich diese Erkenntnisse in verschiedenen Tumorentitäten (Kluger et al. 2007, Burstein et al. 2008, Werner et al. 2016).

Eine multivariate Analyse der verfügbaren klinikopathologischen Variablen sowie XIAP und RIP2 verdeutlichte zudem den Einfluss von XIAP als prognostischen Faktor für das Kolonkarzinom. Für RIP2 konnte kein signifikanter Einfluss in der multivariaten Analyse bestätigt werden, obwohl die Ergebnisse der univariaten Analyse für RIP2 einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigten.

Die in dieser Arbeit erhaltenen immunhistologischen Daten unterstützen und erweitern bereits publizierte Analysen in Bezug auf den Einfluss der Expression des Rezeptors NOD2 und XIAP auf die Tumorprogression und das Gesamtüberleben der Patienten. Des Weiteren wurde deutlich, dass RIP2 als ein möglicher prognostischer Faktor für das Kolonkarzinom in Betracht gezogen werden kann, da es im Tumorgewebe verstärkt exprimiert wird und Einfluss auf das Überleben der Patienten nimmt. Eine detaillierte molekularbiologische Analyse des NOD-Signalwegs und dessen Einfluss auf die Tumorprogression im Kolonkarzinom ist daher von großem Interesse.

## **5.2 Bestimmung der XIAP-abhängigen NF- $\kappa$ B-Zielgene nach Stimulation des NOD-Signalwegs in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien**

Mit Hilfe eines Oligonukleotid-Arrays sollten nun die NF- $\kappa$ B-Zielgene detektiert werden, deren Transkription innerhalb des NOD-Signalwegs und in Abhängigkeit von XIAP differentiell reguliert wurden. Dazu wurde die Genexpression der Zelllinie HCT116 WT (SIB) und XIAP<sup>-/-</sup> nach Stimulation mit den NOD-Rezeptorliganden MDP bzw. DAP mit Hilfe des Microarrays analysiert. Durch eine KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) -Analyse der erhaltenen Rohdaten wurde deutlich, dass die MDP induzierte Stimulation des NOD2-Signalwegs Gene aktivierte, die in insgesamt 17 unterschiedlichen Signalwegen aktiv waren (Abb. 12C+D). Im Gegensatz dazu wurden durch die Stimulation des NOD1-Signalwegs mittels DAP lediglich sieben verschiedene Signalwege stimuliert (Abb. 12A+B). Erwartungsgemäß waren die meisten Gene in Chemokin-, interessanterweise aber auch in Krebs-assoziierten Signalwegen aktiv. Des Weiteren wurden u.a. Apoptose-induzierende Signalwege sowie

NOD-ähnliche Rezeptor-Signalwege stimuliert. Insbesondere nach der MDP-Stimulation wurden auch MAPK-Signalwege aktiv.

Die detaillierte Auswertung der XIAP-abhängigen Genexpression zeigte deutlich, dass die am stärksten differentiell regulierten Gene *IL8*, *CXCL1*, *CCL20* und *BIRC3/cIAP2* waren. Dabei waren diese nach MDP-Stimulation um ein Vielfaches stärker exprimiert als nach DAP-Stimulation (Abb. 12B+D). Eine differentielle Regulierung von *CCL20* und *BIRC3/cIAP2* konnte im Microarray sogar ausschließlich nach der Stimulation der HCT116-Zellen mit MDP nachgewiesen werden. Für diese Arbeit waren die NF- $\kappa$ B-Zielgene relevant, die in XIAP-Abhängigkeit Funktionen in migratorischen, invasiven oder angiogenetischen Aktivitäten einer Tumorzelle besaßen. Daher wurden die in dieser Gruppe am stärksten regulierten Gene *IL8*, *CXCL1*, *CCL20* und *BIRC3/cIAP2* für die weiteren Untersuchungen als „Read Out System“ gewählt. Interleukin 8 (IL8) besitzt eine Vielzahl von Funktionen und wurde zunächst im malignen Melanom als Komponente der Tumorprogression und Metastasierung bestimmt (Schadendorf et al. 1993). Es wird zudem in Verbindung mit der Induktion von Angiogenese, Migration und EMT gebracht (Brew et al. 2000, Bates et al. 2004, Ning et al. 2011). Auch das Chemokin CXCL1 besitzt Einfluss auf die Proliferation, Invasivität und Angiogenese verschiedener Tumorentitäten (Wang et al. 2006, Vandercappellen et al. 2008, Cheng et al. 2011, Miyake et al. 2013). Eine starke CXCL1-Expression im Kolonkarzinom ist zudem mit einem reduzierten Gesamtüberleben der Patienten korreliert (Oladipo et al. 2011, le Rolle et al. 2015). Als weiteres Chemokin wurde CCL20 ausgewählt. Es wird in Zusammenhang mit entzündlichen Darmerkrankungen gebracht. Neuere Untersuchungen zeigen zudem dessen Aktivierung durch Toll-like Rezeptoren (TLR) und somit einen Einfluss in entzündlichen Prozessen des Gastrointestinaltrakts (Sugiura et al. 2013). CCL20 besitzt zusammen mit seinem Rezeptor CCR6 eine wichtige Funktion bei der Organisation von Strukturen des intestinalen Immunsystems (Williams 2006). Darüber hinaus konnte in zwei neueren Studien gezeigt werden, dass CCL20 sowohl EMT als auch Metastasierung, Proliferation und Invasion von Zellen stimuliert (Cheng et al. 2014, Ikeda et al. 2016).

cIAP2 wurde als Zielgen ausgewählt, da es wie XIAP ein Mitglied der IAP-Familie ist und modulierende Funktionen sowohl innerhalb des Zellzyklus (Jin et al. 2006) als auch während des Ablaufs apoptotischer Prozesse besitzt (Roy et al. 1997). Weiterhin ist es bei der

Signalweiterleitung innerhalb inflammatorischer Prozesse aktiv, in denen es als E3-Ubiquitin-Protein Ligase fungiert (Bertrand et al. 2009). Insbesondere aufgrund seiner XIAP-ähnlichen Funktion, der Ubiquitinierung von RIP2 innerhalb des NOD-Signalwegs, ist es für diese Arbeit als NF- $\kappa$ B-Zielgen interessant.

Für die Verifikation der Microarray-Ergebnisse wurden unterschiedliche Kolonkarzinom-Zelllinien, die sowohl aus Primärtumoren als auch aus Metastasen etabliert wurden, mit MDP und DAP stimuliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. 13). Die semi-adhärenenten Zelllinien Colo205 und Colo206F, die aus demselben Patienten stammen, zeigten die stärksten Reaktionen auf die Stimulationen. Beispielsweise stieg hier die IL8-Expression nach MDP-Stimulation um das 576-fache bei Colo205 und auf das 553-fache in der Zelllinie Colo206F an. Die Expression nach DAP-Stimulation fiel mit 29-facher bzw. 13-facher Expression weitaus geringer aus. Unter den adhärenenten Zelllinien zeigten LoVo und HCT116 sibli (SIB) die stärkste IL8-Expression nach MDP und DAP-Stimulation. Nach MDP-Zugabe stieg die Expression bei LoVo auf das 14-fache, nach DAP-Stimulation auf das 162-fache. Die Zelllinie HCT116 (SIB) exprimierte IL8 156-fach (MDP) und 39-fach (DAP). Ähnlich verhielten sich die unterschiedlichen Zelllinien bei der Expression der anderen Zielgene des untersuchten Panels. Die Ergebnisse des Microarrays für die vier ausgewählten XIAP-abhängigen NF- $\kappa$ B-Zielgene *IL8*, *CXCL1*, *CCL20* und *CIAP2* konnten anschließend mittels qRT-PCR auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Zusätzlich zu der Validierung mittels qRT-PCR konnte die Abhängigkeit der *CIAP2*-Expression von XIAP in der Zelllinie HCT116 auch auf Proteinebene verifiziert werden (Abb. 14). *CIAP2* wurde hier ausschließlich in wild-typischen, stimulierten Zellen heraufreguliert, nicht aber in Zellen mit XIAP Knock Out.

Die Auswertung und Interpretation der mittels Oligonukleotid-Array, Real Time PCR und Western Blot erhaltenen Ergebnisse zeigte eine deutliche Abhängigkeit der NF- $\kappa$ B-Zielgene *IL8*, *CXCL1*, *CCL20* und *BIRC3/CIAP2* von der XIAP-Aktivität innerhalb des NOD-Signalwegs. Somit konnte dieses Gen-Panel als valides Read-Out-System in weiteren Versuchen herangezogen werden, um die Aktivität von NF- $\kappa$ B zu überprüfen.

### 5.3 Etablierung von genetischen RIP2 und TAB1-Knock Outs in der Zelllinie HCT116

Um den Einfluss von RIP2 und TAB1 auf die XIAP-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in der Zelllinie HCT116 genauer zu untersuchen, wurden zunächst genetische Knock Out-Klone dieser Zelllinie hergestellt (Abb. 15 + Abb. 24). Es konnten jeweils mehrere Klone mit einem RIP2 oder einem TAB1-Knock Out etabliert werden. Dazu wurde die Zelllinien HCT116 Wildtyp (SIB) und HCT116 WT genutzt. Die Zelllinie HCT116 WT (SIB) diente als mock-Kontrolle des HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>-Klons und besaß ein zufällig inseriertes Knock Out Konstrukt. Dieses Konstrukt war im HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>-Klon gezielt in das Exon 2 des XIAP-Gens inseriert und führte zum Knock Out. Beide Zelllinien enthielten zudem eine Geneticin-Resistenz, die sich nicht auf die Funktionalität der Zelllinien auswirkte. Die Zelllinien wurden von Bert Vogelstein zur Verfügung gestellt (Cummins et al. 2004).

Der während des hier präsentierten Projekts etablierte RIP2<sup>-/-</sup>-Klon P5.6 enthielt eine Basendeletion in der Spleißsequenz des Exons 1, wodurch kein intaktes Protein mehr gebildet werden konnte. Der TAB1<sup>-/-</sup>-Klon P19 besaß eine Duplikation zweier Basen in Exon 2. Hierdurch kam es zu einer Leserasterverschiebung und infolgedessen zum Knock Out des Gens. Diese Knock Out Klone, die aus der Zelllinie HCT116 WT (SIB) hervorgingen, konnten aufgrund der Geneticin-Resistenz nicht für eine stabile XIAP-Überexpression verwendet werden, da hier Geneticin zur Selektion der XIAP-überexprimierenden Zellen verwendet werden sollte. Daher wurden für diese Versuche zunächst RIP2- und TAB1-Knock Out Klone in der Zelllinie HCT116 WT generiert. Hier entstanden die Knock Out Klone RIP2<sup>-/-</sup> Klon P70 sowie die TAB1<sup>-/-</sup>-Klone P54, P55 und P60. Der RIP2<sup>-/-</sup>-Klon P70 enthielt wie der RIP2<sup>-/-</sup>-Klon P5.6 eine Deletion eines Guanins am Ende des Exons 1 sowie die Insertion eines 166 bp langen DNA-Fragments an der gleichen Stelle des zweiten Allels. Der TAB1<sup>-/-</sup>-Klon P54 enthielt eine Deletion im Exon 2, während die Klone P55 und P60 jeweils Insertionen mehrerer Basen in Exon 2 aufwiesen. Die Expressionskontrollen mittels Western Blot zeigten wie erwartet keine RIP2- bzw. TAB1-Proteinexpression in allen generierten Knock Out Klonen, so dass die angestrebten Experimente zur Untersuchung eventuell veränderter Zellproliferation und Invasionsfähigkeit durchgeführt werden konnten.

#### 5.4 Nachweis der Spezifität des RIP2- bzw. TAB1-Knock Outs in HCT116 Kolonkarzinom-Zelllinien auf den NOD-Signalweg

Um die Spezifität des RIP2- und TAB1-Knock Outs für den NOD-Signalweg zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen Knock Out-Klone mit TNF $\alpha$  stimuliert. Durch die Behandlung der Zellen (Abb. 17) wurde deutlich, dass durch die Insertion der verschiedenen genetischen Knock Outs in die Zelllinie eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung weiterhin möglich war und die Knock Outs von RIP2, TAB1 und XIAP spezifisch in den NOD-Signalwegen wirken. Die IL8-Expression erreichte nach 60-minütiger Stimulation ihren Höhepunkt, während cIAP2 erst nach 360 Minuten am stärksten exprimiert war. Die Expressionsstärke war hierbei in wild-typischen sowie in RIP2<sup>-/-</sup> und TAB1<sup>-/-</sup>-Klonen ähnlich stark und wies keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Lediglich die IL8- und cIAP2-Expression im XIAP<sup>-/-</sup>-Klon wies eine stark erhöhte Expressionsrate auf. Die verstärkte Expression dieser Proteine legte die Vermutung nahe, dass diese Effekte auf Kompensationsmechanismen der Zelle zurückzuführen sein könnten. Einen Anhaltspunkt zeigte die Arbeitsgruppe um Harlin. Sie konnte in XIAP-defizienten Mäusen beobachten, dass bei einem Verlust von XIAP vermehrt die Proteine cIAP1 und cIAP2 exprimiert wurden (Harlin et al. 2001). Es gibt jedoch weitere Arbeiten mit cIAP1-, cIAP2- und XIAP-defizienten murinen und humanen Zellen, die keine kompensatorischen Mechanismen nachweisen konnten (Conze et al. 2005, Conte et al. 2006). Damit übereinstimmend sind Ergebnisse einer weiteren Arbeitsgruppe, die mittels Chip Microarray zeigte, dass ein Knockdown von XIAP in der Zelllinie HCT116 keinen kompensatorischen Effekt durch andere IAPs auslöst (Connolly et al. 2009). Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Experimenten mit MDP- und DAP-stimulierten HCT116 WT (SIB) und HCT116 XIAP<sup>-/-</sup>-Zellen konnte keine vermehrte cIAP2-Expression in den XIAP-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Daher hat die in der qRT-PCR gemessene stärkere cIAP2- und IL8-Expression in XIAP<sup>-/-</sup>-Zellen wahrscheinlich keinen kompensatorischen Grund, sondern besitzt eine andere Ursache, die mit der hier vorliegenden Datenlage nicht näher definiert werden kann. Hierzu müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

Die generelle Aktivität von NF- $\kappa$ B war durch die verschiedenen genetischen Knock Outs nicht beeinflusst. Dies zeigte eine TNF $\alpha$ -Stimulation der verschiedenen HCT116 (SIB)-Klone.

Hier konnte gezeigt werden, dass der Knock Out von XIAP, RIP2 oder TAB1 keinen Einfluss auf die generelle Aktivierbarkeit von NF- $\kappa$ B und dessen Zielgenen hat. Somit können die in den weiteren Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse auf Effekte der Inaktivierung des NOD-Signalwegs zurückgeführt werden.

### **5.5 Effekte des RIP2- und TAB1-Knock Outs auf die Signalweiterleitung innerhalb des NOD-Signalwegs und die damit verbundene Expression NF- $\kappa$ B-abhängiger Zielgene**

Durch die funktionelle Überprüfung der generierten HCT116 (SIB) Knock Out Klone durch NOD1- und NOD2-Überexpressionen sowie der Stimulation mit den Liganden MDP und DAP konnte bestätigt werden, dass die jeweiligen genetischen Knock Outs die Signalweiterleitung innerhalb der NOD-Signalwege unterbrechen (Abb. 16). Wie erwartet kam es durch den Knock Out von RIP2 zu einer vollständigen Störung der Signalkaskade. RIP2 fungiert hier als Aktivator des TAB/TAK-Komplexes, wodurch im weiteren Verlauf NF- $\kappa$ B aktiviert werden kann. Weder nach NOD-Rezeptor-Überexpression noch nach der Stimulation mit MDP oder DAP konnten erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivitäten gemessen werden. Auffällig war jedoch, dass sowohl die Überexpression der NOD-Rezeptoren als auch deren Stimulation mit rezeptorspezifischen Liganden MDP und DAP zu einer signifikant messbaren Verstärkung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in HCT116 TAB1<sup>-/-</sup>-Zellen führten. Aufgrund der vorliegenden Proteinexpressionskontrollen mittels Western Blot konnte die NF- $\kappa$ B-Aktivität nicht auf das Vorhandensein des TAB1-Proteins in den Zellen zurückgeführt werden, da dieses nicht mehr exprimiert wurde. Vielmehr war es wahrscheinlich, dass der Knock Out von TAB1 in der Zelllinie HCT116 zwar zu einer im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle verminderten NF- $\kappa$ B-Aktivität führte, jedoch die Signaltransduktion nicht vollständig unterbrechen konnte. Lu und Kollegen zeigten in der murinen Fibroblasten-Zelllinie MEF, dass der Knock-Down von TAB1 mittels siRNA in XIAP-überexprimierenden Zellen zu einer verminderten NF- $\kappa$ B-Aktivität führte, die sich auch nicht nach Steigerung der XIAP-Expression verstärkte. Diese Ergebnisse konnten die Interaktion von XIAP mit TAB1 als einen essentiellen Faktor in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B darstellen (Lu et al. 2007). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass das Fehlen von TAB1 für verschiedene Signalwege der inflammatorischen Immunantwort

wie den TNF- $\alpha$  oder IL-1 Signalweg unerheblich ist (Inagaki et al. 2008). Hier wurden nach Stimulation gleiche oder höhere NF- $\kappa$ B-Aktivitäten im Vergleich zu wildtypischen Zellen nachgewiesen (Shim et al. 2005). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit legen ebenfalls nahe, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität in TAB1<sup>-/-</sup>-Zellen nach Stimulation des NOD-Signalwegs weiterhin, wenn auch in einem geringeren Maße als im Wildtyp, ohne die Mitwirkung von TAB1 vermittelt werden kann. Ein Grund dafür könnte sein, dass TAB1 zwar dauerhaft an TAK1 gebunden und für die Erhaltung der Basalaktivität des Enzyms verantwortlich ist, es jedoch keinen direkten Einfluss auf die Aktivierung von TAK1 innerhalb einer Signalkaskade besitzt (Omori et al. 2012). Allerdings interagiert TAB1 auch direkt mit der BIR1-Domäne von XIAP (Lu et al. 2007), wodurch es TAK1 in direkte Nähe zu RIP2 und dem LUBAC-Komplex bringt (Krieg et al. 2010, Damgaard et al. 2012). Durch diese beiden Proteine bzw. Proteinkomplexe wird TAK1 dann mittels Phosphorylierung aktiviert. Durch das Fehlen von TAB1 ist es wahrscheinlich, dass der TAB1-TAK-Komplex nun nicht mehr aktiv durch die Bindung mit XIAP in die Nähe zu RIP2 und dem LUBAC-Komplex gebracht werden kann, wodurch im folgenden Verlauf die NF- $\kappa$ B-Aktivität in TAB1<sup>-/-</sup>-Zellen sinkt. Dass jedoch weiterhin eine, wenn auch verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivität in diesen Knock Out Zellen messbar ist, liegt wahrscheinlich an den TAK1-Adapterproteinen TAB2 und/oder TAB3. TAK1 liegt zu meist im Heterotrimer mit TAB1 und entweder TAB2 oder TAB3 vor (Cheung et al. 2004). TAB2 und TAB3 binden an die Polyubiquitinketten, die sich am Lysin an Position 63 (K63) eines Proteins, u.a. den RIP-Proteinen, befinden (Kanayama et al. 2004, Sato et al. 2009). Aus diesen Gründen liegt die Vermutung nahe, dass TAB2/TAB3 an die K63-Ubiquitinkette von RIP2 binden und es somit zu einer TAB1-unabhängigen Aktivierung durch Autophosphorylierung von TAK1 kommt. Die Bindung von TAB1 an XIAP würde somit die Phosphorylierung von TAK1 unterstützend fördern, wodurch es zu einer stärkeren NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt, die ohne TAB1 schwächer ausfallen würde. Ist TAB1 nun durch den Knock Out nicht mehr vorhanden, wird die Stärke der NF- $\kappa$ B-Aktivität dadurch lediglich verringert, ist aber immer noch möglich. Unterstützt wird diese Erkenntnis durch das Wissen, dass der TAB1/TAK1-Komplex bei der Signalweiterleitung durch cIAP1 oder cIAP2 innerhalb des NOD-Signalwegs vermutlich nicht direkt an diese beiden IAP-Proteine gebunden wird. Dennoch kommt es zu einer TAK1-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Bertrand et al. 2009, Krieg et

al. 2010). Die Theorie der TAB2/TAB3-vermittelten Signalweiterleitung innerhalb des NOD-Signalwegs muss jedoch noch in der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie verifiziert werden, da Ori und Kollegen 2013 zeigten, dass die NF- $\kappa$ B-aktivierende Funktion von TAB2/TAB3 Zelltyp-spezifisch zu sein scheint (Ori et al. 2013).

Unterstützt werden die oben genannten Beobachtungen durch die Expressionsmessung des ausgewählten NF- $\kappa$ B Zielgen-Panels auf mRNA-Ebene nach MDP- und DAP-Stimulation. Auch hier konnten in den verschiedenen Knock Out Klonen keine signifikanten Veränderungen im Expressionsverhalten der Zielgene als Reaktion auf die Stimulationen beobachtet werden (Abb. 18). Eine Ausnahme war der HCT116 TAB1<sup>-/-</sup>-Klon P19, der in einer von drei Wiederholungsversuchen eine erhöhte Zielgen-Expression aufwies. Auch in den HCT116 TAB1<sup>-/-</sup>-Klonen P54, P55 und P60 war zu beobachten, dass es nach MDP-Stimulation zu deutlichen Expressionsanstiegen der Zielgene IL8 und cIAP2 kam. Dieser Anstieg war allerdings weiterhin geringer als in den wildtypischen Kontrollzellen (Abb. 25). Auch die Messung der IL8-Sekretion in das umgebende Zellkulturmedium der verschiedenen HCT116 (SIB)-Klone bestätigte die zuvor erhaltenen Ergebnisse (Abb. 19). Hier zeigte sich nach MDP- und DAP-Stimulation der Zellen lediglich eine verstärkte Sekretion in wildtypischen und im mit MDP behandelten HCT116 (SIB) TAB1<sup>-/-</sup> Klon, nicht aber nach DAP-Stimulation. Die uneinheitlichen Ergebnisse bezüglich des TAB1 Knock Outs in HCT116 Zellen stützen die These einer additiven, aber keiner essentiellen Funktion von TAB1 bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B innerhalb des NOD-Signalwegs. Die Funktion von TAB2/TAB3 muss in diesem Zusammenhang noch überprüft werden. Gleichzeitig verdeutlichen die hier durchgeführten Untersuchungen die essentielle Bedeutung von RIP2 bei der Signalweiterleitung innerhalb des NOD-Signalwegs. In HCT116 RIP2<sup>-/-</sup>-Zellen konnte nach Stimulation des NOD-Signalwegs weder eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung noch eine erhöhte Expression der Zielgene IL8, cIAP2, CXCL1 und CCL20 beobachtet werden (vgl. Abb. 16 und Abb. 18).

## **5.6 Reaktivierungsversuche des NOD-Signalwegs durch die Rekonstitution von RIP2 und TAB1**

Um die Reaktivierungsfähigkeit des NOD-Signalwegs durch Rekonstitution der ausgeknockten Gene zu überprüfen, wurden zunächst unterschiedliche Mengen RIP2- und TAB1-Plasmid-DNA in die entsprechenden Knock Out Zellen transfiziert. Mit Hilfe einer qRT-PCR konnten Mengen von 75 ng bis 100 ng für eine erfolgreiche RIP2-Rekonstitution und der RIP2-Expression auf wildtypischem Niveau ermittelt werden. Für die Rekonstitution von TAB1 lag die zu transfizierende DNA-Menge bei 10 bzw. 25 ng (Abb. 20).

Die Mengen von 75 ng RIP2-Plasmid-DNA und 25 ng TAB1-Plasmid-DNA wurden dann in weiteren Versuchen eingesetzt. Mittels Expressionsanalyse des NF- $\kappa$ B Zielgen-Panels sollte nun nicht nur die Rekonstitutionsfähigkeit nachgewiesen, sondern vor allem die Bedeutung der Interaktion von TAB1 sowie RIP2 mit XIAP für die Signaltransduktion überprüft und dargestellt werden. Dazu wurden RIP2 und TAB1 in den jeweiligen Knock Out Klonen rekonstituiert und gleichzeitig XIAP in den Zellen überexprimiert (Abb. 22). Hier zeigte sich, dass die Interaktion von RIP2 mit XIAP ein essentieller Faktor bei der XIAP-vermittelten Signalweiterleitung innerhalb des NOD-Signalwegs ist. Die Expression der NF- $\kappa$ B-Zielgene IL8, CXCL1 und CCL20 war erst dann signifikant erhöht, nachdem RIP2 in den Zellen rekonstituiert war und gleichzeitig eine XIAP-Überexpression stattgefunden hatte.

Für TAB1 wurden bereits Effekte nach alleiniger Rekonstitution von TAB1 deutlich, die unabhängig von einer XIAP-Überexpression waren. Eine erhöhte CCL20-Expression wurde hingegen auch schon durch alleinige XIAP-Überexpression erreicht. Diese Ergebnisse lassen weiterhin die Vermutung zu, dass TAB1 keinen essentiellen Faktor bei der XIAP-vermittelten Signalweiterleitung darstellt und eine ausschließlich unterstützende Funktion bei der Signaltransduktion einnimmt.

## **5.7 Auswirkungen des Knock Outs von RIP2 oder TAB1 auf die Invasionsfähigkeit der HCT116 Zelllinie**

Die Aktivierung des NOD-Signalwegs führt zur Ausschüttung von Zytokinen, die u.a. die Progression des Tumors unterstützen können. Dadurch kann es zu vermehrter Invasivität und Migration der Tumorzellen kommen. Um den möglichen Einfluss der generierten Knock

Outs auf die Invasionsfähigkeit der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 zu untersuchen, wurden Invasionsassays durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der alleinige Knock Out von RIP2 zu einer deutlichen, statistisch signifikanten Verminderung der Invasivität der Zellen führte (Abb. 23). Während die Auswertung der wildtypischen HCT116 (SIB) Zelllinie durchschnittlich 163 invadierte Zellen pro Assay ergab, konnten bei den RIP2 Knock Out-Zellen nur durchschnittlich 29 invadierte Zellen gezählt werden. Auch die Auswertung des XIAP<sup>-/-</sup>-Klons zeigte lediglich 44 invadierte Zellen. Hingegen hatte der Knock Out des TAB1-Gens keine Auswirkungen auf die Invasionsfähigkeit der Zellen. Hier wurden durchschnittlich 260 Zellen pro Filter gezählt. Somit lag die Invasivität tendenziell sogar über der des Wildtyps. Die durch die Invasionsassays erhaltenen Ergebnisse werden durch weitere, bereits von anderen Forschungsgruppen publizierte Daten gestützt. So konnte die Arbeitsgruppe um Mehrotra 2010 zeigen, dass ein Knock Out von XIAP in der HCT116 Zelllinie die Invasivität der Zellen inhibierte (Mehrotra et al. 2010). In ihrer Arbeit konnten sie nachweisen, dass die IAP-Proteine u.a. durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie der Kinasen FAK und Src direkt in die Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen eingreifen und diese mobilisieren. Auch der Knock-Down von RIP2 durch shRNA-Transfektion führte in verschiedenen dreifach negativen (Östrogen-Rezeptor (ER)-, Progesteron-Rezeptor (PR)-, Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (HER2)-negativ) Brustkrebszelllinien zu vermindertem invasivem Wachstum, welches durch die fehlende Aktivierung von NF- $\kappa$ B und c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) zustande kam. Durch den RIP2 Knock Down kam es zu einer verminderten Menge phosphorylierten FAKs, wodurch die Polarität der Zellen verloren ging (Singel et al. 2014). Die Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit erweitern diese publizierten Daten auf die Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116. Auch hier ist die Untersuchung der Phosphorylierungsstatus von FAK und Src interessant. Dass TAB1 hier keinen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit der HCT116 Zelllinie besitzt, fügt sich nahtlos in die zuvor beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit ein und stützt die These, dass TAB1 lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Signalvermittlung durch die NOD-Rezeptoren spielt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde kürzlich anhand eines Xenograft Mausmodells mit einer Mamakarzinom-Zelllinie gezeigt, dass die Invasivität durch den Knock Down von TAB1 reduziert wurde (Huang

et al. 2015). Aufgrund dieser und der hier erhaltenen Daten ist eine tumorspezifische Rolle von TAB1 als invasionsförderndes Protein möglich.

Das Inhibitor of Apoptosis Protein XIAP ist ein bekannter Aktivator invasiven Verhaltens von Tumorzellen (Mehrotra et al. 2010). Daher sollte nun durch einen weiteren Versuch in dieser Arbeit untersucht werden, ob die alleinige Überexpression von XIAP in den verschiedenen Knock Out Klonen zu vermehrter Invasion führt und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B innerhalb des NOD-Signalwegs somit allein durch XIAP stimuliert werden könnte. Durch die stabile Überexpression von XIAP (Abb. 27) in den verschiedenen Knock Out Klonen sowie im Wildtyp konnte gezeigt werden, dass die bloße Expression von XIAP nicht zu vermehrtem invasivem Verhalten der Tumorzellen führte. Während nach XIAP-Überexpression im Wildtyp eine Zunahme invadierender Zellen um das 3-fache beobachtet wurde, konnten für RIP2 und TAB1 Knock Out Zellen nach XIAP-Überexpression keine signifikant erhöhte Invasivität nachgewiesen werden. Durch den Knock Out von RIP2 war die Invasionsfähigkeit der Zellen bereits reduziert. Diese Reduktion konnte durch die Überexpression von XIAP nicht aufgehoben werden. Insbesondere diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine gleichzeitige Präsenz von RIP2 und XIAP in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 gegeben sein muss, um die Invasion dieser Zellen zu ermöglichen. Für TAB1 konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden. Hier lag die Invasivität der Zellen bereits über der des Wildtyps. Jedoch konnte diese durch eine XIAP-Überexpression ebenfalls nicht mehr gesteigert werden. Es wurden pro Zelllinie und Behandlung jeweils drei Invasionsfilter ausgezählt. In der Probe HCT116 TAB1<sup>-/-</sup> mit XIAP-Überexpression lag einer der ermittelten Wert außerhalb der Norm (Filter 1: 519 Zellen, Filter 2: 512 Zellen, Filter 3: 224 Zellen). Dieser wurde aufgrund der statistischen Berechnungsmöglichkeit in die Auswertung miteinbezogen. Wurde er jedoch davon ausgeschlossen, erhielt man einen statistisch signifikanten Anstieg der Invasivität nach XIAP-Überexpression in HCT116 TAB1<sup>-/-</sup> ( $p=0,004$ ). Dieses Ergebnis wäre übereinstimmend mit dem eines weiteren für diese Arbeit durchgeführten Invasionsassays. Aufgrund der allgemein hohen Standardabweichungen innerhalb des Assays mit TAB1<sup>-/-</sup>-Klonen kann jedoch keine definitive Aussage über den Effekt der XIAP-Überexpression in TAB1<sup>-/-</sup>-Zellen gemacht werden. Dennoch kann festgestellt werden, dass es eine Tendenz hinsichtlich einer weiterhin induzierbaren Invasivität in TAB1<sup>-/-</sup>-Zellen gibt. Diese

Beobachtungen stimmen mit den vorausgehenden, in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen überein und bestärken die These, dass TAB1 in der Zelllinie HCT116 eine untergeordnete, wahrscheinlich unterstützende Rolle bei der Signalweiterleitung innerhalb des NOD-Signalwegs spielt.

## 5.8 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der Signalweiterleitung innerhalb des NOD-Signalwegs untersucht. Hierbei lag der Fokus auf der Interaktion von XIAP mit RIP2 und TAB1 und deren Einfluss auf die Invasivität der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116. Mittels Zinkfinger-Nukleasen konnten Knock Outs der Gene von Interesse etabliert werden. Mit Hilfe dieser konnte in Rekonstitutions- und Invasionsversuchen gezeigt werden, dass insbesondere die Interaktion der Proteine XIAP und RIP2 für die Funktionsfähigkeit der hier untersuchten Zelllinie nötig waren. War RIP2 nicht mehr aktiv, so war das invasive Wachstum der Zellen gehemmt und konnte auch nicht durch eine Überexpression von XIAP erhöht werden. Gestützt wurde diese Beobachtung durch die Ergebnisse der immunhistochemischen RIP2-Färbung von Kolonkarzinom- und Normalgewebe. Hier zeigte sich eine verstärkte RIP2-Expression in Kolonkarzinomen gegenüber dem Normalgewebe und eine mit einer starken RIP2-Expression einhergehende schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten. Auch diese Ergebnisse stützen die These einer pathophysiologischen Bedeutung von RIP2 in der molekularen Tumorgenese des Kolonkarzinoms.

Des Weiteren zeigte sich, dass TAB1 eine geringere Funktion bei der Signalweiterleitung übernahm als zu Beginn dieser Arbeit vermutet wurde. XIAP wird als „Brückenprotein“ bewertet, durch welches die Kinase RIP2 und das TAB1-Proteine in direkte Nähe zueinander gelangen. Hierauf erfolgt die weitere Signaltransduktion und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten jedoch lediglich auf einen additiven Effekt von TAB1 bei der NF- $\kappa$ B Aktivierung hin. Nach einem Knock Out von TAB1 in der Zelllinie HCT116 wurde keine reduzierte Invasivität der Zellen beobachtet. Die Ergebnisse einer gleichzeitigen XIAP-Überexpression waren nicht eindeutig. Der Vergleich aller in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigte jedoch, dass eine mit dem Wildtyp vergleichbare Reaktion der HCT116 TAB1<sup>-/-</sup>-Klone nicht erreicht werden konnte. Zusammenfassend kann daraus geschlossen

werden, dass die hauptsächliche Aktivierung des TAB/TAK-Komplexes nicht über TAB1 verläuft, sondern vermutlich über die ebenfalls im Komplex vorhandenen Proteine TAB2/TAB3. TAB1 könnte daher mit der Bindung an XIAP unterstützend für die Effizienz der TAK-Aktivierung wirken.

## **5.9 Ausblick**

Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass TAB1 nicht im Fokus der Signalweiterleitung durch XIAP und RIP2 steht. Hingegen ist RIP2 essentiell für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B innerhalb des NOD-Signalwegs. RIP2 könnte somit ein mögliches Ziel für therapeutische Maßnahmen sein, da gezeigt werden konnte, dass eine Inaktivierung von RIP2 die Aggressivität der untersuchten Tumorzellen verminderte. In weiteren Untersuchungen kann der Fokus nun auf eine mögliche erhöhte Sensitivität gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung in Abhängigkeit einer RIP2-Aktivität gelegt werden. Als Tyrosin-Kinase könnte RIP2 somit ein neuer Angriffspunkt für eine zielgerichtete Behandlung der Patienten mit spezifischen Antikörpern oder Tyrosinkinase-Inhibitoren sein.

## 6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Obwohl bereits viele Therapieansätze zur Verfügung stehen, ist die Patientensterblichkeit weiterhin hoch. Dabei geht die Hauptsterblichkeit nicht vom Primärtumor, sondern von auftretenden Metastasen und Rezidiven aus. Jedoch sind die molekularen Mechanismen dieser Metastasierung bisher nicht vollständig verstanden. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf chronischen Entzündungsreaktionen, da deutlich wurde, dass inflammatorische Prozesse an der Progression des Kolonkarzinoms beteiligt sind. Dabei lag der Fokus der Wissenschaft innerhalb der letzten Jahre vermehrt auf den sogenannten „Toll-like Rezeptoren (TLR)“. Diese sind für die Homöostase des Darms und die Initiation einer ersten Immunantwort auf eindringende, pathogene Keime verantwortlich, weisen aber auch onkogene Effekte im Kolonkarzinom auf. Durch diese Rezeptoren wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert, wodurch es schließlich zur Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorisch wirkender Zytokine und Chemokine kommt. Eine konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt hingegen zu einer verstärkten angiogenetischen Aktivität im betroffenen Gewebe, sowie zu vermehrtem migratorischem und invasivem Verhalten der Zellen. Eine mit den TLR verwandte Familie sind die sogenannten „NOD-Rezeptoren“. Diese liegen zytoplasmatisch vor, erkennen gleichermaßen pathogene Strukturen und aktivieren über ihren entsprechenden Signalweg ebenfalls NF- $\kappa$ B. Innerhalb dieses Signalwegs traten verschiedene Mitglieder der Inhibitor of Apoptosis Proteinfamilie (IAP) zunehmend in den Vordergrund. So konnte gezeigt werden, dass XIAP eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion und der Aktivierung von NF- $\kappa$ B einnimmt, indem es als E3-Ubiquitin-Ligase die Serin-Threonin-Tyrosin-Kinase RIP2 ubiquitiniert und es somit zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt. Da XIAP sowohl als Tumorpromoter als auch als prognostischer Faktor im Kolonkarzinom gilt, soll in dieser Arbeit seine Rolle durch die Interaktion mit den Proteinen RIP2 und TAB1 bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B innerhalb des NOD-Signalwegs untersucht werden.

Da die genauen Mechanismen der Interaktion und eine mögliche onkogene Bedeutung der NOD-Signalkaskade noch nicht vollständig untersucht sind, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Interaktion der drei genannten Proteine innerhalb des NOD-Signalwegs in der

Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 untersucht. Zunächst wurden TMA-Proben von 273 Kolonkarzinom-Patienten hinsichtlich der Proteinexpression der im NOD-Signalweg beteiligten Proteine NOD1, NOD2, XIAP, RIP2 und TAB1 immunhistochemisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Einfluss der XIAP-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten mit Kolonkarzinomen in der uni- und multivariaten Analyse. Auch für RIP2 konnte ein signifikanter Einfluss auf das Überleben der Patienten nachgewiesen werden. Unter Zuhilfenahme des Zinkfinger-nuklease-Systems konnten anschließend verschiedene genetische Knock Out Klone für die Gene RIP2 und TAB1 in der Zelllinie HCT116 generiert werden. Mit Hilfe eines RNA-Microarrays wurde parallel ein Zielgenpanel etabliert, dessen Expression durch die XIAP-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung innerhalb des NOD-Signalwegs kontrolliert wird. Dieses diente in den folgenden Versuchen als ein „Read-Out-System“.

Die erhaltenen Ergebnisse auf molekularer und funktioneller Ebene weisen darauf hin, dass TAB1 eine additive Rolle bei der Signaltransduktion spielt. In den durchgeführten Stimulationsversuchen sowie in funktionellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Signalweiterleitung auch während eines TAB1 Knock Outs weiterhin, wenn auch in vermindelter Intensität, gegeben war.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die NF- $\kappa$ B Aktivität sowie die Expression der entsprechenden Zielgene nach einem RIP2 Knock Out auch nach Stimulation der NOD-Signalkaskade mit spezifischen Liganden nicht mehr gegeben war. Weiterhin wiesen diese Zellen eine verminderte Invasionsfähigkeit auf, die auch durch eine stabile XIAP-Überexpression nicht verstärkt werden konnte. In Rekonstitutionsversuchen wurde deutlich, dass die Interaktion von RIP2 mit XIAP für die NF- $\kappa$ B Aktivierung von essentieller Bedeutung ist.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass RIP2 ein essentieller Faktor der XIAP-abhängigen Signalweiterleitung im NOD-Signalweg ist, die Invasivität von Tumorzellen in vitro reguliert und mit dem Gesamtüberleben von Patienten mit Kolonkarzinom assoziiert ist. Daher sollte es als potentielle therapeutische Zielstruktur verstärkt betrachtet und untersucht werden.

## 7 Abstract

Colorectal cancer is one of the top three cancerous diseases in Germany. Although many therapies are available for these patients, the mortality rate remains high. This is mainly due to metastasis and recurrence of the disease, while the primary tumors have less effect on survival rates. Even now, molecular mechanisms of metastasis are not completely understood.

Special attention needs to be drawn to chronic inflammation, which is one of the main aspects of tumorigenesis of gastro-intestinal carcinomas. Within the last years, research was focused on so-called “Toll-like receptors (TLR)”, which are responsible for homeostasis of the gut, for initiation of the innate immune response in regard of cell-invading pathogenic microbes, as well as for oncogenic effects in colon carcinomas. Through activation of these receptors, NF- $\kappa$ B is released from its inhibitors and migrates into the nucleus of the cell, where it activates target genes, leading to secretion of several inflammatory cytokines and chemokines. In contrast, a constitutive activation of NF- $\kappa$ B leads to enhanced angiogenic activity in the affected tissue, as well as to migratory and invasive behavior of the cells.

The NOD-receptor family is related to TLRs. While TLR-receptors are membrane-bound, NOD-receptors are found in the cytoplasm of cells. They also recognize pathogenic structures of microbes and viruses, and activate NF- $\kappa$ B via their special signaling pathway. Within this pathway, several members of the “inhibitor of apoptosis protein” (IAP) family, which participate in signal transduction, have come to the fore. It was shown that XIAP holds an important function in signal transduction and in activation of NF- $\kappa$ B, by using its E3-ubiquitin-ligase-activity to ubiquitinate and therefore activate serine-threonine-tyrosine kinase RIP2. Since XIAP is known to be a tumor promoting protein and furthermore serves as a prognostic factor in colorectal carcinomas, it is of great interest to investigate its role in NOD signal transduction and to elucidate its need to interact with RIP2 and TAB1.

Because the detailed mechanisms of this interaction and the potential oncogenic impact of the NOD-signaling pathway have not yet been investigated in detail, this doctoral thesis

focuses on the analysis of the protein interactions between XIAP and RIP2, as well as between XIAP and TAB1, an adapter protein of the TAB/TAK-complex in the colon carcinoma cell line HCT116. Initially, TMA-samples of 273 colon carcinoma patients were immunohistochemically evaluated regarding the expression of proteins involved in NOD-signaling pathways such as NOD1, NOD2, XIAP, RIP2 and TAB1. Here, a significant impact of XIAP expression on overall patient survival was found in uni- and multivariate analysis. Additionally, RIP2 displayed a significant impact on the overall survival of patients. By using a zincfinger-nuclease system, several genetic HCT116 knock out clones for the genes of RIP2 and TAB1 could be established. In parallel, through the use of RNA-microarray, XIAP-dependent NF- $\kappa$ B target genes were detected, then taken as “read-out system” for further experiments.

Through these results obtained on molecular and functional basis it could be concluded that TAB1 only has an additive role in signal transduction of the NOD-signaling cascade. In stimulation studies, as well as in functional tests, signal transduction was shown to be still present in HCT116 TAB1<sup>-/-</sup> clones, though in a reduced capacity.

Furthermore, the results of this thesis show that NF- $\kappa$ B expression, as well as the expression of the target gene panel was inactivated after the knock out of RIP2 in the HCT116 cell line, and also couldn't be reactivated by ligand specific stimulation of the NOD-receptors. Also, RIP2<sup>-/-</sup> cells displayed reduced invasiveness. Moreover, invasiveness could not be enhanced by XIAP overexpression in RIP2 knock out cells. In reconstitution trials it became clear that interaction between RIP2 and XIAP is of essential relevance for NF- $\kappa$ B activation.

In this work, it was demonstrated that RIP2 is an essential factor of XIAP-dependent signal transduction in the NOD-signaling pathway. It regulates tumor invasion in vitro, and is correlated with overall survival in patients with colon cancer. Hence, RIP2 would be an interesting target of cancer therapy and is worth further investigation.

## 8 Literaturverzeichnis

Abreu, M. T., L. S. Thomas, E. T. Arnold, K. Lukasek, K. S. Michelsen and M. Arditi (2003). "TLR signaling at the intestinal epithelial interface." J Endotoxin Res **9**(5): 322-330.

ACS (2014). "American Cancer Society Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016." Atlanta: American Cancer Society.

Aharonov, O., G. Maftzir and D. Benezra (1993). "The role of cytokines in angiogenesis." Ocul Immunol Inflamm **1**(1-2): 135-142.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Akyurek, N., Y. Ren, G. Z. Rassidakis, E. J. Schlette and L. J. Medeiros (2006). "Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas." Cancer **107**(8): 1844-1851.

Amado, R. G., M. Wolf, M. Peeters, E. Van Cutsem, S. Siena, D. J. Freeman, T. Juan, R. Sikorski, S. Suggs, R. Radinsky, S. D. Patterson and D. D. Chang (2008). "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **26**(10): 1626-1634.

Bacon, K., M. Baggiolini, H. Broxmeyer, R. Horuk, I. Lindley, A. Mantovani, K. Maysushima, P. Murphy, H. Nomiyama, J. Oppenheim, A. Rot, T. Schall, M. Tsang, R. Thorpe, J. Van Damme, M. Wadhwa, O. Yoshie, A. Zlotnik, K. Zoon and I. W. S. o. C. Nomenclature (2002). "Chemokine/chemokine receptor nomenclature." J Interferon Cytokine Res **22**(10): 1067-1068.

Baeuerle, P. A. and T. Henkel (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." Annu Rev Immunol **12**: 141-179.

Bajetta, E., M. Di Bartolomeo, R. Buzzoni, E. Ferrario, K. F. Dotti, L. Mariani, R. Bajetta, A. Gevorgyan, P. Venturino and M. Galassi (2009). "Dose finding study of erlotinib combined

to capecitabine and irinotecan in pretreated advanced colorectal cancer patients." Cancer Chemother Pharmacol **64**(1): 67-72.

Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-683.

Baldwin, A. S., Jr. (2001). "Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease." J Clin Invest **107**(1): 3-6.

Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet **357**(9255): 539-545.

Bates, R. C., M. J. DeLeo, 3rd and A. M. Mercurio (2004). "The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis." Exp Cell Res **299**(2): 315-324.

Bauler, L. D., C. S. Duckett and M. X. O'Riordan (2008). "XIAP regulates cytosol-specific innate immunity to Listeria infection." PLoS Pathog **4**(8): e1000142.

Bernstein, C. N., J. F. Blanchard, E. Kliewer and A. Wajda (2001). "Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study." Cancer **91**(4): 854-862.

Bertin, J., W. J. Nir, C. M. Fischer, O. V. Tayber, P. R. Errada, J. R. Grant, J. J. Keilty, M. L. Gosselin, K. E. Robison, G. H. Wong, M. A. Glucksmann and P. S. DiStefano (1999). "Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB." J Biol Chem **274**(19): 12955-12958.

Bertrand, M. J., K. Doiron, K. Labbe, R. G. Korneluk, P. A. Barker and M. Saleh (2009). "Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2." Immunity **30**(6): 789-801.

Bertrand, M. J., S. Lippens, A. Staes, B. Gilbert, R. Roelandt, J. De Medts, K. Gevaert, W. Declercq and P. Vandenabeele (2011). "cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse

types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4)." PLoS One **6**(9): e22356.

Böcker (2012). Pathologie, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.

Boland, C. R., F. A. Sinicrope, D. E. Brenner and J. M. Carethers (2000). "Colorectal cancer prevention and treatment." Gastroenterology **118**(2 Suppl 1): S115-128.

Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **25**(6): 280-288.

Bose, S., A. K. Panda, S. Mukherjee and G. Sa (2015). "Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system." Cell Div **10**: 6.

Brew, R., J. S. Erikson, D. C. West, A. R. Kinsella, J. Slavin and S. E. Christmas (2000). "Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro." Cytokine **12**(1): 78-85.

Burstein, D. E., M. T. Idrees, G. Li, M. Wu and T. Kalir (2008). "Immunohistochemical detection of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in cervical squamous intraepithelial neoplasia and squamous carcinoma." Ann Diagn Pathol **12**(2): 85-89.

Burstein, E., L. Ganesh, R. D. Dick, B. van De Sluis, J. C. Wilkinson, L. W. Klomp, C. Wijmenga, G. J. Brewer, G. J. Nabel and C. S. Duckett (2004). "A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1." EMBO J **23**(1): 244-254.

Cai, X., J. Du, Y. Liu, W. Xia, J. Liu, M. Zou, Y. Wang, M. Wang, H. Su and D. Xu (2013). "Identification and characterization of receptor-interacting protein 2 as a TNFR-associated factor 3 binding partner." Gene **517**(2): 205-211.

Cammarota, R., V. Bertolini, G. Pennesi, E. O. Bucci, O. Gottardi, C. Garlanda, L. Laghi, M. C. Barberis, F. Sessa, D. M. Noonan and A. Albini (2010). "The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker." J Transl Med **8**: 112.

Cannon, T. L., M. A. Kokon, S. Shafqat and J. F. Deeken (2015). "RAS Mutations Beyond KRAS Exon 2: A Review and Discussion of Clinical Trial Data." Curr Treat Options Oncol **16**(7): 33.

Cardamone, C., R. Parente, G. D. Feo and M. Triggiani (2016). "Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity." Immunol Lett **178**: 10-14.

Cario, E. and D. K. Podolsky (2000). "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." Infect Immun **68**(12): 7010-7017.

Chambers, A. F., A. C. Groom and I. C. MacDonald (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**(8): 563-572.

Chen, G., M. H. Shaw, Y. G. Kim and G. Nunez (2009). "NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease." Annu Rev Pathol **4**: 365-398.

Cheng, W. L., C. S. Wang, Y. H. Huang, M. M. Tsai, Y. Liang and K. H. Lin (2011). "Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer." Ann Oncol **22**(10): 2267-2276.

Cheng, X. S., Y. F. Li, J. Tan, B. Sun, Y. C. Xiao, X. B. Fang, X. F. Zhang, Q. Li, J. H. Dong, M. Li, H. H. Qian, Z. F. Yin and Z. B. Yang (2014). "CCL20 and CXCL8 synergize to promote progression and poor survival outcome in patients with colorectal cancer by collaborative induction of the epithelial-mesenchymal transition." Cancer Lett **348**(1-2): 77-87.

Cheung, P. C., A. R. Nebreda and P. Cohen (2004). "TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1." Biochem J **378**(Pt 1): 27-34.

Chin, A. I., P. W. Dempsey, K. Bruhn, J. F. Miller, Y. Xu and G. Cheng (2002). "Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses." Nature **416**(6877): 190-194.

Cho, Y. S., S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T. D. Ray, M. Guildford and F. K. Chan (2009). "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation." Cell **137**(6): 1112-1123.

Connolly, K., R. Mitter, M. Muir, D. Jodrell and S. Guichard (2009). "Stable XIAP knockdown clones of HCT116 colon cancer cells are more sensitive to TRAIL, taxanes and irradiation in vitro." Cancer Chemother Pharmacol **64**(2): 307-316.

Conte, D., M. Holcik, C. A. Lefebvre, E. Lacasse, D. J. Picketts, K. E. Wright and R. G. Korneluk (2006). "Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival." Mol Cell Biol **26**(2): 699-708.

Conze, D. B., L. Albert, D. A. Ferrick, D. V. Goeddel, W. C. Yeh, T. Mak and J. D. Ashwell (2005). "Posttranscriptional downregulation of c-IAP2 by the ubiquitin protein ligase c-IAP1 in vivo." Mol Cell Biol **25**(8): 3348-3356.

Cummins, J. M., M. Kohli, C. Rago, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and F. Bunz (2004). "X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells." Cancer Res **64**(9): 3006-3008.

Damgaard, R. B., U. Nachbur, M. Yabal, W. W. Wong, B. K. Fiel, M. Kastirr, E. Rieser, J. A. Rickard, A. Bankovacki, C. Peschel, J. Ruland, S. Bekker-Jensen, N. Mailand, T. Kaufmann, A. Strasser, H. Walczak, J. Silke, P. J. Jost and M. Gyrd-Hansen (2012). "The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity." Mol Cell **46**(6): 746-758.

de Almagro, M. C. and D. Vucic (2012). "The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy." Exp Oncol **34**(3): 200-211.

Dejardin, E., N. M. Droin, M. Delhase, E. Haas, Y. Cao, C. Makris, Z. W. Li, M. Karin, C. F. Ware and D. R. Green (2002). "The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways." Immunity **17**(4): 525-535.

Denoix, P. (1950). "Cancer Staging using anatomical markers." Bull Inst Nat Hyg (Paris) **5**: 81-86.

Dogan, T., G. S. Harms, M. Hekman, C. Karreman, T. K. Oberoi, E. S. Alnemri, U. R. Rapp and K. Rajalingam (2008). "X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility." Nat Cell Biol **10**(12): 1447-1455.

Dohi, T., K. Okada, F. Xia, C. E. Wilford, T. Samuel, K. Welsh, H. Marusawa, H. Zou, R. Armstrong, S. Matsuzawa, G. S. Salvesen, J. C. Reed and D. C. Altieri (2004). "An IAP-IAP complex inhibits apoptosis." J Biol Chem **279**(33): 34087-34090.

Dohi, T., F. Xia and D. C. Altieri (2007). "Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection." Mol Cell **27**(1): 17-28.

Dorsch, M., A. Wang, H. Cheng, C. Lu, A. Bielecki, K. Charron, K. Clauser, H. Ren, R. D. Polakiewicz, T. Parsons, P. Li, T. Ocain and Y. Xu (2006). "Identification of a regulatory autophosphorylation site in the serine-threonine kinase RIP2." Cell Signal **18**(12): 2223-2229.

Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-998.

Dunne, A., N. A. Marshall and K. H. Mills (2011). "TLR based therapeutics." Curr Opin Pharmacol **11**(4): 404-411.

Dutta, J., Y. Fan, N. Gupta, G. Fan and C. Gelinas (2006). "Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB." Oncogene **25**(51): 6800-6816.

Eaden, J. A., K. R. Abrams and J. F. Mayberry (2001). "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis." Gut **48**(4): 526-535.

Ewing, J. (1928). "Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours. By James Ewing, A.M., M.D., Sc.D., Professor of Pathology at Cornell University Medical College, N.Y.; Pathologist to the Memorial Hospital. Third edition. Royal 8vo. Pp. 1127, with 546 illustrations. 1928.

Philadelphia and London: W. B. Saunders Co. Ltd. 63s. net." British Journal of Surgery **16**(61): 174-175.

Falchook, G. S., A. Naing, J. J. Wheler, A. M. Tsimberidou, R. Zinner, D. S. Hong, S. Fu, S. A. Piha-Paul, F. Janku, K. R. Hess, C. Bastida and R. Kurzrock (2014). "Dual EGFR inhibition in combination with anti-VEGF treatment in colorectal cancer." Oncoscience **1**(8): 540-549.

Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.

Festjens, N., T. Vanden Berghe, S. Cornelis and P. Vandenabeele (2007). "RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die." Cell Death Differ **14**(3): 400-410.

Fidler, I. J. (1970). "Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine." J Natl Cancer Inst **45**(4): 773-782.

Fidler, I. J. (1990). "Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture." Cancer Res **50**(19): 6130-6138.

Fisher, G. A., T. Kuo, M. Ramsey, E. Schwartz, R. V. Rouse, C. D. Cho, J. Halsey and B. I. Sikic (2008). "A phase II study of gefitinib, 5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in previously untreated patients with metastatic colorectal cancer." Clin Cancer Res **14**(21): 7074-7079.

Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J. H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R. H. Giles and H. Clevers (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." Nat Cell Biol **3**(4): 433-438.

Fukata, M., A. Chen, A. S. Vamadevan, J. Cohen, K. Breglio, S. Krishnareddy, D. Hsu, R. Xu, N. Harpaz, A. J. Dannenberg, K. Subbaramaiah, H. S. Cooper, S. H. Itzkowitz and M. T. Abreu (2007). "Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors." Gastroenterology **133**(6): 1869-1881.

Garrett, C. R. and C. Eng (2011). "Cetuximab in the treatment of patients with colorectal cancer." Expert Opin Biol Ther **11**(7): 937-949.

Garrison, J. B., R. G. Correa, M. Gerlic, K. W. Yip, A. Krieg, C. M. Tamble, R. Shi, K. Welsh, S. Duggineni, Z. Huang, K. Ren, C. Du and J. C. Reed (2011). "ARTS and Siah collaborate in a pathway for XIAP degradation." Mol Cell **41**(1): 107-116.

Geering, B., C. Stoeckle, S. Conus and H. U. Simon (2013). "Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils." Trends Immunol **34**(8): 398-409.

Gilmore, T. D. (2006). "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives." Oncogene **25**(51): 6680-6684.

Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti and D. J. Philpott (2003). "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan." Science **300**(5625): 1584-1587.

Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott and P. J. Sansonetti (2003). "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection." J Biol Chem **278**(11): 8869-8872.

Grimm, M., M. Kim, A. Rosenwald, U. Heemann, C. T. Germer, A. M. Waaga-Gasser and M. Gasser (2010). "Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumourigenesis and tumour progression." Eur J Cancer **46**(15): 2849-2857.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Harlin, H., S. B. Reffey, C. S. Duckett, T. Lindsten and C. B. Thompson (2001). "Characterization of XIAP-deficient mice." Mol Cell Biol **21**(10): 3604-3608.

Hasegawa, M., Y. Fujimoto, P. C. Lucas, H. Nakano, K. Fukase, G. Nunez and N. Inohara (2008). "A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation." EMBO J **27**(2): 373-383.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.

He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao and X. Wang (2009). "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha." Cell **137**(6): 1100-1111.

He, W., Q. Liu, L. Wang, W. Chen, N. Li and X. Cao (2007). "TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance." Mol Immunol **44**(11): 2850-2859.

Hinz, M. and C. Scheidereit (2014). "The I kappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond." EMBO Rep **15**(1): 46-61.

Hoesel, B. and J. A. Schmid (2013). "The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer." Mol Cancer **12**: 86.

Hofer-Warbinek, R., J. A. Schmid, C. Stehlik, B. R. Binder, J. Lipp and R. de Martin (2000). "Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1." J Biol Chem **275**(29): 22064-22068.

Hofheinz, Arnold and G. F. Markus Borner, Ullrich Graeven, Holger Hebart, Susanna Hegewisch-Becker, Thomas Meybier, Ron Pritzkeleit, Werner Scheithauer, Hans-Joachim Schmoll, Josef Thaler, Jürgen Weitz, Bernhard Wörmann. (2016). "Kolonkarzinom."

Hofheinz, P. D. m. R.-D., P. D. m. D. Arnold, P. D. m. M. Borner, P. D. m. G. Folprecht, P. D. m. U. Graeven, P. D. m. H. Hebart, P. D. m. S. Hegewisch-Becker, D. m. T. Meybier, D. R. Pritzkeleit, U.-P. D. W. Scheithauer, P. D. m. H.-J. Schmoll, P. U.-P. D. J. Thaler, P. D. m. J. Weitz and P. D. m. B. Wörmann. (2016). "Kolonkarzinom."

Hojjat-Farsangi, M. (2014). "Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies." Int J Mol Sci **15**(8): 13768-13801.

Huang, H. L., C. H. Chiang, W. C. Hung and M. F. Hou (2015). "Targeting of TGF-beta-activated protein kinase 1 inhibits chemokine (C-C motif) receptor 7 expression, tumor growth and metastasis in breast cancer." Oncotarget **6**(2): 995-1007.

Huang, S., C. A. Pettaway, H. Uehara, C. D. Bucana and I. J. Fidler (2001). "Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis." Oncogene **20**(31): 4188-4197.

Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou and G. Thomas (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.

Hussain, S. P. and C. C. Harris (2007). "Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials." Int J Cancer **121**(11): 2373-2380.

Ikeda, S., A. Kitadate, M. Ito, F. Abe, M. Nara, A. Watanabe, N. Takahashi, T. Miyagaki, M. Sugaya and H. Tagawa (2016). "Disruption of CCL20-CCR6 interaction inhibits metastasis of advanced cutaneous T-cell lymphoma." Oncotarget **7**(12): 13563-13574.

Inagaki, M., E. Omori, J. Y. Kim, Y. Komatsu, G. Scott, M. K. Ray, G. Yamada, K. Matsumoto, Y. Mishina and J. Ninomiya-Tsuji (2008). "TAK1-binding protein 1, TAB1, mediates osmotic stress-induced TAK1 activation but is dispensable for TAK1-mediated cytokine signaling." J Biol Chem **283**(48): 33080-33086.

Inohara, Chamaillard, C. McDonald and G. Nunez (2005). "NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease." Annu Rev Biochem **74**: 355-383.

Inohara, N., L. del Peso, T. Koseki, S. Chen and G. Nunez (1998). "RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis." J Biol Chem **273**(20): 12296-12300.

Ito, Y., M. Kihara, M. Hirokawa, Y. Takamura, K. Kobayashi, A. Miya and A. Miyauchi (2012). "Validity of 6(th) edition of UICC TNM classification system for medullary thyroid carcinoma: a proposal for intraoperative evaluation of T category." Endocr J **59**(5): 407-416.

Jacquet, S., Y. Nishino, S. Kumphune, P. Sicard, J. E. Clark, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, J. Eickhoff, M. Cotten and M. S. Marber (2008). "The role of RIP2 in p38 MAPK activation in the stressed heart." J Biol Chem **283**(18): 11964-11971.

Jin, H. S. and T. H. Lee (2006). "Cell cycle-dependent expression of cIAP2 at G2/M phase contributes to survival during mitotic cell cycle arrest." Biochem J **399**(2): 335-342.

Kaatsch, P., C. Spix, D. S. H. Prof. Dr. Alexander Katalinic, Dr. Sabine Luttmann, Christa Stegmaier, Dr. Sandra Caspritz, Dr. Monika Christ, Dr. Anke Ernst, Dr. Juliane Folkerts, Dr. Jutta Hansmann, Dr. Stefanie Klein, Dr. Kristine Kranzhöfer, Dr. Beatrice Kunz, Dr. Katrin Manegold, Dr. Andrea Penzkofer, , D. S. W.-R. Dr. Kornelia Treml, Dr. Kerstin Wittenberg, Nadia Baras, Dr. Benjamin Barnes, Dr. Joachim Bertz, Nina Buttman-Schweiger, Dr. Stefan Dahm, Julia Fiebig, and D. J. H. Manuela Franke, Dr. Klaus Kraywinkel, Antje Wienecke, Dr. Ute Wolf (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe. Berlin, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). **10.**

Kanayama, A., R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng and Z. J. Chen (2004). "TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains." Mol Cell **15**(4): 535-548.

Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi and G. Nunez (2007). "Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease." Immunity **27**(4): 549-559.

Karin, M., Y. Cao, F. R. Greten and Z. W. Li (2002). "NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit." Nat Rev Cancer **2**(4): 301-310.

Karin, M. and M. Delhase (2000). "The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling." Semin Immunol **12**(1): 85-98.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.

Kishimoto, K., K. Matsumoto and J. Ninomiya-Tsuji (2000). "TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop." J Biol Chem **275**(10): 7359-7364.

Klein, C. A. (2009). "Parallel progression of primary tumours and metastases." Nat Rev Cancer **9**(4): 302-312.

Kluger, H. M., M. M. McCarthy, A. B. Alvero, M. Sznol, S. Ariyan, R. L. Camp, D. L. Rimm and G. Mor (2007). "The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is up-regulated in metastatic melanoma, and XIAP cleavage by Phenoxodiol is associated with Carboplatin sensitization." J Transl Med **5**: 6.

Knudson, A. G. (2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer." Nat Rev Cancer **1**(2): 157-162.

Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.

Kobayashi, K., N. Inohara, L. D. Hernandez, J. E. Galan, G. Nunez, C. A. Janeway, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2002). "RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems." Nature **416**(6877): 194-199.

Koch, A. E., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elner, S. G. Elner and R. M. Strieter (1992). "Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis." Science **258**(5089): 1798-1801.

Koyama, M., M. Ito, H. Nagai, M. Emi and Y. Moriyama (1999). "Inactivation of both alleles of the DPC4/SMAD4 gene in advanced colorectal cancers: identification of seven novel somatic mutations in tumors from Japanese patients." Mutat Res **406**(2-4): 71-77.

Krieg, A., R. G. Correa, J. B. Garrison, G. Le Negrate, K. Welsh, Z. Huang, W. T. Knoefel and J. C. Reed (2009). "XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14524-14529.

Krieg, A. and J. C. Reed (2010). "IAPs and their emergent role in NLR signaling." Cell Cycle **9**(3): 426-427.

Kühnel, W. (2008). Taschenatlas Histologie, Thieme.

Kutikhin, A. G. (2011). "Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology." Hum Immunol **72**(10): 955-968.

Lala, S., Y. Ogura, C. Osborne, S. Y. Hor, A. Bromfield, S. Davies, O. Ogunbiyi, G. Nunez and S. Keshav (2003). "Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells." Gastroenterology **125**(1): 47-57.

Lamouille, S., J. Xu and R. Derynck (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 178-196.

Langley, R. R. and I. J. Fidler (2011). "The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs." Int J Cancer **128**(11): 2527-2535.

le Rolle, A. F., T. K. Chiu, M. Fara, J. Shia, Z. Zeng, M. R. Weiser, P. B. Paty and V. K. Chiu (2015). "The prognostic significance of CXCL1 hypersecretion by human colorectal cancer epithelia and myofibroblasts." J Transl Med **13**: 199.

Lecine, P., S. Esmiol, J. Y. Metais, C. Nicoletti, C. Nourry, C. McDonald, G. Nunez, J. P. Hugot, J. P. Borg and V. Ollendorff (2007). "The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane." J Biol Chem **282**(20): 15197-15207.

Lee, K.-H. (2011). "Inhibitors of Apoptosis Proteins Expression and Their Prognostic Significance in Colorectal Carcinoma." The Korean Journal of Pathology **45**: 397-405.

Leong, H. S., A. E. Robertson, K. Stoletov, S. J. Leith, C. A. Chin, A. E. Chien, M. N. Hague, A. Ablack, K. Carmine-Simmen, V. A. McPherson, C. O. Postenka, E. A. Turley, S. A. Courtneidge, A. F. Chambers and J. D. Lewis (2014). "Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis." Cell Rep **8**(5): 1558-1570.

Levkau, B., K. J. Garton, N. Ferri, K. Kloke, J. R. Nofer, H. A. Baba, E. W. Raines and G. Breithardt (2001). "XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells." Circ Res **88**(3): 282-290.

Li, L., L. H. Bin, F. Li, Y. Liu, D. Chen, Z. Zhai and H. B. Shu (2005). "TRIP6 is a RIP2-associated common signaling component of multiple NF-kappaB activation pathways." J Cell Sci **118**(Pt 3): 555-563.

Li, M., T. Song, Z. F. Yin and Y. Q. Na (2007). "XIAP as a prognostic marker of early recurrence of nonmuscular invasive bladder cancer." Chin Med J (Engl) **120**(6): 469-473.

Lievre, A., J. B. Bachet, V. Boige, A. Cayre, D. Le Corre, E. Buc, M. Ychou, O. Bouche, B. Landi, C. Louvet, T. Andre, F. Bibeau, M. D. Diebold, P. Rougier, M. Ducreux, G. Tomasic, J. F. Emile, F. Penault-Llorca and P. Laurent-Puig (2008). "KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab." J Clin Oncol **26**(3): 374-379.

Liu, J., D. Zhang, W. Luo, J. Yu, J. Li, Y. Yu, X. Zhang, J. Chen, X. R. Wu and C. Huang (2012). "E3 ligase activity of XIAP RING domain is required for XIAP-mediated cancer cell migration, but not for its RhoGDI binding activity." PLoS One **7**(4): e35682.

Liu, J., D. Zhang, W. Luo, Y. Yu, J. Yu, J. Li, X. Zhang, B. Zhang, J. Chen, X. R. Wu, G. Rosas-Acosta and C. Huang (2011). "X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) mediates cancer cell motility via Rho GDP dissociation inhibitor (RhoGDI)-dependent regulation of the cytoskeleton." J Biol Chem **286**(18): 15630-15640.

- Liu, R., A. D. Truax, L. Chen, P. Hu, Z. Li, J. Chen, C. Song, L. Chen and J. P. Ting (2015). "Expression profile of innate immune receptors, NLRs and AIM2, in human colorectal cancer: correlation with cancer stages and inflammasome components." Oncotarget **6**(32): 33456-33469.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lu, C. C., H. C. Kuo, F. S. Wang, M. H. Jou, K. C. Lee and J. H. Chuang (2014). "Upregulation of TLRs and IL-6 as a marker in human colorectal cancer." Int J Mol Sci **16**(1): 159-177.
- Lu, M., S. C. Lin, Y. Huang, Y. J. Kang, R. Rich, Y. C. Lo, D. Myszk, J. Han and H. Wu (2007). "XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization." Mol Cell **26**(5): 689-702.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). Taschenlehrbuch Histologie, Thieme.
- Mahida, Y. R., M. Ceska, F. Effenberger, L. Kurlak, I. Lindley and C. J. Hawkey (1992). "Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis." Clin Sci (Lond) **82**(3): 273-275.
- Majek, O., A. Gondos, L. Jansen, K. Emrich, B. Holleczeck, A. Katalinic, A. Nennecke, A. Eberle, H. Brenner and G. C. S. W. Group (2012). "Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century." Br J Cancer **106**(11): 1875-1880.
- Malek, S., D. B. Huang, T. Huxford, S. Ghosh and G. Ghosh (2003). "X-ray crystal structure of an IkappaBbeta x NF-kappaB p65 homodimer complex." J Biol Chem **278**(25): 23094-23100.
- Mantovani, A., B. Bottazzi, F. Colotta, S. Sozzani and L. Ruco (1992). "The origin and function of tumor-associated macrophages." Immunol Today **13**(7): 265-270.
- Marsigliante, S., C. Vetrugno and A. Muscella (2013). "CCL20 induces migration and proliferation on breast epithelial cells." J Cell Physiol **228**(9): 1873-1883.

McCarthy, J. V., J. Ni and V. M. Dixit (1998). "RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase." J Biol Chem **273**(27): 16968-16975.

Mehrotra, S., L. R. Languino, C. M. Raskett, A. M. Mercurio, T. Dohi and D. C. Altieri (2010). "IAP regulation of metastasis." Cancer Cell **17**(1): 53-64.

Mercurio, F., J. A. DiDonato, C. Rosette and M. Karin (1993). "p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction." Genes Dev **7**(4): 705-718.

Mishra, A., A. Srivastava, T. Mittal, N. Garg and B. Mittal (2013). "Role of inflammatory gene polymorphisms in left ventricular dysfunction (LVD) susceptibility in coronary artery disease (CAD) patients." Cytokine **61**(3): 856-861.

Miyake, M., S. Goodison, V. Urquidi, E. Gomes Giacoia and C. J. Rosser (2013). "Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways." Lab Invest **93**(7): 768-778.

Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." Clin Microbiol Rev **22**(2): 240-273, Table of Contents.

Moreno, L. and T. Gatheral (2013). "Therapeutic targeting of NOD1 receptors." Br J Pharmacol **170**(3): 475-485.

Mufti, A. R., E. Burstein, R. A. Csomos, P. C. Graf, J. C. Wilkinson, R. D. Dick, M. Challa, J. K. Son, S. B. Bratton, G. L. Su, G. J. Brewer, U. Jakob and C. S. Duckett (2006). "XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders." Mol Cell **21**(6): 775-785.

Mulet-Margalef, N. and X. Garcia-Del-Muro (2016). "Sunitinib in the treatment of gastrointestinal stromal tumor: patient selection and perspectives." Onco Targets Ther **9**: 7573-7582.

Muller, M. F., A. E. Ibrahim and M. J. Arends (2016). "Molecular pathological classification of colorectal cancer." Virchows Arch.

Nagi, C., G. Q. Xiao, G. Li, E. Genden and D. E. Burstein (2007). "Immunohistochemical detection of X-linked inhibitor of apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma." Ann Diagn Pathol **11**(6): 402-406.

Naumann, M., A. Nieters, E. N. Hatada and C. Scheidereit (1993). "NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors." Oncogene **8**(8): 2275-2281.

Navas, T. A., D. T. Baldwin and T. A. Stewart (1999). "RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase." J Biol Chem **274**(47): 33684-33690.

NCI. (2006-2012). "SEER Stat Fact Sheets: Colon and Rectum Cancer."

Nemoto, T., M. Kitagawa, M. Hasegawa, S. Ikeda, T. Akashi, T. Takizawa, K. Hirokawa and M. Koike (2004). "Expression of IAP family proteins in esophageal cancer." Exp Mol Pathol **76**(3): 253-259.

Neufeld, G. and O. Kessler (2006). "Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis." Cancer Metastasis Rev **25**(3): 373-385.

Nguyen, D. X., P. D. Bos and J. Massague (2009). "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization." Nat Rev Cancer **9**(4): 274-284.

Nieto, M. A. (2009). "Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives." Int J Dev Biol **53**(8-10): 1541-1547.

Ning, Y., P. C. Manegold, Y. K. Hong, W. Zhang, A. Pohl, G. Lurje, T. Winder, D. Yang, M. J. LaBonte, P. M. Wilson, R. D. Ladner and H. J. Lenz (2011). "Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models." Int J Cancer **128**(9): 2038-2049.

Oeckinghaus, A. and S. Ghosh (2009). "The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(4): a000034.

Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka and G. Nunez (2001). "Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB." J Biol Chem **276**(7): 4812-4818.

Ogura, Y., S. Lala, W. Xin, E. Smith, T. A. Dowds, F. F. Chen, E. Zimmermann, M. Tretiakova, J. H. Cho, J. Hart, J. K. Greenson, S. Keshav and G. Nunez (2003). "Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis." Gut **52**(11): 1591-1597.

Oladipo, O., S. Conlon, A. O'Grady, C. Purcell, C. Wilson, P. J. Maxwell, P. G. Johnston, M. Stevenson, E. W. Kay, R. H. Wilson and D. J. Waugh (2011). "The expression and prognostic impact of CXC-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue." Br J Cancer **104**(3): 480-487.

Omori, E., M. Inagaki, Y. Mishina, K. Matsumoto and J. Ninomiya-Tsuji (2012). "Epithelial transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) is activated through two independent mechanisms and regulates reactive oxygen species." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(9): 3365-3370.

Ori, D., H. Kato, H. Sanjo, S. Tartey, T. Mino, S. Akira and O. Takeuchi (2013). "Essential roles of K63-linked polyubiquitin-binding proteins TAB2 and TAB3 in B cell activation via MAPKs." J Immunol **190**(8): 4037-4045.

Paget, S. (1989). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889." Cancer Metastasis Rev **8**(2): 98-101.

Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6853-6866.

Park, J. H., Y. G. Kim, C. McDonald, T. D. Kanneganti, M. Hasegawa, M. Body-Malapel, N. Inohara and G. Nunez (2007). "RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs." J Immunol **178**(4): 2380-2386.

Peters, B. A., C. Dominianni, J. A. Shapiro, T. R. Church, J. Wu, G. Miller, E. Yuen, H. Freiman, I. Lustbader, J. Salik, C. Friedlander, R. B. Hayes and J. Ahn (2016). "The gut microbiota in conventional and serrated precursors of colorectal cancer." Microbiome **4**(1): 69.

Petrelli, F., K. Borgonovo, M. Cabiddu, M. Ghilardi, V. Lonati, F. Maspero, M. G. Sauta, G. D. Beretta and S. Barni (2013). "FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in 3500 patients with advanced colorectal cancer: a pooled analysis of 29 published trials." Clin Colorectal Cancer **12**(3): 145-151.

Philpott, D. J., M. T. Sorbara, S. J. Robertson, K. Croitoru and S. E. Girardin (2014). "NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease." Nat Rev Immunol **14**(1): 9-23.

Pierobon, M., A. Silvestri, A. Spira, A. Reeder, E. Pin, S. Banks, E. Parasido, K. Edmiston, L. Liotta and E. Petricoin (2014). "Pilot phase I/II personalized therapy trial for metastatic colorectal cancer: evaluating the feasibility of protein pathway activation mapping for stratifying patients to therapy with imatinib and panitumumab." J Proteome Res **13**(6): 2846-2855.

Pox, C., S. Aretz, S. C. Bischoff, U. Graeven, M. Hass, P. Heussner, W. Hohenberger, A. Holstege, J. Hubner, F. Kolligs, M. Kreis, P. Lux, J. Ockenga, R. Porschen, S. Post, N. Rahner, A. Reinacher-Schick, J. F. Riemann, R. Sauer, A. Sieg, W. Scheppach, W. Schmitt, H. J. Schmoll, K. Schulmann, A. Tannapfel, W. Schmiegel, A. Leitlinienprogramm Onkologie der, V. Deutschen Krebsgesellschaft e and V. Deutschen Krebshilfe e (2013). "[S3-guideline colorectal cancer version 1.0]." Z Gastroenterol **51**(8): 753-854.

Proell, M., S. J. Riedl, J. H. Fritz, A. M. Rojas and R. Schwarzenbacher (2008). "The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences." PLoS One **3**(4): e2119.

Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." Cell **118**(2): 229-241.

Ramp, U., T. Krieg, E. Caliskan, C. Mahotka, T. Ebert, R. Willers, H. E. Gabbert and C. D. Gerharz (2004). "XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas." Hum Pathol **35**(8): 1022-1028.

Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue." Pathologe **8**: 138-140.

Reynolds, I. S., A. O'Toole, J. Deasy, D. A. McNamara and J. P. Burke (2017). "A meta-analysis of the clinicopathological characteristics and survival outcomes of inflammatory bowel disease associated colorectal cancer." Int J Colorectal Dis.

Rice, N. R., M. L. MacKichan and A. Israel (1992). "The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions." Cell **71**(2): 243-253.

Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-928.

Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." EMBO J **16**(23): 6914-6925.

Sahdo, B., E. Sarndahl, F. Elgh and B. Soderquist (2013). "Propionibacterium acnes activates caspase-1 in human neutrophils." APMIS **121**(7): 652-663.

Sakurai, H., H. Miyoshi, J. Mizukami and T. Sugita (2000). "Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1." FEBS Lett **474**(2-3): 141-145.

Sakurai, H., H. Miyoshi, W. Toriumi and T. Sugita (1999). "Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with I kappa B kinases to stimulate NF-kappa B activation." J Biol Chem **274**(15): 10641-10648.

Sakurai, H., N. Shigemori, K. Hasegawa and T. Sugita (1998). "TGF-beta-activated kinase 1 stimulates NF-kappa B activation by an NF-kappa B-inducing kinase-independent mechanism." Biochem Biophys Res Commun **243**(2): 545-549.

Sato, Y., Y. Goto, N. Narita and D. S. Hoon (2009). "Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment." Cancer Microenviron **2 Suppl 1**: 205-214.

Sato, Y., A. Yoshikawa, M. Yamashita, A. Yamagata and S. Fukai (2009). "Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by NZF domains of TAB2 and TAB3." EMBO J **28**(24): 3903-3909.

Saxena, M. and G. Yeretssian (2014). "NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer." Front Immunol **5**: 327.

Schadendorf, D., A. Moller, B. Algermissen, M. Worm, M. Sticherling and B. M. Czarnetzki (1993). "IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor." J Immunol **151**(5): 2667-2675.

Schwabe, R. F. and C. Jobin (2013). "The microbiome and cancer." Nat Rev Cancer **13**(11): 800-812.

Serrano-Gomez, S. J., M. Maziveyi and S. K. Alahari (2016). "Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications." Mol Cancer **15**: 18.

Sha, W. C., H. C. Liou, E. I. Tuomanen and D. Baltimore (1995). "Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses." Cell **80**(2): 321-330.

Shen, X. J., J. F. Rawls, T. Randall, L. Burcal, C. N. Mpande, N. Jenkins, B. Jovov, Z. Abdo, R. S. Sandler and T. O. Keku (2010). "Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas." Gut Microbes **1**(3): 138-147.

Shibuya, H., K. Yamaguchi, K. Shirakabe, A. Tonegawa, Y. Gotoh, N. Ueno, K. Irie, E. Nishida and K. Matsumoto (1996). "TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction." Science **272**(5265): 1179-1182.

Shih, V. F., R. Tsui, A. Caldwell and A. Hoffmann (2011). "A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling." Cell Res **21**(1): 86-102.

Shim, J. H., C. Xiao, A. E. Paschal, S. T. Bailey, P. Rao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto and S. Ghosh (2005). "TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo." Genes Dev **19**(22): 2668-2681.

Silke, J. and D. Vucic (2014). "IAP family of cell death and signaling regulators." Methods Enzymol **545**: 35-65.

Silver, R. T., J. Cortes, R. Waltzman, M. Mone and H. Kantarjian (2009). "Sustained durability of responses and improved progression-free and overall survival with imatinib treatment for accelerated phase and blast crisis chronic myeloid leukemia: long-term follow-up of the STI571 0102 and 0109 trials." Haematologica **94**(5): 743-744.

Singel, S. M., K. Batten, C. Cornelius, G. Jia, G. Fasciani, S. L. Barron, W. E. Wright and J. W. Shay (2014). "Receptor-interacting protein kinase 2 promotes triple-negative breast cancer cell migration and invasion via activation of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase pathways." Breast Cancer Res **16**(2): R28.

Sobhani, I., J. Tap, F. Roudot-Thoraval, J. P. Roperch, S. Letulle, P. Langella, G. Corthier, J. Tran Van Nhieu and J. P. Furet (2011). "Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients." PLoS One **6**(1): e16393.

Sokol, C. L. and A. D. Luster (2015). "The chemokine system in innate immunity." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(5).

Starling, N., F. Vazquez-Mazon, D. Cunningham, I. Chau, J. Tabernero, F. J. Ramos, T. J. Iveson, M. P. Saunders, E. Aranda, A. M. Countouriotis, A. Ruiz-Garcia, G. Wei, J. M. Tursi, C. Guillen-Ponce and A. Carrato (2012). "A phase I study of sunitinib in combination with FOLFIRI in patients with untreated metastatic colorectal cancer." Ann Oncol **23**(1): 119-127.

Stein, A., V. Petersen, M. Schulze, J. Seraphin, H. G. Hoeffkes, A. R. Valdix, J. Schroeder, J. Herrenberger, F. Boxberger, B. Leutgeb, A. Hinke, A. Kutscheidt and D. Arnold (2015). "Bevacizumab plus chemotherapy as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: results from a large German community-based observational cohort study." Acta Oncol **54**(2): 171-178.

Stoletov, K., H. Kato, E. Zardouzian, J. Kelber, J. Yang, S. Shattil and R. Klemke (2010). "Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells." J Cell Sci **123**(Pt 13): 2332-2341.

Strieter, R. M., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott and et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." J Biol Chem **270**(45): 27348-27357.

Strum, W. B. (2016). "Colorectal Adenomas." N Engl J Med **374**(11): 1065-1075.

Sugiura, Y., K. Kamdar, S. Khakpour, G. Young, W. J. Karpus and R. W. DePaolo (2013). "TLR1-induced chemokine production is critical for mucosal immunity against *Yersinia enterocolitica*." Mucosal Immunol **6**(6): 1101-1109.

Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." Cell Res **21**(1): 71-85.

Swidsinski, A., V. Loening-Baucke and A. Herber (2009). "Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview." J Physiol Pharmacol **60 Suppl 6**: 61-71.

Tada, H., S. Aiba, K. Shibata, T. Ohteki and H. Takada (2005). "Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells." Infect Immun **73**(12): 7967-7976.

Takaesu, G., S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji and K. Matsumoto (2000). "TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway." Mol Cell **5**(4): 649-658.

Takeda, K. and S. Akira (2015). "Toll-like receptors." Curr Protoc Immunol **109**: 14 12 11-10.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.

Tanaka, K., M. Oshimura, R. Kikuchi, M. Seki, T. Hayashi and M. Miyaki (1991). "Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18." Nature **349**(6307): 340-342.

Tanaka, T., Z. Bai, Y. Srinoulprasert, B. G. Yang, H. Hayasaka and M. Miyasaka (2005). "Chemokines in tumor progression and metastasis." Cancer Sci **96**(6): 317-322.

Tang, D., R. Kang, C. B. Coyne, H. J. Zeh and M. T. Lotze (2012). "PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity." Immunol Rev **249**(1): 158-175.

Tang, G., Y. Minemoto, B. Dibling, N. H. Purcell, Z. Li, M. Karin and A. Lin (2001). "Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes." Nature **414**(6861): 313-317.

Tannapfel, A. and C. Wittekind (2010). "[The current TNM system for gastrointestinal tumors part II]." Pathologie **31**(5): 348-352.

Tato, C. M. and D. J. Cua (2008). "SnapShot: Cytokines I." Cell **132**(2): 324, 324 e321.

Tchorzewski, M., P. Lewkowicz, A. Dziki and H. Tchorzewski (2014). "Expression of toll-like receptors on human rectal adenocarcinoma cells." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **62**(3): 247-251.

Teng, M. W., J. Galon, W. H. Fridman and M. J. Smyth (2015). "From mice to humans: developments in cancer immunoediting." J Clin Invest **125**(9): 3338-3346.

Thome, M., K. Hofmann, K. Burns, F. Martinon, J. L. Bodmer, C. Mattmann and J. Tschopp (1998). "Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1." Curr Biol **8**(15): 885-888.

Tigno-Aranjuez, J. T., J. M. Asara and D. W. Abbott (2010). "Inhibition of RIP2's tyrosine kinase activity limits NOD2-driven cytokine responses." Genes Dev **24**(23): 2666-2677.

Tokunaga, F. and K. Iwai (2012). "LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses." Microbes Infect **14**(7-8): 563-572.

Townsley, C. A., P. Major, L. L. Siu, J. Dancey, E. Chen, G. R. Pond, T. Nicklee, J. Ho, D. Hedley, M. Tsao, M. J. Moore and A. M. Oza (2006). "Phase II study of erlotinib (OSI-774) in patients with metastatic colorectal cancer." Br J Cancer **94**(8): 1136-1143.

Uchi, R., Y. Takahashi, A. Niida, T. Shimamura, H. Hirata, K. Sugimachi, G. Sawada, T. Iwaya, J. Kurashige, Y. Shinden, T. Iguchi, H. Eguchi, K. Chiba, Y. Shiraishi, G. Nagae, K. Yoshida, Y. Nagata, H. Haeno, H. Yamamoto, H. Ishii, Y. Doki, H. Iinuma, S. Sasaki, S. Nagayama, K. Yamada, S. Yachida, M. Kato, T. Shibata, E. Oki, H. Saeki, K. Shirabe, Y. Oda, Y. Maehara, S. Komune, M. Mori, Y. Suzuki, K. Yamamoto, H. Aburatani, S. Ogawa, S. Miyano and K. Mimori (2016). "Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution." PLoS Genet **12**(2): e1005778.

Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase and H. Takada (2007). "Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines." Mol Immunol **44**(12): 3100-3111.

Uehara, A., Y. Sugawara, S. Kurata, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, Y. Satta, T. Sasano, S. Sugawara and H. Takada (2005). "Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells." Cell Microbiol **7**(5): 675-686.

Uematsu, S. and S. Akira (2006). "Toll-like receptors and innate immunity." J Mol Med (Berl) **84**(9): 712-725.

Vandercappellen, J., J. Van Damme and S. Struyf (2008). "The role of CXC chemokines and their receptors in cancer." Cancer Lett **267**(2): 226-244.

Vaux, D. L. and J. Silke (2005). "IAPs, RINGs and ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 287-297.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med **319**(9): 525-532.

Wang, D., H. Wang, J. Brown, T. Daikoku, W. Ning, Q. Shi, A. Richmond, R. Strieter, S. K. Dey and R. N. DuBois (2006). "CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer." J Exp Med **203**(4): 941-951.

Weinberg, R. A. (2007). The biology of cancer, Garland Science, Tylor & Francis Group, LLC.

Weiss, L. (1992). "Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy." Clin Exp Metastasis **10**(3): 191-199.

Werner, T. A., Y. Tamkan-Olcek, L. Dizdar, J. C. Riemer, A. Wolf, K. Cupisti, P. E. Verde, W. T. Knoefel and A. Krieg (2016). "Survivin and XIAP: two valuable biomarkers in medullary thyroid carcinoma." Br J Cancer **114**(4): 427-434.

Williams, I. R. (2006). "CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis." Ann N Y Acad Sci **1072**: 52-61.

Wittekind, C. and H. Meyer (2010). TNM-Klassifikation maligner Tumoren., Springer Verlag.

Wolpin, B. M. and R. J. Mayer (2008). "Systemic treatment of colorectal cancer." Gastroenterology **134**(5): 1296-1310.

Wu, C. J., D. B. Conze, T. Li, S. M. Srinivasula and J. D. Ashwell (2006). "Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]." Nat Cell Biol **8**(4): 398-406.

Xiang, G., X. Wen, H. Wang, K. Chen and H. Liu (2009). "Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human colorectal cancer and its correlation with prognosis." J Surg Oncol **100**(8): 708-712.

Xiao, G. and J. Fu (2011). "NF-kappaB and cancer: a paradigm of Yin-Yang." Am J Cancer Res **1**(2): 192-221.

Xu, Y. C., Q. Liu, J. Q. Dai, Z. Q. Yin, L. Tang, Y. Ma, X. L. Lin and H. X. Wang (2014). "Tissue microarray analysis of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) expression in breast cancer patients." Med Oncol **31**(3): 764.

Yamaguchi, K., S. Nagai, J. Ninomiya-Tsuji, M. Nishita, K. Tamai, K. Irie, N. Ueno, E. Nishida, H. Shibuya and K. Matsumoto (1999). "XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway." EMBO J **18**(1): 179-187.

Yang, S., B. Wang, F. Humphries, R. Jackson, M. E. Healy, R. Bergin, G. Aviello, B. Hall, D. McNamara, T. Darby, A. Quinlan, F. Shanahan, S. Melgar, P. G. Fallon and P. N. Moynagh (2013). "Pellino3 ubiquitinates RIP2 and mediates Nod2-induced signaling and protective effects in colitis." Nat Immunol **14**(9): 927-936.

Zackular, J. P., N. T. Baxter, K. D. Iverson, W. D. Sadler, J. F. Petrosino, G. Y. Chen and P. D. Schloss (2013). "The gut microbiome modulates colon tumorigenesis." MBio **4**(6): e00692-00613.

Zhang, D., J. Lin and J. Han (2010). "Receptor-interacting protein (RIP) kinase family." Cell Mol Immunol **7**(4): 243-249.

Zhang, D. W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B. J. Lu, S. C. Lin, M. Q. Dong and J. Han (2009). "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis." Science **325**(5938): 332-336.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2012). "The chemokine superfamily revisited." Immunity **36**(5): 705-716.

## 9 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W.T. Knoefel für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes in seiner Klinik.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Krieg danke ich für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die Übernahme des Erstgutachterpostens und insbesondere für die außerordentlich gute Betreuung. Durch seine Anregungen und sein Engagement hat er entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. In seiner Arbeitsgruppe habe ich mich immer am richtigen Platz gefühlt. Auch möchte ich mich für die Möglichkeit an Kongressen teilzunehmen bedanken.

Frau Prof. Dr. Henrike Heise danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die unkomplizierte und freundliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein möchte ich herzlich für die Aufnahme in seinem Labor und die jederzeit bereitwillige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Pfeffer danke ich für die Bereitstellung eines gelegentlichen Arbeitsplatzes in seinem Institut. An dieser Stelle danke ich auch seiner Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor.

Dem gesamten Laborteam der Chirurgischen Forschung möchte ich für die immer angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken. Ohne euch hätte es nur halb so viel Spaß gemacht! Danke besonders an Bianca, Birte, Imke und Levent!

Ein großes Dankeschön gilt insbesondere Maria.

Bei meiner Familie und Hannes bedanke ich mich für die dauerhafte Unterstützung meiner Pläne, für abwechslungsreiche Stunden und offene Ohren in den letzten Jahren.

Großer Dank gebührt auch meinen Freunden.

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner versichere ich, dass ich weder an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf noch an einer anderen Universität versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ebenso habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 02.10.2017