

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Pharmakologie
Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

**Charakterisierung und funktionelle Analyse von humanen
Kolonkarzinomzelllinien mit stabilem genetischem Knockdown von TRIM25**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Victoria Andrea Maria Recknagel

aus Hanau

Frankfurt am Main, 2024

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Wolfgang Eberhardt
Korreferent:	Prof. Dr. Andreas Mathias Weigert
Tag der mündlichen Prüfung:	15.07.2024

Für meine geliebten Eltern,
für meine große Liebe.

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	VIII
<u>Abbildungsverzeichnis</u>	XI
<u>Tabellenverzeichnis</u>	XII
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. TRIM Proteine und ihre Bedeutung bei der Tumorgenese	1
1.1.1. Struktureller Aufbau von Mitgliedern der TRIM Proteinfamilie	1
1.1.2. Rolle der TRIM Proteine beim proteasomalen Abbau	2
1.1.3. TRIM Proteine als Modulatoren onkogener Signalprozesse in gastrointestinalen Tumoren	4
1.1.4. Funktionelle Rolle von TRIM25 bei der Immunabwehr und verschiedenen malignen Tumoren des Menschen	8
1.2. Apoptose und ihre Bedeutung bei der Therapieresistenz	11
1.2.1. Struktur und Funktionen von Caspasen	11
1.2.2. Apoptose	13
1.2.3. Apoptosehemmung als Mechanismus der Chemotherapieresistenz	15
1.3. Pyroptose und Inflammasomaktivierung im Darm	17
1.3.1. Aufbau und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms	17
1.3.2. Physiologische und pathophysiologische Rollen des NLRP3-Inflammasoms	21
1.4. Kolorektales Karzinom	22
<u>2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit</u>	26
<u>3. Material</u>	27
3.1. Zelllinien und Kulturmedien	27
3.2. Instrumente	28
3.3. Chemikalien	29
3.4. Verbrauchsmaterialien	32
3.5. Kits	33
3.6. Lösungen, Puffer und Gele	34
3.6.1. Semiquantitative PCR	34
3.6.2. Proteingewinnung	34

3.6.3.	Gele	35
3.6.4.	Western Blot-Analyse	37
3.6.5.	FACS	39
3.7.	Enzyme	39
3.8.	Antikörper	39
3.8.1.	Primäre Antikörper	39
3.8.2.	Sekundäre Antikörper	40
3.9.	Primer für die PCR	40
3.10.	TaqMan-Sonden	41
3.11.	<i>Small interfering RNAs (siRNAs)</i>	41
4.	Methoden	42
4.1.	Zellkultur, Einfrieren und Auftauen der Zellen	42
4.2.	Transfektion von siRNAs	43
4.3.	Stimulation der Zellen	43
4.4.	Bestimmung der RNA-Expressionsspiegel	44
4.4.1.	RNA-Gewinnung und -Konzentrationsmessung	44
4.4.2.	RT-PCR	45
4.4.2.1.	Reverse Transkription (RT)	45
4.4.2.2.	Semiquantitative PCR	46
4.4.2.3.	Quantitative PCR (TaqMan)	47
4.5.	Western Blot-Analyse	49
4.5.1.	Totalproteingewinnung	49
4.5.2.	Gewinnung von nukleären und cytosolischen Fraktionen	50
4.5.3.	Proteinquantifizierung	50
4.5.4.	SDS-PAGE	51
4.5.5.	Proteintransfer	52
4.5.6.	Immunodetektion	52
4.5.7.	Densitometrie	53
4.6.	Proliferationsassay	53
4.7.	<i>In vitro</i>-Wundheilungsassay (<i>Scratchassay</i>)	54
4.8.	FACS	56

4.8.1.	Gewinnung von FACS Proben und Vorbereitung zur Messung	56
4.8.2.	FACS Messung	57
4.8.3.	FACS <i>Gating</i>	57
4.9.	Statistik und Datenanalyse	58
<u>5.</u>	<u>Ergebnisse</u>	<u>59</u>
5.1.	TRIM25 Expression in RKO-Zelllinien mit stabilem TRIM25 <i>Knockdown</i>	59
5.2.	Einfluss des stabilen TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen	60
5.3.	Einfluss des stabilen TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf die Migration von Kolonkarzinomzellen	61
5.4.	Einfluss des TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf den Zellzyklus von Kolonkarzinomzellen	63
5.5.	Der <i>Knockdown</i> von TRIM25 sensibilisiert Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose	65
5.6.	Untersuchung zur Abhängigkeit der Sensitivierung der Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose von Caspase-2 und -7	70
5.7.	Einfluss des stabilen TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf die Caspase-7 Expression in Kolonkarzinomzellen	72
5.8.	Einfluss des stabilen TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf ausgewählte Apoptose- und Inflammationmarker nach Behandlung mit NLRP3-Inflammation-aktivierenden Substanzen	74
5.9.	Einfluss des stabilen TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf die Expression apoptose- und inflammationsrelevanter Proteine in Kolonkarzinomzellen	78
<u>6.</u>	<u>Diskussion</u>	<u>80</u>
6.1.	TRIM25 hat in RKO-Zellen einen heterogenen Einfluss auf für die Tumorentstehung und -progression wichtige Eigenschaften	80
6.2.	TRIM25 als vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt in der Resensibilisierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber gängigen Therapien	82
6.3.	Der positive Einfluss von TRIM25 auf das NLRP3-Inflammationssom sowie dessen mögliche Bedeutung für die Kolonkarzinogenese	86

6.4.	Ausblick: Etablierung von <i>in vivo</i> -TRIM25 <i>Knockdown/Knockout</i> -Modellen als nächster Schritt in der Entwicklung neuer Therapien des kolorektalen Karzinoms	92
7.	<u>Zusammenfassung/Summary</u>	93
7.1.	Zusammenfassung	93
7.2.	Summary	95
	<u>Literaturverzeichnis</u>	97
	<u>Anhang</u>	117
	<u>Schriftliche Erklärung</u>	119
	<u>Danksagung</u>	120

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>
5-FU	5-Fluorouracil
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CF	cytosolische Fraktion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
Doxo.	Doxorubicin
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	<i>hours</i>

HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HDAC2	Histon-Deacetylase 2
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kE	kurze Exposition
lE	lange Exposition
LPS	Lipopolysaccharid
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
min	Minuten
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NF	nukleäre Fraktion
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamidgelelektrophorese)
PARP-1	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase 1
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
qPCR	quantitative PCR
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (Relative Zentrifugalbeschleunigung)
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
s	Sekunden
s.	siehe

SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
shCtrl.	RKO shRNA <i>control</i> Zellen
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
shTRIM25 #1-5	RKO shRNA TRIM25 Zellen, Klon 1-5
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
u.a.	unter anderem
uB	unspezifische Banden
v.a.	vor allem
wt	RKO Wildtyp Zellen
z.B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Klassifikation der TRIM Proteinfamilie_____	2
Abbildung 2. Ubiquitinierungsmechanismen und ihre Rolle beim proteasomalen Abbau__	3
Abbildung 3. Klassifikation der Caspasen anhand ihrer Struktur und Funktion_____	12
Abbildung 4. Schematische Darstellung der Zellkulturschalen des <i>in vitro</i> - Wundheilungsassays_____	55
Abbildung 5. Bestimmung der TRIM25 Expression auf Proteinebene bei stabilem genetischem <i>Knockdown</i> von TRIM25_____	59
Abbildung 6. Der stabile TRIM25 <i>Knockdown</i> führt zur signifikant vermehrten Proliferation von RKO-Zelllinien bei FCS-Stimulus_____	60
Abbildung 7. Einfluss des stabilen TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf die Migration von RKO- Zelllinien_____	62
Abbildung 8. Einfluss des stabilen TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf den Zellzyklus von RKO- Zelllinien_____	64
Abbildung 9. Der transiente TRIM25 <i>Knockdown</i> hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus von RKO-Zelllinien_____	65
Abbildung 10. Der stabile TRIM25 <i>Knockdown</i> führt zur Sensibilisierung der RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose_____	67
Abbildung 11. Der transiente TRIM25 <i>Knockdown</i> führt zur Sensibilisierung der RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose_____	69
Abbildung 12. Im FACS ist eine signifikant vermehrte Doxorubicin-induzierte Apoptose in shTRIM25 #5 Zellen nachweisbar_____	70
Abbildung 13. Der stabile TRIM25 <i>Knockdown</i> sensibilisiert RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose über einen Caspase-2-unabhängigen Mechanismus_____	72
Abbildung 14. Einfluss des stabilen TRIM25 <i>Knockdowns</i> auf die Caspase-7 Expression in RKO-Zelllinien_____	74
Abbildung 15. Die alleinige Stimulation mit LPS hat keinen Einfluss auf die Spaltung von Caspase-7 und PARP-1 in RKO-Zelllinien_____	75

Abbildung 16. Der stabile TRIM25 *Knockdown* führt zur verminderten Caspase-3-, -7- und PARP-1-Spaltung in RKO-Zelllinien nach Behandlung mit klassischen Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms _____ 77

Abbildung 17. Der stabile TRIM25 *Knockdown* hat keinen Einfluss auf die Expression der analysierten apoptose- und inflammasomrelevanten Proteine in RKO-Zelllinien _____ 79

Abbildung 18. Grafische Zusammenfassung möglicher TRIM25-abhängiger Effekte auf Apoptose vs. NLRP3-Inflammasom _____ 91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Mastermix für eine RT _____ 45

Tabelle 2. Mastermix für eine PCR _____ 46

Tabelle 3. Temperaturschema der PCR _____ 47

Tabelle 4. Mix der qPCR für ein Well _____ 48

Tabelle 5. Zyklen der qPCR _____ 49

Tabelle 6. Exemplarisches Schema des Proliferationsassays in einer 96-Well-Platte _____ 53

1. Einleitung

1.1. TRIM Proteine und ihre Bedeutung bei der Tumorgenese

1.1.1. Struktureller Aufbau von Mitgliedern der TRIM Proteinfamilie

Die Mitglieder der TRIM (*tripartite motif*) Proteinfamilie gehören zu einer großen Gruppe von Proteinen, die sich durch ihre hoch konservierte und charakteristische N-terminale Struktur auszeichnen. In der Orientierung vom N- zum C-Terminus setzt sich diese aus drei (*tripartite*, dreigliedrig) Zink-bindenden Domänen zusammen, der RING-Domäne (*really interesting new gene*), ein bis zwei B-Box-Domänen (B1 und B2) und der CC-Domäne (*coiled-coil*) (Abbildung 1). Aufgrund dieser charakteristischen Struktur werden TRIM Proteine auch als RBCC-Proteine (*RING finger, B-box, coiled-coil*) bezeichnet. Der C-Terminus der TRIM Proteine ist variabel.¹⁻³ Aktuell sind mehr als 70 verschiedene TRIM Proteine bekannt, die anhand der Struktur ihres C-Terminus in 11 Subfamilien (C-I bis C-XI) eingeteilt werden. Im Gegensatz dazu gibt es auch TRIM Proteine, die nicht in die Klassifikation miteinbezogen werden, da sie keine RING-Domäne besitzen.⁴⁻⁶ Die Domänen der TRIMs definieren nicht nur ihre Zugehörigkeit zur TRIM Proteinfamilie, sondern ermöglichen ihnen auch verschiedenste Funktionen.⁷ RING-Fingerproteine besitzen bekannterweise eine Ubiquitin-Ligaseaktivität.⁸ Auch für die RING-Domäne einiger TRIM Proteine konnte die E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität belegt werden, wie z.B. für TRIM5 α , TRIM8, TRIM11, TRIM21, TRIM22 und TRIM25.⁵ Bei den B-Box-Domänen werden zwei unterschiedliche Typen unterschieden, B-Box Typ 1 und B-Box Typ 2. Beide bestehen aus ternären Strukturen, die strukturell der RING-Domäne ähneln.^{9,10} Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit wird angenommen, dass B-Box-Domänen die E3-Ligaseaktivität der RING-Domäne verstärken.⁶ Des Weiteren ist bekannt, dass manche TRIMs, wie z.B. TRIM16, trotz ihrer fehlenden RING-Domäne eine Ubiquitin-Ligaseaktivität aufweisen. Diese wird den strukturell ähnlichen B-Boxen zugeschrieben.¹¹ Die CC-Domäne ist dagegen für Protein-Protein-Interaktionen durch Homo- bzw. Hetero-Oligomerisierung und die zelluläre Kompartimentierung der TRIM Proteine von Bedeutung.¹ Die C-terminale Region der TRIM Proteine ist für die Substraterkennung verantwortlich.¹²

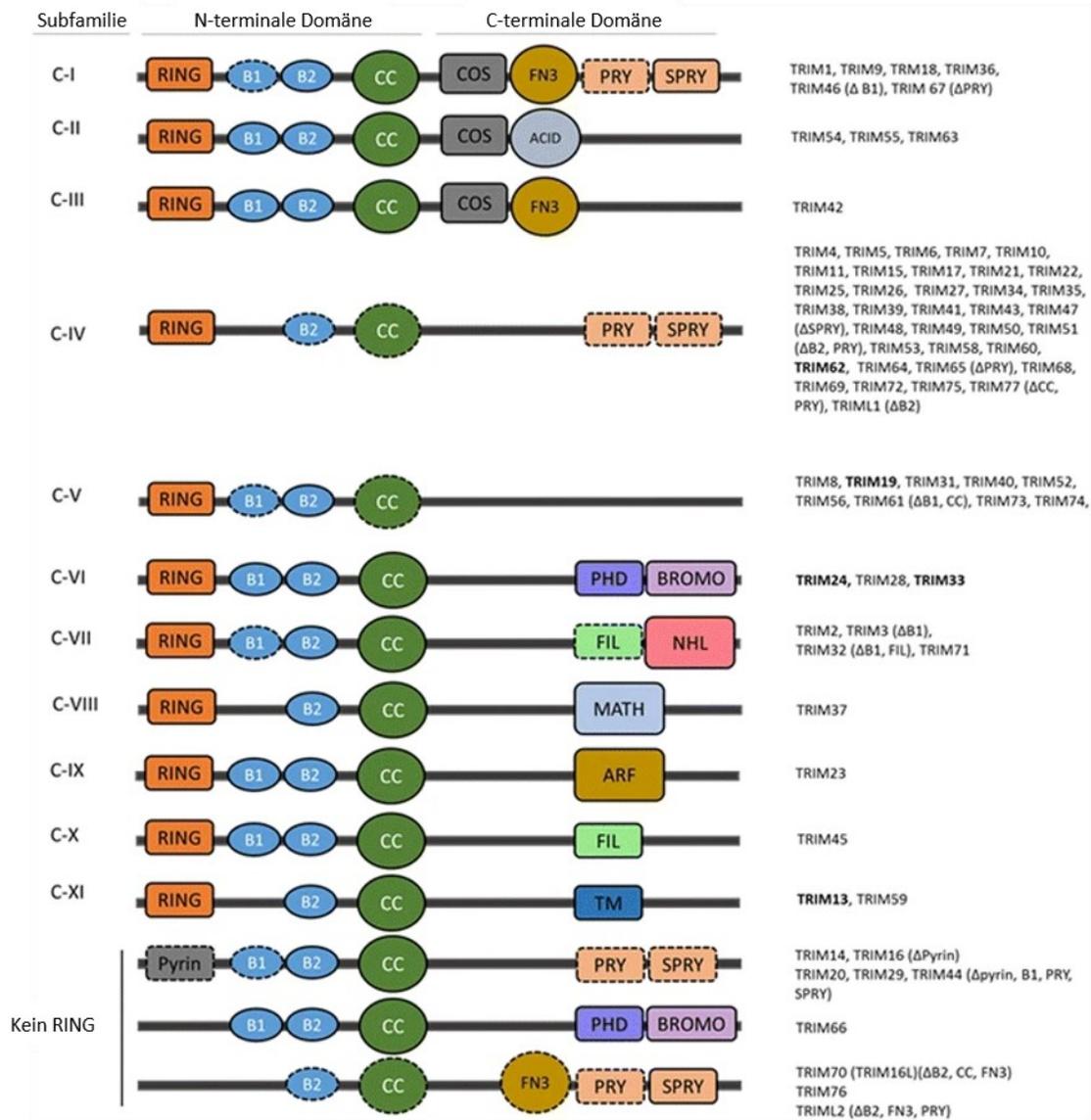


Abbildung 1. Klassifikation der TRIM Proteinfamilie

Die meisten TRIM Proteine besitzen eine typische N-terminale Struktur, bestehend aus einer RING-Domäne, ein bis zwei B-Box-Domänen (B1 und B2) und einer CC-Domäne. Basierend auf ihrer variablen C-terminalen Domäne werden TRIM Proteine in 11 Subfamilien eingeteilt (C-I bis C-XI). Zusätzlich gibt es eine nicht separat klassifizierte Gruppe, welche keine RING-Domäne aufweist (modifizierte Abbildung aus Crawford *et al.* 2018⁶).

1.1.2. Rolle der TRIM Proteine beim proteasomalen Abbau

Ein zentraler Prozess beim proteasomalen Abbau in eukaryotischen Zellen ist die Ubiquitinierung durch das sogenannte **Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)**.¹³ Ubiquitinierung zählt zu den posttranslationalen Modifikation von Proteinen.¹⁴ Das UPS besteht aus einer Reihe von Enzymen, den Ubiquitin-aktivierenden Enzymen (E1), den Ubiquitin-konjugierenden

Enzymen (E2) und den Ubiquitin-Ligasen (E3).¹⁵⁻¹⁷ Es gibt über 600 E3-Ubiquitin-Ligasen, welche in drei Klassen eingeteilt werden: RING (*really interesting new gene*), HECT (*homologous to E6-AP C-Terminus*) and RBR (*RING-between-RING*).¹⁸ RING-Proteine repräsentieren die größte Klasse der E3-Ligasen und innerhalb der RING-E3-Ligasen stellen TRIM Proteine die größte Subfamilie dar.^{6,19} Bei der Ubiquitinierung wird das Ubiquitin zunächst durch ein E1-Enzym aktiviert, unter ATP-Verbrauch bildet sich ein E1-Ubiquitin Thioester (Abbildung 2). Das aktivierte Ubiquitin wird sodann auf das E2-Enzym übertragen. Die RING-E3-Ligasen binden schließlich den E2-Ubiquitinkomplex und ihr Substrat, auf diese Weise können sie den Transfer des Ubiquitins vom E2-Enzym auf einen Lysinrest des Substrats unter Ausbildung einer Isopeptidbindung katalysieren.¹⁵⁻¹⁷

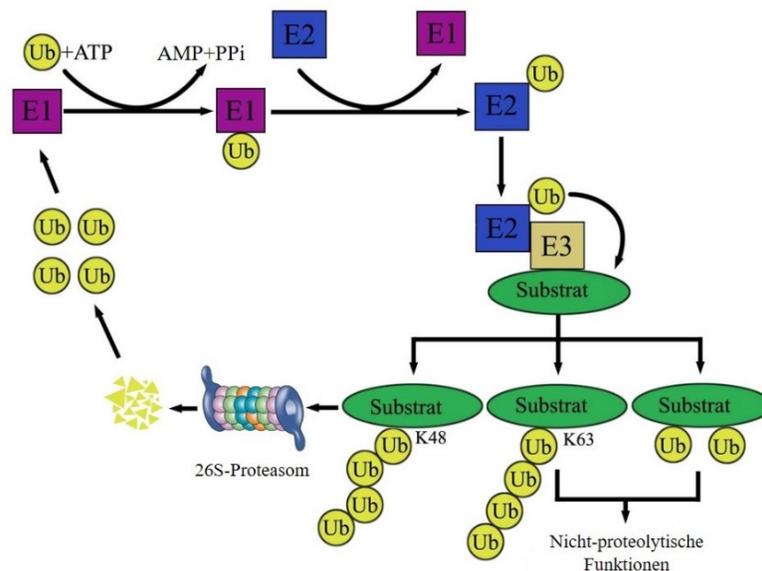


Abbildung 2. Ubiquitinierungsmechanismen und ihre Rolle beim proteasomalen Abbau

Die Ubiquitinierung erfolgt durch E1-, E2- und E3-Enzyme entsprechend des gezeigten Schemas. Die Reaktionskette kann einfach (Monoubiquitinierung) oder mehrfach (Polyubiquitinierung) durchlaufen werden. In Abhängigkeit der Ubiquitinverbindungen werden polyubiquitinierte Proteine entweder dem proteasomalen Abbau zugeführt (K48-Verbindungen) oder erfüllen nicht proteolytische Funktionen (K63-Verbindungen) (modifizierte Abbildung aus Gong *et al.* 2015²⁰).

Im Rahmen der Polyubiquitinierung wird Ubiquitin selbst an sieben verschiedenen Lysinresten (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63) oder einem Methioninrest (M1) ubiquitiniert.²¹ Dabei führt beispielsweise die Polyubiquitinierung mit K48-Ubiquitin-Verbindungen zur proteasomalen Degradation durch das 26S-Proteasom.²² Die Ubiquitinierung ist aber nicht nur für die Proteinqualitätskontrolle von Bedeutung. Auch für die Regulation von Protein-

Protein-Interaktionen, der Aktivität und Lokalisation von Proteinen und für intrazelluläre Prozesse, wie z.B. Rezeptorinternalisierung und Regulation von Signalmolekülen, spielt die Ubiquitinierung eine Rolle.^{19,23} Die Polyubiquitinierung mit K63-Verknüpfungen zwischen den Ubiquitinmolekülen führt in der Regel zur funktionellen Aktivierung des Proteins²⁴ und vermittelt so außer der Degradation durch das 26S-Proteasom z.B. die Regulation von vesikulären Transportmechanismen, Proteinkinaseaktivierung, DNA-Reparatur und Chromatinstrukturierung.^{22,25} Im Rahmen posttranslationaler Modifikationen sind E3-Ligasen neben der (Poly-) Ubiquitinierung auch für den Transfer Ubiquitin-ähnlicher Proteine wie SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), ISG15 (*interferon-stimulated gene 15*) und Nedd8 (*neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8*) verantwortlich.^{26,27} TRIM Proteine vermitteln als E3-Ubiquitinligasen interessanterweise nicht nur die Ubiquitinierung und ubiquitin-ähnliche Modifikationen, sondern auch die direkte Regulation von Nukleinsäuren.^{19,28}

1.1.3. TRIM Proteine als Modulatoren onkogener Signalprozesse in gastrointestinalen Tumoren

TRIM Proteine nehmen eine Vielzahl unterschiedlicher regulatorischer Funktionen in zellulären Prozessen ein, wie z.B. bei der Proliferation,²⁹ der Migration,²⁹ dem Zellzyklus,³⁰ der Proteinqualitätskontrolle, der intrazellulären Signaltransduktion, der Apoptose, dem angeborenen Immunsystem, der Autophagie und der Karzinogenese.^{22,31} So können TRIMs beispielsweise über die Beeinflussung verschiedener für die Tumorentstehung relevanter Signalprozesse in die Tumorentwicklung und -progression eingreifen. Hierbei führen sie sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Funktionen aus.^{19,31} Interessanterweise nehmen manche TRIMs eine duale Rolle ein, dasselbe TRIM Protein wirkt in Abhängigkeit des Tumortyps als Onkogen oder als Tumorsuppressor.¹⁹ In Tumoren sind onkogene TRIM Proteine in der Regel vermehrt exprimiert, während tumorsuppressive TRIM Proteine eine verminderte Expression aufweisen.^{19,22} Die Überexpression onkogener TRIMs korreliert dabei mit einem verminderten Langzeitüberleben von Tumorpatienten und einer erhöhten Tumorrezidivrate.¹⁹ Durch Modulation onkogener Signalprozesse spielen TRIM Proteine auch in der Entwicklung und Progression gastrointestinaler Tumoren eine wichtige Rolle¹⁹: Die

betreffenden TRIM Proteine regulieren z.B. den Abbau und die Aktivität des Tumorsuppressors p53. Über p53 regulierte Signalwege induzieren u.a. einen Zellzyklusarrest mit folgender Apoptose bei irreparablen DNA-Schäden und regulieren dadurch Zellzyklus, Apoptose und genomische Stabilität.³² Die Hemmung von über p53 vermittelten Signalwegen ist daher mit Tumorgenese und Therapieresistenz (s. 1.2.3) assoziiert.³³ TRIM24 fördert als onkogene E3-Ubiquitinligase bekanntermaßen die Degradation von p53 über Polyubiquitinierung und proteasomalen Abbau.³⁴ Das ebenfalls onkogene TRIM25 vermindert hingegen die transkriptionelle Aktivität von p53 über Hemmung der für die Rekrutierung von Koaktivatoren und Histonacetyltransferasen benötigten Acetylierung von p53.³⁵ Des Weiteren nehmen TRIM Proteine Einfluss auf den für die Proliferation, Migration und Zelladhäsion wichtigen Wnt/ β -Catenin-Signalweg.³⁶ Die Induktion des Signalwegs erlaubt die Dissoziation des Koaktivators β -Catenin vom sog. „ *β -catenin destruction complex*“. β -Catenin transloziert daraufhin in den Kern und fördert beispielsweise die Transkription von Genen, welche für die **Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)** von Bedeutung sind.¹⁹ EMT bezeichnet den Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften und leistet einen wesentlichen Beitrag zur Tumorinvasion und -metastasierung.³⁷ Aufgrund der verschiedenen onkogenen Funktionen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, ist seine Dysregulation häufig mit verschiedenen Malignomen einschließlich gastrointestinalen Tumoren assoziiert.^{36,38} Das onkogene Protein TRIM29 kann über zwei Mechanismen die konstitutive Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Kolorektalkarzinomzellen induzieren: 1. Direkt über die Hemmung der β -Catenin Phosphorylierung durch Phosphorylierung der Kinase GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*). 2. Indirekt über die Expressionssteigerung des multifunktionellen Transmembranproteins CD44, welches wiederum im Zusammenhang mit einer vermehrten Phosphorylierung von GSK3 β und dadurch verringerten β -Catenin Phosphorylierung steht. Durch beide Mechanismen wird β -Catenin letztendlich vermindert proteasomal abgebaut, mit dem Ergebnis, dass es sich im Zellkern anreichert und dort seine Funktion als transkriptioneller Koaktivator von u.a. für die EMT relevanten Genen verstärkt.³⁹ Darüber hinaus spielen TRIM Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulation des TGF β /Smad-Signalweges (TGF β , *transforming growth factor β*). Die Aktivierung des Signalweges erfolgt durch

Bindung eines Mitglieds der TGF β -Superfamilie an einen entsprechenden Rezeptor und führt zur Phosphorylierung von R-Smad Proteinen (*receptor-regulated Smad*), die gemeinsam mit dem Co-Smad Protein (*common-mediator Smad*) Smad4 transkriptionell aktive Komplexe bilden. Diese translozieren in den Zellkern und induzieren die Transkription TGF β -kontrollierter Zielgene. Die TGF β -Superfamilie besteht aus verschiedenen von der Zelle sezernierten Cytokinen, die u.a. bei der Regulation von Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose beteiligt sind.⁴⁰ Eine Dysregulation des TGF β -Signalweges ist daher mit verschiedenen Erkrankungen sowie Tumorgenese assoziiert.⁴¹ TRIM47 steigert beispielsweise die Ubiquitinierung und Degradation von Smad4 in Kolorektalkarzinomzellen, was zur Hochregulation des Cytokins CCL15 (*C-C motif chemokine ligand 15*) führt. CCL15 induziert nachfolgend die Proliferation und Invasion der Zellen über den CCL15-CCR1-Signalweg (CCR1, *C-C chemokine receptor type 1*).⁴² Ein weiterer in Tumoren häufig fehlerhaft regulierter Signalprozess ist der PI3K/Akt-Signalweg. Bei Induktion dieses Signalweges wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) oder das monomere G-Protein Ras aktiviert. PI3K phosphoryliert infolgedessen Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) mit Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃), welches die Serin/Threoninkinase Akt (Proteinkinase B, PKB) rekrutiert. Akt wird mittels Phosphorylierung durch PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) aktiviert und fördert schließlich über verschiedene zelluläre Mechanismen die Proliferation und das Zellüberleben.⁴³ Auch auf diesen onkogenen Signalweg können einige TRIM Proteine einen regulatorischen Einfluss nehmen. TRIM14 vermittelt beispielsweise die vermehrte Ubiquitinierung und Degradation der Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*).⁴⁴ PTEN dephosphoryliert PIP₃ zu PIP₂ und wirkt somit als PI3K-Antagonist.¹⁹ Der vermehrte Abbau von PTEN durch TRIM14 führt zu einer Enthemmung des PI3K/Akt-Signalweges und fördert auf diesem Wege die Proliferation und Apoptosehemmung in Kolorektalkarzinomzellen.⁴⁴ Schließlich spielen TRIM Proteine bei der konstitutiven Überaktivierung proinflammatorischer Signalwege eine Rolle, welche insbesondere über die Transkriptionsfaktoren STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) und NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*) vermittelt werden.¹⁹ Die Überaktivierung des STAT3- bzw. NF- κ B-Signalweges kann zur chronischen Entzündung

und der Entwicklung Entzündungs-induzierter Tumore, wie z.B. dem Colitis-assoziierten Kolonkarzinom, beitragen. Auch das sporadisch auftretende kolorektale Karzinom ist häufig mit der konstitutiven Aktivierung der genannten proinflammatorischen Signalwege assoziiert.^{19,45-47} Die Induktion des STAT3-Signalweges aktiviert mit den entsprechenden Rezeptoren assoziierte Januskinasen (JAKs), welche STAT3 phosphorylieren. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Dimerisierung von STAT3 und nach dessen Translokation in den Zellkern zur transkriptionellen Induktion von Genen, die insbesondere Prozesse wie Proliferation, Migration, Invasion, Angiogenese, Immunsuppression und das Zellüberleben fördern.⁴⁸⁻⁵⁰ Der STAT3-Signalweg wird über Tyrosin-Phosphatasen, wie z.B. Shp2 (*SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2*), negativ reguliert. In diesem Zusammenhang induziert z.B. TRIM52 durch die vermehrte Polyubiquitinierung und proteasomale Degradierung von Shp2 eine verstärkte Aktivierung des STAT3-Signalweges.⁵¹ Der proinflammatorische NF-κB-Signalweg wird hingegen über dimere Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Proteinfamilie vermittelt. Die Induktion des klassischen (kanonischen) NF-κB-Signalweges führt zu einer Phosphorylierung und nachfolgenden proteasomalen Degradation des Inhibitors von NF-κB (IκB), welche durch die aktivierte IκB Kinase (IKK) vermittelt wird. Der aktivierte Transkriptionsfaktor NF-κB transloziert daraufhin in den Zellkern, wo er die Transkription von verschiedenen NF-κB-Zielgenen induziert. Die meisten der bislang identifizierten Zielgene von NF-κB besitzen ein hohes onkogenes Potential, indem sie beispielsweise bei der Regulation der Zellproliferation, Migration, Entzündung oder des Zellüberlebens beteiligt sind.^{47,52-54} Im Rahmen dieses Signalweges können TRIM Proteine in verschiedenen Prozessen regulatorisch eingreifen.⁵⁵ TRIM31 steigert beispielsweise die Expression der Cytokine Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1β und Interleukin-6, welche den NF-κB-Signalweg aktivieren. Anhand der gesteigerten Aktivierung des NF-κB-Signalweges kann TRIM31 u.a. die Invasion und Metastasierung von Kolorektalkarzinomzellen fördern.⁵⁶ Neben den zahlreich tumorfördernden Eigenschaften können einige Mitglieder der TRIM Proteinfamilie allerdings auch tumorhemmende Funktionen vermitteln. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist TRIM67. In Kolorektalkarzinomzellen stört TRIM67 den Abbau von p53 über Hemmung seiner Ubiquitinierung durch die RING-E3-Ligase Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*).⁵⁷

Zusammenfassend sind TRIM Proteine aufgrund der vielfältigen Bedeutung bei der Steuerung onkogener Signalprozesse und der nachgewiesenen häufig veränderten Expressionsspiegel in Tumoren sowohl als frühe Tumormarker als auch für die Tumorbehandlung attraktive Zielproteine.¹⁹

1.1.4. Funktionelle Rolle von TRIM25 bei der Immunabwehr und verschiedenen malignen Tumoren des Menschen

TRIM25 gehört als Mitglied der TRIM Proteinfamilie zu den E3-Ubiquitinligasen.^{58,59} Die Struktur des TRIM25 Proteins ist durch die für die meisten TRIM Proteine typischen RING-Domäne, zwei B-Box-Domänen (B1 und B2), einer CC-Domäne und der C-terminalen PRY/SPRY-Domäne charakterisiert.⁶⁰ Innerhalb der TRIM Proteinfamilie wird TRIM25 der Gruppe C-IV zugeordnet (Abbildung 1). TRIM25 wurde ursprünglich als *Estrogen-responsive Finger Protein* (EFP) im Rahmen eines Screenings zur Identifizierung von humaner DNA, die mit hoher Affinität an Östrogenrezeptoren bindet, beschrieben.⁶¹ EFP ist ein Zielgen des Östrogenrezeptors ER α (*estrogen receptor α*), hierbei wird die Expression von EFP bekanntermaßen nach Bindung von Östrogen an den entsprechenden Östrogenrezeptor induziert.^{61,62} Funktionell spielt EFP eine Schlüsselrolle bei der Östrogen-abhängigen Proliferation und Uterusentwicklung.^{58,62,63} Neben seiner Rolle bei der Entwicklung ist TRIM25 insbesondere bei der Immunabwehr und Krebs von Bedeutung.⁵⁸ Im Rahmen des angeborenen Immunsystems vermittelt TRIM25 beispielsweise eine antivirale Immunantwort, welche insbesondere über eine an Lysin 63 (K63)-vermittelte Polyubiquitinierung von RIG-1 (*retinoic acid inducible gene 1*) und einer darauffolgenden über RIG-1 induzierten Interferonsynthese vermittelt wird. RIG-1 ist ein wichtiger cytosolischer PRR (*pattern recognition receptor*), welcher v.a. über die Erkennung von intrazellulären viralen RNAs bei Immunreaktionen des angeborenen Immunsystems eine tragende Rolle spielt. Bei einer viralen Infektion kann TRIM25 mithilfe seiner SPRY-Domäne an die N-terminale CARD (*caspase recruitment domain*)-Domäne von RIG-1 binden, wodurch es zum Transfer K63-verbundener Ubiquitinketten kommt. Die K63-Polyubiquitinierung erleichtert die spezifische Interaktion von RIG-1 mit seinen Adapterproteinen (MAVS, *mitochondrial antiviral signaling protein*), was letztendlich zu einer Aktivierung des RIG-1-Signalweges und der damit verbundenen verstärkten

Synthese von Interferonen im Sinne einer Steigerung der antiviralen Immunantwort führt.^{64,65} Einige neuere Arbeiten stellen jedoch die Rolle von TRIM25 bei der Regulation des RIG-1-Signalweges infrage, da in verschiedenen experimentellen Ansätzen eine Abhängigkeit der RIG-1-induzierten antiviralen Immunantwort von TRIM25 nicht bestätigt werden konnte.⁶⁶⁻⁶⁸ Diese Diskrepanzen lassen sich möglicherweise durch den Einsatz unterschiedlicher Viren bzw. Zelllinien sowie die Verwendung isolierter RIG-1 CARD-Domänen bzw. des vollständigen RIG-1 Proteins in den jeweiligen experimentellen Ansätzen erklären.^{60,67} Eine weitere Funktion von TRIM25 in der Immunabwehr ist die Regulation der antiviralen Aktivität des Proteins ZAP (*zinc finger antiviral protein*). ZAP ist ein über Interferon induziertes Protein, welches die Replikation einiger Viren beispielsweise durch Bindung viraler mRNAs hemmt. Einerseits durch Hinderung der Translation, andererseits durch verstärkten Abbau der mRNA. Über verschiedene noch nicht vollständig entschlüsselte Mechanismen ist TRIM25 für die Entfaltung der antiviralen Funktionen von ZAP erforderlich.^{69,70} Auch in Bezug auf die Infektionskrankheit COVID-19 wurde TRIM25 als antivirales Protein identifiziert, wobei es nach Infektion mit SARS-CoV-2 zur reflektorischen Hochregulation von TRIM25 kommt.⁷¹ Des Weiteren spielt TRIM25 im Rahmen der antiviralen Immunabwehr bei Influenzavirusinfektionen eine Rolle. In diesem Zusammenhang wirkt TRIM25 als RNA-Bindeprotein (RBP, *RNA-binding protein*). TRIM25 bindet virale Ribonukleoproteine (vRNPs) des Influenza-A-Virus und verhindert damit die Anlagerung der viralen RNA an den Polymerasekomplex. Auf diese Weise wird die RNA-Elongation und somit die Replikation des Influenza-A-Virus gehemmt.⁷² Als RNA-Bindeprotein zellulärer mRNAs wurde TRIM25 erstmalig in HeLa-Zellen identifiziert.⁷³ Die RNA-Bindung von TRIM25 wird bekanntermaßen durch seine PRY/SPRY-Domäne vermittelt und ist für die Ubiquitin-Ligaseaktivität gegenüber TRIM25 selbst (Autoubiquitinierung) sowie gegenüber seinen Zielproteinen, wie z.B. ZAP, erforderlich.^{74,75} Zusätzlich ist die Fähigkeit zur RNA-Bindung beispielsweise für die antiviralen Funktionen von TRIM25 wesentlich.⁷⁵ Neben der PRY/SPRY-Domäne ist in menschlichen embryonalen Nierenzellen die CC-Domäne von TRIM25 für die RNA-Bindung notwendig.⁷⁶ TRIM25 nimmt als RBP verschiedenste Funktionen wahr. Zuvor identifizierte unsere Arbeitsgruppe TRIM25 beispielsweise als Caspase-2 und -7 mRNA-bindendes Protein in humanen

Kolonkarzinomzellen. Die RNA-Bindung durch TRIM25 hemmt in diesem Zusammenhang die Caspase-2/-7 Proteinexpression durch negative Regulation der Caspase-2 Translation bzw. Destabilisierung der Caspase-7 mRNA. Ein transienter TRIM25 *Knockdown* mit siRNA steigert daher die Caspase-2 und -7 Proteinexpressionsspiegel. Unsere Arbeitsgruppe konnte dabei zeigen, dass die erhöhte Caspasenexpression zur Sensitivierung der Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose führt. So lässt die nachgewiesene Hemmung der Caspasen durch TRIM25 auf einen „Überlebensmechanismus“ (*Survival*) der Tumorzellen durch Hemmung von Apoptose schließen, welcher zugleich dafür bekannt ist, zur Chemotherapieresistenz von Tumorzellen beizutragen (s. 1.2.3). Vor diesem Hintergrund stellt sich TRIM25 als mögliches therapeutisches *Target* in der Resensibilisierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber gängigen Chemotherapien heraus.^{77,78} Neben seiner Bedeutung als RBP kann TRIM25 mithilfe seiner Zinkfinger-B-Box-Domänen mit DNA assoziieren. So bindet TRIM25 in Brustkrebszellen beispielsweise direkt an DNA sowie RNA und kontrolliert damit die Expression Metastase-relevanter Gene auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene.⁷⁹ TRIM25 spielt eine bedeutende pathophysiologische Rolle bei verschiedenen malignen Tumoren des Menschen, wie z.B. bei Malignomen der Prostata,^{59,80} der Leber,^{81,82} der Brust,^{62,79,83,84} des Ovars,⁸⁵ des Endometriums,⁸⁶⁻⁸⁸ der Lunge,⁸⁹ des Magens^{90,91} und des Kolorektums.^{23,35,77} Interessanterweise sind für TRIM25 dabei in Abhängigkeit der Tumorart sowohl tumorfördernde^{23,62,77,80,81,84,89,90} als auch tumorsuppressive^{82,91} Eigenschaften dokumentiert. Seine tumorigenen Eigenschaften sind indirekt auch dadurch belegt, dass TRIM25 in einigen humanen Tumoren erhöhte Expressionsspiegel aufweist,^{23,81,89,90,92} was mit einer schlechten Prognose bzw. einem verminderten Langzeitüberleben der betroffenen Patienten korreliert.^{81,90} Für das kolorektale Karzinom konnten TRIM25 bislang verschiedene onkogene Funktionen zugeordnet werden. Neben der bereits beschriebenen Rolle von TRIM25 bei der negativen Regulation von Caspase-2 und -7 und deren Auswirkung auf die Apoptose und Chemotherapieresistenz in Kolonkarzinomzellen nimmt TRIM25 Einfluss auf den Zellzyklus. In der humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116 reduziert TRIM25 die p53-abhängige, durch DNA-Schäden induzierte Apoptose: TRIM25 hemmt an dieser Stelle die transkriptionelle Aktivität von p53 durch

Beeinträchtigung der für die Rekrutierung von Koaktivatoren und Histonacetyltransferasen benötigten Acetylierung von p53.³⁵ Außerdem fördert TRIM25 durch Induktion des TGF β -Signalweges die Proliferation und Invasion von Kolorektalkarzinomzellen.²³ Neben seiner funktionellen Bedeutung bei der Proliferation, Migration und Apoptose spielt TRIM25 über die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von 14-3-3 σ eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus in Brustkrebszellen.⁶² 14-3-3 σ ist ein durch p53 regulierter Tumorsuppressor, welcher einen G₂-Phasenarrest herbeiführen kann.⁹³ Durch den verstärkten proteasomalen Abbau von 14-3-3 σ fördert TRIM25 das Fortschreiten des Zellzyklus und somit die Proliferation der Brustkrebszellen.⁶²

1.2. Apoptose und ihre Bedeutung bei der Therapieresistenz

1.2.1. Struktur und Funktionen von Caspasen

Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-specific protease*) gehören zu einer Gruppe von Cysteinproteasen, die ihre Substrate C-terminal der Aminosäure Aspartat proteolytisch spalten.⁹⁴ Sämtliche Caspasen werden zunächst als inaktive Zymogene (Procaspasen) synthetisiert, um später durch gezielte Proteolyse aktiviert zu werden.⁹⁵ Caspasen bestehen aus einer Prodomäne, einer großen (p20) und einer kleinen Untereinheit (p10).^{96,97} Anhand gemeinsamer Strukturmerkmale werden Initiatorcaspasen (Caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 und -12) von Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterschieden (Abbildung 3). Initiatorcaspasen liegen in ihrer inaktiven Form als Monomere vor und besitzen lange Prodomänen, die typischerweise ein bis zwei Domänen vom DED-Typ (*death effector domain*) oder eine Domäne vom CARD-Typ (*caspase recruitment domain*) enthalten. Effektorcaspasen zeichnen sich hingegen durch sehr kurze Prodomänen aus und liegen im Unterschied zu Initiatorcaspasen auch im inaktiven Zustand als Dimere vor.⁹⁶ Die langen Prodomänen sind für Protein-Protein-Interaktionen von großer Bedeutung. Sie sind wesentliche strukturelle Voraussetzung dafür, dass Initiatorcaspasen zu apoptose- oder inflammasomrelevanten Komplexen (*death- bzw. inflammation-inducing signaling complexes*) rekrutiert werden. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Interaktion von Adapterproteinen mit den langen Prodomänen und zur Dimerisierung der Initiatorcaspasen, welche in ihrer Aktivierung resultiert.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Die darauffolgende Proteolyse ist hierbei nicht der entscheidende Schritt zur

Aktivierung der Initiatorcaspasen, führt aber zu einer Stabilisierung der aktivierten Dimere.¹⁰¹⁻¹⁰³ Effektorcaspasen, denen wie bereits erwähnt die langen Prodomänen fehlen, besitzen nicht die Fähigkeit zur Autoaktivierung. Ihre Aktivierung erfolgt stattdessen über die proteolytische Spaltung durch bereits aktivierte Initiatorcaspasen.^{100,101,104} Die proteolytische Aktivierung von Procaspasen resultiert in der Abspaltung der Prodomäne sowie der Trennung der großen (p20) von der kleinen (p10) Untereinheit.⁹⁶ Diese Untereinheiten bilden als heterotetramere Komplexe (p20₂-p10₂) die enzymatisch aktiven Caspasen.^{97,98} Neben der strukturellen Klassifizierung, können Caspasen anhand ihrer unterschiedlichen Funktionen in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden (Abbildung 3): die apoptotischen Caspasen, bestehend aus Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10, und die inflammatorischen Caspasen, denen Caspase-1, -4, -5, -11 und -12 zugeordnet werden.⁹⁶ Die apoptotischen Caspasen spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion und -exekution, während inflammatorische Caspasen insbesondere für die proteolytische Reifung proinflammatorischer Cytokine (v.a. von Pro-Interleukin-1 β und Pro-Interleukin-18) durch Prozessierung während der Entzündung verantwortlich sind.^{94,96,105} Neben ihrer tragenden Rolle bei der Regulation von Apoptose und Entzündung, konnten einigen Caspasen weitere wichtige Kontrollfunktionen zugeschrieben werden, etwa bei der Regulation der Zelldifferenzierung, der Proliferation oder der Migration.^{96,106-108}

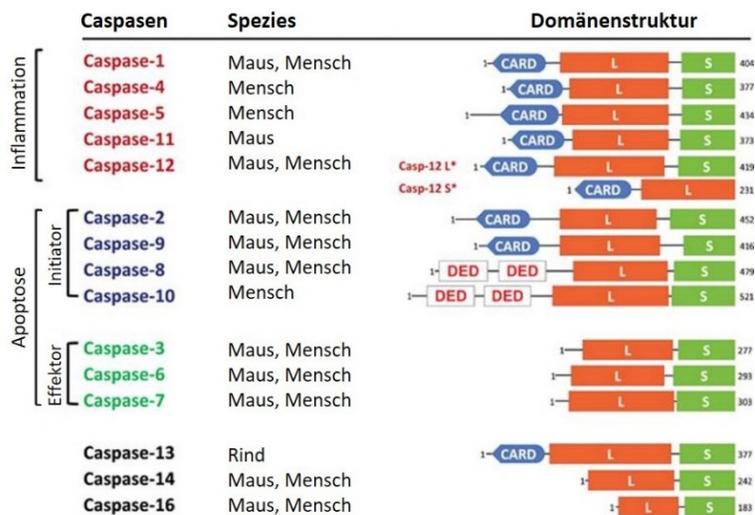


Abbildung 3. Klassifikation der Caspasen anhand ihrer Struktur und Funktion

Anhand ihrer Struktur werden Initiator- von Effektorcaspasen unterschieden, anhand ihrer Funktion hingegen apoptotische von inflammatorischen Caspasen. CARD, *caspase recruitment domain*; DED, *death effector domain*; L, *large subunit*; S, *small subunit*; L*, *long form*; S*, *short form* (modifizierte Abbildung aus Shalini et al. 2015¹⁰⁹).

1.2.2. Apoptose

Apoptose beschreibt eine Form des programmierten Zelltods, die sich durch charakteristische morphologische Veränderungen der betroffenen Zellen sowie eine genau festgelegte Folge von energieverbrauchenden Prozessen auszeichnet. Die Apoptose spielt bei vielen physiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle, u.a. bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von Zellpopulationen, der Gewebsumbildung während der Embryogenese und der Entwicklung des Immunsystems. Dagegen wird der Dysregulation von Apoptose eine wichtige Bedeutung bei der Pathogenese zahlreicher Krankheiten zugeschrieben, wie z.B. bei Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen und insbesondere Krebs-erkrankungen.^{110,111} Während des Apoptoseprozesses sind typische morphologischen Veränderungen der Zellen in chronologischer Folge zu beobachten: Chromatinkondensation mit Pyknose und Zellschrumpfung, Bläschenbildung der Plasmamembran mit charakteristischer Exposition des Membranlipids Phosphatidylserin an die äußere Membranoberfläche, Karyorrhesis und Bildung membranumhüllter apoptotischer Körperchen.^{110,112} Der abschließende phagozytäre Verdau der apoptotischen Partikel durch benachbarte Zellen und/oder Makrophagen ist eine wichtige Voraussetzung dafür, dass es im Gegensatz zur Nekrose nicht zur Auslösung einer Entzündungsreaktion und der damit einhergehende Aktivierung des Immunsystems kommt.^{110,113,114} Die Initiation der Apoptose kann im Wesentlichen über zwei unterschiedliche Signalwege erfolgen: den extrinsischen Weg, der über Rezeptoren an der Zelloberfläche und einen extrazellulären Stimulus vermittelt wird, und den intrinsischen Weg, welcher über Freisetzung von mitochondrialen Substanzen wie z.B. Cytochrom c induziert wird. Beide Signalwege werden durch eine proteolytische Caspasenkaskade vermittelt und teilen eine gemeinsame Endstrecke, die sog. „Exekutionsphase“.^{110,115,116} Der extrinsische Weg wird durch die Aktivierung sog. „Todesrezeptoren“ (*death receptors*) auf der Plasmamembran initiiert. Zu den Todesrezeptoren gehören Mitglieder der TNF (*tumor necrosis factor*)-Rezeptorfamilie, die mit entsprechenden zur TNF-Proteinfamilie gehörenden Liganden interagieren.^{116,117} Einige Beispiele für Rezeptoren mit ihren Liganden sind:

TNFR1/TNF α (**TNF-receptor 1**), FasR/FasL, TRAILR1 (DR4)/TRAIL und TRAILR2 (DR5)/TRAIL (**TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1** bzw. 2).¹¹⁸ Die Todesrezeptoren besitzen eine charakteristische, auf Protein-Protein-Interaktionen spezialisierte Domäne vom DD-Typ (**death domain**), die essenziell an der Apoptoseinduktion beteiligt ist.^{119,120} Durch Bindung spezifischer Liganden an die Todesrezeptoren werden Adapterproteine wie z.B. FADD (**Fas-associated protein with death domain**) über DD-DD-Interaktionen zwischen Adapterprotein und Rezeptor rekrutiert. Das Adapterprotein bindet wiederum die entsprechenden Initiatorcaspasen (Procaspase-8 bzw. -10) und bildet so den **death-inducing signaling complex** (DISC). Dieser Komplex ist Voraussetzung für die anschließende Autoaktivierung der Procaspase-8 bzw. -10 durch Dimerisierung und proteolytische Spaltung und führt letztendlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7).^{116,121,122} Des Weiteren kann die aktivierte Caspase-8 das Protein Bid (**BH3 interacting-domain death agonist**), ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie (**B-cell lymphoma 2**), spalten. Das dabei entstehende t-Bid (**truncated Bid**) induziert an Mitochondrien die Freisetzung apoptotischer Faktoren wie z.B. Cytochrom c durch einen Prozess, der als MOMP (**mitochondrial outer membrane permeabilization**) zusammengefasst wird. Es kommt zur Initiierung des intrinsischen Weges, wodurch eine direkte Verbindung (**Crosstalk**) zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptoseweg ermöglicht wird.^{116,123,124} Die intrinsische Apoptose wird über die Wirkung von Mitochondrien und mitochondrialen Proteinen vermittelt und durch eine Vielzahl verschiedener intrazellulärer Stimuli induziert. Prominente Beispiele sind: DNA-Schäden, oxidativer Stress, cytosolische Calciumüberladung und ER-Stress (**Endoplasmatisches Retikulum**).^{125,126} Dies ist ein Prozess, der u.a. durch fehlerhafte Proteinfaltungen im ER ausgelöst wird. Die Regulation der intrinsischen Apoptose erfolgt durch das Wechselspiel zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie. Hierbei hemmen antiapoptotische Proteine, wie z.B. Bcl-2, die Aktivität von proapoptotischen Proteinen, wie z.B. Bax (**Bcl-2 associated X protein**) und Bak (**Bcl-2 homologous antagonist/killer 1**).¹¹⁶ Apoptotische Stimuli führen in der Regel zu einer Aktivierung von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen (z.B. Bax und Bak), insbesondere über ihre transkriptionelle Hochregulation durch den aktivierten Transkriptionsfaktor p53. Daneben spielen posttranslationale Modifikationen

wie Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Aktivierung proapoptotischer Faktoren.¹²⁷ Innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zu einer Oligomerisierung der aktivierten proapoptotischen Proteine, was durch Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) eine gesteigerte Freisetzung von Proteinen des mitochondrialen Intermembranraumes, wie z.B. Cytochrom c, zur Folge hat.^{126,128-130} Cytochrom c bildet im Cytosol gemeinsam mit Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*), dATP (Desoxyadenosintriphosphat) und zwei Molekülen Procaspase-9 einen Komplex, welcher als das sog. „Apoptosom“ zusammengefasst wird. In diesem Komplex wird Procaspase-9 mittels proteolytischer Spaltung aktiviert. Caspase-9 kann daraufhin, ähnlich wie zuvor für Caspase-8 beschrieben, über die Aktivierung von Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) die Exekutionsphase der Apoptose einleiten.^{116,131,132} Während der Exekutionsphase spalten und aktivieren die Effektorcaspasen verschiedene zelluläre Substrate und führen so den Zelltod herbei.¹²⁶ Zu diesen Substraten gehören beispielsweise Proteasen, die für den Abbau des Zellkerns und Cytoskeletts notwendig sind, sowie DNA-Reparaturenzyme wie Poly (ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1), dessen proteolytische Spaltung zur Inaktivierung des Enzyms führt.^{110,133}

1.2.3. Apoptosehemmung als Mechanismus der Chemotherapieresistenz

Das Auftreten einer Therapieresistenz kann die Behandlung von Tumoren erheblich einschränken. Dabei kann eine Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen zur Resistenz gegenüber verschiedenen Therapieformen, wie z.B. Chemotherapie, Radiotherapie oder zielgerichteter Krebstherapie (*targeted therapy*), führen. Zur Chemotherapieresistenz kommt es beispielsweise im Rahmen der *Multi Drug Resistance* (MDR), welche häufig zum Versagen von gängigen Krebstherapien beiträgt.¹³⁴ Zu den prototypischen Mechanismen der MDR gehört die tumorzellspezifische Expressionssteigerung von Membrantransportproteinen wie ABC (*ATP binding cassette*)-Transportern, zu denen auch das P-Glykoprotein zählt. Mitglieder dieser Klasse von Membranproteinen werden für das vermehrte Ausschleusen von Medikamenten aus Tumorzellen verantwortlich gemacht.^{77,135,136} Ein anderer Mechanismus der Therapieresistenz ist die sog. „Immunevasion“, welche insbesondere bei der Resistenzentwicklung gegenüber Immuncheckpoint-Inhibitoren eine Rolle spielt. Dabei

behindern die Tumorzellen beispielsweise durch genetische/epigenetische Veränderungen, welche die Neoantigenbildung, -präsentation und -prozessierung beeinträchtigen, ihre Erkennung und darauffolgende Eliminierung durch Zellen des Immunsystems.¹³⁷ Auch die Hemmung von Apoptose leistet einen wesentlichen Beitrag zur Therapieresistenz von Tumorzellen.^{111,127,138} Apoptosehemmung ist eine der charakteristischen Eigenschaften von Tumorzellen (*hallmarks of cancer*), welche die Zellen im Rahmen ihrer Entartung (Tumorgenese) erhalten und die zum verstärkten Überleben (*Survival*) der Tumorzellen beitragen.¹³⁹ Da die üblichen Tumorthérapien wie Chemotherapie, Radiotherapie und gezielte Krebstherapie über die Induktion von Apoptose in Tumorzellen wirken, trägt die Hemmung der Apoptose nicht nur maßgeblich zur Tumorgenese bei, sondern führt zugleich zur Therapieresistenz von Tumorzellen.^{111,127,138,140} Interessanterweise können Tumorzellen dabei über Resistenzen gegenüber Apoptose-induzierenden Therapieformen verfügen, ohne jemals zuvor mit diesen in Kontakt getreten zu sein (sog. „primäre Resistenz“).¹²⁷ Apoptosehemmung in Tumorzellen kann über zwei wesentliche Mechanismen erfolgen: zum einen die vermehrte Aktivierung antiapoptotischer Signalwege und zum anderen die Hemmung proapoptotischer Signalwege. Die zugrundeliegenden Mechanismen können sehr vielfältig sein und veränderte Expressionsspiegel, Mutationen, epigenetische Veränderungen oder posttranslationale Modifikationen beinhalten.^{127,138} In vielen Fällen konnte die tumorzell-spezifische Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen wie Apoptose-Inhibitoren (IAPs, *inhibitors of apoptosis proteins*),^{141,142} Bcl-2,¹⁴³⁻¹⁴⁵ Bcl-xL^{146,147} und c-FLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*)¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ für die vermehrte Aktivierung antiapoptotischer Signalwege verantwortlich gemacht werden. Auch die Überexpression und vermehrte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, welcher die erhöhte Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL induziert,¹⁵¹ leistet dazu einen Beitrag.¹¹¹ Hingegen erfolgt die Hemmung proapoptotischer Signalwege u.a. durch verminderte Expression von Todesrezeptoren,¹⁵² verminderte Expression von Apaf-1^{153,154} und Inaktivierung bzw. Hemmung der proapoptotischen Proteine p53,¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Bax^{158,159} und PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*).^{111,160} Als weitere Beispiele für die Hemmung proapoptotischer Signalwege, sind die Inaktivierung und verminderte Expression von Caspase-8¹⁶¹⁻¹⁶⁴ sowie die Hemmung der

Caspase-2 und -7 Expression durch HuR (*human antigen R*)¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ und TRIM25^{77,78} zu nennen. TRIM Proteine können in vielfältiger Weise die Therapieresistenz von Tumorzellen fördern, indem sie verschiedene onkogene Signalwege beeinflussen (s. 1.1.3), u.a. solche, die im Rahmen der Apoptoseregulation bedeutsam sind.¹⁹ So kann TRIM25 beispielsweise p53 vermittelte Signalprozesse beeinträchtigen³⁵ und über die Hemmung der Caspase-2 und -7 Expression zur Therapieresistenz in Kolonkarzinomzellen beitragen.^{77,78} Zusammenfassend trägt die Hemmung von Apoptose nicht nur zur Tumorgenese, sondern auch zur Therapieresistenz von Tumorzellen bei. Hierdurch kann der Behandlungserfolg von Tumorthérapien erheblich eingeschränkt werden. Daher stellen die für Apoptosehemmung relevanten Signalwege wichtige therapeutische Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten dar, mit deren Hilfe eine verstärkte Apoptoseinduktion in Tumorzellen wieder ermöglicht werden kann. So soll letztendlich eine Resensibilisierung der Krebszellen gegenüber gängigen Apoptose-induzierenden Tumorthérapien erreicht werden.^{77,78,128,138}

1.3. Pyroptose und Inflammasomaktivierung im Darm

1.3.1. Aufbau und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms

Das ursprünglich von Martinon *et al.* 2002 identifizierte Inflammasom ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems¹⁶⁸ und vermittelt u.a. bei Infektionen oder Zellschäden über Aktivierung von Caspase-1 die Reifung und Sekretion der proinflammatorischen Cytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-18 (IL-18).^{169,170} Als Bestandteil des Immunsystems kommt das Inflammasom insbesondere in Zellen der myeloischen Reihe vor, wie z.B. in Makrophagen.¹⁷¹ Aber auch in anderen Zelllinien, wie z.B. in Keratinocyten,¹⁷² Adipocyten¹⁷³ und Epithelzellen,¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ konnte das Inflammasom nachgewiesen werden. Anhand ihrer Zusammensetzung werden verschiedene Inflammasom-Subtypen unterschieden,^{169,177} wobei das NLRP3-Inflammasom am besten charakterisiert ist.¹⁷⁰ Das NLRP3-Inflammasom ist ein cytoplasmatischer Multiproteinkomplex bestehend aus dem Sensorprotein NLRP3 (*NOD-like receptor (NLR) family pyrin domain containing 3*), dem Adapterprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) und der Procaspase-1.^{178,179} Das NLRP3-Protein detektiert als PRR (*pattern recognition receptor*) verschiedene PAMPs, DAMPs (*pathogen-/damage-associated molecular patterns*) und HAMPs

(*homeostasis-altering molecular processes*).^{169,170} Die Detektion der jeweiligen Liganden durch den PRR führt zur Ausbildung des Inflammasomkomplexes. Dabei kommt es über die Rekrutierung des Adapterproteins ASC zur Assoziation des NLRP3-Proteins mit Procaspase-1 und der folgenden autokatalytischen Spaltung und Aktivierung von Procaspase-1. Die aktive Caspase-1 leitet daraufhin die proteolytische Spaltung von Pro-IL-1 β bzw. Pro-IL-18 in ihre reifen und biologisch aktiven Formen IL-1 β bzw. IL-18 ein und vermittelt damit einhergehend ihre Sekretion.^{169,170,178} Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kann über unterschiedliche Signalwege erfolgen: den kanonischen, den nicht-kanonischen oder den alternativen Signalweg.¹⁶⁹ Zur Aktivierung des kanonischen NLRP3-Inflammasoms sind zwei Schritte erforderlich: 1. das *Priming* (Signal 1) und 2. die Aktivierung (Signal 2). Das *Priming* wird durch verschiedene Stimuli wie PAMPs, DAMPs oder endogene Cytokine induziert, welche letztlich als Liganden von TLRs (*toll-like receptor*), NLRs (*NOD-like receptor*) oder Cytokinrezeptoren wirken. Die Bindung des Liganden an den entsprechenden Rezeptor führt charakteristischerweise zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher die Expression von NLRP3, Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 steigert.^{169,177,178} Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 translozieren daraufhin vom Nukleus ins Cytosol, wo sie bis zum 2. Signal im inaktiven Zustand verbleiben.¹⁸⁰ Der Aktivierungsschritt folgt auf das *Priming* und kann ebenfalls durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli vermittelt werden. In der Regel induzieren Stimuli wie PAMPs und DAMPs zelluläre Prozesse, wie z.B. Ionenströme (u.a. K⁺-Efflux, Ca²⁺-Mobilisierung), Beschädigung/Ruptur von Lysosomen oder die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*). Diese führen schließlich über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen zur Ausbildung des NLRP3-Inflammasomkomplexes mit der bereits zuvor beschriebenen Procaspase-1-Spaltung sowie Reifung und Sekretion von IL-1 β und IL-18.^{169,170,178} Neben der Freisetzung der proinflammatorischen Cytokine und der darauffolgenden Entzündungsreaktion (s. 1.3.2), kann die NLRP3-Inflammasomaktivierung zusätzlich eine entzündliche Form des programmierten Zelltods, die sog. „Pyroptose“, induzieren.¹⁷⁰ Pyroptose wird auch als regulierte Nekrose bezeichnet, da hier sowohl Prozesse der Apoptose als auch der Nekrose wiederzufinden sind. So ist Pyroptose in Ähnlichkeit zur Apoptose eine durch Caspasen regulierte Form des Zelltods und weist gleichzeitig

morphologische Gemeinsamkeiten zur Nekrose auf. Wie bei der Nekrose kommt es bei der Pyroptose zum Verlust der Membranintegrität mit Freisetzung proinflammatorischer, intrazellulärer Substanzen, daher zählt Pyroptose zum entzündlichen Zelltod und ist strikt vom sterilen Zelltod im Rahmen der Apoptose zu unterscheiden.¹⁸¹ Mitglieder der Gasdermin-Proteinfamilie wie Gasdermin D vermitteln letztlich die Pyroptose. Die während der Zusammensetzung des vollständigen Inflammasomkomplexes aktivierte Caspase-1, aber auch andere inflammatorische Caspasen wie Caspase-4, -5 und -11, können durch Gasdermin D-Spaltung Pyroptose induzieren. Das N-terminale Fragment von Gasdermin D bindet an negativ geladene Phospholipide der Zellmembran, woraufhin es zur Konformationsänderung und Oligomerisierung innerhalb der Zellmembran kommt. Dadurch bilden sich schließlich Poren in der Plasmamembran, welche u.a. die Freisetzung von IL-1 β und IL-18 sowie anderer intrazellulärer Substanzen aus der Zelle vermitteln und so eine Entzündungsreaktion auslösen. Des Weiteren kommt es durch die Porenbildung zu einem Flüssigkeitseinstrom in die Zelle, was zur Zellschwellung und Plasmamembranruptur führt.¹⁸¹⁻¹⁸³ Die Inflammasomaktivierung kann über die aktivierte Caspase-1 allerdings nicht nur Pyroptose, sondern auch Apoptose induzieren, z.B. in Gasdermin D defizienten Makrophagen.^{184,185} Die Expressionsspiegel von Gasdermin D entscheiden folglich über das weitere Schicksal der Zelle nach Caspase-1-Aktivierung. Bei hohen Gasdermin D-Spiegeln induziert die aktivierte Caspase-1 Pyroptose, bei niedrigen Gasdermin D-Spiegeln dagegen Apoptose. Dabei unterscheiden sich die Expressionsspiegel von Gasdermin D zwischen verschiedenen Zelltypen.¹⁸¹ Die Komplexität des Zusammenspiels zwischen Pyroptose, Apoptose und Inflammasomaktivierung wird weiterhin durch die Tatsache erhöht, dass Caspase-1-induzierte Pyroptose und Apoptose sich gegenseitig aktivieren können.¹⁸⁶ Unter bestimmten Bedingungen ist aber auch eine gegenseitige Hemmung von Pyroptose und Apoptose möglich.¹⁸¹ Im Rahmen der Inflammasombildung kann die aktivierte Caspase-1 z.B. Gasdermin D am Aspartatrest 275 (Asp275) spalten und somit einerseits Pyroptose induzieren sowie andererseits Caspase-3 und -7 aktivieren und darüber Apoptose einleiten. Die aktivierte Caspase-3 bzw. -7 kann ihrerseits eine inaktivierende Spaltung von Gasdermin D am Aspartatrest 87 (Asp87) hervorrufen und darüber Pyroptoseprozesse hemmen.¹⁸⁵ Auf diese Weise sind verschiedene

Verkettungen (*Crosstalks*) zwischen Inflammassomaktivierung, Apoptose und Pyroptose möglich. Eine Dysregulation des NLRP3-Inflammassoms ist mit verschiedenen Krankheiten wie entzündlichen Autoimmunerkrankungen und Krebs assoziiert (s. 1.3.2),¹⁷⁰ weshalb eine strikte Regulation der Inflammassomaktivierung von essenzieller Bedeutung erscheint. Dabei spielen u.a. interagierende Partner und posttranslationale Modifikationen des NLRP3-Proteins eine wichtige Rolle.¹⁶⁹ So regulieren Proteine, wie z.B. Hsp 90 (*heat shock protein 90*) oder GBP5 (*guanylate-binding protein 5*), das NLRP3-Inflammassom durch direkte Interaktion mit NLRP3. Als posttranslationale Modifikationen sind v.a. Ubiquitinierung, Phosphorylierung und SUMOylierung des NLRP3-Proteins zu erwähnen, welche die NLRP3-Inflammassomaktivierung in Abhängigkeit der Umstände sowohl fördern als auch hemmen können.¹⁶⁹ Insbesondere das Ubiquitinsystem ist für die Regulation des kanonischen NLRP3-Inflammassoms von zentraler Bedeutung.¹⁸⁷ Die E3-Ligase TRIM31 ist beispielsweise für die K48-Polyubiquitinierung mit folgender proteasomaler Degradation von NLRP3 bekannt.¹⁸⁸ Im Gegensatz zu dieser durch TRIM31 vermittelten inhibitorischen Rolle der Ubiquitinierung, fördert die E3-Ligase Pellino2 die NLRP3-Inflammassomaktivierung über die K63-Polyubiquitinierung von NLRP3.¹⁸⁹ Folglich nehmen auch TRIM Proteine eine Rolle bei der Regulation des NLRP3-Inflammassoms ein. Wie schon zuvor beschrieben, spielen TRIM Proteine sowohl als positive als auch negative Regulatoren von Entzündung und Immunabwehr eine bedeutende Rolle, wie z.B. beim NF- κ B-Signalweg oder der Interferonproduktion über den RIG-1-Signalweg (s. 1.1.3 und 1.1.4). Mit der Regulation der Inflammassomaktivierung durch TRIM Proteine tragen sie einmal mehr zur Regulation von Immunprozessen bei.^{24,190} Zusätzlich zu der oben genannten Regulation des NLRP3-Proteins durch TRIM31, wurden weitere TRIM Proteine als Regulatoren beschrieben: TRIM21 und TRIM33 fördern z.B. die NLRP3-Inflammassomaktivierung, während TRIM20 und TRIM30 die Inflammassomaktivierung hemmen.¹⁹⁰ Aufgrund der Bedeutung von TRIMs bei der Regulation des NLRP3-Inflammassoms aber auch anderer proinflammatorischer Signalwege, stellen sie attraktive therapeutische Ziele u.a. in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen dar.¹⁹⁰

1.3.2. Physiologische und pathophysiologische Rollen des NLRP3-Inflammasoms

Als Komponente des angeborenen Immunsystems spielt das NLRP3-Inflammasom eine bedeutende physiologische Rolle bei der antibakteriellen, antiviralen und antifungalen Immunabwehr.¹⁹¹⁻¹⁹⁴ Wie zuvor beschrieben kommt es bei Infektionen und Gewebsverletzungen zur NLRP3-Inflammasomaktivierung mit folgender Reifung und Sekretion der proinflammatorischen Cytokine IL-1 β und IL-18. IL-1 β induziert daraufhin die Expression von Genen, welche Fieber, Vasodilatation, Hypotension und eine reduzierte Schmerzschwelle zur Folge haben. Des Weiteren fördert IL-1 β die Immunzellinfiltration in beschädigte oder infizierte Gewebe. Währenddessen vermittelt IL-18 u.a. die Interferon-Gamma-Produktion.¹⁹⁵ Über IL-1 β und IL-18 aber auch über die Induktion von Pyroptose leistet das NLRP3-Inflammasom daher einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung einer adäquaten Entzündungsreaktion und Pathogenabwehr.¹⁹⁶ Es verwundert daher nicht, dass die Dysregulation des NLRP3-Inflammasoms eng mit der Pathogenese zahlreicher entzündlicher Erkrankungen korreliert: Darunter u.a. mit dem **Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrom (CAPS)**, autoinflammatorischen Erkrankungen, Diabetes, Gicht, Alzheimer-Demenz und Krebs.¹⁹⁷ Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der intestinalen Entzündung z.B. im Rahmen **chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED)** wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist dagegen umstritten^{177,198,199}: In verschiedenen Modellen konnte eine protektive Funktion des NLRP3-Inflammasoms gegenüber intestinalen Entzündungen nachgewiesen werden.^{176,200} Im Gegensatz dazu ließ sich in anderen Experimenten feststellen, dass eine NLRP3-Inflammasomaktivierung die Entwicklung chronisch intestinaler Entzündung fördert.^{201,202} Entzündung kann zur Entstehung von Krebs in einem Prozess, der als „entzündungsinduzierte Tumorgenese“ (*inflammation-induced tumorigenesis*) bezeichnet wird, beitragen.^{170,180} In diesem Zusammenhang konnte die Beteiligung einer dysregulierten NLRP3-Inflammasomaktivierung bei der Pathogenese zahlreicher Malignitäten wie z.B. Lungenkrebs, Brustkrebs, dem hepatozellulären Karzinom aber auch dem kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden.^{180,203} Dabei ist die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Tumorgenese nach aktuellem Forschungsstand ähnlich zur oben beschriebenen Funktion bei der intestinalen Entzündung strittig: Während viele Studien eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms an der Krebsentstehung

und -progression aufzeigen (tumorigene Rolle), konnte in anderen Experimenten eine protektive Funktion des NLRP3-Inflammasoms bei der Tumorgenese festgestellt werden.^{170,180} Auch im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom konnte eine duale Rolle des NLRP3-Inflammasoms belegt werden.^{170,180,203} Das NLRP3-Inflammasom wird bei intestinalen Gewebsschäden aktiviert. IL-18-abhängig kommt es zur verminderten Expression des löslichen IL-22-Rezeptors, welcher dafür bekannt ist, IL-22 zu binden und dadurch in seiner Funktion zu neutralisieren. IL-22 wird während intestinaler Schädigung induziert und zeigt zwar protektive Funktionen während des Höhepunktes der Schädigung, fördert aber schließlich die intestinale Tumorentwicklung während der Genesungsphase.²⁰⁴ Im Gegensatz zu dieser tumorigenen Funktion des NLRP3-Inflammasoms ist bei einem Subtyp des kolorektalen Karzinoms, dem mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen häufig einhergehenden Colitis-assoziierten Kolonkarzinom (*Colitis-associated cancer, CAC*), eine protektive Rolle beschrieben: In NLRP3-defizienten Mäusen konnte eine erhöhte Empfindlichkeit für die durch AOM (*azoxymethane*)- und DSS (*dextran sulfate sodium*)-induzierte intestinale Entzündung und ein vermehrtes Aufkommen von Colitis-assoziierten Kolonkarzinomen beobachtet werden. Für diese Effekte sind die verringerten IL-18-Spiegel verantwortlich, welche die verminderte Produktion und Aktivierung der Tumorsuppressoren Interferon-Gamma und STAT1 zur Folge haben.^{205,206} Die genannten Beispiele verdeutlichen die komplexe Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei entzündlichen Erkrankungen sowie der Tumorentstehung und -progression. Nach genauerer Kenntnis der zugrundeliegenden Mechanismen ist das NLRP3-Inflammasom daher als attraktives Ziel von antiinflammatorischen und krebshemmenden Therapien sowie als prognostischer Marker anzusehen.^{170,180,197}

1.4. Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom, umgangssprachlich auch als Darmkrebs bezeichnet, belegt weltweit den dritten Platz der Krebsneuerkrankungen (Inzidenz) und stellt die zweithäufigste Krebserkrankung mit Todesfolge dar.²⁰⁷ Trotz seiner langsamen Progression und zahlreicher therapeutischer Möglichkeiten ist das kolorektale Karzinom durch eine hohe Mortalität charakterisiert, welche insbesondere durch den hohen Grad an Metastasierung des Primärtumors und die hohe Rezurrenz-Rate erklärt werden kann.^{19,208} Ein Erklärungsmodell zur

Pathogenese des kolorektalen Karzinoms ist die sog. „Adenom-Karzinom-Sequenz“ bzw. „Vogelstein-Sequenz“. Dabei entsteht Darmkrebs typischerweise in einem mehrstufigen Prozess genetischer Veränderungen aus einer gutartigen Darmschleimhautwucherung (Polyp bzw. Adenom). An den molekulargenetischen Veränderungen sind sukzessive Mutationen verschiedener Tumorsuppressor- und Protoonkogene beteiligt.²⁰⁹ Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms ist vielfältig. So wird beispielsweise von einem familiären Risiko berichtet: In 20 % der Fälle steigert sich das Risiko der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um mehr als das Doppelte beim Auftreten eines kolorektalen Karzinoms in der Verwandtschaft ersten Grades.²¹⁰ Außerdem sind Formen beschrieben, bei welchen eine erbliche Prädisposition für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms besteht, wie z.B. das „hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom“ (HNPCC) oder die „familiäre adenomatöse Polyposis“ (FAP).²¹¹ Daneben können auch chronisch-entzündliche Prozesse zur malignen Transformation von Zellen führen (s. 1.3.2). So ist die intestinale Entzündung im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn ein Risikofaktor für die Entstehung eines Colitis-assoziierten Kolonkarzinoms (CAC).⁴⁷ Schließlich ist auch eine spontane Genese möglich. Das spontane kolorektale Karzinom ist die häufigste Form unter den kolorektalen Karzinomen.²¹² Zusätzlich werden eine Reihe von Umweltfaktoren mit der Entstehung des kolorektalen Karzinoms in Verbindung gebracht, wobei u.a. folgende Faktoren das Risiko erhöhen: Alter, männliches Geschlecht, ungesunde Ernährung, Alkoholkonsum, Tabakkonsum, Adipositas und Diabetes.^{208,210} Neben Umweltfaktoren spielen v.a. auch Mutationen eine Rolle, die wichtige Signalwege beeinflussen, welche die Homöostase sich schnell selbst erneuernder Gewebe und die epitheliale Integrität des Darms aufrechterhalten.²¹³ Typische Beispiele solcher Signalwege sind der Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der TGF β /Smad-Signalweg, der PI3K/Akt-Signalweg, der NF- κ B-Signalweg, der STAT3-Signalweg und über p53 regulierte Signalwege.^{19,213} Veränderungen in diesen Signalwegen können wesentlich zur Entstehung und Metastasierung von kolorektalen Karzinomen beitragen.^{47,214-216} Dabei ist bekannt, dass TRIM Proteine auf die genannten Signalwege Einfluss nehmen und darüber sowohl tumorfördernde als auch tumorsuppressive Rollen in Bezug auf das kolorektale

Karzinom wahrnehmen können (s. 1.1.3 und 1.1.4).¹⁹ Neben den Veränderungen auf genetischer Ebene gibt es zunehmend Berichte über Modifikationen auf post-transkriptioneller Ebene z.B. durch Beeinflussung der Stabilität oder Translation von mRNAs, welche für tumorrelevante Proteine kodieren. Diese können letztlich zur Tumorentstehung und -progression beitragen, u.a. auch beim kolorektalen Karzinom.^{217,218} Die konventionellen Therapien des kolorektalen Karzinoms umfassen eine operative Entfernung, Chemotherapie und Radiotherapie, welche in Abhängigkeit des Tumorstadiums auch in Kombination angewandt werden können.^{219,220} Die Chemotherapie ist als Monotherapie oder Kombinationstherapie möglich. Während die Monotherapie des kolorektalen Karzinoms mit 5-Fluorouracil (5-FU) erfolgt, gibt es zahlreiche Therapieschemata für Kombinationstherapien von 5-FU, Folin-säure (Leucovorin®), Oxaliplatin, Irinotecan und Capecitabin. Dazu gehören z.B. FOLFOX (**F**olin-säure + 5-FU + **O**xaliplatin), FOLFIRI (**F**olin-säure + 5-FU + **I**rinotecan) oder XELOX (**X**eloda® (Capecitabin) + **O**xaliplatin).^{219,221,222} Als neuere Therapieoption des kolorektalen Karzinoms ist die zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) hinzugekommen, zu der beispielsweise auch die Immuntherapie gehört.^{219,221} Diese Therapieformen haben den entscheidenden Vorteil, dass Nebenwirkungen durch fehlende Spezifität vermieden werden. Im Gegensatz zur Chemo- und Radiotherapie, welche sowohl Krebszellen als auch gesunde körpereigene Zellen schädigt, visieren zielgerichtete Therapien spezifisch Eigenschaften von Krebszellen an, was letztlich die Zerstörung von insbesondere Krebszellen unter Schonung des gesunden körpereigenen Gewebes zur Folge hat.²²⁰⁻²²³ Im Rahmen zielgerichteter Therapien des kolorektalen Karzinoms werden beispielsweise monoklonale Antikörper gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) wie Bevacizumab oder gegen den Rezeptor von EGF (*epidermal growth factor*) wie Cetuximab oder Panitumumab eingesetzt.^{221,222} Trotz der sich fortlaufend verbessernden Therapien kann die Prognose eines metastasierten kolorektalen Karzinoms nach wie vor als schlecht bezeichnet werden. Während die 5-Jahres-Überlebensrate für das kolorektale Karzinom in den USA ohne Metastasierung (lokalisiertes Stadium zum Diagnosezeitpunkt) bei ca. 90 % liegt, ist bei Patienten mit Fernmetastasierung zum Diagnosezeitpunkt eine Rate von unter 15 % anzunehmen.^{224,225} Ein entscheidender Faktor, der den Erfolg aktueller Therapien erheblich einschränkt, ist die Entwicklung von

Therapieresistenzen. Hierbei sind verschiedene Mechanismen, die zur Resistenzentwicklung führen können, zu unterscheiden, wie z.B. die Apoptosehemmung als Ursache reduzierter Sensitivität gegenüber des Therapie-induzierten Zelltods (s. 1.2.3).^{77,111,166,219} Aufgrund der hohen Inzidenz und Mortalität, der schlechten Prognose und der Entwicklung von Therapieresistenzen besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung neuer, verbesserter Therapien des kolorektalen Karzinoms sowie Therapieformen, welche primär eine Resensibilisierung der Krebszellen gegenüber gängigen, bereits bestehenden Therapiemöglichkeiten bewirken können.^{77,166,215,222}

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Therapieresistenz spielt nach wie vor eine große Rolle beim Therapieversagen des kolorektalen Karzinoms. Eine charakteristische Eigenschaft therapieresistenter Tumore besteht dabei in der Unterdrückung der Apoptose (s. 1.2.3). Daher ist die Entwicklung von neuen Therapien denkbar, welche Kolorektalkarzinomzellen gegenüber gängigen Apoptose-induzierenden Behandlungsmethoden durch Eingriff in die Apoptosehemmung resensibilisieren. Voraussetzung hierfür ist die ausreichende Kenntnis der zugrundeliegenden Mechanismen. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe zuvor die E3-Ligase TRIM25 als Caspase-2 und -7 mRNA-bindendes Protein und negativen Regulator der Caspasenexpression in humanen Kolonkarzinomzellen identifizieren. Funktionell führt ein transienter TRIM25 *Knockdown* in Abhängigkeit der erhöhten Caspasenexpression zur Sensitivierung der Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose.^{77,78} Dies lässt auf einen TRIM25-abhängigen „Überlebensmechanismus“ (*Survival*) schließen, welcher durch Apoptosehemmung maßgeblich zur Chemotherapieresistenz von Tumorzellen beitragen kann. Ein Ziel dieser Arbeit war, die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf einen *loss-of-function*-Ansatz mit stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen zu überprüfen, um die Zellen in einem später geplanten *in vivo*-Xenograftmodell zu verwenden. Dazu sollten die zuvor mittels lentiviraler Transduktion genspezifischer shRNA generierten Kolonkarzinomzellklone mit stabilem TRIM25 *Knockdown* hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose untersucht werden. Viele TRIM Proteine werden aufgrund ihrer tumorspezifischen Expressionsveränderungen und ihrer z.T. vielseitigen Rolle bei der Regulation von sowohl onkogenen als auch tumorsuppressiven Signalwegen als attraktive Zielproteine in der Tumorbehandlung diskutiert (s. 1.1.3). Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen hinsichtlich eines möglichen Einflusses von TRIM25 auf einige zentrale tumorigene Eigenschaften wie Proliferation, Migration, Zellzyklus und Inflammation.

3. Material

3.1. Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinien		Kulturmedien	Zusätzliche Bestandteile
RKO (Humane Kolonkarzinomzellen, p53 Wildtyp) von LGC-Promochem, Wiesbaden	wt	DMEM	10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Pen-Strep
	shCtrl.	DMEM	10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Pen-Strep 2,5 µg/ml Puromycin
	shTRIM25 #1		
	shTRIM25 #5		

Bei shCtrl., shTRIM25 #1 und shTRIM25 #5 handelt es sich um stabile Kolonkarzinomzelllinien mit konstitutiver *control* shRNA gegen die mRNA nichtkodierender DNA-Abschnitte bzw. konstitutiver shRNA gegen TRIM25 mRNA. Die Zelllinien wurden mithilfe lentiviraler Transduktion aus wt-RKO-Zellen generiert. Lentivirale Partikel zur Transduktion der *control* shRNA wurden freundlicherweise von Dr. Gergely Imre zur Verfügung gestellt. Mithilfe fünf verschiedener TRIM25 spezifischer shRNAs wurden fünf shTRIM25 Klone generiert (#1-5). Dabei dienten folgende lentivirale Partikel als Vektoren:

Klone	Identifikationsnummern der lentiviralen Partikel	Hersteller
shTRIM25 #1	TRCN 00 00 27 26 49	Sigma Aldrich, Steinheim
shTRIM25 #2	TRCN 00 00 27 26 99	
shTRIM25 #3	TRCN 00 00 00 34 49	
shTRIM25 #4	TRCN 00 00 27 26 50	
shTRIM25 #5	TRCN 00 00 27 26 98	

Sequenzen der shRNAs

shTRIM25 #1

5'-CCGGGAGTGAGATCCAGACCTTGAACCTCGAGTTCAAGGTCTGGATCTCACTCTTTTTG-3'

shTRIM25 #2

5'-CCGGGATCTCTGCCTGGCACAATAACTCGAGTTATTGTGCCAGGCAGAGATCTTTTTG-3'

shTRIM25 #3

5'-CCGGGTGCCCGATTCTCTTAGAGACTCGAGTCTCTAAGAGGAATCGGGCACTTTTT-3'

shTRIM25 #4

5'-CCGGGTGCCCGATTCTCTTAGAGACTCGAGTCTCTAAGAGGAATCGGGCACTTTTTG-3'

shTRIM25 #5

5'-CCGGGAACTGAACCACAAGCTGATACTCGAGTATCAGCTTGTGGTTCAGTTCTTTTTG-3'

3.2. Instrumente

Instrumente	Hersteller
BD FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
CO ₂ Inkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop, Biozero	Keyence, Neu-Isenburg
Gelelektrophoresekammer, EasyPhor	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Heizblock, Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Laborabzug	Waldner, Wangen im Allgäu
Laborschüttler, Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Magnetrührer mit Heizplatte, IKA-COM-BIMAG RCT	IKA®-Werke GmbH, Staufen
Mikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Reader, SpectraMax® M5e	Molecular Devices, San José, USA

Mikrozentrifuge, Fresco 21	Thermo Scientific Heraeus, Hanau
Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad, München
Multipette®	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Königshofen
Pipetten, Gilson Pipetman (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe, pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
<i>Real-Time-PCR-System</i> , QuantStudio 3	Applied Biosystems, Weiterstadt
Röntgenfilmentwickler, AGFA CP 1000	AGFA HealthCare, Bonn
Sicherheitswerkbank, HERAsafe®	Thermo Scientific, Langenselbold
Thermoschüttler, Thermal Shake lite	VWR International, Darmstadt
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München
UV-Transilluminator, Universal Hood II	Bio-Rad, München
Vortexmischer, peqTWIST	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge, Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

3.3. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco, Darmstadt
2x qPCR BIO Probe Mix Lo-ROX	PCR Biosystems, London, UK
5-Fluorouracil	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

5x Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega, Mannheim
5x Reaction Buffer	Thermo Scientific, Dreieich
Acrylamid (30 %)-Bisacrylamid (0,8 %)- Stammlösung (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Eurogentec, Köln
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Aldrich, Steinheim
ATP	Sigma Aldrich, Steinheim
BlueStar Prestained Protein Marker	NIPPON Genetics Europe, Düren
Bovines Serumalbumin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chlorwasserstoffsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail	Roche Biochemicals, München
Desoxynucleosidtriphosphate	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
DEPC	Sigma Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMEM	Gibco, Darmstadt
DMSO	AppliChem, Darmstadt
Doxorubicin	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
DPBS	Gibco, Darmstadt
DTT	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim
EGTA	Sigma Aldrich, Steinheim

Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS	Biochrom, Berlin
GelRed®	Biotium Incorporated, Fremont, USA
Glycerin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
LPS	Sigma Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Promega, Mannheim
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich, Steinheim
NP-40	Sigma Aldrich, Steinheim
O'RangeRuler 20 bp DNA Leiter	Thermo Scientific, Dreieich
Oligofectamine™ Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM® + GlutaMAX™	Gibco, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Darmstadt
Puromycin	InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich
Random Hexamer Primer	Thermo Scientific, Dreieich
SDS	Roth, Karlsruhe

SYTOX™ Blue Dead Cell Stain	Life Technologies, Darmstadt
TEMED	Sigma Aldrich, Steinheim
TRI Reagent®	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Triton™ X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trizma® (Tris Base)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Western Lightning® Plus-ECL, <i>Enhanced</i>	Perkin Elmer, Rodgau
α-Toxin	Sigma Aldrich, Steinheim

3.4. Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
96-Well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well Zellkultur Mikroplatten (steril)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Blotting-Papier (Filterpapier)	Macherey-Nagel, Düren
Einfrierröhrchen, CRYO.S™ (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen, FALCON® Polystyrene Round-Bottom Tubes (5 ml)	Corning Incorporated, Corning NY, USA
Hamilton-Pipette	Hamilton Central Europe, Ghiroda, Rumänien
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, München
Pasteur-Kapillarpipetten (230 mm)	WU, Mainz

PCR SoftTubes (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen (10 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Eppendorf™ Combitips Advanced™ (10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, Amersham Hyperfilm MP	GE Healthcare, München
serologische Pipetten, Corning® Costar® Stripette® (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated, Corning NY, USA
TaqMan 96-Wellplatte, MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems, Weiterstadt
TaqMan Folie, MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Weiterstadt
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (60/15 mm, 100/20 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber (steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, CELLSTAR® Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.5. Kits

Kits	Hersteller
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Dreieich

3.6. Lösungen, Puffer und Gele

3.6.1. Semiquantitative PCR

10x TBE Puffer

Substanz	Finale Konzentration	Menge
Tris Base	0,89 M	216 g
Borsäure	0,89 M	110 g
EDTA	0,02 M	14,8 g
Aqua bidest.		<i>ad</i> 2.000 ml

3.6.2. Proteingewinnung

Lysepuffer (Totalproteingewinnung)

Substanz	Finale Konzentration	Menge
NaCl	137 mM	5,48 ml (von 5 M Stammlösung)
Tris-HCl, pH 8,0	20 mM	4 ml (von 1 M Stammlösung)
EDTA, pH 8,0	5 mM	2 ml (von 0,5 M Stammlösung)
Glycerin	10 %	20 g
Triton™ X-100	1 %	2 g
Aqua bidest.		<i>ad</i> 200 ml

Erst kurz vor Gebrauch des Lysepuffers wurden die Phosphataseinhibitoren Na_3VO_4 (finale Konzentration 1 mM) und NaF (finale Konzentration 1 mM) sowie eine Mischung von Proteaseinhibitoren (1x cOmplete (TM) Proteasehemmer-Cocktail (25x)) hinzugegeben.

Puffer A

Substanz	Finale Konzentration	Menge
HEPES, pH 7,9	10 mM	500 μl (von 1 M Stammlösung)

KCl	10 mM	500 µl (von 1 M Stammlösung)
EDTA	0,1 mM	10 µl (von 0,5 M Stammlösung)
EGTA	0,1 mM	10 µl (von 0,5 M Stammlösung)
Aqua bidest.		<i>ad</i> 50 ml

Erst kurz vor Gebrauch des Puffers wurden die Phosphataseinhibitoren Na₃VO₄ (finale Konzentration 1 mM) und NaF (finale Konzentration 1 mM) sowie eine Mischung von Proteaseinhibitoren (1x cOmplete (TM) Proteasehemmer-Cocktail (25x)) hinzugegeben.

Puffer C

Substanz	Finale Konzentration	Menge
HEPES, pH 7,9	20 mM	1 ml (von 1 M Stammlösung)
Glycerin	25 %	13 g
NaCl	0,4 M	8 ml (von 2,5 M Stammlösung)
EDTA	1 mM	100 µl (von 0,5 M Stammlösung)
EGTA	1 mM	100 µl (von 0,5 M Stammlösung)
Aqua bidest.		<i>ad</i> 50 ml

Erst kurz vor Gebrauch des Puffers wurden die Phosphataseinhibitoren Na₃VO₄ (finale Konzentration 1 mM) und NaF (finale Konzentration 1 mM) sowie eine Mischung von Proteaseinhibitoren (1x cOmplete (TM) Proteasehemmer-Cocktail (25x)) hinzugegeben.

3.6.3. Gele

Upper Tris Puffer

Substanz	Finale Konzentration	Menge
Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M	30,4 g
Aqua bidest.		<i>ad</i> 500 ml

Lower Tris Puffer

Substanz	Finale Konzentration	Menge
Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M	181,65 g
Aqua bidest.		<i>ad</i> 1.000 ml

APS-Lösung

Substanz	Finale Konzentration	Menge
APS	10 % (w/v)	1 g
Aqua bidest.		<i>ad</i> 10 ml

Sammelgel, 4 % Acrylamid (für zwei Gele)

Substanz	Menge
Upper Tris	1,3 ml
Acrylamid (30 %)-Bisacrylamid (0,8 %)- Stammlösung	0,7 ml
Aqua bidest.	3 ml
APS (10 %)	30 µl
TEMED	10 µl

Trenngele, 10-17 % Acrylamid (für zwei Gele)

Substanz	Menge		
	10 %	12 %	17 %
Lower Tris	2,5 ml		

Acrylamid (30 %)-Bisacrylamid (0,8 %)- Stammlösung	3,4 ml	4,0 ml	5,7 ml
Aqua bidest.	4,0 ml	3,4 ml	1,6 ml
SDS (20 %)	100 µl		
APS (10 %)	100 µl		
TEMED	5 µl		

Agarosegel (1,2 %)

Substanz	Menge
Agarose	1,2 g
1x TBE-Puffer	<i>ad</i> 100 ml

Das Agarosepulver wurde im TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurden 10 µl GelRed® (Verhältnis 1:10.000) hinzugegeben und die Lösung wurde zur Aushärtung in eine entsprechende Geltrageschale gegossen.

3.6.4. Western Blot-Analyse

4x Laemmli-Puffer (Probenpuffer)

Substanz	Finale Konzentration	Menge
Glycerin	40 % (v/v)	8 ml
SDS	10 % (w/v)	2 g
Tris-HCl, pH 6,8	125 mM	5 ml (von 0,5 M Stammlösung)
DTT	50 mM	154 mg
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)	2 mg
Aqua bidest.		<i>ad</i> 20 ml

10x SDS-PAGE-Puffer (Laufpuffer)

Substanz	Finale Konzentration	Menge
Tris Base	0,25 M	60 g
Glycin	1,92 M	288 g
SDS	1 %	20 g (100 ml von 20 % Stammlösung)
Aqua bidest.		<i>ad</i> 2.000 ml

1x Towbin Puffer (Transferpuffer)

Substanz	Finale Konzentration	Menge
Tris Base	25 mM	3,03 g
Glycin	192 mM	14,4 g
Isopropanol	20 %	200 ml
Aqua bidest.		<i>ad</i> 1.000 ml

10x TBST Puffer

Substanz	Finale Konzentration	Menge
Tris-HCl, pH 7,6	0,15 M	24,2 g
NaCl	3,1 M	180 g
Aqua bidest.		<i>ad</i> 2.000 ml

Vor Gebrauch des Puffers wurde der 10x TBS-Puffer mit bidestilliertem Wasser 1:10 verdünnt und Tween-20 im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben.

3.6.5. FACS

Extraktionspuffer

Substanz	Finale Konzentration	pH
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	200 mM	7,8 (mit HCl eingestellt)

3.7. Enzyme

Enzyme	Hersteller
GoTaq® DNA Polymerase	Promega, Mannheim
RevertAid Reverse Transcriptase	Thermo Scientific, Dreieich
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Dreieich
RNase A	Thermo Scientific, Dreieich

3.8. Antikörper

3.8.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
Bcl-2	#15071	Cell Signaling, Frankfurt	1:1.000
Caspase-1	ab238979	Abcam, Berlin	1:500
	sc-56036	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
Caspase-2	611022	BD Biosciences, Fulda	1:500
Caspase-3	#9662	Cell Signaling, Frankfurt	1:500
Caspase-7	#9494	Cell Signaling, Frankfurt	1:1.000
Caspase-8	#9746	Cell Signaling, Frankfurt	1:500

Caspase-9	#9508	Cell Signaling, Frankfurt	1:1.000
HDAC2	sc-9959	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
NF- κ B p65	sc-372	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
PARP-1	#9542	Cell Signaling, Frankfurt	1:1.000
TRIM25	ab167154	Abcam, Berlin	1:1.000
β -Aktin	A2228	Merck, Darmstadt	1:20.000

3.8.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
Goat anti-mouse IgG-HRP	12-349	Sigma Aldrich, Steinheim	1:20.000
Goat anti-rabbit IgG-HRP	G-21234	Invitrogen, Karlsruhe	1:20.000

3.9. Primer für die PCR

Primer	Oligonukleotidsequenz (5' - 3')	Hersteller
Caspase-7 (<i>Forward</i>)	5'-AGT GAC AGG TAT GGG CGT TC-3'	Biomers.net GmbH, Ulm
Caspase-7 (<i>Reverse</i>)	5'-CGG CAT TTG TAT GGT CCT CT-3'	Biomers.net GmbH, Ulm
GAPDH (<i>Forward</i>)	5'-CAC CAT CTT CCA GGA GCG AG-3'	Biomers.net GmbH, Ulm
GAPDH (<i>Reverse</i>)	5'-GCA GGA GGC ATT GCT GAT-3'	Biomers.net GmbH, Ulm
TRIM25 (<i>Forward</i>)	5'-CCG CAA ATG TTC CCA GCA CA-3'	Biomers.net GmbH, Ulm
TRIM25 (<i>Reverse</i>)	5'-TGC AGT CAT CCG CAC ATC CT-3'	Biomers.net GmbH, Ulm

3.10. TaqMan-Sonden

Sonden	Katalognummer	Hersteller
Caspase-7	Hs00169152_m1	Applied Biosystems, Weiterstadt
GAPDH	#4352339E	Applied Biosystems, Weiterstadt
TRIM25	Hs01116121_m1	Applied Biosystems, Weiterstadt

3.11. *Small interfering RNAs (siRNAs)*

siRNAs	Katalognummer	Hersteller
siCaspase-2	SI00299551	Qiagen, Hilden
siCaspase-7	SI00299572	Qiagen, Hilden
siControl (<i>non-targeting</i> siRNA)	D0012061320	Dharmacon, Lafayette, USA
siTRIM25	4390824	Thermo Scientific, Dreieich

4. Methoden

4.1. Zellkultur, Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Dabei wurden die subkonfluenten Zellen (Zelldichte ca. 90 %) zunächst mit PBS gewaschen. Danach erfolgte das Trypsinieren der Zellen mithilfe von 0,05 % Trypsin-EDTA für etwa 5 min bei Raumtemperatur. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche konnte mittels eines Mikroskops überprüft werden. Nach der vollständigen Ablösung von der Zellkulturflasche wurden die Zellen zur Beendigung der Trypsinaktivität in Zellkulturmedium (DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Pen-Strep) resuspendiert. Die in Kulturmedium resuspendierten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 800 min⁻¹ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde sodann in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und ein Teil dieser Suspension wurde in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Kulturmedium gegeben. Dabei wurden in der Regel Verdünnungen zwischen 1:10 (v/v) und 1:25 (v/v) gewählt.

Zum Einfrieren wurden die subkonfluenten Zellen entsprechend den oben beschriebenen Vorgaben von der Zellkulturflasche gelöst. Nach der Zentrifugation folgte das Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml FCS statt in Zellkulturmedium und davon wurden je 0,5 ml in ein steriles Einfrierröhrchen gegeben. Die Einfrierröhrchen kühlten für mindestens 3 min in einem Eisbad ab, woraufhin in jedes Einfrierröhrchen tropfenweise 0,5 ml FCS/20 % DMSO (v/v) gegeben wurde. Nach weiteren 30 min im Eisbad wurden die Zellen für mindestens 48 Stunden bei -80 °C gelagert, daraufhin konnten sie zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen zunächst für wenige Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in eine mit frischem Kulturmedium befüllte Zellkulturflasche überführt. Dabei wurden zunächst alle Zelllinien in Kulturmedium ohne Puromycin (DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Pen-Strep) kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte der Austausch des Kulturmediums mit frischem Zellkulturmedium.

Beim ersten Passagieren nach dem Auftauen wurden die mit shRNA transduzierten Zellen zur Selektion auf puromycinhaltiges Zellkulturmedium umgestellt und fortan in diesem Medium kultiviert. Das zur Transduktion der shRNA verwendete Plasmid kodierte für eine Puromycinresistenz, wodurch nur die shRNA Zellen selektioniert wurden.

4.2. Transfektion von siRNAs

Small interfering RNAs (siRNAs) sind kurze Ribonukleinsäuremoleküle, welche der vorübergehenden und zielgerichteten Stilllegung von Genen durch Degradation der Ziel-mRNA dienen (*Gen-Knockdown*). Dabei können siRNAs mittels Transfektion in Zellen eingebracht werden. Für die Transfektion von siRNAs wurden die Zellen zunächst mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, da in den Zellschalen für optimale Transfektionsbedingungen eine Konfluenz von 30-50 % angestrebt wurde. In Abhängigkeit des durchzuführenden Experimentes wurden daher $2-4 \times 10^5$ Zellen pro 60 mm Schale in Transfektionsmedium ohne Antibiotika (DMEM, 10 % (v/v) FCS) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Transfektionsmedium durch 1 ml Opti-MEM® + GlutaMAX™ ersetzt. Außerdem wurde für jede 60 mm Schale ein Transfektionsgemisch bestehend aus 1 ml Opti-MEM® + GlutaMAX™, 6 µl Oligofectamine™ Transfection Reagent sowie der entsprechenden siRNA angesetzt. Die siRNAs (s. 3.11) wurden in Abhängigkeit der *Knockdowneffizienz* des Zielproteins im Transfektionsgemisch in einer Konzentration von 25 nM bis 100 nM eingesetzt, wobei die Kontroll-siRNA in der jeweils höchsten Konzentration verwendet wurde. Zur Ausbildung von Komplexen aus siRNA und Transfektionsreagenz wurde das Transfektionsgemisch 40 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise in die Zellschalen gegeben. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde das siRNA enthaltende Transfektionsgemisch in den Schalen wieder durch Transfektionsmedium ohne Antibiotika ersetzt, woraufhin die Zellen für weitere Experimente verwendet werden konnten. Die *Knockdowneffizienz* wurde für jedes Experiment mittels Western Blot-Analyse überprüft.

4.3. Stimulation der Zellen

Für die Stimulation mit Chemotherapeutika (Doxorubicin oder 5-Fluorouracil) oder mit inflammasomaktivierenden Substanzen (LPS, ATP und α -Toxin) wurden die Zellen in 2 ml

Kulturmedium (DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Pen-Strep) in 60 mm Schalen ausgesät und für mindestens 24 Stunden im CO₂-Inkubator kultiviert. Dabei wurde die auszusäende Zellzahl so angepasst, dass die Schalen zum Zeitpunkt der Ernte ca. 70-90 % konfluent waren. Bei höherer Zellkonfluenz zum Zeitpunkt der Ernte war eine, möglicherweise durch Nährstoffmangel und verstärkte Zell-Zell-Kontakte bedingte, basale Apoptoseinduktion der Kolonkarzinomzellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Eine dosisabhängige Steigerung der Apoptose und die zu untersuchenden Effekte von TRIM25 auf die Sensibilisierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose konnten dann nicht mehr dokumentiert werden. Nach den 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen mit den oben genannten Stimulanzen für weitere 1 bis maximal 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Gewinnung der für die nachfolgenden Experimente benötigten Proben (s. 4.5.1, 4.5.2, 4.8.1).

4.4. Bestimmung der RNA-Expressionsspiegel

4.4.1. RNA-Gewinnung und -Konzentrationsmessung

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA wurden in Zellkulturmedium resuspendierte Zellen in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 6.500 min⁻¹ und 4 °C abzentrifugiert. Zum Waschen wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde für 10 min bei Raumtemperatur in 1 ml Trizol (TRI Reagent®) lysiert. Daraufhin wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, 10 Sekunden mithilfe eines Vortexmischers gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 min bei 14.000 min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation kam es zur Auftrennung in eine wässrige, die Gesamt-RNA der Zellen enthaltende, und eine organische Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues, RNase-freies Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und die RNA über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation für 30 min bei 14.000 min⁻¹ und 4 °C pelletiert und mit 500 µl 70 % Ethanol in DEPC-Wasser (Nuklease-freies Wasser) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 14.000 min⁻¹ und 4 °C wurde die RNA bei 37 °C bis zur Farblosigkeit getrocknet. Das Pellet wurde in 15-35 µl DEPC-Wasser resuspendiert und zur vollständigen Lösung für 10 min bei 60 °C und 300 min⁻¹ auf einem Heizblock

geschüttelt. Die RNA-Konzentration wurde durch die Absorptionsmessung der Proben mithilfe eines Spectrophotometers (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer) bei 260 nm ermittelt. Zur Bestimmung der RNA-Reinheit wurde das Verhältnis der Probenabsorption bei 260 nm und 280 nm berechnet. Bei einem Verhältnis von 2,0 (260 nm/280 nm) wurde von reiner RNA ausgegangen.

4.4.2. RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Kombination der reversen Transkription, bei welcher sämtliche in den Proben befindliche RNA in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben wird, und der Polymerase-Kettenreaktion, bei welcher spezifisch die zu untersuchende cDNA vervielfältigt werden kann. Mithilfe der RT-PCR können die RNA-Expressionspiegel von Zellen untersucht und somit Rückschlüsse auf die Genexpression gezogen werden.

4.4.2.1. Reverse Transkription (RT)

Zunächst wurde ein Mastermix vorbereitet, in welchen alle Enzyme und Substrate für die reverse Transkription gegeben wurden (Tabelle 1).

Tabelle 1. Mastermix für eine RT

Es wurden vier Ansätze für die reverse Transkription benötigt (wt, shCtrl., shTRIM25 #1, shTRIM25 #5).

Substanz	Menge
5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U·µl ⁻¹)	1 µl
dNTP Mix (10 mM je dNTP)	2 µl
RevertAid Reverse Transcriptase (200 U·µl ⁻¹)	1 µl
Random Hexamer Primer	1 µl

Die RNA-Proben wurden mit DEPC-Wasser verdünnt. Anschließend wurde der Gesamtansatz der RT mit 9 µl Mastermix und 250 ng RNA je Probe in einem RNase-freien PCR-

Reaktionsgefäß angesetzt. Der Ansatz wurde bis auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Schließlich folgte das Umschreiben der RNA in cDNA mithilfe eines Thermozyklers (GeneAmp® PCR System 9700). Für das Priming der Reversen Transkriptase und die nachfolgende reverse Transkription wurden die Proben für 10 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. Zur Terminierung der reversen Transkription wurden die Proben für 10 min auf 70 °C erhitzt, dabei kam es zur Zerstörung der Reversen Transkriptase. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.4.2.2. Semiquantitative PCR

Für die semiquantitative PCR erfolgte die spezifische Vervielfältigung der cDNA durch eine Polymerase-Kettenreaktion und ein anschließender Nachweis der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese. Bei der Polymerase-Kettenreaktion wurden die cDNAs von Caspase-7, TRIM25 und als *housekeeper* GAPDH mithilfe von spezifisch bindenden *Forward*- und *Reverse*-Primern (s. 3.9) vervielfältigt. Zuerst wurde je ein Mastermix mit den jeweiligen Primern, Enzymen und Substraten der PCR angesetzt (Tabelle 2).

Tabelle 2. Mastermix für eine PCR

Für Caspase-7, TRIM25 und GAPDH wurden je vier Ansätze für die Polymerase-Kettenreaktion benötigt (wt, shCtrl., shTRIM25 #1, shTRIM25 #5). *Forward*- und *Reverse*-Primer stehen als Platzhalter für die entsprechenden Primer zur spezifischen Vervielfältigung von Caspase-7- bzw. TRIM25- bzw. GAPDH-cDNA.

Substanz	Menge
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	1 µl
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM je dNTP)	2 µl
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	3 µl
DEPC-Wasser	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
GoTaq® DNA Polymerase	0,15 µl

Je 13 µl des entsprechenden Mastermixes wurden mit 2 µl der cDNA-Proben in einem PCR-Tube gemischt. Mithilfe eines Thermozyklers erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion entsprechend des in Tabelle 3 gezeigten Schemas.

Tabelle 3. Temperaturschema der PCR

		Caspase-7 & GAPDH		TRIM25	
Schritt	Temperatur	Zeit			
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min		4 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	28 Zyklen	30 s	32 Zyklen
Primer-Hybridisierung	55 °C	1 min		45 s	
Elongation	72 °C	1 min		45 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min		5 min	

Die PCR-Produkte konnten direkt in einem Agarosegel visualisiert oder bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert werden. Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde ein 1,2 %-Agarosegel gegossen, das den Fluoreszenzfarbstoff GelRed® enthielt (s. 3.6.3, Agarosegel). GelRed® färbt durch Interkalation Nukleinsäuren an. Die Proben (15 µl PCR-Produkte) sowie als Größenstandard 4 µl Marker (O'RangeRuler 20 bp DNA Leiter) wurden in das Gel geladen, bevor die Elektrophorese in 1x TBE-Puffer bei 85 V für 70-90 min durchgeführt wurde. Anschließend konnten die mit GelRed® angefärbten PCR-Produkte mithilfe eines UV-Transilluminators (Universal Hood II) visualisiert werden. Dazu wurde der Farbstoff mithilfe von UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt, welche durch den UV-Transilluminator detektiert und visualisiert wurde.

4.4.2.3. Quantitative PCR (TaqMan)

Die quantitative PCR (qPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, die eine Echtzeit-Quantifizierung der gebildeten PCR-Produkte ermöglicht. Die verwendeten TaqMan-Sonden beinhalten einen *Quencher* (von englisch *to quench*, „löschen“) und einen

Reporter-Fluoreszenzfarbstoff. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) werden die Sonden während der Sequenzierung gespalten. Aufgrund der vergrößerten räumlichen Entfernung zum *Quencher*, wird die vom Reporter-Fluoreszenzfarbstoff erzeugte Fluoreszenz nicht länger unterdrückt und kann zur Quantifizierung der Nukleinsäuren herangezogen werden. Die Nutzung unterschiedlicher TaqMan-Sonden mit unterschiedlichen Fluorophoren ermöglicht die Quantifizierung verschiedener Nukleinsäuren innerhalb derselben Probe. Die qPCR wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden auf 2,5 ng/μl in RNase-freiem Wasser verdünnt und es wurde ein Mix mit TaqMan-Sonden (s. 3.10), Enzymen und Substraten angesetzt (Tabelle 4).

Tabelle 4. Mix der qPCR für ein Well

Substanz	Menge
20x TaqMan-Sonden (Casp-7 bzw. TRIM25)	0,5 μl
20x TaqMan-Sonden (GAPDH)	0,5 μl
2x qPCRBIO Probe Mix Lo-ROX (Mastermix)	5 μl
Aqua bidest.	2 μl

In jedes Well wurden 2 μl verdünnte cDNA (5 ng cDNA) und 8 μl Mix (Caspase-7 & GAPDH bzw. TRIM25 & GAPDH) pipettiert. Die Kontrolle enthielt 8 μl Mix und 2 μl bidestilliertes Wasser. Es wurden Duplikate der zu bestimmenden Proben erstellt. Die 96-Well-Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und für 1 min bei 1.000 min⁻¹ zentrifugiert. Dadurch mischen sich Mix und cDNA. Mithilfe eines *Real-Time-PCR-Systems* (QuantStudio 3) erfolgte die qPCR entsprechend des in Tabelle 5 gezeigten Schemas. Dabei konnten die Ct-Werte der Proben ermittelt werden. Schließlich wurden die cDNA-Proben mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantifiziert, wobei anhand von GAPDH normalisiert wurde.

Tabelle 5. Zyklen der qPCR

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1	95 °C	2 min
Denaturierung	40	95 °C	5 s
<i>Annealing</i> , Polymerisierung und Signalgenerierung		62 °C	30 s

4.5. Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analyse ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen mithilfe spezifischer Antikörper.

4.5.1. Totalproteingewinnung

Die Gewinnung von Totalprotein erfolgte aus in 60 mm Zellkulturschalen wachsenden Zellen. Zur Ernte ohne Überstand wurden die Zellen in den Schalen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS/EDTA (5 mM) mit einem Zellschaber von den Schalen abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Stimulation mit apoptotischen Substanzen oder Induktoren des Inflammasoms erfolgte die Ernte dagegen mit Überstand, das bedeutet inklusive im Kulturmedium schwimmender, nicht-lebender Zellen. Bei der Ernte mit Kulturmedium wurden die Zellen direkt mithilfe eines Zellschabers von den Schalen abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 6.500 min^{-1} und 4 °C , woraufhin die Zellpellets in 1 ml eiskaltem PBS/EDTA (5 mM) resuspendiert wurden. Nach dem Resuspendieren in PBS/EDTA wurden sämtliche Proben auf die gleiche Weise weiterverarbeitet. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 6.500 min^{-1} und 4 °C . Dann wurden die Zellpellets in 80-100 μl eiskaltem Totalproteinpuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (s. 3.6.2, Lysepuffer) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels eines sechsfachen Frieren-Tauen-Zyklus aufgeschlossen und 30 min bei 13.000 min^{-1} und 4 °C zentrifugiert. Dabei trennten sich die Zelltrümmer (*cell*

debris) vom Totalprotein der Zellen. Der das Totalprotein enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

4.5.2. Gewinnung von nukleären und cytosolischen Fraktionen

Die Gewinnung von nukleären und cytosolischen Fraktionen erfolgte aus in 60 mm Zellkulturschalen wachsenden Zellen. Die Zellen wurden mit dem Kulturmedium mithilfe eines Zellschabers von den Schalen abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 6.500 min^{-1} und 4 °C, woraufhin die Zellpellets in 1 ml eiskaltem PBS/EDTA (5 mM) resuspendiert wurden. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 5 min bei 6.500 min^{-1} und 4 °C wurden die Zellpellets in ca. 70 µl eiskaltem Puffer A mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (s. 3.6.2, Puffer A) resuspendiert. Nach maximal 10 min Inkubationszeit auf Eis wurde zum Stoppen der weiteren Zellyse 1/15 des Puffer A-Volumens einer 10 %igen Nonidet P-40-Lösung (NP-40) hinzugegeben, die Proben wurden 10 Sekunden mithilfe eines Vortexmischers gemischt und für 20 min bei 13.000 min^{-1} und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die im Überstand befindlichen cytosolischen Proteine in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Die Pellets wurden dreimal mit PBS gewaschen und 20 min bei 13.000 min^{-1} und 4 °C zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand zur weiteren Aufreinigung der Pellets vollständig abgenommen. Im Anschluss wurden ca. 30 µl eiskalter Puffer C mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (s. 3.6.2, Puffer C) zu den Pellets hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden für 60 min bei 1.400 min^{-1} und 4 °C geschüttelt und anschließend für 30 min bei 13.000 min^{-1} und 4 °C zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen nukleären Proteine wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

4.5.3. Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte mithilfe des Micro BCA™ Protein Assay Kits von Thermo Scientific. Das enthaltende Cu^{+2} wird innerhalb der alkalischen Lösung durch die Reaktion mit Proteinen zu Cu^{+1} reduziert (Biuretreaktion).²²⁶ Die Quantifizierung von Protein beruht auf der Bildung eines violetten Reaktionsproduktes aus zwei Molekülen BCA (*bicinchoninic acid*), die mit Cu^{+1} einen Chelatkomplex bilden. Das gebildete Reaktionsprodukt weist eine

starke Absorption bei 562 nm auf, die linear zur Proteinkonzentration zunimmt. Für die Proteinquantifizierung wurde zunächst eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen von Bovinem Serumalbumin (BSA) (3,125-200 µg/ml) und den entsprechenden Absorptionen bei 562 nm erstellt. Für die Proteinkonzentrationsmessung wurden in eine 96-Well-Platte jeweils 150 µl bidestilliertes Wasser sowie 1 µl der jeweiligen Probe gegeben. Als Referenz dienten 151 µl bidestilliertes Wasser. Zuletzt wurden in jedes Well 150 µl BCA-Reagenz gegeben (Zusammensetzung aus Lösung A, B und C im Verhältnis 25:24:1). Die 96-Well-Platte wurde mit Alufolie abgedeckt und bei 60 °C für 30 min inkubiert. Anschließend kühlte die Platte auf Raumtemperatur ab und die Absorption der Proben wurde bei 562 nm mithilfe eines Mikrotiterplatten-Readers (SpectraMax® M5e) bestimmt.

4.5.4. SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Variante der Gelelektrophorese, bei welcher das anionische Detergens SDS an Proteine bindet, ihre Sekundär- und Tertiärstruktur denaturiert und ihnen eine zum Molekulargewicht proportionale negative Ladung verleiht. Dadurch können die Polypeptidketten im Polyacrylamidgel innerhalb eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Für die Gelelektrophorese mussten zunächst Polyacrylamidgele vorbereitet werden (s. 3.6.3, Trenngel und Sammelgel). Die Gele wurden in Gussständern zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zuerst wurde das Trenngel angefertigt und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel inklusive Kamm für die Proben Taschen auf das Trenngel gegossen. Bei der Vorbereitung zur Gelelektrophorese wurden die Proben mit 1/4 des Probengesamtvolumens 4x Laemmli-Puffer (s. 3.6.4, 4x Laemmli-Puffer) gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Im Anschluss konnten die Proben und als Größenstandard 5 µl Proteinmarker (BlueStar Prestained Protein Marker) mithilfe einer Hamilton-Spritze auf das Polyacrylamidgel aufgetragen werden. Je Probe wurden 20-30 µg Protein aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer (1x SDS-PAGE-Puffer) befüllt und die Proteine bei 200 V für 60-90 min aufgetrennt.

4.5.5. Proteintransfer

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels eines *Semidry-Blot*-Systems auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Bei dieser Methode wandern die negativ geladenen Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel in Richtung Anode auf eine Membran. Dazu wurden anodenseitig drei mit Transferpuffer (s. 3.6.4, Towbin Puffer) durchtränkte Filterpapiere und eine mit Transferpuffer durchtränkte Nitrocellulosemembran aufgeschichtet. Auf die Membran folgte das mit Transferpuffer gewaschene Gel sowie drei weitere mit Transferpuffer durchtränkte Filterpapiere. Der Transfer erfolgte in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des zu übertragenden Proteins für 70-90 min bei 25 V und 1 A.

4.5.6. Immunodetektion

Nach Auftrennung und Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran können sie mithilfe entsprechender Antikörper nachgewiesen werden. Dabei werden primäre Antikörper, die spezifisch gegen das nachzuweisende Protein gerichtet sind, und sekundäre Antikörper, die die primären Antikörper binden und an eine Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelt sind, verwendet. Durch die Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Luminol durch die HRP wird Chemilumineszenz erzeugt. Für die Immunodetektion wurden die Nitrocellulosemembranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % Magermilchpulver gelöst in 1x TBST unter konstantem Schütteln inkubiert. Auf diese Weise werden Bindungsstellen der Membran, an die kein Protein gebunden hat, gesättigt. Anschließend wurden die Membranen mit den primären Antikörpern unter konstantem Schütteln über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Membranen mindestens dreimal für 5 min in 1x TBST gewaschen, für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern inkubiert und erneut mindestens dreimal für 5 min in 1x TBST gewaschen. Schließlich konnten die an die nachzuweisenden Proteine gebundenen Antikörper durch die katalysierte Reaktion der HRP detektiert werden. Dazu wurde eine Chemilumineszenzmixtur (Western Lightning® Plus-ECL) mit Wasserstoffperoxid und Luminol, den Substraten der HRP, angemischt und über die Membranen gegeben. Schließlich wurde das bei der Reaktion emittierte Licht durch das Auflegen von Röntgenfilmen auf die Membranen in einer

Dunkelkammer visualisiert. Die Röntgenfilme wurden in einem Röntgenfilmentwickler (AGFA CP 1000) entwickelt.

4.5.7. Densitometrie

Nach der Visualisierung der Proteine auf den Röntgenfilmen konnten die sichtbaren Proteinbanden mittels Densitometrie, eines Verfahrens zur Quantifizierung der Farbdichte (Farbmenge pro Flächeneinheit), ausgemessen werden. Dabei wurde zur Quantifizierung der Spaltprodukte von PARP-1, Caspase-3 und -7 jeweils der Quotient aus den densitometrisch erfassten Spaltprodukten und der inaktiven Vorstufe gebildet.

4.6. Proliferationsassay

Der Proliferationsassay wurde mithilfe des Kits CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay von Promega entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Mithilfe des Proliferationsassays erfolgte die vergleichende Untersuchung der Zellen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens anhand der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen. Proliferierende Zellen setzten dabei Tetrazoliumsalz in Formazan um, welches anschließend durch photometrische Messung quantifiziert wurde. Zunächst wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und je 5.000 Zellen pro Well in eine sterile 96-Well-Platte in Kulturmedium (DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Pen-Strep) nach folgendem Schema ausgesät (Tabelle 6).

Tabelle 6. Exemplarisches Schema des Proliferationsassays in einer 96-Well-Platte

Die Kontrolle entspricht Kulturmedium (DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Pen-Strep). Ohne Stimulus bedeutet 10 % (v/v), mit Stimulus 20 % (v/v) FCS im Medium.

	Kontrolle	shCtrl.	shTRIM25 #1	shTRIM25 #5
	1	2	3	4
A	Ohne Stimulus (10 % FCS)			
B				
C	Mit Stimulus (20 % FCS)			
D				

Das Gesamtvolumen betrug gemäß Herstellerangaben 100 µl pro Well. Als Wachstumsstimulus wurden zusätzliche 10 % FCS zum Kulturmedium zugesetzt (final 20 % FCS), als Kontrolle diente Kulturmedium mit entsprechendem FCS-Gehalt ohne Zellen. Nach 48 Stunden Kultivierung im CO₂-Inkubator erfolgte unter sterilen Bedingungen die Zugabe von 15 µl der lichtempfindlichen Farblösung bei ausgeschaltetem Raumlicht. In den folgenden 1-4 Stunden Inkubationszeit im CO₂-Inkubator bei 37 °C setzten die proliferierenden Zellen das in der Farblösung vorhandene Tetrazoliumsalz in ein Formazan um, wobei die Menge des gebildeten Formazans direkt proportional zur Zellanzahl ist. Nach der Inkubation wurden unterhalb eines Laborabzugs 100 µl des *Stop Mix* hinzugefügt. Dieser sollte zur photometrischen Messung das von den Zellen gebildete Formazan in Lösung bringen. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Lösung in den Wells resuspendiert, bis eine einheitliche Färbung entstand. Der Inkubationsschritt mit *Stop Mix* konnte optional auch über Nacht bei Raumtemperatur erfolgen. Danach folgte die photometrische Messung der Absorption bei 570 nm, dem Absorptionsmaximum des Formazans, und bei 700 nm als Referenzwellenlänge zur Reduktion des Hintergrundsignals mithilfe eines Mikrotiterplatten-Readers (SpectraMax® M5e). Zur Auswertung wurde zunächst die Absorption bei 700 nm von der Absorption bei 570 nm abgezogen. Dann wurde der Mittelwert der Duplikate der Kontroll-Wells (Kulturmedium und FCS ohne Zellen) von dem Mittelwert der Wells mit den zu untersuchenden Zellen subtrahiert. Abschließend wurde die prozentuale Proliferation der zu untersuchenden Zelllinien (shTRIM25 #1 und shTRIM25 #5) im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie (shCtrl.) berechnet, wobei shCtrl. als 100 % definiert wurde.

4.7. *In vitro*-Wundheilungsassay (Scratchassay)

Mithilfe des *in vitro*-Wundheilungsassays erfolgte die vergleichende Untersuchung der Zellen hinsichtlich ihres Migrationverhaltens, welches entscheidend für Wundheilungsprozesse ist. Zunächst wurden die Zellen mit 2 ml Kulturmedium in 60 mm Schalen ausgesät und für 24 Stunden im CO₂-Inkubator kultiviert. Dabei wurde für den Zeitpunkt des *Scratches* („Kratzwunde“) eine Konfluenz von nahezu 100 % angestrebt. Am nächsten Tag erfolgte der Austausch des Kulturmediums mit 2 ml FCS-freiem Medium (Hungermedium: DMEM, 100 mg/L BSA, 1 % (v/v) Pen-Strep), welches die Proliferation der Zellen, die bei

Wundheilungsprozessen ebenfalls von Bedeutung ist, dämpfen sollte. Somit konnte das Migrationsverhalten der Zellen unabhängig vom Proliferationsverhalten untersucht werden. Nach 24 Stunden Kultivierung in FCS-freiem Medium wurde in den Zellschalen mithilfe einer sterilen 200 μ l-Pipettenspitze ein gleichmäßiger *Scratch* durch den konfluenten Zellrasen entlang einer vorher eingezeichneten bodenseitigen Markierung (Abbildung 4) gesetzt. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml FCS-freies Medium in die Zellschalen gegeben. Direkt im Anschluss erfolgten die ersten Aufnahmen der *Scratches* (Zeitpunkt 0 h) mithilfe der 10-fachen Vergrößerung eines Mikroskops (Biozero, Keyence). Nach weiteren 6 bzw. 24 Stunden wurden zur Beobachtung des Migrationsverhaltens im zeitlichen Verlauf ebenfalls Bilder der *Scratches* aufgenommen. Die Versuchsmethode des *Assays* beruht darauf, dass die Zellen in Richtung der freien Fläche migrieren, um diese mittels Ausbildung neuer Zell-Zell-Kontakte wieder zu verschließen. Zur genaueren Beurteilung wurden je drei Aufnahmen pro Zellschale angefertigt und im jeweiligen Bildausschnitt die Abstände der Wundränder (Breite der *Scratches*) mithilfe des Mikroskops ausgemessen. Durch die Abnahme des Abstandes der Wundränder zueinander konnte die Migration der Zellen quantifiziert und vergleichend dargestellt werden. Zur Auswertung wurde zunächst die Migration der Zellwand in Prozent der anfänglichen Breite der *Scratches* ermittelt und anschließend der Mittelwert der Triplikate derselben Zellschale zum gleichen Zeitpunkt gebildet.

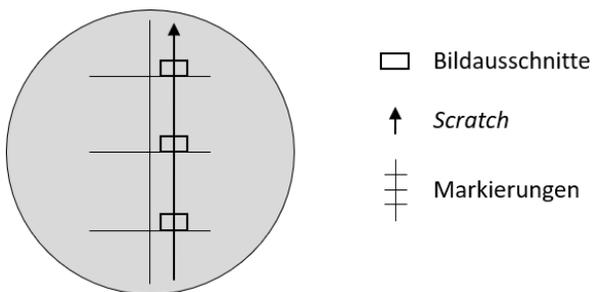


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Zellkulturschalen des *in vitro*-Wundheilungsassays

Zunächst wurden am Boden der 60 mm Zellschalen von außen Markierungen entsprechend der Abbildung eingezeichnet. Nachfolgend wurde bei jeder Zellschale ein *Scratch* auf der rechten Seite der Markierungen angebracht. Die Bildausschnitte wurden oberhalb der horizontal eingezeichneten Markierungen angesetzt und für das gesamte Experiment beibehalten.

4.8. FACS

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) ist eine Form der Durchflusszytometrie, bei welcher die Eigenschaften von Zellen mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen analysiert werden können. Die sich in Lösung befindenden Zellen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt und treten nacheinander in den Messkanal des FACS-Gerätes ein. Die Zellen passieren einen oder mehrere Laserstrahlen, wodurch es zur Streuung des Lichtes sowie zur Anregung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe kommt. Das entstehende Vorwärtsstreu-licht (*Forward Scatter*), Seitwärtsstreu-licht (*Side Scatter*) und emittierte Licht (Fluoreszenz) kann von Detektoren im Gerät ermittelt werden und liefert Aussagen über die Eigenschaften der Zellen. In dieser Arbeit wurde ein fluoreszierender Nukleinsäurefarbstoff verwendet. Die gemessene Fluoreszenz korrelierte mit dem Nukleinsäuregehalt der Zellen, der sich beispielsweise im Rahmen des Zellzyklus oder der Apoptose spezifisch verändert. Dadurch wurde eine Zellzyklusanalyse und eine Quantifizierung apoptotischer Zellen ermöglicht.

4.8.1. Gewinnung von FACS Proben und Vorbereitung zur Messung

Die Gewinnung von FACS Proben erfolgte mit Überstand aus in 60 mm Zellkulturschalen wachsenden Zellen. Das Kulturmedium der Zellschale wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen in der Schale einmalig mit 1 ml PBS gewaschen und auch das PBS in das entsprechende Röhrchen gegeben. Es folgte das Trypsinisieren der Zellen mit 700 µl 0,05 % Trypsin-EDTA für etwa 5 min bei 37 °C. Nach der vollständigen Ablösung von der Schale wurden die Zellen zur Beendigung der Trypsinaktivität im Kulturmedium aus dem Zentrifugenröhrchen resuspendiert, die Zellsuspension in das Röhrchen überführt und bei 1200 rcf für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet vorsichtig in 1 ml 70 %igem Ethanol resuspendiert und für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt kam es zum Fixieren und Permeabilisieren der Zellen, sie wurden in ihrer Zellzyklusphase konserviert und ihre Zellmembran wurde für kleine DNA-Fragmente und den zur Messung verwendeten Farbstoff durchlässig. Die Proben konnten für 1-2 Wochen bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Die Zentrifugenröhrchen wurden erneut bei 1200 rcf für 3 min zentrifugiert, der Überstand vollständig verworfen und die Zellpellets in 500 µl Extraktionspuffer (s. 3.6.5) mit 15 µg/ml RNase A resuspendiert. In den

folgenden 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur baute die RNase A die in den Proben vorhandene RNA ab. Dadurch wurde bei der FACS Messung ausschließlich die DNA der Zellen quantifiziert. Die Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 1 μ l des lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs SYTOX™ Blue Dead Cell Stain für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Schließlich folgte die Messung der Proben.

4.8.2. FACS Messung

Die Proben wurden vor ihrer Messung mithilfe eines Vortexmischers gemischt, bis eine einheitliche Färbung entstand. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Zellen, welcher mit der gemessenen Fluoreszenz korrelierte, mithilfe des FACS-Gerätes BD FACSCanto II (BD Biosciences) bestimmt. Der verwendete Farbstoff SYTOX™ Blue Dead Cell Stain zeichnet sich durch eine Anregungswellenlänge von 444 nm und eine Emissionswellenlänge von 480 nm aus. Im Zellzyklus ändert sich der DNA-Gehalt von Zellen spezifisch entsprechend der jeweiligen Phase. Bei der FACS Messung ließen sich daher anhand des DNA-Gehaltes der Zellen G₁-, S- und G₂-Phasen unterscheiden und in einem *Dotplot* bzw. Histogramm visualisieren und quantifizieren. Im Histogramm war die Anzahl der detektierten Ereignisse (= gemessene Zellen) an der y-Achse und der DNA-Gehalt der Zellen an der x-Achse ablesbar. Die Analyse der Sub-G₁-Phase, welche v.a. das Ausmaß apoptotischer Zellen innerhalb der analysierten Zellpopulation repräsentiert, beruht auf der zunehmenden Fragmentierung der DNA während der späten Apoptose. Bei spät-apoptotischen Zellen verringert sich durch Permeabilisierung der Zellmembranen bei der FACS Probengewinnung und dem folgenden Verlust der DNA-Fragmente der Nukleinsäuregehalt der Zellen. Die spät-apoptotischen Zellen können daher als separate Zellpopulation mit verringertem DNA-Gehalt (Sub-G₁-Phase) im FACS quantifiziert werden.

4.8.3. FACS Gating

Das FACS *Gating* erfolgte mithilfe des Programms BD FACSDiva™ 8.0.2. Bei der Zellzyklusanalyse wurden die Sub-G₁-, G₁-, S- und G₂-Phasen nicht aber der Zelldetritus (Zelltrümmer) in das *Gate* miteinbezogen. Bei der Sub-G₁-Phasen-Analyse mit Doxorubicinstimulus wurde lediglich die Sub-G₁-Phase *gegattet*. Bei der Stimulation mit 5-Fluorouracil wurde der

Zelldetritus in das *Gate* miteinbezogen, da eine klare Unterscheidung zwischen Zelldetritus und Sub-G₁-Phase nicht möglich war.

4.9. Statistik und Datenanalyse

Sämtliche graphisch dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die n-Zahl gibt die Anzahl der voneinander unabhängig durchgeführten Experimente an. Die Datenanalyse erfolgte mit Microsoft Excel und die statistische Auswertung mithilfe von GraphPad Prism 9. Dabei wurde die statistische Signifikanz der Daten mittels t-Test für unabhängige Stichproben überprüft, bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen.

	Software
Datenanalyse	Microsoft Excel 2019
Densitometrie, Visualisierung der Gelelektrophoresen (semiquantitative PCR)	Quantity One 4.6.6 (Basic)
FACS Datenanalyse	BD FACSDiva™ 8.0.2
Grafiken	GraphPad Prism 9, Microsoft PowerPoint 2019
<i>In vitro</i> -Wundheilungsassay	BZ-8100 Observation Application
Proteinquantifizierung	SoftMax Pro 5.4.6
qPCR	QuantStudio™ Design and Analysis Software
RNA-Konzentrationsmessung	NanoDrop 3.1.0
Statistik	GraphPad Prism 9

5. Ergebnisse

5.1. TRIM25 Expression in RKO-Zelllinien mit stabilem TRIM25 *Knockdown*

Die E3-Ubiquitinligase TRIM25 spielt neben ihrer zentralen Rolle bei der antiviralen Immunantwort durch Retinolsäure-induziertes Gen 1 (RIG)-vermittelte Aktivierung von Interferon⁶⁵ eine bedeutende pathophysiologische Rolle bei verschiedenen malignen Tumoren des Menschen, wie z.B. bei Malignomen der Prostata,⁵⁹ der Brust,⁸³ des Ovars,⁸⁵ des Endometriums,^{87,88} der Lunge⁸⁹ und des Kolorektums²³ (s. 1.1.4). Bei Kolorektalkarzinomzelllinien vermittelt TRIM25 verschiedene potentiell onkogene Funktionen, da es die Proliferation und Migration der Tumorzellen fördert.²³ Zuvor konnte unsere Arbeitsgruppe erstmalig eine funktionelle Bedeutung von TRIM25 bei der negativen Regulation der proapoptotischen Caspasen-2 und -7 in Kolonkarzinomzellen und deren Auswirkung auf das Überleben (*Survival*) der Tumorzellen und die Therapieresistenz belegen.^{77,78} Um den möglichen Einfluss von TRIM25 auf für die Tumorentstehung und -progression wichtige Eigenschaften von humanen Kolonkarzinomzelllinien untersuchen zu können, wurden RKO-Zellen mit stabilem *Knockdown* des TRIM25 Gens generiert. Die stabilen *Knockdown* Zellen dienten zudem der später geplanten Etablierung eines Xenograftmodells. Von den insgesamt fünf generierten Klonen zeigten Klon 1 (shTRIM25 #1) und Klon 5 (shTRIM25 #5) den effizientesten *Knockdown* des TRIM25 Proteins (Abbildung 5). Beide Zellklone wurden daher für die nachfolgenden Experimente verwendet. Die Zellen wurden insbesondere im Hinblick auf tumorrelevante Eigenschaften wie Proliferation, Migration, Zellzyklus, Apoptose und Inflammation untersucht.

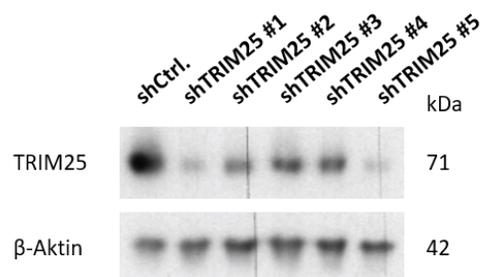


Abbildung 5. Bestimmung der TRIM25 Expression auf Proteinebene bei stabilem genetischem *Knockdown* von TRIM25
ShCtrl. und shTRIM25 #1-5 (Klon 1-5) wurden freundlicherweise von Herr Dr. Gergely Imre und Frau Dr. Kristina Stanke aus wt-RKO-Zellen mithilfe von *control* shRNA bzw. fünf verschiedenen TRIM25 spezifischen shRNAs generiert. Die

Effizienz des TRIM25 *Knockdowns* wurde mittels Totalproteingewinnung und anschließendem Western Blot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Der stabile TRIM25 *Knockdown* wurde regelmäßig auf RNA- bzw. Proteinebene mittels semiquantitativer RT-PCR bzw. Western Blot-Analyse überprüft und ist bei sämtlichen in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen bestätigt worden. Da der *Knockdown* mit zunehmender Zellpassage an Effizienz verlor, wurden die Zellen maximal bis Passage 24 verwendet.

5.2. Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen

Der Einfluss von TRIM25 auf die Proliferation von RKO-Kolonkarzinomzelllinien wurde mittels einer vergleichenden Analyse des Wachstumsverhaltens von Kontrollzellen und Zellen mit stabilem TRIM25 *Knockdown* im Proliferationsassay untersucht. Der in der Arbeit verwendete Assay beruht auf der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen. Proliferierende Zellen setzen Tetrazoliumsalz in Formazan um, welches anschließend durch photometrische Messung quantifiziert werden kann. Die Menge des gebildeten Formazans ist direkt proportional zur Zellanzahl. Ohne zusätzlichen FCS-Stimulus zeigten die TRIM25 *Knockdown* Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (shCtrl.) eine vermehrte Proliferation, dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. Dagegen führte die Stimulation mit FCS zu einer signifikant verstärkten Proliferation von TRIM25 *Knockdown* Zellen im Vergleich zu shCtrl. (Abbildung 6). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Proliferation von RKO-Zellen TRIM25-abhängig gehemmt wird.

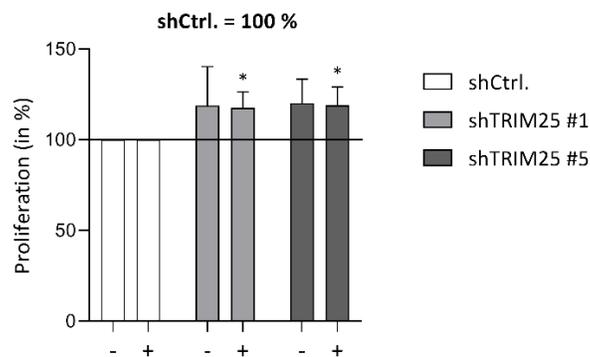
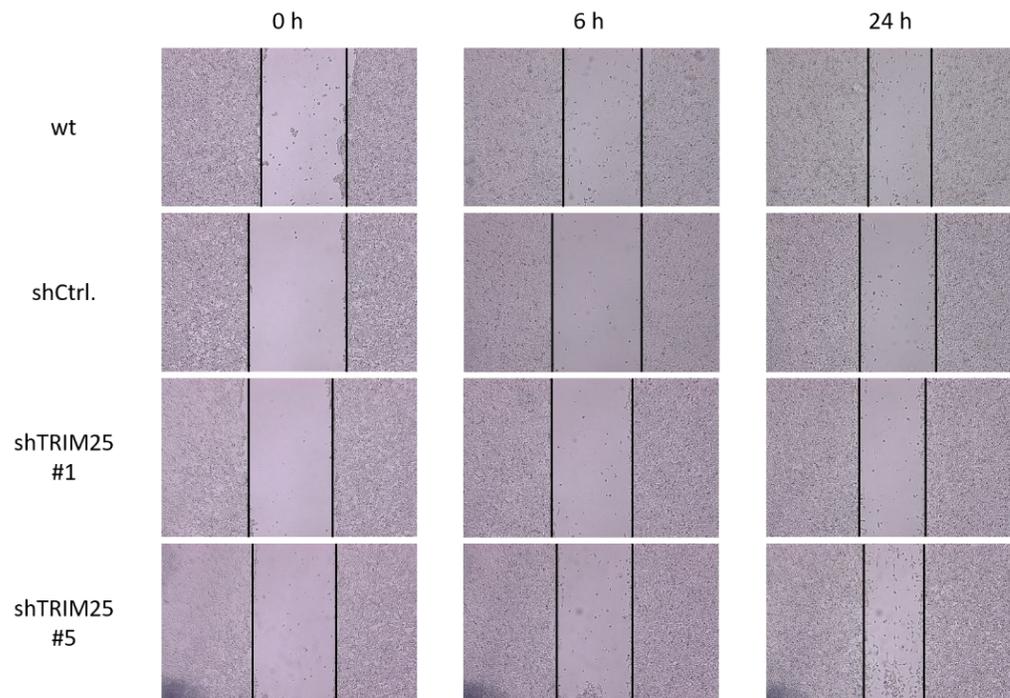
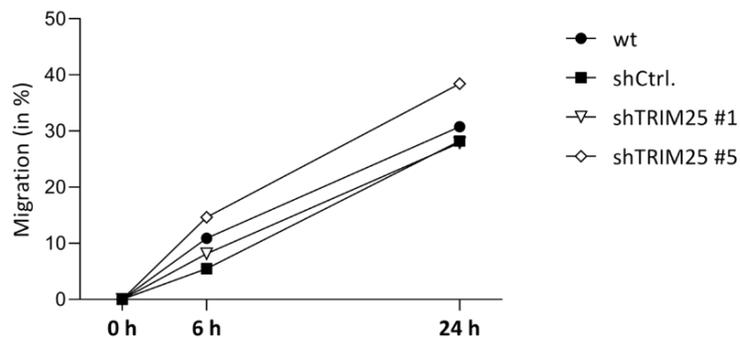


Abbildung 6. Der stabile TRIM25 *Knockdown* führt zur signifikant vermehrten Proliferation von RKO-Zelllinien bei FCS-Stimulus

Der Proliferationsassay wurde mithilfe des CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assays (Promega) durchgeführt. Die Zellen wurden für 48 h ohne (-) oder mit (+) Wachstumsstimulus kultiviert. Als Stimulus dienten zusätzliche 10 % FCS im Kulturmedium (final 20 % FCS im Medium). Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD (n = 3), * p < 0,05 (shTRIM25 #1 bzw. #5 verglichen mit shCtrl.) und wurden in Relation der Proliferation der Kontrollzelllinie angegeben (shCtrl. = 100 %, durchgezogene Linie).

5.3. Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf die Migration von Kolonkarzinomzellen

Im nächsten Abschnitt wurde der Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf das Migrationsverhalten der RKO-Zelllinien im *in vitro*-Wundheilungsassay analysiert. Bei diesem Assay wurde zunächst mittels einer Pipettenspitze ein gleichmäßiger *Scratch* durch den konfluenten Zellrasen der Schalen gesetzt. Anschließend wurde die zeitabhängige Migration der Zellen in Richtung des *Scratches* durch Messung des Abstandes der Wundränder zueinander mikroskopisch quantifiziert. Zusätzlich wurden auch Wildtyp- (wt) und Kontrollzellen (shCtrl.) miteinander verglichen, um shRNA-vermittelte Effekte auf die Migration auszuschließen. Bei der Auswertung fiel auf, dass sich das Migrationsverhalten derselben Zellklone in den durchgeführten Experimenten interexperimentell relativ stark unterschied, was aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen deutlich wird. Aufgrund dieser interexperimentellen Abweichungen kann keine eindeutige Aussage über mögliche Unterschiede im Migrationsverhalten der Zellen und einem daraus zu schlussfolgernden Einfluss von TRIM25 auf die Migration von RKO-Zellen getroffen werden (Abbildung 7).

A.**B.****Mittelwert ± Standardabweichung:**

	0 h	6 h	24 h
wt	0,00 ± 0,00	10,89 ± 8,14	30,79 ± 8,99
shCtrl.	0,00 ± 0,00	5,48 ± 3,04	28,25 ± 6,52
shTRIM25 #1	0,00 ± 0,00	8,14 ± 3,98	27,89 ± 11,95
shTRIM25 #5	0,00 ± 0,00	14,66 ± 9,36	38,42 ± 5,60

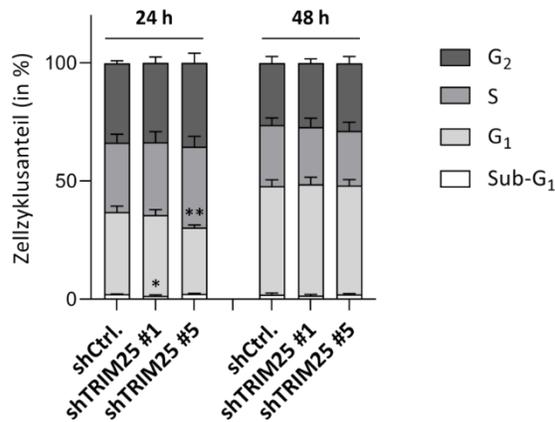
Abbildung 7. Einfluss des stabilen TRIM25 Knockdowns auf die Migration von RKO-Zelllinien

Nach 24 Stunden Kultivierung der Zellen wurde das Kulturmedium in den Schalen durch FCS-freies Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde in den Zellschalen ein gleichmäßiger *Scratch* durch den konfluenten Zellrasen mithilfe einer sterilen 200 µl-Pipettenspitze gesetzt. **A.** Die *Scratches* wurden direkt im Anschluss (0 h) und nach 6 bzw. 24 h mittels Durchlichtmikroskopie analysiert und fotografiert. Die gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente mit ähnlichen Resultaten. **B.** Die Breite der *Scratches* wurde durch Ausmessung des Abstandes der Wundränder zueinander quantifiziert. Die Migration der Zellwand wurde in Prozent der anfänglichen Breite der *Scratches* (zum Zeitpunkt 0 h) angegeben (0 h = 0 % Migration). Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten ± SD (n = 4).

5.4. Einfluss des TRIM25 *Knockdowns* auf den Zellzyklus von Kolonkarzinomzellen

In der nächsten Versuchsreihe wurde ein möglicher Einfluss von TRIM25 auf den Zellzyklus von RKO-Zellen untersucht. Der Zellzyklus ist durch die streng regulierte Abfolge verschiedener Aktivitätsphasen, der G₁-, S-, G₂- und M-Phase, charakterisiert. In Abhängigkeit der jeweiligen Phase ändert sich spezifisch der Nukleinsäuregehalt der Zellen. Bei der Zellzyklusanalyse mittels FACS wurde durch Verwendung eines in die DNA interkalierenden Farbstoffes (SYTOX™ Blue Dead Cell Stain) der DNA-Gehalt und somit die Zellzyklusphase der Zellen in den Proben ermittelt und der Anteil der Zellen, der sich in einer bestimmten Phase befand, quantifiziert. Zusätzlich erlaubt diese Methode die Erfassung der Sub-G₁-Phase, welche v.a. das Ausmaß apoptotischer Zellen innerhalb der analysierten Zellpopulation repräsentiert. Der Einfluss von TRIM25 auf den Zellzyklus von RKO-Zelllinien wurde zunächst durch eine vergleichende Analyse von Kontrollzellen (shCtrl.) und Zellen mit stabilem TRIM25 *Knockdown* zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h und 48 h) untersucht. Zum Zeitpunkt „24 h“ konnte eine signifikante Verringerung des Anteils der Sub-G₁-Phase am Zellzyklus des shTRIM25 #1 Klons im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Außerdem zeigten die Zellen des shTRIM25 #5 Klons eine im Vergleich zu den shCtrl. Zellen signifikant verringerte G₁-Phase (Abbildung 8). Darüber hinaus ließen sich sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden Kultivierung keine weiteren signifikanten Unterschiede im Zellzyklus nachweisen. Nach 48 Stunden war außerdem bei sämtlichen Zellen eine anteilige Erhöhung der G₁-Phase auffällig, während die S- bzw. G₂-Phasen zu diesem Zeitpunkt entsprechend erniedrigt waren. Innerhalb der G₁-Phase wird über das weitere Schicksal der Zelle entschieden: Entweder kommt es durch Fortführung des Zellzyklus (S-, G₂- und M-Phase) zur Zellteilung oder, wenn sich die Zelle z.B. aufgrund von Nährstoffmangel nicht mehr teilen kann, zum Eintritt in die G₀-Phase (reversible Ruhephase). Die Erhöhung der G₁-Phase bei gleichzeitiger Verringerung von S- und G₂-Phase mag daher auf einem zunehmenden Mangel an Wachstumsfaktoren (FCS) bei längeren Kultivierungsdauern der Zellen beruhen.

A.



B.

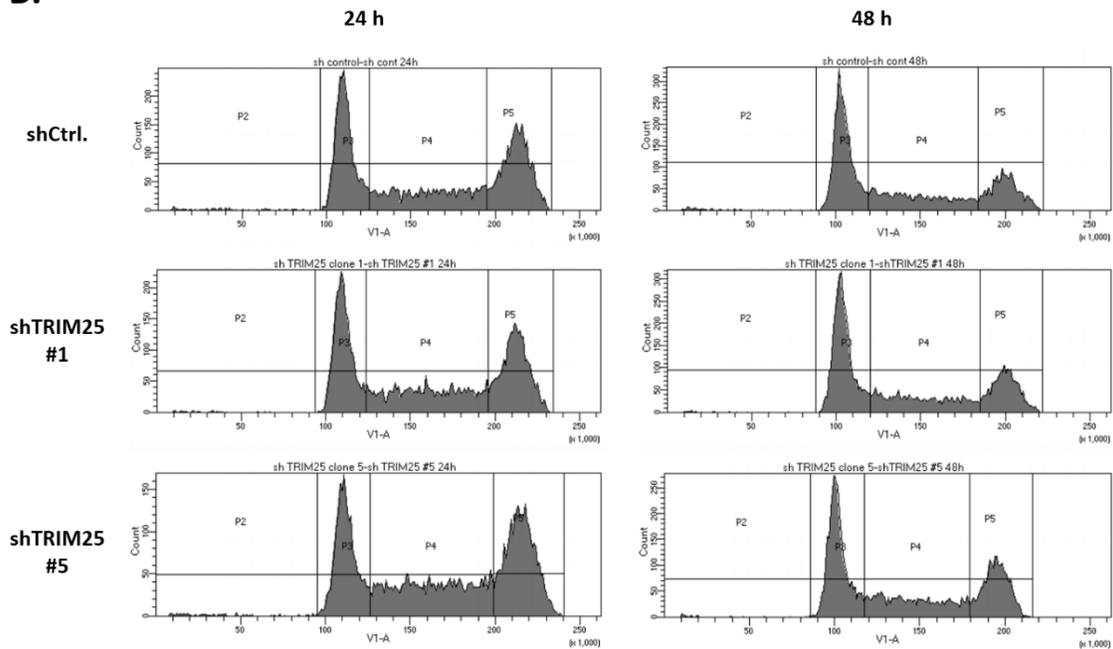


Abbildung 8. Einfluss des stabilen TRIM25 Knockdowns auf den Zellzyklus von RKO-Zelllinien

Für die Analyse der Zellzyklusphasen wurden die FACS Proben nach 24 h bzw. 48 h Kultivierung der Zellen gewonnen. Die Zellen wurden für 30 min mit SYTOX™ Blue Dead Cell Stain inkubiert. Es folgte die Messung der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie. Durch *Gating* jeder Phase (Sub-G₁, G₁, S, G₂) konnte der Anteil der einzelnen Phasen am Zellzyklus bestimmt werden. **A.** Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD (n (24 h) = 4; n (48 h) = 7), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (shTRIM25 #1 bzw. #5 verglichen mit shCtrl.). **B.** Die gezeigten Analysen sind repräsentativ für vier (24 h) bzw. sieben (48 h) unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. P2 entspricht der Sub-G₁-Phase, P3 der G₁-Phase, P4 der S-Phase und P5 der G₂-Phase. Für genauere Angaben zum speziellen *Gating* der Zellzyklusphasen s. Anhang 1.

Der Einfluss von TRIM25 auf den Zellzyklus wurde zusätzlich mithilfe eines *loss-of-function*-Ansatzes mit transienten TRIM25 *Knockdown* Zellen untersucht. Dazu wurde mithilfe von siRNA-Transfektion ein transienter TRIM25 *Knockdown* generiert und der Effekt des

Knockdowns auf den Zellzyklus von RKO-Zelllinien analysiert. Der transiente *Knockdown* von TRIM25 hat im Vergleich zu Kontrollzellen keinen Einfluss auf den Zellzyklus (Abbildung 9).

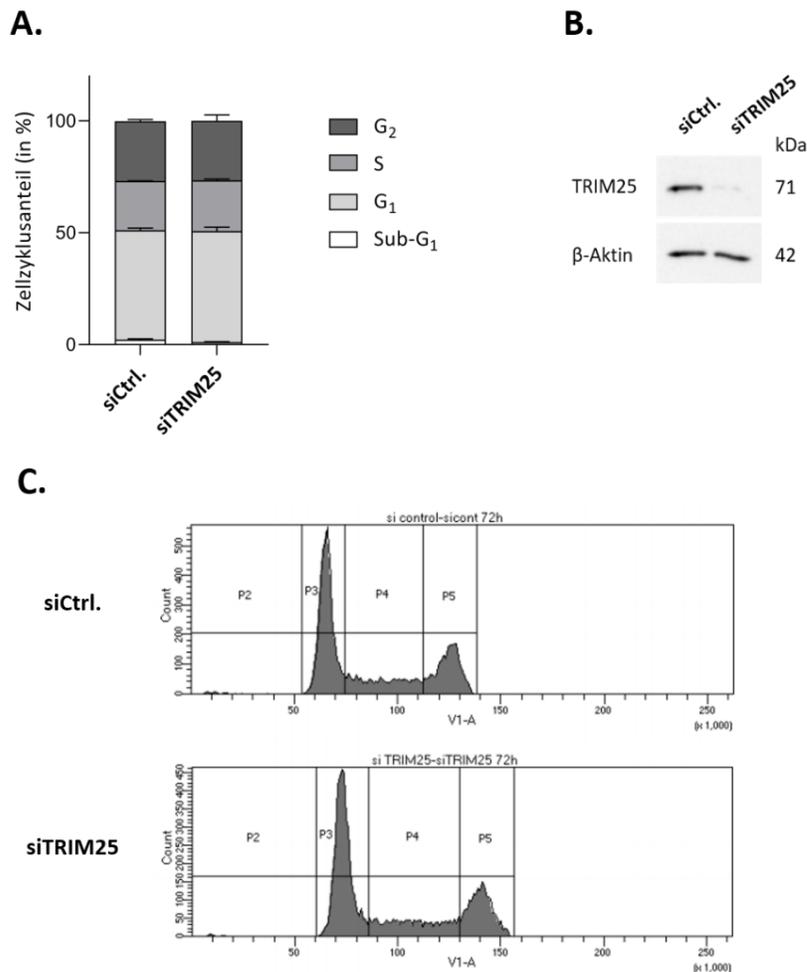


Abbildung 9. Der transiente TRIM25 *Knockdown* hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus von RKO-Zelllinien

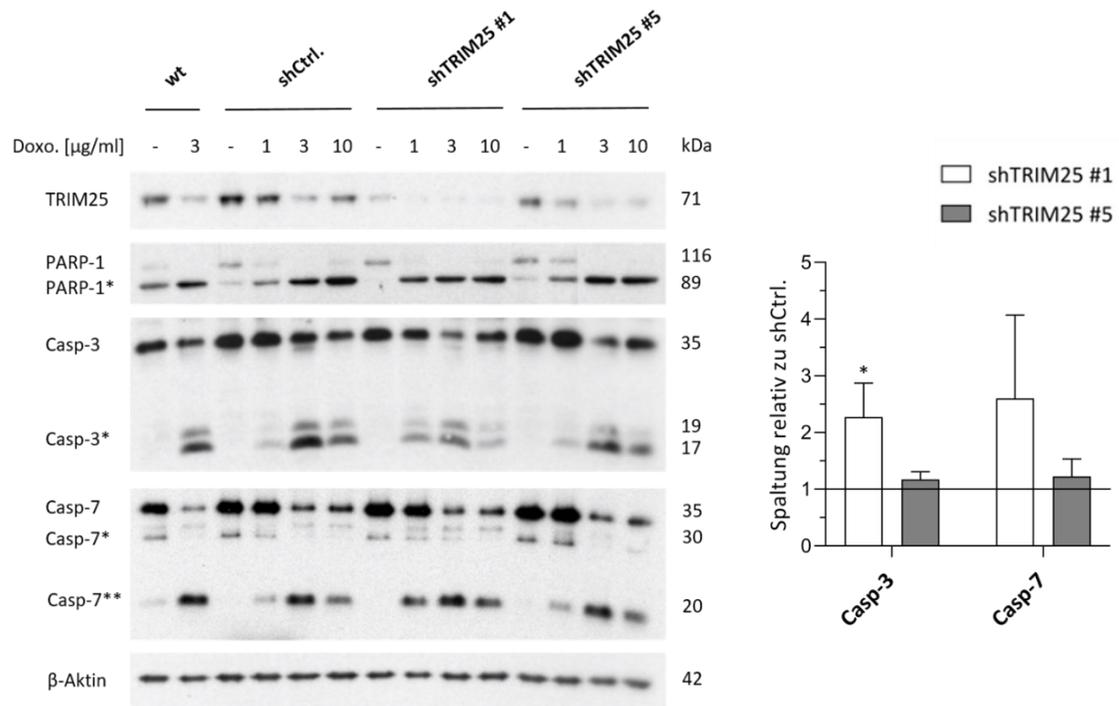
Nach 24 h Kultivierung wurden die subkonfluenten Wildtyp-RKO-Zellen mit 50 nM *control* siRNA bzw. TRIM25 spezifischer siRNA transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden die FACS Proben wie im Methodenteil beschrieben gewonnen und die Zellen für 30 min mit SYTOX™ Blue Dead Cell Stain inkubiert. Es folgte die Messung der Zellzyklusphasen. Durch *Gating* jeder Phase (Sub-G₁, G₁, S, G₂) konnte der Anteil der einzelnen Phasen am Zellzyklus bestimmt werden. **A.** Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD ($n = 2$). **B.** Bei der FACS Probengewinnung wurde außerdem Totalprotein gewonnen. Mittels Western Blot-Analyse wurde der transiente TRIM25 *Knockdown* bestätigt. **C.** Die gezeigten Analysen sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. P2 entspricht der Sub-G₁-Phase, P3 der G₁-Phase, P4 der S-Phase und P5 der G₂-Phase. Für genauere Angaben zum speziellen *Gating* der Zellzyklusphasen s. Anhang 2.

5.5. Der *Knockdown* von TRIM25 sensibilisiert Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose

Da unsere Arbeitsgruppe zuvor mithilfe eines transienten TRIM25 *Knockdowns* die funktionelle Rolle von TRIM25 bei der Sensitivierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber

Chemotherapeutika-induzierter Apoptose nachweisen konnte,^{77,78} wurde in der folgenden Versuchsreihe die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Verhältnisse in stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen überprüft. Dazu wurden die entsprechenden RKO-Zelllinien entweder mit dem DNA-Interkalator und Topoisomerase-II-Hemmstoff Doxorubicin oder alternativ mit dem Basenanalogen 5-Fluorouracil für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Apoptose der Zellen durch Spaltung von ausgewählten Apoptosemarkern (PARP-1, Caspase-3 und -7) im Western Blot nachgewiesen und densitometrisch quantifiziert. Dabei wurden in den Ansätzen mit Doxorubicin auch Wildtyp- (wt) und Kontrollzellen (shCtrl.) miteinander verglichen, aufgrund äquivalenter Ergebnisse konnten shRNA-vermittelte Effekte auf die Apoptose ausgeschlossen werden. Sowohl nach Doxorubicin- als auch nach 5-Fluorouracil-stimulus zeigten die TRIM25 *Knockdown* Zellen eine im Vergleich zu den Kontrollzellen (shCtrl.) verstärkte Caspase-3-, -7- und PARP-1-Spaltung (Abbildung 10). Die folglich nachgewiesene verstärkte Apoptose in TRIM25-depletierten Zellen zeigt, dass der stabile TRIM25 *Knockdown* RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose sensibilisiert. Interessanterweise zeigten sich Stimulus-spezifische Sensitivitätsunterschiede zwischen den beiden untersuchten TRIM25 Klonen (shTRIM25 #1 und #5). Eine Sensitivierung war in Abhängigkeit des verwendeten Chemotherapeutikums insbesondere in shTRIM25 #1 Zellen gegenüber Doxorubicin und in shTRIM25 #5 Zellen gegenüber 5-Fluorouracil deutlich. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden shTRIM25 Klone gegenüber den untersuchten Pharmaka zeigte sich besonders anhand einer Konzentrationsreihe.

A.



B.

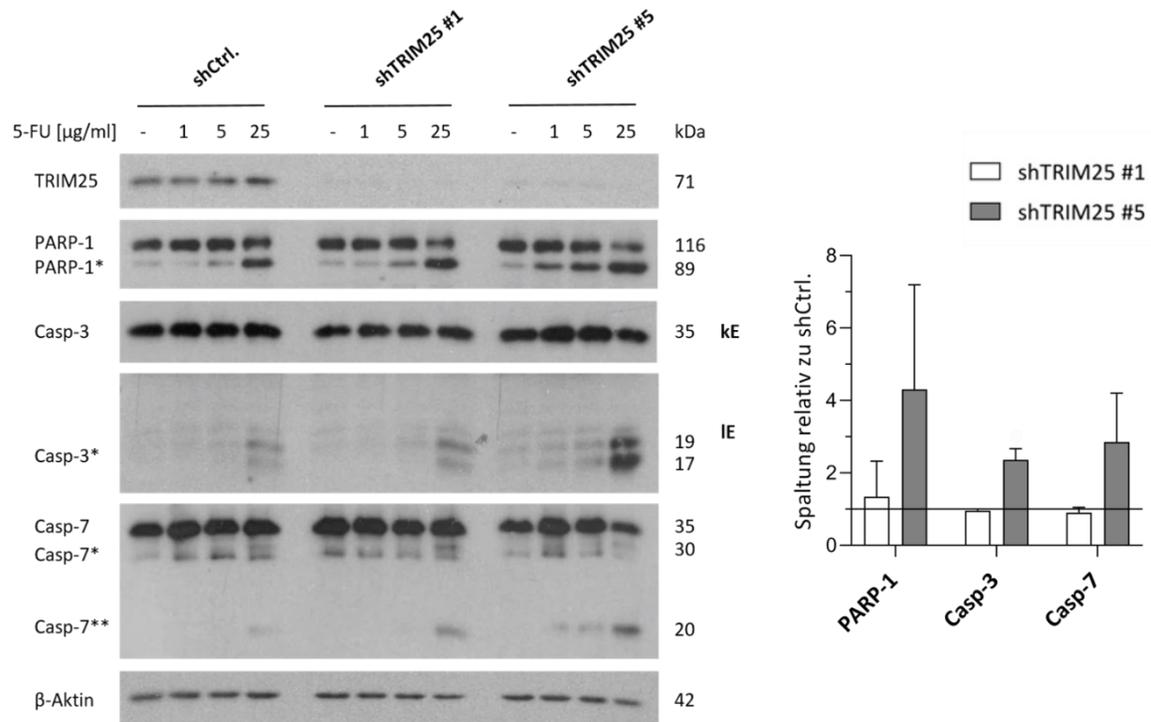


Abbildung 10. Der stabile TRIM25 *Knockdown* führt zur Sensibilisierung der RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose

Die Zellen wurden für 24 h kultiviert und für weitere 24 h mit den angegebenen Dosen von Doxorubicin (Doxo.) (**A.**) bzw. 5-Fluorouracil (5-FU) (**B.**) behandelt. Als Kontrolle (-) dienten mit DMSO behandelte (**A.**) oder unstimulierte (**B.**) Zellen. Anschließend wurde das Totalprotein der Zellen mitsamt Überstand gewonnen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurden 25 µg Protein je Probe auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Spaltprodukte der Proteine sind durch das Asterisk Symbol (*,**) gekennzeichnet. Abkürzungen: kE, kurze Exposition; lE, lange Exposition. Für die Densitometrie wurde zunächst die Caspase-3-, -7- und PARP-1-Spaltung durch den Quotienten aus Spaltprodukt und inaktiver Proform quantifiziert. Dann wurde die Spaltung der Apoptosemarker von shTRIM25 #1 bzw. #5 relativ zu shCtrl. angegeben (shCtrl. = 1, durchgezogene Linie). **A.** Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für zwei (wt) bzw. drei (shCtrl. und shTRIM25 Klone) unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. In der Densitometrie (Balkendiagramm) wurden selektiv die mit 1 µg/ml Doxorubicin stimulierten Zellen ausgewertet. Die Daten entsprechen den Mittelwerten ± SD (n = 3), * p < 0,05 (shTRIM25 #1 bzw. #5 verglichen mit shCtrl.). **B.** Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. In der Densitometrie (Balkendiagramm) wurden die mit 1 µg/ml (PARP-1) bzw. mit 5 µg/ml (Caspase-3 und -7) 5-Fluorouracil stimulierten Zellen ausgewertet. Die Daten entsprechen den Mittelwerten ± SD (n = 2) (shTRIM25 #1 bzw. #5 verglichen mit shCtrl.).

Für den direkten Vergleich des stabilen mit einem transienten TRIM25 *Knockdown* wurde zusätzlich mithilfe von siRNA-Transfektion ein transienter TRIM25 *Knockdown* in Wildtyp-RKO-Zellen generiert und die Auswirkungen der TRIM25 Attenuation auf die Doxorubicin-induzierte Apoptose untersucht. Hierfür wurde erneut die Spaltung von PARP-1, Caspase-3 und -7 analysiert. Die veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe,^{77,78} konnten dabei bestätigt werden. Wie der stabile, führte auch der transiente TRIM25 *Knockdown* zur Sensitivierung der RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose (Abbildung 11). Des Weiteren wurde im transienten Ansatz eine TRIM25 *Knockdown*-abhängige Hochregulation von Caspase-7 auf Proteinebene bestätigt.⁷⁸ Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein TRIM25 *Knockdown* Kolonkarzinomzellen sowohl in transienten als auch in stabilen Ansätzen gegenüber Pharmakon-induzierter Apoptose sensibilisiert.

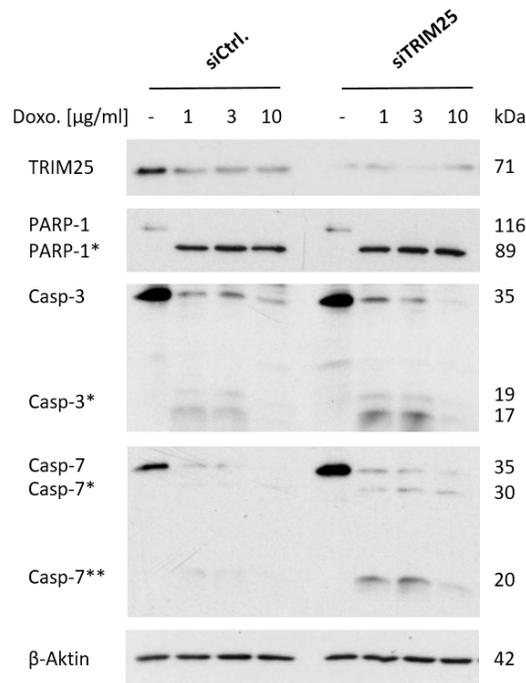


Abbildung 11. Der transiente TRIM25 Knockdown führt zur Sensibilisierung der RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose

Nach 24 h Kultivierung wurden die subkonfluenten Wildtyp-RKO-Zellen für 24 h mit 50 nM *control* siRNA bzw. TRIM25 spezifischer siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h mit den angegebenen Dosen von Doxorubicin (Doxo.) behandelt. Als Kontrolle (-) dienten mit DMSO behandelte Zellen. Das Totalprotein der Zellen wurde mitsamt Überstand gewonnen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurden 20 µg Protein je Probe auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Spaltprodukte der Proteine sind durch das Asterisk Symbol (*,**) gekennzeichnet. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Der Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose wurde zusätzlich mittels Apoptoseinduktion durch Doxorubicin bzw. 5-Fluorouracil und der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse der Sub-G₁-Phase untersucht. Für die Experimente wurden die Konzentrationen gewählt, bei denen zuvor die maximalen Effekte auf die Sensitivierung gegenüber Apoptose erkennbar waren. Bei Analyse der Sub-G₁-Phase konnte eine signifikant vermehrte Doxorubicin-induzierte Apoptose lediglich in Zellen von Klon 5 nachgewiesen werden (Abbildung 12). Bei Behandlung der Zellen mit 5-Fluorouracil konnte in sämtlichen untersuchten Zellen nur ein moderater Anstieg der Sub-G₁-Phase gemessen werden. Die mittels Western Blot-Analysen nachweisbare Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose korreliert daher nicht uneingeschränkt mit den Ergebnissen der FACS-Analysen.

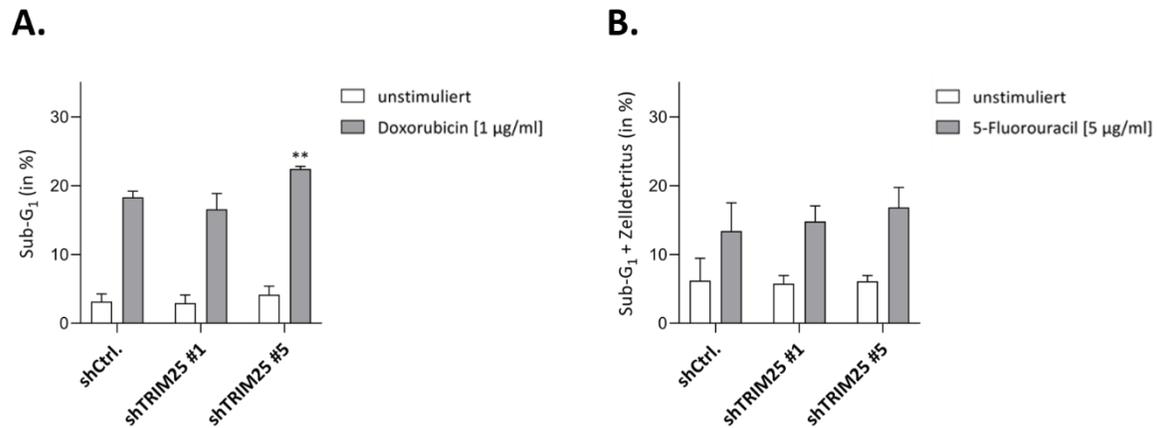


Abbildung 12. Im FACS ist eine signifikant vermehrte Doxorubicin-induzierte Apoptose in shTRIM25 #5 Zellen nachweisbar

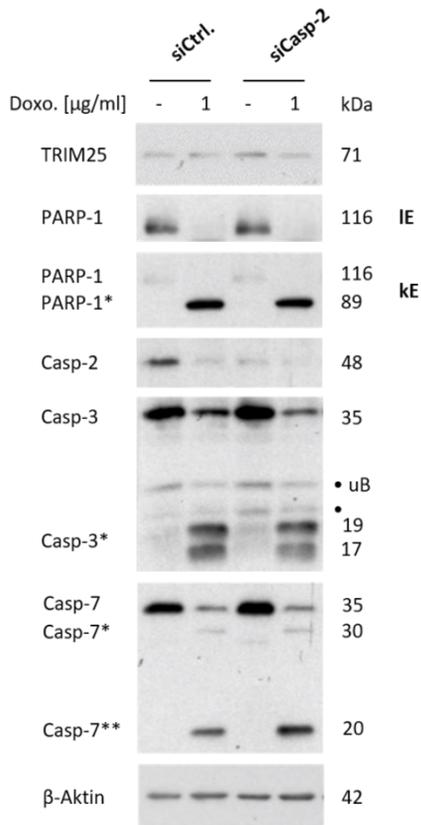
Für die Analyse der Sub-G₁-Phase wurden die Zellen nach 24 h Kultivierung für weitere 24 h mit 1 µg/ml Doxorubicin (A.) bzw. 5 µg/ml 5-Fluorouracil (B.) behandelt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurden die FACS Proben gewonnen und die Zellen für 30 min mit SYTOX™ Blue Dead Cell Stain inkubiert. Es folgte die Messung der Sub-G₁-Phase mittels Durchflusszytometrie. Durch *Gating* konnte die Sub-G₁-Phase quantifiziert und vergleichend zwischen den Zellklonen dargestellt werden. A. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten ± SD (n = 3), ** p < 0,01 (shTRIM25 #1 bzw. #5 verglichen mit shCtrl.). B. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten ± SD (n = 2).

5.6. Untersuchung zur Abhängigkeit der Sensitivierung der Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose von Caspase-2 und -7

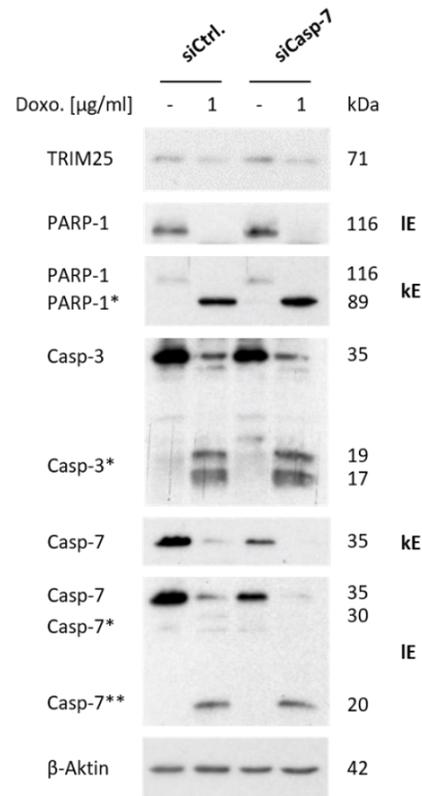
Unsere Arbeitsgruppe hatte zuvor die wichtige Funktion der proapoptotischen Caspasen-2 und -7 für die Sensitivierung von transienten TRIM25 *Knockdown* Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose nachweisen können.^{77,78} In der nachfolgenden Versuchsreihe wurde daher die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Verhältnisse in stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen überprüft. Dazu wurde in RKO-Zellen mit stabilem TRIM25 *Knockdown* mittels siRNA-Transfektion zusätzlich ein transienter Caspase-2 bzw. -7 *Knockdown* generiert und die entsprechenden Klone mit der zuvor optimierten Dosis der jeweiligen Chemotherapeutika behandelt (1 µg/ml Doxorubicin für Klon 1 und 5 µg/ml 5-Fluorouracil für Klon 5). In einer darauffolgenden Western Blot-Analyse wurde die Spaltung der Apoptosemarker Caspase-3 und PARP-1 untersucht. Für Caspase-7 konnte zu keiner Zeit ein uns zufriedenstellender *Knockdown* erreicht werden (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu konnte mittels Western Blot-Analysen ein nahezu vollständiger *Knockdown* von Caspase-2 bestätigt werden. Da die Experimente dieser Versuchsreihe ausschließlich mit stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen durchgeführt wurden (kein shCtrl.), bildet die

Caspase-3- und PARP-1-Spaltung bei Stimulation mit Doxorubicin und 5-FU bereits die Sensitivierung im Hinblick auf eine vermehrte Caspase-3- und PARP-1-Spaltung ab. Im Fall einer Abhängigkeit dieser Sensitivierung von Caspase-2, wäre eine Verringerung der Caspase-3- und PARP-1-Spaltung nach Caspase-2 *Knockdown* zu erwarten. Die Spaltung von Caspase-3 und PARP-1 zeigte sich allerdings unbeeinträchtigt des Caspase-2 *Knockdowns* (Abbildung 13). Dies deutet darauf hin, dass, im Gegensatz zum transienten Ansatz,⁷⁷ der stabile TRIM25 *Knockdown* RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose durch einen Mechanismus sensibilisiert, welcher von Caspase-2 unabhängig ist.

A.



B.



C.

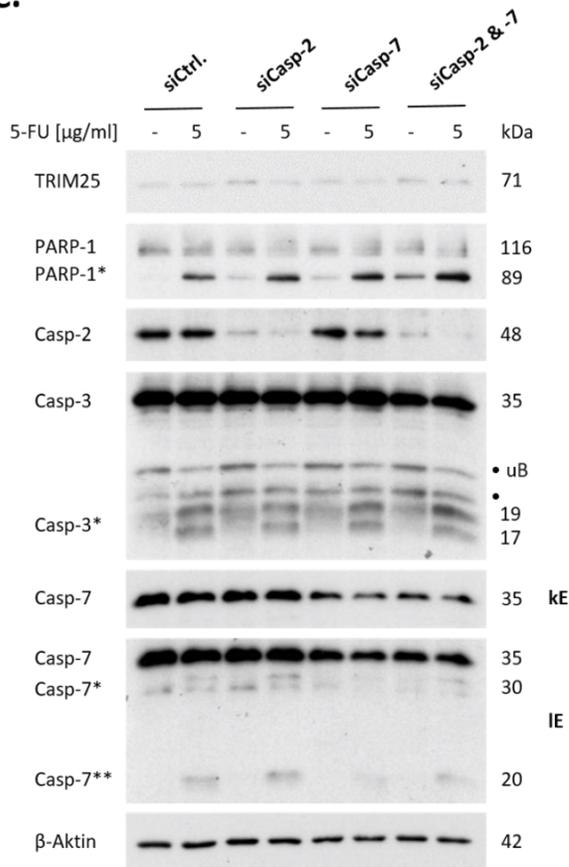


Abbildung 13. Der stabile TRIM25 *Knockdown* sensibilisiert RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose über einen Caspase-2-unabhängigen Mechanismus

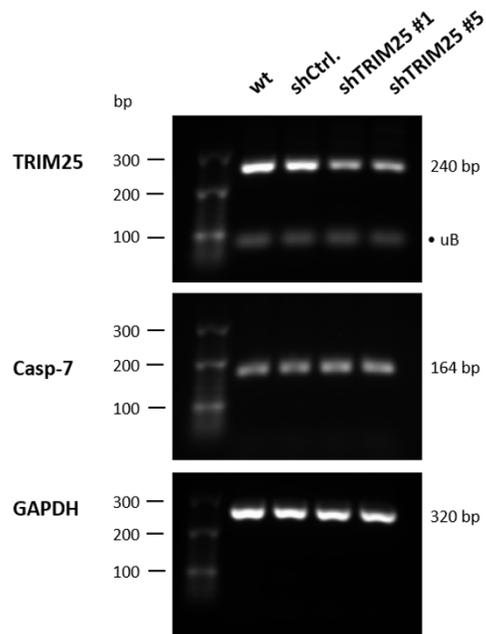
Nach 24 h Kultivierung wurden die subkonfluenten RKO-Zellen für 24 h mit 25 nM-100 nM *control* siRNA bzw. Caspase-2 oder -7 spezifischer siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 14 bis 24 h mit 1 µg/ml Doxorubicin (Doxo.) (A. und B.) bzw. 5 µg/ml 5-Fluorouracil (5-FU) (C.) behandelt. Als Kontrolle (-) dienten mit DMSO behandelte (A. und B.) oder unstimulierte (C.) Zellen. Das Totalprotein der Zellen wurde mitsamt Überstand gewonnen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurden 20-25 µg Protein je Probe auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Spaltprodukte der Proteine sind durch das Asterisk Symbol (*,**) gekennzeichnet. Abkürzungen: kE, kurze Exposition; IE, lange Exposition; uB, unspezifische Banden. A. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. A.-C. Für die Ansätze mit Doxo. wurden shTRIM25 #1 Zellen verwendet, für die Ansätze mit 5-FU shTRIM25 #5 Zellen.

5.7. Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf die Caspase-7 Expression in Kolonkarzinomzellen

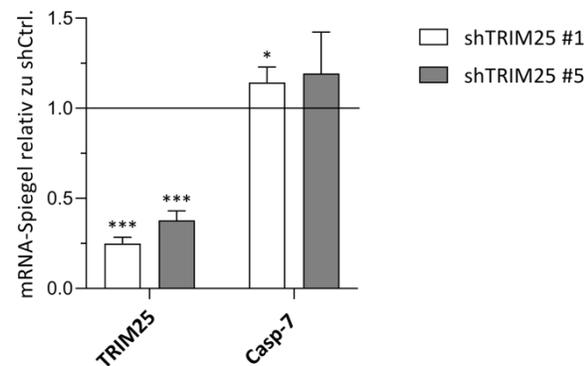
Zuvor hatte unsere Arbeitsgruppe erstmalig nach transientem TRIM25 *Knockdown* eine Hochregulation der Caspase-7 mRNA- und Proteinspiegel in verschiedenen humanen Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen.⁷⁸ Auch in den hier gezeigten Experimenten mit transientem TRIM25 *Knockdown* Zellen konnten *Knockdown*-abhängig erhöhte Caspase-7 Proteinspiegel bestätigt werden (s. 5.5). In der folgenden Versuchsreihe wurden die stabilen

TRIM25 *Knockdown* RKO-Zellen hinsichtlich einer analogen TRIM25-abhängigen Regulation der Caspase-7 Expression untersucht. Mögliche Unterschiede der Caspase-7 mRNA-Spiegel wurden mittels semiquantitativer RT-PCR und qPCR (TaqMan) gemessen, während TRIM25-abhängige Veränderungen der Caspase-7 Proteinspiegel über Western Blot-Analysen ermittelt wurden. Dabei erfolgte auch ein Vergleich von Wildtyp- (wt) und Kontrollzellen (shCtrl.). Hierbei konnten aufgrund äquivalenter Ergebnisse in der semiquantitativen RT-PCR shRNA-vermittelte Effekte auf die Caspase-7 mRNA-Spiegel ausgeschlossen werden. Im Unterschied zur beschriebenen Expressionsänderung nach transientem TRIM25 *Knockdown* konnte mittels semiquantitativer RT-PCR und Western Blot-Analyse weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine Veränderung der Caspase-7 Expression in den stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen detektiert werden (Abbildung 14). Resultate aus qPCR-Analysen zeigten hingegen moderat erhöhte Caspase-7 mRNA-Spiegel in stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen.

A.



B.



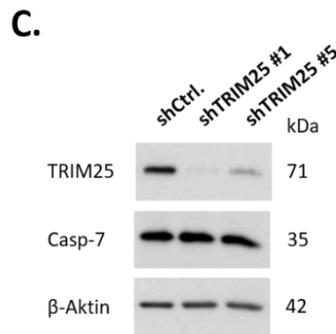


Abbildung 14. Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf die Caspase-7 Expression in RKO-Zelllinien

A. Agarosegel einer semiquantitativen RT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von TRIM25 und Caspase-7 in unterschiedlichen RKO-Zelllinien. Nach erfolgter RT-PCR wurden die genspezifischen cDNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese separiert und mit GelRed® visualisiert. GAPDH diene als Ladekontrolle. Das gezeigte Gel ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. Abkürzungen: uB, unspezifische Banden. **B.** Zusammenfassende Analyse derselben mRNA-Proben nach qPCR. Bei der Messung wurden die Ct-Werte der Proben ermittelt und anhand von GAPDH normalisiert. Schließlich wurden die cDNA-Proben mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantifiziert, wodurch Rückschlüsse auf die relativen Expressionsunterschiede der Caspase-7- bzw. TRIM25-mRNA zwischen shTRIM25 #1 bzw. shTRIM25 #5 und shCtrl. gezogen werden konnten. Die Werte von shTRIM25 #1 und shTRIM25 #5 sind relativ zu shCtrl. angegeben (shCtrl. = 1, durchgezogene Linie). Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD (n = 3), * p < 0,05, *** p < 0,001. **C.** Expressionsspiegel von Caspase-7 Protein nach stabilem TRIM25 *Knockdown*. Die Caspase-7 Proteinspiegel wurden mittels Totalproteingewinnung und anschließendem Western Blot analysiert. Dabei wurden 20-25 μ g Protein je Probe auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. β -Aktin diene als Ladekontrolle. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

5.8. Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf ausgewählte Apoptose- und Inflammationsmarker nach Behandlung mit NLRP3-Inflammasom-aktivierenden Substanzen

Die Apoptosemarker Caspase-7 und PARP-1 spielen nicht nur bei der Apoptose eine wichtige Rolle, sondern auch im Rahmen Inflammasom-induzierter Signaltransduktionsprozesse,^{179,227} sodass deren Spaltung zusätzlich auf eine Inflammasomaktivierung zurückgeführt werden könnte. Caspase-7 wird beispielsweise nach LPS-induzierter NLRP3-Inflammasomaktivierung durch die aktivierte Caspase-1 gespalten, um nachfolgend PARP-1 als spezifisches nukleäres Caspase-7 Substrat zu spalten. Die PARP-1-Spaltung kann dann wiederum die Expression NF- κ B-regulierter Zielgene steigern und somit inflammatorische Prozesse fördern.¹⁷⁹ Aufgrund der gezeigten TRIM25-abhängigen Effekte auf die Apoptosemarker Caspase-7 und PARP-1, sollte nachfolgend ein zusätzlicher Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf die Spaltung dieser Proteine nach Inflammasomaktivierung untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelt, welches als PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) und *Toll-like receptor 4* (TLR4)-Agonist sowohl

das *Priming* (Signal 1) als auch die Aktivierung (Signal 2) des NLRP3-Inflammasoms einleiten kann.^{180,228} Das *Priming* ist klassischerweise für die NF- κ B-vermittelte Expression von NLRP3 sowie den unreifen Cytokinen Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 verantwortlich und wichtige Voraussetzung für die weitere Aktivierung des kanonischen NLRP3-Inflammasoms.^{169,177,178} Da in veröffentlichten Daten bereits erfolgreich die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch alleinige Stimulation mit LPS gezeigt werden konnte,¹⁷⁹ wurden in einem nachfolgenden Experiment RKO-Zellen (shCtrl. und shTRIM25 #1) für 1, 8, 16 oder 24 Stunden ausschließlich mit LPS stimuliert, das Totalprotein der Zellen gewonnen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. In der Western Blot-Analyse war weder in Kontrollzellen (shCtrl.) noch in TRIM25 *Knockdown* Zellen eine Spaltung von Caspase-7 oder PARP-1 als Reaktion auf den alleinigen LPS-Stimulus sichtbar (Abbildung 15).

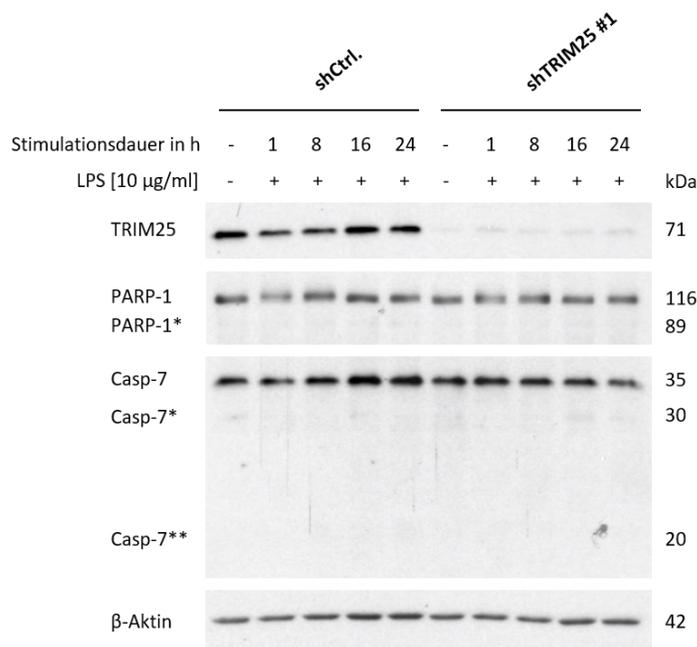


Abbildung 15. Die alleinige Stimulation mit LPS hat keinen Einfluss auf die Spaltung von Caspase-7 und PARP-1 in RKO-Zelllinien

Die Zellen wurden für 24 h kultiviert und anschließend für weitere 1, 8, 16 oder 24 h mit 10 μ g/ml LPS stimuliert. Als Kontrolle (-) dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurde das Totalprotein der Zellen mitsamt Überstand gewonnen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurden 25 μ g Protein je Probe auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Mögliche Spaltprodukte der Proteine sind durch das Asterisk Symbol (*, **) gekennzeichnet.

Das Ergebnis zeigt, dass eine alleinige LPS-Stimulation nicht ausreicht, um Caspase-7 und PARP-1 in RKO-Zellen zu spalten. Dies ist in Übereinstimmung mit Arbeiten, die gezeigt

haben, dass LPS lediglich das *Priming* des Inflammasoms einleitet, für den finalen Aktivierungsschritt jedoch ein zusätzlicher Stimulus benötigt wird.²²⁸ In der nächsten Versuchsreihe wurden daher zusätzlich zu LPS weitere Stimulanzen eingesetzt, welche für den zweiten Schritt der NLRP3-Inflammasomaktivierung von Bedeutung sind. Die Zellen wurden in diesem Ansatz für 16 Stunden mit LPS sowie simultan mit ATP und α -Toxin (= α -Hämolysin von *Staphylococcus aureus*) stimuliert und im Anschluss cytosolische und nukleäre Proteinylysate gewonnen. ATP und α -Toxin induzieren bekanntlich einen K^+ -Efflux, der zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt.^{178,180,194,228} In Abhängigkeit der Stimulation mit LPS, ATP und α -Toxin war eine Spaltung von Caspase-7 und PARP-1 erkennbar, welche allerdings in den TRIM25-depletierten Zellen deutlich schwächer ausgeprägt war (Abbildung 16). Interessanterweise war das C-terminale PARP-1-Spaltprodukt (89 kDa) nach Stimulation auch in den cytosolischen Lysaten der Zellen detektierbar, obwohl PARP-1 maßgeblich im Zellkern lokalisiert ist.¹⁷⁹ Des Weiteren zeigte sich zwar der größte Anteil der Caspase-7-Spaltung erwartungsgemäß in den cytosolischen Fraktionen, ein kleinerer Anteil war hingegen auch im Nukleus nachweisbar, sodass von einer Translokation der aktiven Caspase-7 in den Kern der Zellen ausgegangen werden kann. Da außerdem eine positive Korrelation zwischen der Caspase-7- und PARP-1-Spaltung festgestellt werden konnte, liegt der oben beschriebene, bereits bekannte Mechanismus nahe.¹⁷⁹ In der Western Blot-Analyse wurden zudem Caspase-1 und -3 nachgewiesen. Das NLRP3-Inflammasom ist ein cytoplasmatischer Multiproteinkomplex bestehend aus Caspase-1, NLRP3 und ASC, Caspase-1 ist für die Inflammasomaktivierung daher unverzichtbar (s. 1.3.1). Das Caspase-1-Protein konnte in den Experimenten aufgrund der mangelnden Qualität der zur Verfügung stehenden Antikörper nicht zufriedenstellend nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Überprüfung von Caspase-3 zeigte sich ein analoges Spaltungsprofil zu Caspase-7: Durch den Inflammasom-aktivierenden Stimulus kam es zur Caspase-3-Spaltung, diese war nach *Knockdown* von TRIM25 geringer ausgeprägt. Schließlich wurde p65 als eine von fünf möglichen Untereinheiten des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Western Blot-Analysen überprüft. Beim *Priming* des kanonischen NLRP3-Inflammasoms transloziert der im Cytosol befindliche, aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern und steigert hier die

Expression von NLRP3, Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 (s. 1.3.1). Eine stimulusabhängige Verlagerung von p65 in den Zellkern konnte in den hier gezeigten Experimenten nicht konsistent nachgewiesen werden.

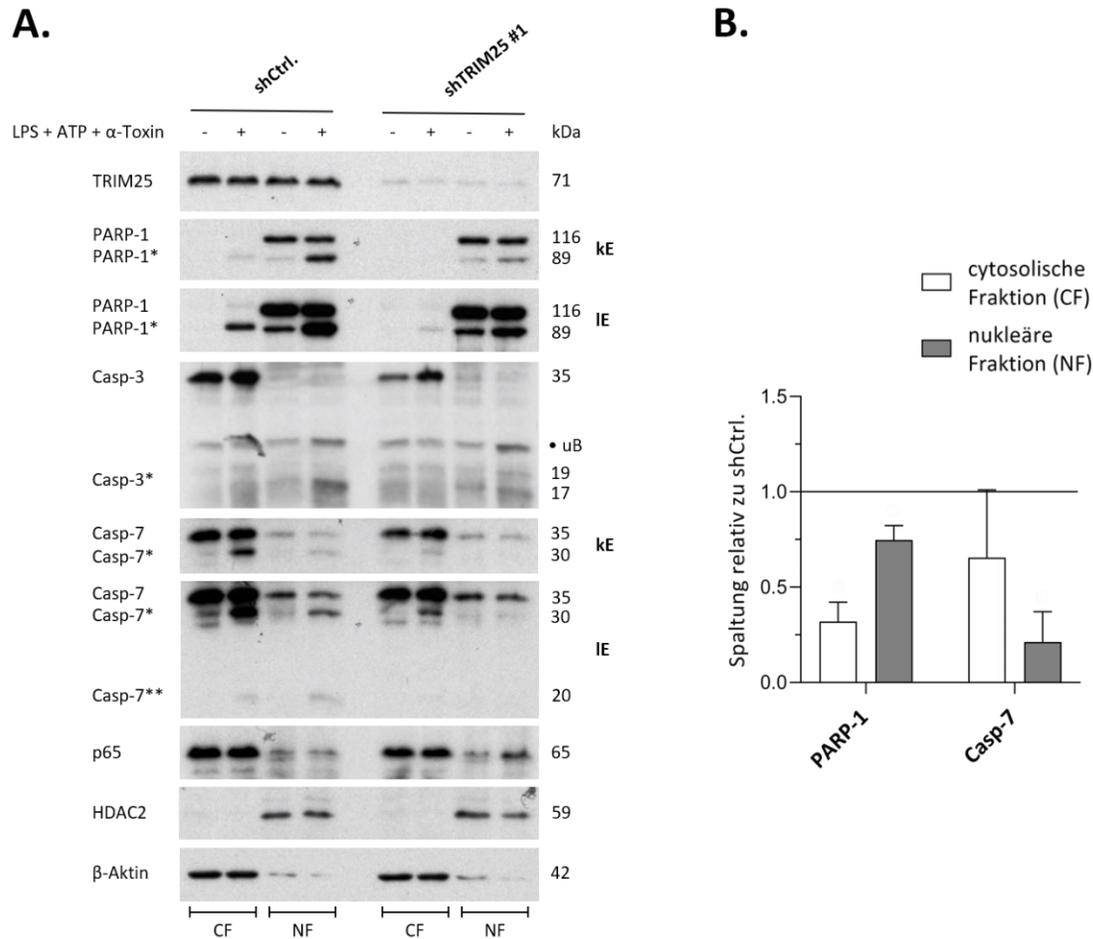


Abbildung 16. Der stabile TRIM25 Knockdown führt zur verminderten Caspase-3-, -7- und PARP-1-Spaltung in RKO-Zelllinien nach Behandlung mit klassischen Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms

Die Zellen wurden für 24 h kultiviert und für weitere 16 h simultan mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 5 mM ATP und 100 ng/ml α -Toxin stimuliert. Als Kontrolle (-) dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurden das cytosolische und nukleäre Protein der Zellen mitsamt Überstand gewonnen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurden 25 μg Protein je Probe auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. β -Aktin diente als Ladekontrolle für cytosolische und HDAC2 als Ladekontrolle für nukleäre Proteine. Spaltprodukte der Proteine sind durch das Asterisk Symbol (*,**) gekennzeichnet. Abkürzungen: kE, kurze Exposition; lE, lange Exposition; uB, unspezifische Banden; CF, cytosolische Fraktion; NF, nukleäre Fraktion. **A.** Mit Ausnahme des Caspase-3-Blots sind die dargestellten Western Blots repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. **B.** Für die Densitometrie wurde zunächst die Caspase-7- und PARP-1-Spaltung durch den Quotienten aus Spaltprodukt und inaktiver Proform quantifiziert. Dann wurde die Spaltung der Proteine von shTRIM25 #1 relativ zu shCtrl. angegeben (shCtrl. = 1, durchgezogene Linie). Es wurden ausschließlich die stimulierten Zellen (+) ausgewertet. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD (n = 2) (shTRIM25 #1 verglichen mit shCtrl.).

5.9. Einfluss des stabilen TRIM25 *Knockdowns* auf die Expression apoptose- und inflammasomrelevanter Proteine in Kolonkarzinomzellen

Zur Überprüfung der Annahme, dass TRIM25 über die Regulation der Expression apoptose- und inflammasomrelevanter Proteine Einfluss auf die beschriebenen, TRIM25-abhängigen Prozesse nimmt, sollte in einer abschließenden Versuchsreihe eine vergleichende Expressionsanalyse einer Reihe ausgewählter apoptose- und inflammasomrelevanter Proteine in stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden Totalproteinlysate aus unstimulierten RKO-Zelllinien gewonnen und die TRIM25-abhängige Expression der entsprechenden Proteine im Western Blot analysiert. Dabei wurden auch Wildtyp-Zellen (wt) untersucht, um mögliche shRNA-vermittelte Effekte auf die untersuchten Expressionsspiegel auszuschließen. Bei einigen Apoptose- und Inflammasommarkern ließ sich trotz des fehlenden Stimulus eine basale Spaltung (Aktivierung) nachweisen. Für keines der untersuchten Proteine konnten konsistente Unterschiede zwischen Kontrollzellen (shCtrl.) und TRIM25 *Knockdown* Zellen gezeigt werden (Abbildung 17), was nahelegt, dass keines der untersuchten apoptose- und inflammasomrelevanten Proteine eine TRIM25-abhängige Expression aufweist.

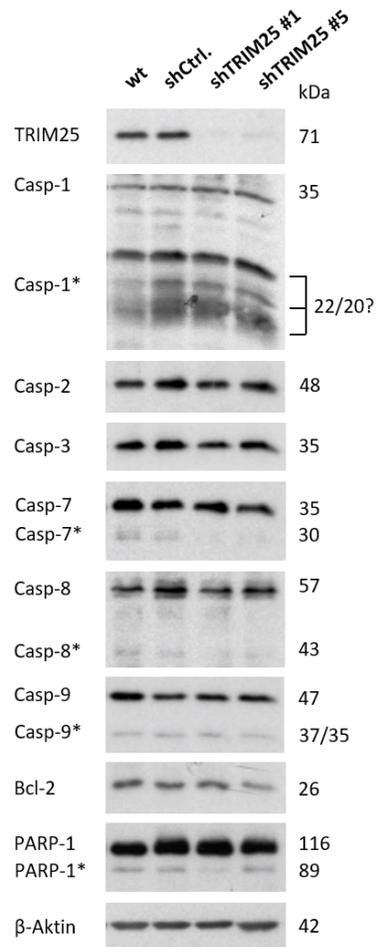


Abbildung 17. Der stabile TRIM25 *Knockdown* hat keinen Einfluss auf die Expression der analysierten apoptose- und inflammasomrelevanten Proteine in RKO-Zelllinien

Die Zellen wurden ohne Stimulus für 24 h kultiviert. Anschließend wurde das Totalprotein der Zellen ohne Überstand gewonnen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurden 30 µg Protein je Probe auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Spaltprodukte der Proteine sind durch das Asterisk Symbol (*) gekennzeichnet. Auf Höhe der Caspase-1 Spaltprodukte (22 und 20 kDa) ließen sich drei Banden nachweisen, von denen keine mit Sicherheit als Caspase-1 Spaltprodukt identifiziert werden konnte. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Passagen mit vergleichbaren Ergebnissen.

6. Diskussion

6.1. TRIM25 hat in RKO-Zellen einen heterogenen Einfluss auf für die Tumorentstehung und -progression wichtige Eigenschaften

Die wesentliche funktionelle Rolle von TRIM25 im Rahmen der Immunabwehr und verschiedenen malignen Tumoren des Menschen, darunter auch dem kolorektalen Karzinom, ist bekannt. Dabei wurden sowohl tumorfördernde als auch tumorsuppressive Eigenschaften von TRIM25 beschrieben (s. 1.1.4). In der vorliegenden Arbeit wurde der mögliche Einfluss von TRIM25 auf für die Tumorentstehung und -progression wichtige Eigenschaften humaner Kolonkarzinomzelllinien durch vergleichende Analyse von Proliferation, Migration, Zellzyklus, Apoptose und Inflammation in TRIM25 *Knockdown* und Kontrollzellen untersucht. Ein tumorigener Einfluss von TRIM25 durch Förderung von Proliferation, Invasion und Migration ist in der Literatur bereits belegt: So ist TRIM25 in den Kolorektalkarzinomzelllinien HT29 und HCT116 signifikant überexprimiert und fördert durch Aktivierung des TGF β -Signalweges die Proliferation und Invasion der Tumorzellen.²³ Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente belegten dagegen eine signifikant verstärkte Proliferation von RKO-Zellen nach stabilem TRIM25 *Knockdown* (s. 5.2). Dieses Ergebnis legt im Gegensatz zur beschriebenen Literatur eine tumorsuppressive Rolle von TRIM25 nahe. Interessanterweise war der Unterschied in der Proliferation von *Knockdown* vs. Kontrollzellen im Mittel sowohl ohne als auch mit FCS-Stimulus nicht wesentlich verändert, die Ergebnisse waren aber nur bei Anwendung eines zusätzlichen FCS-Stimulus signifikant. Möglicherweise führt der Wachstumsstimulus mit FCS zu einer Synchronisation der Zellproliferation, wodurch die Experimente mit FCS-Stimulus reproduzierbarer werden und Unterschiede zwischen den Kontroll- und den *Knockdown* Zellen besser detektiert werden können. Eine Überprüfung des Phosphorylierungsstatus des Proteins Smad2 in stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen zeigte keine veränderte Smad2-Phosphorylierung im Vergleich zu Kontrollzellen (persönliche Mitteilung U. Nasrullah). Dies steht im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen, dass TRIM25 in RKO-Zellen die Proliferation hemmt, anstatt diese zu fördern und lässt darauf schließen, dass die verminderte Proliferation in RKO-Zellen nicht durch eine TRIM25-abhängige Hemmung des TGF β -Smad-Signalweges bedingt ist. Eine TRIM25-abhängige Hemmung

der Proliferation von Kolonkarzinomzellen ist dagegen in einem anderen Zusammenhang bereits bekannt: Das *Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1* (UBE2J1) ist zusammen mit der E3-Ligase TRIM25 für die Ubiquitinierung und Degradation von RPS3 (*ribosomal protein S3*), einer Komponente der 40S-Untereinheit eukaryotischer Ribosomen, verantwortlich. Die negative Regulation von RPS3 hemmt die Proliferation und Metastasierung von Kolorektalkarzinomzellen.²²⁹ Eine mögliche UBE2J1-TRIM25-abhängige Ubiquitinierung und vermehrte Degradation von RPS3 könnte daher die verringerte Proliferation in TRIM25-nativen Zellen (Kontrollzellen) erklären und bedarf der weiteren Untersuchung. Im Zusammenhang bereits veröffentlichter Daten wurde mittels Wundheilungsassays eine weitere onkogene Funktion von TRIM25 belegt: Die Überexpression von TRIM25 fördert hier die Migration von Kolorektalkarzinomzellen.²³ Meine Experimente zur Untersuchung des Einflusses von TRIM25 auf die Migration von RKO-Zellen zeigten in entsprechenden Wundheilungsassays interexperimentell Unterschiede im Migrationsverhalten derselben Zellklone (s. 5.3). Daher kann keine eindeutige Aussage über den Einfluss von TRIM25 auf die Migration von RKO-Zellen getroffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem der Einfluss von TRIM25 auf den Zellzyklus von RKO-Zellen (s. 5.4) untersucht: Die Ergebnisse zeigten zum Zeitpunkt „24 h“ wenige signifikante Unterschiede zwischen den stabilen TRIM25 *Knockdown* und den Kontrollzellen, welche allerdings zwischen den TRIM25 *Knockdown* Klonen variierten und nach weiteren 24 Stunden (Zeitpunkt „48 h“) nicht mehr nachweisbar waren. Auch im Ansatz mit transienten TRIM25 *Knockdown* Zellen konnten keine Unterschiede im Zellzyklus nach TRIM25 Attenuation bestätigt werden, was darauf hindeutet, dass TRIM25 keinen konsistenten Einfluss auf den Zellzyklus von RKO-Zellen nimmt. Dies steht im Gegensatz zu veröffentlichten Daten über einen zumindest anteiligen Einfluss von TRIM25 auf den Zellzyklus und das Zellwachstum von Kolorektalkarzinomzellen über Mitwirkung an einem durch LINC00955 (*Long Intergenic Non-protein Coding RNA 955*) regulierten Mechanismus: LINC00955 fördert über verstärkte Bindung von TRIM25 an Sp1 (*Sp1 transcription factor*) dessen Abbau. In diesem Zusammenhang nutzt TRIM25 LINC00955 als molekulares Gerüst zur Bindung, Ubiquitinierung und Degradation von Sp1. Der vermehrte Abbau von Sp1 führt

letztendlich zu einem G₀/G₁-Phasenarrest in Kolorektalkarzinomzellen und einem Zellwachstumsstop.²³⁰

6.2. TRIM25 als vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt in der Resensibilisierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber gängigen Therapien

Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor eine negative Regulation von Caspase-2 und -7 durch TRIM25 und konsequenterweise eine Sensitivierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose nach transientem TRIM25 *Knockdown* nachweisen.^{77,78} Eine entsprechende Sensibilisierung ließ sich auch in den hier gezeigten experimentellen Ansätzen mit stabilen TRIM25 *Knockdown* RKO-Zellen belegen (s. 5.5). Die daraus abgeleitete, TRIM25-abhängige Hemmung der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose in RKO-Zellen spricht für einen „Überlebensmechanismus“, welcher bekanntermaßen zur Chemotherapieresistenz von Kolonkarzinomzellen beitragen kann (s. 1.2.3). Diese antiapoptische Funktion spricht TRIM25 folglich eine tumorfördernde (onkogene) Rolle in Kolonkarzinomzellen zu und unterstreicht die E3-Ligase als vielversprechendes *Target* für die Resensibilisierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber gängigen Therapien, wie z.B. Chemotherapie. In meinen Experimenten korrelierte die in Western Blot-Analysen sichtbare Sensitivierung allerdings nicht uneingeschränkt mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie (s. 5.5). Bei Stimulation der Zellen mit Doxorubicin konnte zwar eine signifikante Steigerung der Apoptose in TRIM25-depletierten Zellen (Klon 5) nachgewiesen werden, die Ergebnisse bestätigten sich jedoch nicht nach Behandlung der Zellen mit 5-Fluorouracil. Generell war die späte Apoptose nach Doxorubicin-Stimulation in sämtlichen Zellen wesentlich stärker ausgeprägt als nach Stimulation mit 5-Fluorouracil: Hier war durch die Stimulation nur ein moderater Anstieg der Sub-G₁-Phase messbar. Vermutlich war die gewählte Dosis von 5-Fluorouracil zur effizienten Induktion der späten Apoptose zu niedrig, um einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzellen und stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen durchflusszytometrisch detektieren zu können. Eine Wiederholung der Messung mit höheren 5-FU-Dosen sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die Sensitivierung auch in Sub-G₁-Analysen mit 5-FU-Stimulus abbilden lässt. Auch die Ergebnisse zur Caspase-2 und -7 Regulation in transienten TRIM25 *Knockdown* Zellen^{77,78} waren nicht vollständig mit meinen

Experimenten in Übereinstimmung: Anhand der Western Blot-Analysen mit stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen konnte keine Erhöhung der Caspase-2 Proteinspiegel nach TRIM25 Attenuation bestätigt werden (s. 5.9). Im Einklang hierzu und im Gegensatz zu den Ergebnissen der transienten TRIM25 *Knockdown* Analysen⁷⁷ ließ sich bei den stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen keine Caspase-2-Abhängigkeit bei der Sensitivierung der Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose nachweisen (s. 5.6). Dies deutet darauf hin, dass der stabile ebenso wie der transiente TRIM25 *Knockdown* RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose sensibilisiert, allerdings im Gegensatz zum transienten Ansatz durch einen Caspase-2-unabhängigen Mechanismus. Die zuvor belegte Hochregulation der Caspase-7 mRNA- und Proteinspiegel nach transientem TRIM25 *Knockdown*⁷⁸ war auch in den stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen z. T. nachweisbar, wenn auch wesentlich moderater: Die in qPCR-Analysen nachgewiesene moderate Caspase-7 Regulation durch TRIM25 ließ sich hingegen mit den weniger sensitiven Methoden wie semiquantitativer RT-PCR und Western Blot nicht bestätigen (s. 5.7 und 5.9). Die Verifizierung der Caspase-7 Regulation auf mRNA-Ebene könnte durch eine Transkriptomanalyse (= Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle exprimierten RNA-Moleküle) beider Zelllinien erfolgen. Zusätzlich zur Untersuchung der Proteinspiegel von u.a. Caspase-2 und -7 (s. 5.9), wurde vergleichend zum transienten Ansatz⁷⁸ eine Proteomanalyse (= Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle exprimierten Proteine) der stabilen TRIM25 *Knockdown* RKO-Zellen und Kontrollzellen mittels Massenspektrometrie durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden mit einem *Cut-Off*-Wert von 0,5 ($\log_2(\text{shTRIM25/control}) \geq 0,5$ entspricht Hochregulation, $\log_2(\text{shTRIM25/control}) \leq 0,5$ entspricht Herunterregulation; p-Wert < 0,05) insgesamt 24 (shTRIM25 #1) bzw. 23 (shTRIM25 #5) mutmaßlich durch TRIM25 signifikant regulierte Zielproteine identifiziert. Im Hinblick auf eine Caspase-2 Regulation ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse, eine Aussage zu einer Regulation durch TRIM25 war somit nicht möglich. Die Caspase-7 Regulation erreichte zwar nicht den definierten *Cut-Off*-Wert von 0,5, zeigte aber trotz allem eine signifikante, wenn auch moderate Hochregulation bei stabilem TRIM25 *Knockdown*. Dies ist im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen der qPCR-Analysen sowie der bekannten

Hochregulation von Caspase-7 bei transientem TRIM25 *Knockdown*.⁷⁸ Bei der vergleichenden Proteomanalyse von Klon 1 (shTRIM25 #1) und Klon 5 (shTRIM25 #5) fiel überraschenderweise auf, dass zwar beide Klone einen signifikanten *Knockdown* von TRIM25 aufwiesen, die regulierten Proteine sich bis auf wenige Ausnahmen ansonsten aber deutlich unterschieden. Möglicherweise steht dieser Unterschied im Proteom in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Sensitivität der Klone gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika (s. 5.5). Bei einem Vergleich der Proteomanalysen von transienten⁷⁸ und stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen entsprach die Schnittmenge aus in stabilen und transienten Ansätzen regulierten Proteinen nur einem Bruchteil der insgesamt regulierten Proteine. Als einziger Kandidat, der sowohl im Proteom der transienten als auch der stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen signifikant hochreguliert war, konnte TNFRSF10D (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 10D*), auch bekannt als **TRAIL receptor 4** (TRAILR4), identifiziert werden. In verschiedenen Zellen konnten bisher hauptsächlich tumorigene, antiapoptotische Funktionen des Rezeptors nachgewiesen werden.²³¹⁻²³⁵ Daher kann die TRIM25 *Knockdown*-abhängige Hochregulation von TNFRSF10D nicht für die Sensitivierung der Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose verantwortlich gemacht werden. Die funktionelle Konsequenz der TNFRSF10D Regulation bedarf aber der weiteren Untersuchung. Interessanterweise zeigte sich schon nach transientem TRIM25 *Knockdown*, dass die Caspase-2 Hochregulation nur von vorübergehender Natur ist.⁷⁷ Die fehlende (Caspase-2) bzw. vermindert ausgeprägte (Caspase-7) Caspasenregulation in den stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen lässt vermuten, dass die Tumorzellen insbesondere bei einem längerfristigen *Knockdown* mit shRNA der durch TRIM25 Attenuation bedingten Hochregulation Zell-tod-induzierender Proteine gegenregulieren. Die Gegenüberstellung der Proteomanalysen bei transientem und stabilem TRIM25 *Knockdown* unterstützt diese Annahme durch die Tatsache, dass in den stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen weitaus weniger Proteine TRIM25-abhängig reguliert waren. Es ist daher sinnvoll, Experimente mit konstitutiven TRIM25 *Knockdown* Zellen mit einem transienten Ansatz zu vergleichen, da den Zellen hier ein wesentlich geringeres Zeitfenster zur Gegenregulation zur Verfügung steht. Eine Gegenregulation der Tumorzellen wäre etwa durch Hemmung der Caspasen-Transkription, durch

Destabilisierung der für die betreffenden Caspasen kodierenden mRNAs, durch Verringerung der Caspasen-Translation oder durch einen verstärkten proteasomalen Abbau der beiden Caspasen denkbar. Möglicherweise verfügen die Tumorzellen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus, welcher das Überschreiten eines kritischen Proteinspiegels der Caspasen limitiert. Eine Abhängigkeit der Sensibilisierung von RKO-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose von einer TRIM25-induzierten Caspase-7 Regulation wurde in den hier gezeigten Experimenten ebenfalls überprüft: Die bereits für transiente Ansätze bekannte,⁷⁸ TRIM25-abhängige Regulation von Caspase-7 war in shTRIM25 Zellen nach wie vor nachweisbar, wenn auch in deutlich geringerem Umfang. Die moderate Caspase-7 Hochregulation in stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen mag daher als Mechanismus zur Sensibilisierung der Zellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose ausreichen. Aufgrund der angenommenen Gegenregulation der stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen, der aber zugleich noch nachweisbaren Sensitivierung der Zellen gegenüber Apoptose, sind zusätzliche, bisher noch nicht bekannte Mechanismen denkbar. Diese könnten Kolonkarzinomzellen neben der Caspase-2 und -7 Regulation TRIM25-abhängig vor Apoptose schützen und somit die hier gezeigte Apoptosesensibilisierung nach TRIM25 *Knockdown* unabhängig von Caspase-2 und -7 erklären. In der vorliegenden Arbeit konnten außer Caspase-2 und -7 keine weiteren TRIM25 Zielgene identifiziert werden (s. 5.9). Obwohl TRIM25 keine typischen *RNA-binding domains* (RBDs) aufweist, besitzt die E3-Ligase bekannterweise die Möglichkeit zur RNA-Bindung über ihre PRY/SPRY-Domäne.⁷⁴ Vorangegangene Studien konnten belegen, dass TRIM25 darüber die Prozessierung und Stabilität der gebundenen mRNAs beeinflussen kann.^{58,77,78} Eine Regulation der Expression weiterer, in dieser Arbeit nicht untersuchter, apoptoserelevanter Proteine wäre daher über die RNA-Bindung von TRIM25 an die entsprechende mRNA möglich. Ebenfalls ist eine Regulation der Aktivität apoptotischer Proteine durch TRIM25 denkbar. TRIM25 ist als E3-Ligase im Rahmen posttranslationaler Modifikationen zur Ubiquitinierung seiner spezifischen Substrate fähig (s. 1.1.2 und 1.1.4). Während die K48-Polyubiquitinierung zum proteasomalen Abbau des entsprechenden Proteins führt, ist die K63-Polyubiquitinierung an der Vermittlung nicht-degradativer Prozesse wie beispielsweise der funktionellen Aktivierung von Proteinen

beteiligt. Möglicherweise werden im Rahmen der TRIM25-abhängigen Apoptosehemmung in RKO-Zellen antiapoptotische Proteine wie z.B. Bcl-2 über TRIM25-abhängige K63-Polyubiquitinierung in ihrer Aktivität positiv beeinflusst. Um dies zu überprüfen, könnten vergleichende massenspektrometrische Analysen zur Identifizierung TRIM25-abhängiger Ubiquitinierungen im Proteom von stabilen TRIM25 *Knockdown* und Kontrollzellen durchgeführt werden. Da die in den hier gezeigten Experimenten verwendete Zelllinie „RKO“ humanen Kolonkarzinomzellen mit p53-Wildtyp entspricht, ist außerdem die Regulation p53-abhängiger Signalwege durch TRIM25 zu diskutieren. So ist bereits bekannt, dass TRIM25 über DNA-Schäden induzierte, proapoptotische Signalwege durch Blockade der transkriptionellen Aktivität von p53 hemmen kann.³⁵ Ein ähnlicher Mechanismus wäre daher auch zur Erklärung der TRIM25-abhängigen Hemmung Chemotherapeutika-induzierter Apoptose in den hier gezeigten Experimenten denkbar.

6.3. Der positive Einfluss von TRIM25 auf das NLRP3-Inflammasom sowie dessen mögliche Bedeutung für die Kolonkarzinogenese

Da Caspase-7 neben ihrer Rolle als Effektorcaspase während der Apoptose zusätzlich nicht-apoptotische Funktionen vermittelt, könnte die gezeigte Modulation durch TRIM25 neben der Apoptose auch andere Caspase-7-abhängige Signalprozesse beeinflussen, wie z.B. proinflammatorische Vorgänge während der NLRP3-Inflammasomaktivierung. So ist Caspase-7 als direktes Substrat von Caspase-1 für die Inflammasom-induzierte PARP-1-Spaltung und die nachfolgende Expression NF- κ B-regulierter Zielgene verantwortlich.^{179,227,236} Das NLRP3-Inflammasom ist ein cytoplasmatischer Multiproteinkomplex mit einer physiologischen Rolle bei der Immunabwehr, während die Dysregulation des NLRP3-Inflammasoms mit verschiedenen Krankheiten wie entzündlichen Autoimmunerkrankungen und Krebs, darunter auch dem kolorektalen Karzinom, assoziiert ist (s. 1.3.2). Eine strikte Regulation der Inflammasomaktivierung erscheint daher von essenzieller Bedeutung und wird u.a. durch die Mitwirkung von Mitgliedern der TRIM Proteinfamilie gewährleistet.²³⁷ Dabei spielen v.a. posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung einzelner Komponenten des NLRP3-Multiproteinkomplexes eine wichtige Rolle (s. 1.3.1). Die hier gezeigten Experimente machen eine TRIM25 *Knockdown*-abhängige, verminderte Spaltung von Caspase-3, -7 und PARP-1 in

RKO-Zellen nach Behandlung mit klassischen Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms deutlich (s. 5.8). Interessanterweise war nach Stimulation mit Inflammasomaktivatoren das C-terminale PARP-1-Spaltprodukt auch in den cytosolischen Lysaten der Zellen detektierbar, obwohl PARP-1 maßgeblich im Zellkern lokalisiert ist.¹⁷⁹ Außerdem zeigte das cytosolische im Gegensatz zum nukleären PARP-1-Spaltprodukt ein etwas höheres Molekulargewicht wie anhand der verminderten Migration der immunpositiven Bande im Western Blot ersichtlich ist. Dies lässt einen Transport vom Kern in das Cytosol sowie eine mögliche posttranslationale Modifikation des PARP-1-Spaltproduktes vermuten. Eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms anhand Inflammasom-spezifischer Marker konnte in dieser Arbeit bislang nicht belegt werden. Für eine Inflammasomaktivierung spricht jedoch die stimulionsspezifische Modulation der Caspase-7- und PARP-1-Spaltung in TRIM25 *Knockdown* Zellen (Hemmung der Spaltung im Gegensatz zur Aktivierung nach Chemotherapeutikastimulation), die bekanntermaßen auch im Rahmen Inflammasom-induzierter Signalprozesse eine wichtige Rolle spielen kann.¹⁷⁹ Weitere Marker wie z.B. eine Caspase-1-Spaltung und p65-Verlagerung vom Cytosol in den Zellkern, die in diesem Rahmen spezifischer für eine Inflammasomaktivierung sprechen würden, konnten leider bislang nicht zuverlässig nachgewiesen werden. Zum Beweis einer Inflammasomaktivierung nach LPS-, ATP- und α -Toxin-Stimulation in RKO-Zellen sollten daher weitere inflammasomspezifische Marker analysiert werden, beispielsweise die erhöhte Expression von NLRP3, Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 nach Behandlung mit Inflammasom-induzierenden Stimuli. Die in meinen Experimenten nachweisbare Caspase-3-Spaltung gibt zusätzlich einen Anhalt für das Vorliegen von Apoptose (s. 1.2.1) bzw. Pyroptose.²³⁸ Letztendlich sind verschiedene Verkettungen (*Crosstalks*) zwischen Inflammasomaktivierung, Apoptose und Pyroptose möglich (s. 1.3.1): Apoptose und Pyroptose können das Inflammasom aktivieren,^{181,196} während umgekehrt, das Inflammasom selbst Pyroptose und Apoptose induzieren kann.¹⁸¹ Apoptotische Vorgänge können außerdem Pyroptose sowohl induzieren¹⁸¹ als auch hemmen.¹⁸⁵ Aufgrund der Beteiligung von Caspasen in sowohl apoptotischen, pyroptotischen als auch inflammatorischen Signalwegen ist die Unterscheidung von Apoptose-, Pyroptose- und Inflammasominduktion alleine über den Nachweis einer Caspasenspaltung unzureichend. Andere Verfahren zum Nachweis

und der Unterscheidung zwischen den entsprechenden Signalwegen müssten daher in zusätzlichen Experimenten herangezogen werden. Eine Möglichkeit, um spezifisch Pyroptose zu erfassen, besteht im Nachweis einer Gasdermin D- oder E-Spaltung. Im Rahmen apoptotischer Vorgänge kann Gasdermin E beispielsweise durch Caspase-3 und Gasdermin D durch Caspase-8 proteolytisch gespalten werden und dadurch Pyroptose einleiten.¹⁸¹ Die Komplexität in der Deutung der hier gezeigten Ergebnisse wird zusätzlich durch die Tatsache erhöht, dass α -Toxin neben dem Inflammasom auch Apoptose induzieren kann.²³⁹ Gegen das primäre Vorliegen apoptotischer Vorgänge in den vorliegenden Experimenten spricht, dass der stabile TRIM25 *Knockdown* nachweislich zur Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose führt (s. 5.5), während im Gegensatz dazu in den Experimenten mit inflammasomaktivierenden Stimulanzen eine verminderte Caspase-3-, -7- und PARP-1-Spaltung bei *Knockdown* nachweisbar war (s. 5.8). Die folgende Kausalkette kann postuliert werden: Durch Stimulation mit LPS, ATP und α -Toxin wird das NLRP3-Inflammasom aktiviert. Wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben¹⁷⁹ kommt es durch die damit verbundene Caspase-1-Spaltung zur Aktivierung von Caspase-7, woraufhin Caspase-7 in den Zellkern transloziert und dort PARP-1 spaltet. Die Abhängigkeit der PARP-1-Spaltung von Caspase-7 sollte allerdings noch in weiterführenden Experimenten bestätigt werden. In der zitierten Arbeit¹⁷⁹ führte die PARP-1-Spaltung zur verstärkten Expression NF- κ B-regulierter Zielgene, die im Rahmen inflammatorischer Prozesse eine Rolle spielen können. Eine Verlagerung der NF- κ B Untereinheit p65 vom Cytosol in den Zellkern, wie sie bei Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vorkommt, konnte in den hier gezeigten Experimenten nicht konsistent nachgewiesen werden. Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B allerdings insgesamt fünf verschiedene Untereinheiten besitzt, die an der Bildung des aktiven Dimers beteiligt sein können,²⁴⁰ sollten in zukünftigen Experimenten sämtliche Untereinheiten hinsichtlich einer stimulusabhängigen Verlagerung in den Kern überprüft werden. PARP-1 ist ein DNA-Reparaturenzym, welches im Rahmen apoptotischer und nekrotischer Prozesse durch Spaltung inaktiviert wird, um die Zelle vor einem weiteren Energieverlust zu schützen.²⁴¹ Außerdem ist bekannt, dass die während der NLRP3-Inflammasomaktivierung gespaltene Caspase-7 zur PARP-1-Spaltung mit folgender Einleitung pyroptotischer Vorgänge

beiträgt.²⁴¹ Die Spaltung von PARP-1 kann somit Ausdruck Inflammasom-induzierter Signalprozesse sein, ist aber gleichzeitig ein etablierter Marker für sowohl Apoptose, Nekrose als auch Pyroptose. Eine weitere Verbindung zwischen Inflammasom, Apoptose und Pyroptose wird durch Caspase-1 vermittelt: Caspase-1 aktiviert bekanntlich über verschiedene Mechanismen Caspase-3 mit der nachfolgenden Induktion von Apoptose.¹⁸¹ Die aktivierte Caspase-3 kann neben Apoptose über Gasdermin E-Spaltung zusätzlich Pyroptose einleiten,²³⁸ sodass die angenommene Inflammasomaktivierung in den hier gezeigten Experimenten letztlich sowohl apoptotische als auch pyroptotische Prozesse auslösen könnte. Zusammenfassend scheint der stabile TRIM25 *Knockdown* in Kolonkarzinomzellen zur Hemmung von Inflammasom-induzierten Signalprozessen zu führen und die Zellen dadurch möglicherweise vor Apoptose/Pyroptose zu schützen. Daraus könnte auf eine positive Regulation des NLRP3-Inflammasoms und nachfolgend induzierter Signalprozesse wie Apoptose/Pyroptose durch TRIM25 geschlossen werden. Die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms bei intestinaler Entzündung und dem kolorektalen Karzinom ist in der Fachliteratur hinreichend beschrieben (s. 1.3.2). Daher kann postuliert werden, dass TRIM25 auch über die Regulation des NLRP3-Inflammasoms in die Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms eingreifen kann. Während akute Entzündungen z. T. antitumorigen wirken, ist bekannt, dass chronische Entzündung zur malignen Transformation von Zellen führen^{151,170,180} (*inflammation-induced tumorigenesis*) und hierbei neben der Tumorumitiation auch die Tumorumprogression fördern kann.¹⁵¹ Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Tumorgenese ist allerdings umstritten: Während viele Studien eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms an der Krebsentstehung und -progression aufzeigen (tumorigene Rolle), ist in anderen Studien eine protektive Funktion des NLRP3-Inflammasoms bei der Tumorgenese beschrieben worden.^{170,180,204-206} Die genauen Mechanismen einer TRIM25-abhängigen Regulation des NLRP3-Inflammasoms in Kolonkarzinomzellen und inwieweit sich die Einflussnahme durch TRIM25 zwischen gesunden Darmepithelzellen und Kolonkarzinomzellen unterscheidet (Physiologische (antivirale?) oder tumorspezifische (onkogene oder tumorsuppressive?) Funktion von TRIM25 beim NLRP3-Inflammasom?), sind aktuell Gegenstand der Forschung in unserer Arbeitsgruppe. Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt, wurde im Rahmen

einer Proteomanalyse die TRIM25 *Knockdown*-abhängige Hochregulation des Rezeptors TNFRSF10D in transienten und stabilen Ansätzen nachgewiesen. Die Bedeutung von TNFRSF10D für das Inflammasom-*Signaling* und damit zusammenhängende Signalwege sind ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung in unserer Arbeitsgruppe. Ein möglicher Mechanismus, über den TRIM25 Einfluss auf das NLRP3-Inflammasom nehmen könnte, wäre die Regulation der Aktivität inflammasomrelevanter Proteine. So ist beispielsweise die Regulation des NLRP3-Inflammasoms durch TRIM-abhängige Ubiquitinierung verschiedener Substrate, wie des NLRP3-Proteins, bekannt.^{187-189,237} Eine TRIM25-abhängige K63-Polyubiquitinierung von NLRP3 könnte daher zur verstärkten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in TRIM25-nativen Zellen beitragen. Neben der für TRIM Proteine bekannten, herkömmlichen Regulation über Ubiquitinierung ist für TRIM50 eine fördernde Wirkung auf das NLRP3-Inflammasom über direkte Interaktion mit NLRP3 beschrieben: TRIM50 interagiert über seine RING-Domäne mit NLRP3, hemmt dadurch die Ubiquitinierung, induziert die NLRP3-Oligomerisierung und fördert so schlussendlich die NLRP3-Inflammasomaktivierung sowie damit assoziierte Erkrankungen.²⁴² Ein ähnlicher Mechanismus ist für TRIM25 denkbar. Des Weiteren zeigen vorangegangene Untersuchungen einen aktivierenden Einfluss von z.B. TRIM14 und TRIM22 auf den proinflammatorischen NF- κ B/NLRP3-Inflammasom-Signalweg.^{243,244} NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher bekanntermaßen beim *Priming*¹⁶⁹ sowie der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms¹⁷⁹ eine Rolle spielt. Eine positive Regulation des NF- κ B-Signalweges, welche auch für TRIM25 in anderem Zusammenhang bereits bekannt ist,²⁴⁵ kann daher Einfluss auf das NLRP3-Inflammasom nehmen. Die meisten der bislang identifizierten Zielgene von NF- κ B besitzen ein hohes onkogenes Potential, indem sie beispielsweise bei der Regulation der Zellproliferation, Migration, Entzündung oder des Zellüberlebens beteiligt sind (s. 1.1.3). Eine mögliche positive Regulation des NF- κ B/NLRP3-Inflammasom-Signalweges durch TRIM25 steht daher im Verdacht, die Kolonkarzinogenese zu fördern. Daneben gibt es bereits Studien über eine TRIM25-abhängige Regulation des NLRP3-Inflammasoms unabhängig der Kolonkarzinogenese. Es werden sowohl hemmende²³⁷ als auch fördernde²⁴⁶ Funktionen von TRIM25 beschrieben: TRIM25 fördert z.B. die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch verstärkte Interaktion von Pro-Caspase-1 mit

ASC.²⁴⁶ Um die Erkenntnisse dieser Arbeit zusammenzufassen, führt der stabile TRIM25 *Knockdown* in RKO-Zellen stimulusabhängig (Apoptose- vs. Inflammasom-induzierende Stimuli) entweder zur Sensibilisierung oder zur Desensibilisierung gegenüber der Spaltung derselben Proteine (Caspase-7 und PARP-1). Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass die verschiedenen Stimuli selektiv unterschiedliche Signalwege induzieren (Apoptose vs. NLRP3-Inflammasom), in denen beide Proteine eine Rolle spielen und daher als Marker des entsprechenden Signalweges herangezogen werden können. Für TRIM25 kann dabei ein gegensätzlicher Einfluss postuliert werden: Die Apoptose wird gehemmt, während Inflammasom-induzierte Signalprozesse positiv beeinflusst werden (Abbildung 18).

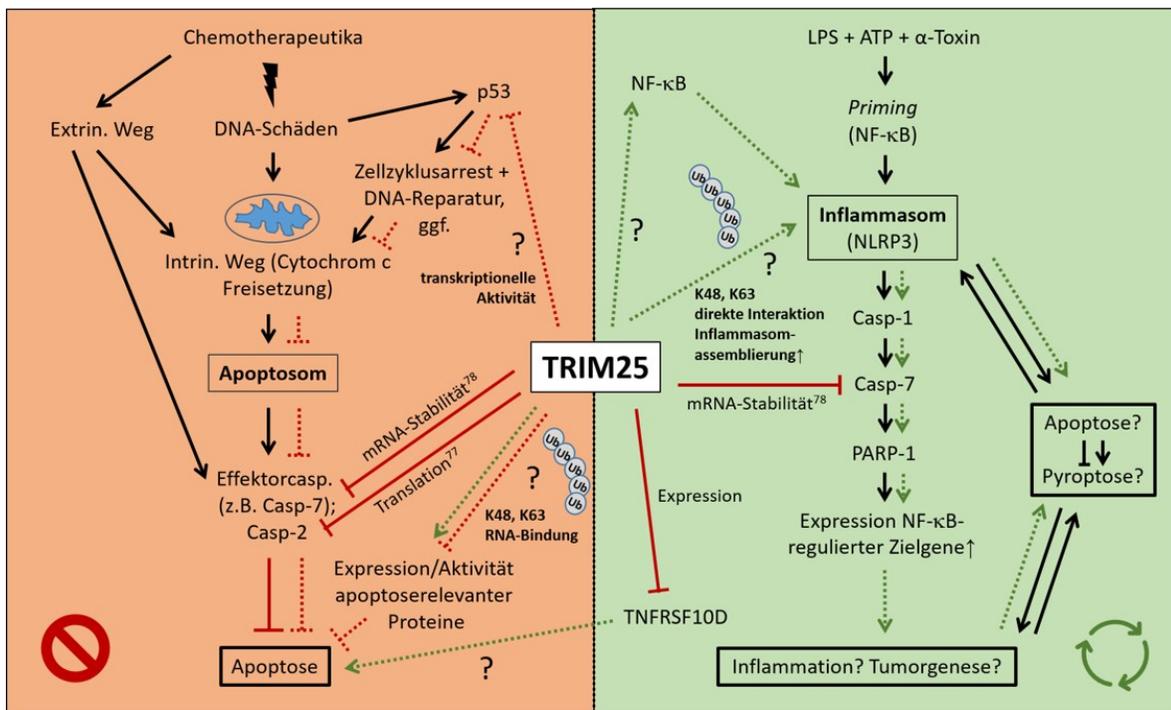


Abbildung 18. Grafische Zusammenfassung möglicher TRIM25-abhängiger Effekte auf Apoptose vs. NLRP3-Inflammasom

Der postulierte Einfluss von TRIM25 auf Apoptose und das NLRP3-Inflammasom sowie mögliche Mechanismen sind an dieser Stelle vereinfacht zusammengefasst. Durchgezogene Linien entsprechen bekannten, gestrichelte Linien vermuteten Zusammenhängen. Schwarz = Signalwege, rot = hemmt, grün = fördert.

6.4. Ausblick: Etablierung von *in vivo*-TRIM25 *Knockdown*/*Knockout*-Modellen als nächster Schritt in der Entwicklung neuer Therapien des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom steht weltweit auf Platz 3 der Krebsneuerkrankungen und ist die zweithäufigste Krebstodesursache (s. 1.4). Aufgrund der hohen Inzidenz und Mortalität, der schlechten Prognose und der Entwicklung von Therapieresistenzen besteht daher ein dringender Bedarf in der Entwicklung neuer, verbesserter Therapien des kolorektalen Karzinoms sowie der Resensibilisierung der Krebszellen gegenüber gängigen, bereits bestehenden Therapieoptionen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein onkogener Einfluss von TRIM25 auf Kolonkarzinomzellen durch Hemmung Chemotherapeutika-induzierter Apoptose nachgewiesen werden, während eine mögliche tumorigene (oder tumorsuppressive?) Rolle von TRIM25 durch zusätzliche Aktivierung Inflammasom-induzierter Signalprozesse weiterer Untersuchungen bedarf. Zusammenfassend kann TRIM25 als vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt für die Entwicklung von sowohl neuen antientzündlichen als auch tumorsuppressiven Therapien betrachtet werden. Um die *in vivo*-Relevanz der Erkenntnisse zu überprüfen, bedarf es zunächst einer Bestätigung, z.B. am Xenograftmodell der Maus. Xenograft-Mausmodelle sind ein häufig genutztes und simples Tumormodell zur Untersuchung neuer therapeutischer Ansätze. Bei der Verwendung Zelllinien-basierter Xenograftmodelle kann die Implantation von humanen Tumorzellen orthotop oder heterotop (z.B. subkutan) erfolgen. Die Implantation stabiler TRIM25 *Knockdown* Zellen oder die Generierung eines TRIM25 *Knockouts* wäre daher der nächste Schritt zur Validierung einer tumorigenen Rolle von TRIM25 in der Kolonkarzinogenese. Eine Genattenuation durch siRNA und shRNA ist sowohl *in vitro* an Zellkulturen²⁴⁷ als auch *in vivo* an Mausmodellen^{248,249} bereits vielfach erfolgreich durchgeführt worden. Des Weiteren spielt RNA-Interferenz in der zielgerichteten Therapie von Erkrankungen eine Rolle. Eine wachsende Wirkstoffklasse von bereits für die Therapie am Menschen zugelassenen RNAi-Therapeutika, sind beispielsweise siRNA-Präparate wie Inclisiran, welches zur Therapie der Hypercholesterinämie eingesetzt wird.²⁵⁰ Vor diesem Hintergrund erscheint die genetische Attenuation von TRIM25 neben einer Anwendung in der Grundlagenforschung außerdem ein attraktiver Ansatz einer personalisierten, zielgerichteten Tumorthherapie (*targeted (cancer) therapy*).

7. Zusammenfassung/Summary

7.1. Zusammenfassung

Die E3-Ubiquitinligase TRIM25 ist in verschiedenen humanen Tumoren verstärkt exprimiert, was häufig mit einer schlechten Prognose der betroffenen Patienten sowie dem Auftreten von Therapieresistenzen korreliert. Unsere Arbeitsgruppe konnte TRIM25 zuvor als Caspase-2 und -7 mRNA-bindendes Protein und negativen Regulator beider Caspasen in humanen Kolonkarzinomzellen identifizieren. Ein transienter TRIM25 *Knockdown* führt in Abhängigkeit der erhöhten Expression der jeweiligen Caspasen zur Sensitivierung der Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose. Ein Ziel dieser Arbeit war, die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf einen *loss-of-function*-Ansatz mit stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen zu überprüfen. Die stabilen *Knockdown* Zellen sollten der späteren Etablierung eines Xenograftmodells dienen. Da zahlreiche TRIM Proteine bekannterweise eine vielseitige Rolle bei der Regulation sowohl onkogener als auch tumorsuppressiver Prozesse einnehmen, wurde als weitere maßgebliche Fragestellung dieser Arbeit der Einfluss von TRIM25 auf wichtige tumorigene Eigenschaften wie Proliferation, Migration, Zellzyklus und Inflammation untersucht. TRIM25-abhängige Effekte auf das Migrationsverhalten von RKO-Zellen wurden im *in vitro*-Wundheilungsassay mit stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen analysiert. Aufgrund hoher interexperimenteller Unterschiede im Migrationsverhalten derselben Zellklone konnte hinsichtlich einer TRIM25-abhängigen Regulation der Migration jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden. Dagegen belegten die gezeigten Proliferationsassays eine signifikant vermehrte Proliferation von RKO-Zellen nach stabilem TRIM25 *Knockdown*. Dies legt eine tumorsuppressive Rolle von TRIM25 nahe. Durchflusszytometrische Analysen stabiler TRIM25 *Knockdown* und Kontrollzellen zeigten hingegen keinen konsistenten Einfluss von TRIM25 auf den Zellzyklus von RKO-Zellen. Eine Sensitivierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika-induzierter Apoptose konnte auch in stabilen TRIM25 *Knockdown* Zellen nachgewiesen werden, während die für transiente Ansätze bekannte, TRIM25 *Knockdown*-abhängige Hochregulation von Caspase-2 und -7 dagegen deutlich geringer ausgeprägt war. Dies lässt vermuten, dass die Tumorzellen einer Hochregulation Zelltod-induzierender Proteine bei einem konstitutiven TRIM25

Knockdown gegenregulieren. Aufgrund der aber nach wie vor nachweisbaren Sensitivierung der TRIM25 *Knockdown* Zellen gegenüber Apoptose, können zusätzliche, bisher noch nicht bekannte Mechanismen postuliert werden, welche zur Sensitivierung dieser Zellen gegenüber Apoptose beitragen. Die daraus abgeleitete, TRIM25-abhängige Apoptosehemmung spricht für einen „Überlebensmechanismus“, welcher maßgeblich zur Chemotherapieresistenz von Kolonkarzinomzellen beitragen kann. Hinsichtlich eines Einflusses von TRIM25 auf entzündliche Prozesse wurden RKO-Zellen mit klassischen Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms stimuliert und ausgewählte Marker mittels Western Blot-Analysen nachgewiesen. TRIM25 *Knockdown*-abhängig war eine verminderte Spaltung der Apoptosemarker Caspase-3, -7 und PARP-1 nachweisbar. Caspase-7 und PARP-1 spielen bekanntermaßen auch im Rahmen Inflammasom-induzierter Signalprozesse eine wichtige Rolle, während die Spaltung von Caspase-3 durch das NLRP3-Inflammasom induziert werden kann und v.a. für apoptotische oder pyroptotische Prozesse verantwortlich gemacht wird. Daher kann postuliert werden, dass der stabile TRIM25 *Knockdown* zur Hemmung von Inflammasom-induzierten Signalprozessen führt und darüber Kolonkarzinomzellen vor Apoptose/Pyroptose geschützt werden. Umgekehrt deutet dies auf eine Aktivierung von Inflammasom-vermittelten Signalprozessen durch TRIM25 hin.

Aufgrund der hohen Inzidenz und Mortalität, der schlechten Prognose und der Entwicklung von Therapieresistenzen besteht ein dringender Bedarf in der Entwicklung neuer, verbesserter Therapien des kolorektalen Karzinoms sowie der Resensibilisierung der Krebszellen gegenüber gängigen, bereits bestehenden Therapieoptionen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein onkogener Einfluss von TRIM25 auf Kolonkarzinomzellen durch Hemmung Chemotherapeutika-induzierter Apoptose nachgewiesen werden, während eine mögliche tumorigene Rolle von TRIM25 durch zusätzliche Aktivierung Inflammasom-induzierter Signalprozesse weiterer Untersuchungen bedarf. Zusammenfassend kann TRIM25 als vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt für die Entwicklung von sowohl neuen anti-entzündlichen als auch tumorsuppressiven Therapien betrachtet werden.

7.2. Summary

The E3 ubiquitin ligase TRIM25 is overexpressed in various human tumors and often correlates with poor prognosis and the occurrence of therapy resistance in patients. Our group has previously identified TRIM25 as a caspase-2 and -7 mRNA-binding protein and novel suppressor of both caspases in human colon carcinoma cells. Transient TRIM25 silencing leads to increased sensitivity of colon carcinoma cells towards drug-induced apoptosis depending on the increased expression of the respective caspases in response to TRIM25 silencing. The goal of this study was to compare results from the transient TRIM25 knockdown approach with those obtained with stable TRIM25 knockdown cells. These cells were also planned for the later establishment of a xenograft model of colon cancer. Since TRIM proteins are known to play multifaceted roles in the regulation of both oncogenic and tumor-suppressive processes, a further aim of this study was to investigate the impact of TRIM25 on important tumorigenic features such as proliferation, migration, cell cycle and inflammation. TRIM25-dependent effects on the migration of RKO cells were analyzed by wound healing assays in stable TRIM25 knockdown cells. However, due to inter-experimental differences in the migration of cell clones, no conclusion could be made regarding a TRIM25-dependent regulation of migration. Besides a comparison of cell cycle of stable TRIM25 knockdown with control cells by flow cytometry did not reveal any consistent impact of TRIM25. In contrast, proliferation assays demonstrated a significant increase in cell proliferation in stable TRIM25 knockdown cells suggesting a tumor suppressive role of TRIM25. A sensitization of colon carcinoma cells towards drug-induced apoptosis was confirmed in stable TRIM25 knockdown cells, while the stable TRIM25 knockdown-dependent upregulation of caspases was weaker than after transient knockdown. This suggests that the tumor cells counter-regulate the upregulation of cell death-inducing proteins during a long-term TRIM25 knockdown. However, since cells were still sensitized to drug-induced apoptosis, additional, as yet unknown mechanisms contributing to the TRIM25 knockdown-dependent sensitization of colon carcinoma cells can be postulated. The concluded TRIM25-dependent inhibition of apoptosis supports the assumption of a "survival mechanism" which is underlying chemotherapeutic drug resistance of colon carcinoma cells. Regarding

the possible influence of TRIM25 on inflammatory processes, RKO cells were stimulated with classical activators of the NLRP3 inflammasome and selected markers were detected by Western blot analysis. The results showed reduced cleavage of caspase-3, -7 and PARP-1 in stable TRIM25 knockdown cells. While cleavage of Caspase-7 and PARP-1 indicate an activation in inflammasome-induced signaling processes, the cleavage of caspase-3 by the NLRP3 inflammasome is more likely to reflect either apoptotic or pyroptotic processes. Together these data indicate that the long-term TRIM25 knockdown impairs inflammasome-induced signaling processes and thereby may protect colon carcinoma cells from apoptosis/pyroptosis. Conversely, this suggests an activation of inflammasome-mediated signaling processes by TRIM25.

Due to the high incidence and mortality, the poor prognosis and the development of therapy resistance, there is an urgent need for the development of new, improved therapies for colorectal carcinoma and the resensitization of cancer cells to current therapies. The results of this study demonstrate an oncogenic impact of TRIM25 on colon carcinoma cells by inhibiting drug-induced apoptosis, while a possible tumorigenic role of TRIM25 through additional activation of inflammasome-induced signaling processes needs further investigation. In summary, TRIM25 could reflect a promising therapeutic target for the development of new anti-inflammatory and tumor-suppressive therapies.

Literaturverzeichnis

1. Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J*. 2001;20(9):2140-2151. doi:10.1093/emboj/20.9.2140.
2. Torok M, Etkin LD. Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation*. 2001;67(3):63-71. doi:10.1046/j.1432-0436.2001.067003063.x.
3. Gushchina LV, Kwiatkowski TA, Bhattacharya S, Weisleder NL. Conserved structural and functional aspects of the tripartite motif gene family point towards therapeutic applications in multiple diseases. *Pharmacol Ther*. 2018;185:12-25. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.10.020.
4. Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem*. 2006;281(13):8970-8980. doi:10.1074/jbc.M512755200.
5. Ozato K, Shin D-M, Chang T-H, Morse HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(11):849-860. doi:10.1038/nri2413.
6. Crawford LJ, Johnston CK, Irvine AE. TRIM proteins in blood cancers. *J Cell Commun Signal*. 2018;12(1):21-29. doi:10.1007/s12079-017-0423-5.
7. McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(1):46-56. doi:10.1016/j.coi.2010.10.021.
8. Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. 2000;102(5):549-552. doi:10.1016/s0092-8674(00)00077-5.
9. Massiah MA, Simmons BN, Short KM, Cox TC. Solution structure of the RBCC/TRIM B-box1 domain of human MID1: B-box with a RING. *J Mol Biol*. 2006;358(2):532-545. doi:10.1016/j.jmb.2006.02.009.
10. Massiah MA, Matts JAB, Short KM, et al. Solution structure of the MID1 B-box2 CHC(D/C)C(2)H(2) zinc-binding domain: insights into an evolutionarily conserved RING fold. *J Mol Biol*. 2007;369(1):1-10. doi:10.1016/j.jmb.2007.03.017.
11. Bell JL, Malyukova A, Holien JK, et al. TRIM16 acts as an E3 ubiquitin ligase and can heterodimerize with other TRIM family members. *PLoS One*. 2012;7(5):e37470. doi:10.1371/journal.pone.0037470.
12. Wang H-T, Hur S. Substrate recognition by TRIM and TRIM-like proteins in innate immunity. *Semin Cell Dev Biol*. 2021;111:76-85. doi:10.1016/j.semcdb.2020.09.013.

13. Zhao J, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL. mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(52):15790-15797. doi:10.1073/pnas.1521919112.
14. Stringer DK, Piper RC. Terminating protein ubiquitination: Hasta la vista, ubiquitin. *Cell Cycle*. 2011;10(18):3067-3071. doi:10.4161/cc.10.18.17191.
15. Sadowski M, Suryadinata R, Tan AR, Roesley SNA, Sarcevic B. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life*. 2012;64(2):136-142. doi:10.1002/iub.589.
16. Callis J. The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *Arabidopsis Book*. 2014;12:e0174. doi:10.1199/tab.0174.
17. Morreale FE, Walden H. Types of Ubiquitin Ligases. *Cell*. 2016;165(1):248-248.e1. doi:10.1016/j.cell.2016.03.003.
18. Buetow L, Huang DT. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(10):626-642. doi:10.1038/nrm.2016.91.
19. Eberhardt W, Haeussler K, Nasrullah U, Pfeilschifter J. Multifaceted Roles of TRIM Proteins in Colorectal Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20). doi:10.3390/ijms21207532.
20. Gong J, Cao J, Liu G, Huo J-R. Function and mechanism of F-box proteins in gastric cancer (Review). *Int J Oncol*. 2015;47(1):43-50. doi:10.3892/ijo.2015.2983.
21. Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(8):508-523. doi:10.1038/nrm3394.
22. Hatakeyama S. TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(4):297-311. doi:10.1016/j.tibs.2017.01.002.
23. Sun N, Xue Y, Dai T, Li X, Zheng N. Tripartite motif containing 25 promotes proliferation and invasion of colorectal cancer cells through TGF- β signaling. *Biosci Rep*. 2017;37(4). doi:10.1042/BSR20170805.
24. Versteeg GA, Benke S, García-Sastre A, Rajsbaum R. InTRIMsic immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(5):563-576. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.08.001.
25. Lim K-L, Lim GGY. K63-linked ubiquitination and neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2011;43(1):9-16. doi:10.1016/j.nbd.2010.08.001.
26. Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*. 2005;27(11):1147-1157. doi:10.1002/bies.20304.

27. Berndsen CE, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(4):301-307. doi:10.1038/nsmb.2780.
28. Cano F, Miranda-Saavedra D, Lehner PJ. RNA-binding E3 ubiquitin ligases: novel players in nucleic acid regulation. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(6):1621-1626. doi:10.1042/BST0381621.
29. Kano S, Miyajima N, Fukuda S, Hatakeyama S. Tripartite motif protein 32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2. *Cancer Res.* 2008;68(14):5572-5580. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6231.
30. Venuto S, Merla G. E3 Ubiquitin Ligase TRIM Proteins, Cell Cycle and Mitosis. *Cells.* 2019;8(5). doi:10.3390/cells8050510.
31. Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(11):792-804. doi:10.1038/nrc3139.
32. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* 2000;60(24):6788-6793.
33. Li X-L, Zhou J, Chen Z-R, Chng W-J. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015;21(1):84-93. doi:10.3748/wjg.v21.i1.84.
34. Allton K, Jain AK, Herz H-M, et al. Trim24 targets endogenous p53 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(28):11612-11616. doi:10.1073/pnas.0813177106.
35. Zhang P, Elabd S, Hammer S, et al. TRIM25 has a dual function in the p53/Mdm2 circuit. *Oncogene.* 2015;34(46):5729-5738. doi:10.1038/onc.2015.21.
36. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology.* 2012;142(2):219-232. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.001.
37. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008;14(6):818-829. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009.
38. Cheng X, Xu X, Chen D, Zhao F, Wang W. Therapeutic potential of targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2019;110:473-481. doi:10.1016/j.biopha.2018.11.082.
39. Sun J, Zhang T, Cheng M, et al. TRIM29 facilitates the epithelial-to-mesenchymal transition and the progression of colorectal cancer via the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):104. doi:10.1186/s13046-019-1098-y.
40. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-791. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.753.

41. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001.
42. Liang Q, Tang C, Tang M, Zhang Q, Gao Y, Ge Z. TRIM47 is up-regulated in colorectal cancer, promoting ubiquitination and degradation of SMAD4. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):159. doi:10.1186/s13046-019-1143-x.
43. Papadatos-Pastos D, Rabbie R, Ross P, Sarker D. The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;94(1):18-30. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.12.006.
44. Shen W, Jin Z, Tong X, et al. TRIM14 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by suppressing PTEN in colorectal cancer. *Cancer Manag Res*. 2019;11:5725-5735. doi:10.2147/CMAR.S210782.
45. Bollrath J, Greten FR. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep*. 2009;10(12):1314-1319. doi:10.1038/embor.2009.243.
46. Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell*. 2009;15(2):79-80. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.009.
47. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-2114.e5. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.058.
48. Xiong H, Zhang Z-G, Tian X-Q, et al. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells. *Neoplasia*. 2008;10(3):287-297. doi:10.1593/neo.07971.
49. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):736-746. doi:10.1038/nrc3818.
50. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):798-809. doi:10.1038/nrc2734.
51. Pan S, Deng Y, Fu J, et al. TRIM52 promotes colorectal cancer cell proliferation through the STAT3 signaling. *Cancer Cell Int*. 2019;19:57. doi:10.1186/s12935-019-0775-4.
52. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020.
53. Sun S-C. The non-canonical NF-kB pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(9):545-558. doi:10.1038/nri.2017.52.
54. Jana A, Krett NL, Guzman G, et al. NFkB is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget*. 2017;8(23):37377-37393. doi:10.18632/oncotarget.16343.

55. Roy M, Singh R. TRIMs: selective recruitment at different steps of the NF- κ B pathway-determinant of activation or resolution of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2021. doi:10.1007/s00018-021-03900-z.
56. Wang H, Yao L, Gong Y, Zhang B. TRIM31 regulates chronic inflammation via NF- κ B signal pathway to promote invasion and metastasis in colorectal cancer. *Am J Transl Res*. 2018;10(4):1247-1259. Published April 15, 2018.
57. Wang S, Zhang Y, Huang J, et al. TRIM67 Activates p53 to Suppress Colorectal Cancer Initiation and Progression. *Cancer Res*. 2019;79(16):4086-4098. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3614.
58. Heikel G, Choudhury NR, Michlewski G. The role of Trim25 in development, disease and RNA metabolism. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(4):1045-1050. doi:10.1042/BST20160077.
59. Wang S, Kollipara RK, Humphries CG, et al. The ubiquitin ligase TRIM25 targets ERG for degradation in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(40):64921-64931. doi:10.18632/oncotarget.11915.
60. Choudhury NR, Heikel G, Michlewski G. TRIM25 and its emerging RNA-binding roles in antiviral defense. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2020;11(4):e1588. doi:10.1002/wrna.1588.
61. Inoue S, Orimo A, Hosoi T, et al. Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(23):11117-11121. doi:10.1073/pnas.90.23.11117.
62. Urano T, Saito T, Tsukui T, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature*. 2002;417(6891):871-875. doi:10.1038/nature00826.
63. Orimo A, Inoue S, Minowa O, et al. Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(21):12027-12032. doi:10.1073/pnas.96.21.12027.
64. Gack MU, Kirchhofer A, Shin YC, et al. Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16743-16748. doi:10.1073/pnas.0804947105.
65. Gack MU, Shin YC, Joo C-H, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 2007;446(7138):916-920. doi:10.1038/nature05732.
66. Cadena C, Ahmad S, Xavier A, et al. Ubiquitin-Dependent and -Independent Roles of E3 Ligase RIPLET in Innate Immunity. *Cell*. 2019;177(5):1187-1200.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.03.017.

67. Hayman TJ, Hsu AC, Kolesnik TB, et al. RIPLET, and not TRIM25, is required for endogenous RIG-I-dependent antiviral responses. *Immunol Cell Biol.* 2019;97(9):840-852. doi:10.1111/imcb.12284.
68. Shi Y, Yuan B, Zhu W, et al. Ube2D3 and Ube2N are essential for RIG-I-mediated MAVS aggregation in antiviral innate immunity. *Nat Commun.* 2017;8:15138. doi:10.1038/ncomms15138.
69. Li MMH, Lau Z, Cheung P, et al. TRIM25 Enhances the Antiviral Action of Zinc-Finger Antiviral Protein (ZAP). *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006145. doi:10.1371/journal.ppat.1006145.
70. Zheng X, Wang X, Tu F, Wang Q, Fan Z, Gao G. TRIM25 Is Required for the Antiviral Activity of Zinc Finger Antiviral Protein. *J Virol.* 2017;91(9). doi:10.1128/JVI.00088-17.
71. Lee S, Lee Y-S, Choi Y, et al. The SARS-CoV-2 RNA interactome. *Mol Cell.* 2021;81(13):2838-2850.e6. doi:10.1016/j.molcel.2021.04.022.
72. Meyerson NR, Zhou L, Guo YR, et al. Nuclear TRIM25 Specifically Targets Influenza Virus Ribonucleoproteins to Block the Onset of RNA Chain Elongation. *Cell Host Microbe.* 2017;22(5):627-638.e7. doi:10.1016/j.chom.2017.10.003.
73. Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell.* 2012;149(6):1393-1406. doi:10.1016/j.cell.2012.04.031.
74. Choudhury NR, Heikel G, Trubitsyna M, et al. RNA-binding activity of TRIM25 is mediated by its PRY/SPRY domain and is required for ubiquitination. *BMC Biol.* 2017;15(1):105. doi:10.1186/s12915-017-0444-9.
75. Sanchez JG, Sparrer KMJ, Chiang C, et al. TRIM25 Binds RNA to Modulate Cellular Anti-viral Defense. *J Mol Biol.* 2018;430(24):5280-5293. doi:10.1016/j.jmb.2018.10.003.
76. Kwon SC, Yi H, Eichelbaum K, et al. The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(9):1122-1130. doi:10.1038/nsmb.2638.
77. Nasrullah U, Haeussler K, Biyanee A, Wittig I, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Identification of TRIM25 as a Negative Regulator of Caspase-2 Expression Reveals a Novel Target for Sensitizing Colon Carcinoma Cells to Intrinsic Apoptosis. *Cells.* 2019;8(12). doi:10.3390/cells8121622.
78. Nasrullah U, Stanke K, Recknagel V, et al. The E3 Ligase TRIM25 Impairs Apoptotic Cell Death in Colon Carcinoma Cells via Destabilization of Caspase-7 mRNA: A Possible Role of hnRNPH1. *Cells.* 2023;12(1). doi:10.3390/cells12010201.
79. Walsh LA, Alvarez MJ, Sabio EY, et al. An Integrated Systems Biology Approach Identifies TRIM25 as a Key Determinant of Breast Cancer Metastasis. *Cell Rep.* 2017;20(7):1623-1640. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.052.

80. Takayama K-I, Suzuki T, Tanaka T, et al. TRIM25 enhances cell growth and cell survival by modulating p53 signals via interaction with G3BP2 in prostate cancer. *Oncogene*. 2018;37(16):2165-2180. doi:10.1038/s41388-017-0095-x.
81. Liu Y, Tao S, Liao L, et al. TRIM25 promotes the cell survival and growth of hepatocellular carcinoma through targeting Keap1-Nrf2 pathway. *Nat Commun*. 2020;11(1):348. doi:10.1038/s41467-019-14190-2.
82. Zang H-L, Ren S-N, Cao H, Tian X-F. The ubiquitin ligase TRIM25 inhibits hepatocellular carcinoma progression by targeting metastasis associated 1 protein. *IUBMB Life*. 2017;69(10):795-801. doi:10.1002/iub.1661.
83. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, et al. Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(17):6148-6154. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0040.
84. Ueyama K, Ikeda K, Sato W, et al. Knockdown of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits breast cancer cell proliferation and in vivo tumor growth. *Cancer Gene Ther*. 2010;17(9):624-632. doi:10.1038/cgt.2010.19.
85. Sakuma M, Akahira J, Suzuki T, et al. Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2005;99(3):664-670. doi:10.1016/j.ygyno.2005.07.103.
86. Dai H, Zhang P, Zhao S, Zhang J, Wang B. Regulation of the vascular endothelial growth factor and growth by estrogen and antiestrogens through Efp in Ishikawa endometrial carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2009;21(2):395-401.
87. Nakayama H, Sano T, Motegi A, Oyama T, Nakajima T. Increasing 14-3-3 sigma expression with declining estrogen receptor alpha and estrogen-responsive finger protein expression defines malignant progression of endometrial carcinoma. *Pathol Int*. 2005;55(11):707-715. doi:10.1111/j.1440-1827.2005.01900.x.
88. Dai H, Zhao S, Xu L, Chen A, Dai S. Expression of Efp, VEGF and bFGF in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Oncol Rep*. 2010;23(3):795-799.
89. Qin Y, Cui H, Zhang H. Overexpression of TRIM25 in Lung Cancer Regulates Tumor Cell Progression. *Technol Cancer Res Treat*. 2016;15(5):707-715. doi:10.1177/1533034615595903.
90. Zhu Z, Wang Y, Zhang C, et al. TRIM25 blockade by RNA interference inhibited migration and invasion of gastric cancer cells through TGF- β signaling. *Sci Rep*. 2016;6:19070. doi:10.1038/srep19070.

91. Chen J-J, Ren Y-L, Shu C-J, et al. JP3, an antiangiogenic peptide, inhibits growth and metastasis of gastric cancer through TRIM25/SP1/MMP2 axis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):118. doi:10.1186/s13046-020-01617-8.
92. Ikeda K, Orimo A, Higashi Y, Muramatsu M, Inoue S. Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer. *FEBS Lett.* 2000;472(1):9-13. doi:10.1016/s0014-5793(00)01421-6.
93. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al. 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997;1(1):3-11. doi:10.1016/s1097-2765(00)80002-7.
94. Sakamaki K, Satou Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol.* 2009;74(4):727-753. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02184.x.
95. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.383.
96. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008;27(48):6194-6206. doi:10.1038/onc.2008.297.
97. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281(5381):1312-1316. doi:10.1126/science.281.5381.1312.
98. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2665-2672. doi:10.1172/JCI26252.
99. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(6). doi:10.1101/cshperspect.a008672.
100. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 2009;284(33):21777-21781. doi:10.1074/jbc.R800084200.
101. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell.* 2003;11(2):529-541. doi:10.1016/s1097-2765(03)00051-0.
102. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(25):14250-14255. doi:10.1073/pnas.231465798.
103. Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem.* 1999;274(13):8359-8362. doi:10.1074/jbc.274.13.8359.
104. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):32-43. doi:10.1038/sj.cdd.4402060.

105. Dinarello CA. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;856:1-11. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08307.x.
106. Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol.* 2004;14(4):184-193. doi:10.1016/j.tcb.2004.03.002.
107. Kuranaga E, Miura M. Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol.* 2007;17(3):135-144. doi:10.1016/j.tcb.2007.01.001.
108. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):44-55. doi:10.1038/sj.cdd.4402047.
109. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015;22(4):526-539. doi:10.1038/cdd.2014.216.
110. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337.
111. Zhang L, Yu J. Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2013;9(4). doi:10.1007/s11888-013-0188-z.
112. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-257. doi:10.1038/bjc.1972.33.
113. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003;171(9):4672-4679. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4672.
114. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407(6805):784-788. doi:10.1038/35037722.
115. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):277-288. doi:10.1038/nrc776.
116. Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(9):1980-1992. doi:10.3109/10428194.2013.855307.
117. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009;23(6):1625-1637. doi:10.1096/fj.08-111005.
118. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501. doi:10.1016/s0092-8674(01)00237-9.
119. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88(3):355-365. doi:10.1016/s0092-8674(00)81874-7.

120. Yoon J-H, Gores GJ. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol.* 2002;37(3):400-410. doi:10.1016/s0168-8278(02)00209-x.
121. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22(53):8543-8567. doi:10.1038/sj.onc.1207107.
122. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem.* 2008;104(4):1124-1149. doi:10.1002/jcb.21707.
123. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94(4):491-501. doi:10.1016/s0092-8674(00)81590-1.
124. Green DR, Llamby F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12). doi:10.1101/cshperspect.a006080.
125. Zhou X, Jiang W, Liu Z, Liu S, Liang X. Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses.* 2017;9(11). doi:10.3390/v9110316.
126. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2). doi:10.3390/ijms19020448.
127. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 2002;108(2):153-164. doi:10.1016/s0092-8674(02)00625-6.
128. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):603-619. doi:10.18632/aging.100934.
129. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116(2):205-219. doi:10.1016/s0092-8674(04)00046-7.
130. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1:S2-19. doi:10.1038/onc.2009.39.
131. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-489. doi:10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
132. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1067-1074. doi:10.1038/sj.cdd.4400601.

133. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993;53(17):3976-3985.
134. Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr Opin Oncol.* 2000;12(5):450-458. doi:10.1097/00001622-200009000-00011.
135. Volm M. Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer Res.* 1998;18(4C):2905-2917.
136. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci.* 2000;25(1):1-6. doi:10.1016/s0968-0004(99)01493-0.
137. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer.* 2018;118(1):9-16. doi:10.1038/bjc.2017.434.
138. Fulda S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;39:20-25. doi:10.1016/j.semcdb.2015.01.006.
139. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
140. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):485-495. doi:10.1093/carcin/21.3.485.
141. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 2004;64(20):7183-7190. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1918.
142. Fulda S. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia.* 2009;23(3):467-476. doi:10.1038/leu.2008.329.
143. Abramson JS, Shipp MA. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood.* 2005;106(4):1164-1174. doi:10.1182/blood-2005-02-0687.
144. Gandour-Edwards R, Mack PC, Devere-White RW, Gumerlock PH. Abnormalities of apoptotic and cell cycle regulatory proteins in distinct histopathologic components of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2004;7(4):321-326. doi:10.1038/sj.pcan.4500749.
145. Watanabe A, Yasuhira S, Inoue T, et al. BCL2 and BCLxL are key determinants of resistance to antitubulin chemotherapeutics in melanoma cells. *Exp Dermatol.* 2013;22(8):518-523. doi:10.1111/exd.12185.
146. Foreman KE, Wrone-Smith T, Boise LH, et al. Kaposi's sarcoma tumor cells preferentially express Bcl-xL. *Am J Pathol.* 1996;149(3):795-803.

147. Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1996;56(10):2422-2427.
148. Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(2):210-213. doi:10.1016/j.biocel.2009.11.015.
149. Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997;388(6638):190-195. doi:10.1038/40657.
150. Shirley S, Micheau O. Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Lett.* 2013;332(2):141-150. doi:10.1016/j.canlet.2010.10.009.
151. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
152. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* 2009;124(3):511-515. doi:10.1002/ijc.24064.
153. Baldi A, Santini D, Russo P, et al. Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Exp Dermatol.* 2004;13(2):93-97. doi:10.1111/j.0906-6705.2004.00136.x.
154. Soengas MS, Capodici P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* 2001;409(6817):207-211. doi:10.1038/35051606.
155. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature.* 2000;404(6780):892-897. doi:10.1038/35009130.
156. Attardi LD, Jacks T. The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(1):48-63. doi:10.1007/s000180050269.
157. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(3):851-858. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.189.
158. Brimmell M, Mendiola R, Mangion J, Packham G. BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene.* 1998;16(14):1803-1812. doi:10.1038/sj.onc.1201704.
159. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science.* 1997;275(5302):967-969. doi:10.1126/science.275.5302.967.
160. Qiu W, Carson-Walter EB, Kuan SF, Zhang L, Yu J. PUMA suppresses intestinal tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* 2009;69(12):4999-5006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0262.

161. Shivapurkar N, Toyooka S, Eby MT, et al. Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(1):65-69. doi:10.4161/cbt.1.1.45.
162. Teitz T, Wei T, Valentine MB, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med.* 2000;6(5):529-535. doi:10.1038/75007.
163. Zuzak TJ, Steinhoff DF, Sutton LN, Phillips PC, Eggert A, Grotzer MA. Loss of caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumour/medulloblastoma. *Eur J Cancer.* 2002;38(1):83-91. doi:10.1016/s0959-8049(01)00355-0.
164. Kim HS, Lee JW, Soung YH, et al. Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology.* 2003;125(3):708-715. doi:10.1016/s0016-5085(03)01059-x.
165. Badawi A, Biyanee A, Nasrullah U, et al. Inhibition of IRES-dependent translation of caspase-2 by HuR confers chemotherapeutic drug resistance in colon carcinoma cells. *Oncotarget.* 2018;9(26):18367-18385. doi:10.18632/oncotarget.24840.
166. Badawi A, Hehlhans S, Pfeilschifter J, Rödel F, Eberhardt W. Silencing of the mRNA-binding protein HuR increases the sensitivity of colorectal cancer cells to ionizing radiation through up-regulation of caspase-2. *Cancer Lett.* 2017;393:103-112. doi:10.1016/j.canlet.2017.02.010.
167. Winkler C, Doller A, Imre G, et al. Attenuation of the ELAV1-like protein HuR sensitizes adenocarcinoma cells to the intrinsic apoptotic pathway by increasing the translation of caspase-2L. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1321. doi:10.1038/cddis.2014.279.
168. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10(2):417-426. doi:10.1016/s1097-2765(02)00599-3.
169. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13). doi:10.3390/ijms20133328.
170. Hamarsheh S, Zeiser R. NLRP3 Inflammasome Activation in Cancer: A Double-Edged Sword. *Front Immunol.* 2020;11:1444. doi:10.3389/fimmu.2020.01444.
171. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* 2004;430(6996):213-218. doi:10.1038/nature02664.
172. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer H-D. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol.* 2007;17(13):1140-1145. doi:10.1016/j.cub.2007.05.074.

173. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2010;12(6):593-605. doi:10.1016/j.cmet.2010.11.011.
174. Abdul-Sater AA, Koo E, Häcker G, Ojcius DM. Inflammasome-dependent caspase-1 activation in cervical epithelial cells stimulates growth of the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem.* 2009;284(39):26789-26796. doi:10.1074/jbc.M109.026823.
175. Yilmaz O, Sater AA, Yao L, Koutouzis T, Pettengill M, Ojcius DM. ATP-dependent activation of an inflammasome in primary gingival epithelial cells infected by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol.* 2010;12(2):188-198. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01390.x.
176. Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity.* 2010;32(3):379-391. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.003.
177. Lissner D, Siegmund B. The multifaceted role of the inflammasome in inflammatory bowel diseases. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1536-1547. doi:10.1100/tsw.2011.139.
178. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 2019;10(2):128. doi:10.1038/s41419-019-1413-8.
179. Erener S, Pétrilli V, Kassner I, et al. Inflammasome-activated caspase 7 cleaves PARP1 to enhance the expression of a subset of NF- κ B target genes. *Mol Cell.* 2012;46(2):200-211. doi:10.1016/j.molcel.2012.02.016.
180. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer.* 2018;17(1):158. doi:10.1186/s12943-018-0900-3.
181. Tsuchiya K. Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications. *Microbiol Immunol.* 2020;64(4):252-269. doi:10.1111/1348-0421.12771.
182. Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem Sci.* 2017;42(4):245-254. doi:10.1016/j.tibs.2016.10.004.
183. Lee K-H, Kang T-B. The Molecular Links between Cell Death and Inflammasome. *Cells.* 2019;8(9). doi:10.3390/cells8091057.
184. Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, et al. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. *Nat Commun.* 2019;10(1):2091. doi:10.1038/s41467-019-09753-2.

185. Taabazuing CY, Okondo MC, Bachovchin DA. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. *Cell Chem Biol.* 2017;24(4):507-514.e4. doi:10.1016/j.chembiol.2017.03.009.
186. Chen KW, Demarco B, Heilig R, et al. Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP3 inflammasome assembly. *EMBO J.* 2019;38(10). doi:10.15252/embj.2019101638.
187. Lopez-Castejon G. Control of the inflammasome by the ubiquitin system. *FEBS J.* 2020;287(1):11-26. doi:10.1111/febs.15118.
188. Song H, Liu B, Huai W, et al. The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nat Commun.* 2016;7:13727. doi:10.1038/ncomms13727.
189. Humphries F, Bergin R, Jackson R, et al. The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun.* 2018;9(1):1560. doi:10.1038/s41467-018-03669-z.
190. Yang L, Xia H. TRIM Proteins in Inflammation: from Expression to Emerging Regulatory Mechanisms. *Inflammation.* 2021;44(3):811-820. doi:10.1007/s10753-020-01394-8.
191. Thomas PG, Dash P, Aldridge JR, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity.* 2009;30(4):566-575. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.006.
192. Allen IC, Scull MA, Moore CB, et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity.* 2009;30(4):556-565. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.005.
193. Gross O, Poeck H, Bscheider M, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature.* 2009;459(7245):433-436. doi:10.1038/nature07965.
194. Greaney AJ, Leppla SH, Moayeri M. Bacterial Exotoxins and the Inflammasome. *Front Immunol.* 2015;6:570. doi:10.3389/fimmu.2015.00570.
195. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
196. Mathur A, Hayward JA, Man SM. Molecular mechanisms of inflammasome signaling. *J Leukoc Biol.* 2018;103(2):233-257. doi:10.1189/jlb.3MR0617-250R.
197. Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol.* 2011;166(1):1-15. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04440.x.

198. Pellegrini C, Antonioli L, Lopez-Castejon G, Blandizzi C, Fornai M. Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. *Front Immunol*. 2017;8:36. doi:10.3389/fimmu.2017.00036.
199. Zhen Y, Zhang H. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*. 2019;10:276. doi:10.3389/fimmu.2019.00276.
200. Hirota SA, Ng J, Lueng A, et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(6):1359-1372. doi:10.1002/ibd.21478.
201. Zhang J, Fu S, Sun S, Li Z, Guo B. Inflammasome activation has an important role in the development of spontaneous colitis. *Mucosal Immunol*. 2014;7(5):1139-1150. doi:10.1038/mi.2014.1.
202. Bauer C, Duewell P, Mayer C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2010;59(9):1192-1199. doi:10.1136/gut.2009.197822.
203. Karki R, Man SM, Kanneganti T-D. Inflammasomes and Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(2):94-99. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0269.
204. Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature*. 2012;491(7423):259-263. doi:10.1038/nature11535.
205. Allen IC, TeKippe EM, Woodford R-MT, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*. 2010;207(5):1045-1056. doi:10.1084/jem.20100050.
206. Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol*. 2010;185(8):4912-4920. doi:10.4049/jimmunol.1002046.
207. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
208. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2016;7(3):105-114. Published September 30, 2016.
209. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-532. doi:10.1056/NEJM198809013190901.

210. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*. 2019;11(1). doi:10.3390/nu11010164.
211. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*. 2007;21(20):2525-2538. doi:10.1101/gad.1593107.
212. Burt RW. Colon cancer screening. *Gastroenterology*. 2000;119(3):837-853. doi:10.1053/gast.2000.16508.
213. Eberhardt W, Nasrullah U, Haeussler K. Inhibition of Caspase-2 Translation by the mRNA Binding Protein HuR: A Novel Path of Therapy Resistance in Colon Carcinoma Cells? *Cells*. 2019;8(8). doi:10.3390/cells8080797.
214. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci*. 2019;9:97. doi:10.1186/s13578-019-0361-4.
215. Rosa M de, Pace U, Rega D, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 2015;34(3):1087-1096. doi:10.3892/or.2015.4108.
216. Liu X, Ji Q, Fan Z, Li Q. Cellular signaling pathways implicated in metastasis of colorectal cancer and the associated targeted agents. *Future Oncol*. 2015;11(21):2911-2922. doi:10.2217/fon.15.235.
217. Audic Y, Hartley RS. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell*. 2004;96(7):479-498. doi:10.1016/j.biolcel.2004.05.002.
218. Legrand N, Dixon DA, Sobolewski C. AU-rich element-binding proteins in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2019;11(2):71-90. doi:10.4251/wjgo.v11.i2.71.
219. Wang H. MicroRNAs and Apoptosis in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15). doi:10.3390/ijms21155353.
220. Johdi NA, Sukor NF. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Front Immunol*. 2020;11:1624. doi:10.3389/fimmu.2020.01624.
221. Xie Y-H, Chen Y-X, Fang J-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):22. doi:10.1038/s41392-020-0116-z.
222. McQuade RM, Stojanovska V, Bornstein JC, Nurgali K. Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Curr Med Chem*. 2017;24(15):1537-1557. doi:10.2174/0929867324666170111152436.
223. Piawah S, Venook AP. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the

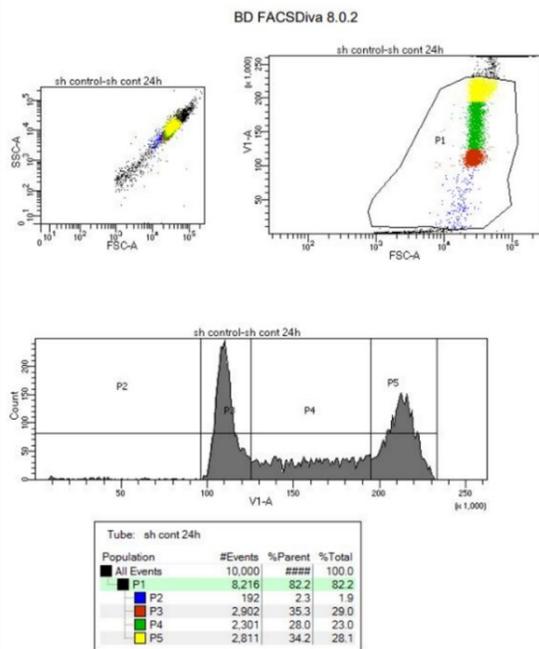
- treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2019;125(23):4139-4147.
doi:10.1002/cncr.32163.
224. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(3):145-164. doi:10.3322/caac.21601.
225. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30. doi:10.3322/caac.21590.
226. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
227. Lamkanfi M, Kanneganti T-D, van Damme P, et al. Targeted peptide-centric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(12):2350-2363. doi:10.1074/mcp.M800132-MCP200.
228. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006;440(7081):228-232. doi:10.1038/nature04515.
229. Wang T, Jin C, Yang P, et al. UBE2J1 inhibits colorectal cancer progression by promoting ubiquitination and degradation of RPS3. *Oncogene*. 2023;42(9):651-664. doi:10.1038/s41388-022-02581-7.
230. Ren G, Li H, Hong D, et al. LINC00955 suppresses colorectal cancer growth by acting as a molecular scaffold of TRIM25 and Sp1 to inhibit DNMT3B-mediated methylation of the PHIP promoter. *BMC Cancer*. 2023;23(1):898. doi:10.1186/s12885-023-11403-2.
231. Singh HD, Otano I, Rombouts K, et al. TRAIL regulatory receptors constrain human hepatic stellate cell apoptosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5514. doi:10.1038/s41598-017-05845-5.
232. Li C, Zhang X, Kang X, et al. Upregulated TRAIL and Reduced DcR2 Mediate Apoptosis of Decidual PMN-MDSC in Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Front Immunol*. 2020;11:1345. doi:10.3389/fimmu.2020.01345.
233. Clancy L, Mruk K, Archer K, et al. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18099-18104. doi:10.1073/pnas.0507329102.
234. Tawfik D, Groth C, Gundlach J-P, et al. TRAIL-Receptor 4 Modulates $\gamma\delta$ T Cell-Cytotoxicity Toward Cancer Cells. *Front Immunol*. 2019;10:2044. doi:10.3389/fimmu.2019.02044.
235. Lalaoui N, Morlé A, Mérino D, et al. TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. *PLoS One*. 2011;6(5):e19679. doi:10.1371/journal.pone.0019679.

236. Lamkanfi M, Kanneganti T-D. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(1):21-24. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.013.
237. Deng N-H, Zhou Z-X, Liu H-T, et al. TRIMs: Generalists Regulating the NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. *DNA Cell Biol.* 2022;41(3):262-275. doi:10.1089/dna.2021.0943.
238. Jiang M, Qi L, Li L, Li Y. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discov.* 2020;6:112. doi:10.1038/s41420-020-00349-0.
239. Zhang X, Hu X, Rao X. Apoptosis induced by Staphylococcus aureus toxins. *Microbiol Res.* 2017;205:19-24. doi:10.1016/j.micres.2017.08.006.
240. Mussbacher M, Derler M, Basílio J, Schmid JA. NF- κ B in monocytes and macrophages - an inflammatory master regulator in multitalented immune cells. *Front Immunol.* 2023;14:1134661. doi:10.3389/fimmu.2023.1134661.
241. Malireddi RKS, Ippagunta S, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. Cutting edge: proteolytic inactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 by the Nlrp3 and Nlrc4 inflammasomes. *J Immunol.* 2010;185(6):3127-3130. doi:10.4049/jimmunol.1001512.
242. Lin Y, Lv X, Sun C, et al. TRIM50 promotes NLRP3 inflammasome activation by directly inducing NLRP3 oligomerization. *EMBO Rep.* 2022;23(11):e54569. doi:10.15252/embr.202154569.
243. Xie X, Wang F, Li X. Inhibition of TRIM14 protects cerebral ischemia/reperfusion injury through regulating NF- κ B/NLRP3 pathway-mediated inflammation and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res.* 2022;42(2):197-205. doi:10.1080/10799893.2021.1887218.
244. Kang C, Lu Z, Zhu G, Chen Y, Wu Y. Knockdown of TRIM22 Relieves Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Apoptosis and Inflammation Through Inhibition of NF- κ B/NLRP3 Axis. *Cell Mol Neurobiol.* 2021;41(2):341-351. doi:10.1007/s10571-020-00855-w.
245. Liu Y, Liu K, Huang Y, et al. TRIM25 Promotes TNF- α -Induced NF- κ B Activation through Potentiating the K63-Linked Ubiquitination of TRAF2. *J Immunol.* 2020;204(6):1499-1507. doi:10.4049/jimmunol.1900482.
246. Park H-S, Lu Y, Pandey K, Liu G, Zhou Y. NLRP3 Inflammasome Activation Enhanced by TRIM25 is Targeted by the NS1 Protein of 2009 Pandemic Influenza A Virus. *Front Microbiol.* 2021;12:778950. doi:10.3389/fmicb.2021.778950.
247. Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(9):746-759. doi:10.1016/j.addr.2009.04.004.

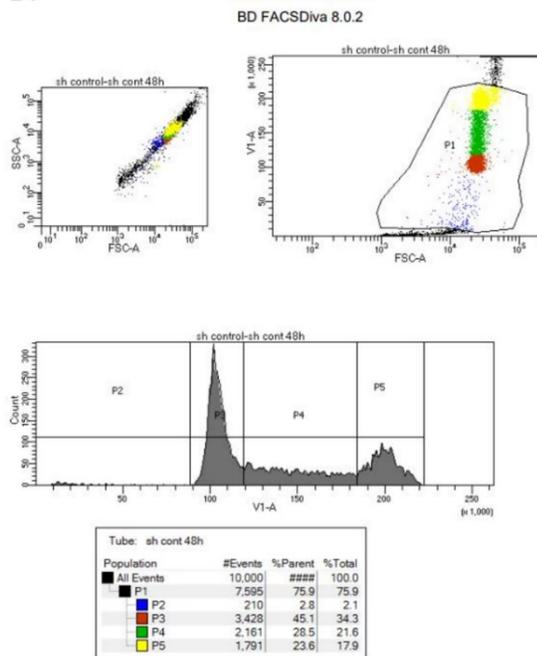
-
248. Aigner A. Cellular delivery in vivo of siRNA-based therapeutics. *Curr Pharm Des.* 2008;14(34):3603-3619. doi:10.2174/138161208786898815.
249. Kleinhammer A, Wurst W, Kühn R. Gene knockdown in the mouse through RNAi. *Methods Enzymol.* 2010;477:387-414. doi:10.1016/S0076-6879(10)77020-8.
250. Lamb YN. Inclisiran: First Approval. *Drugs.* 2021;81(3):389-395. doi:10.1007/s40265-021-01473-6.

Anhang

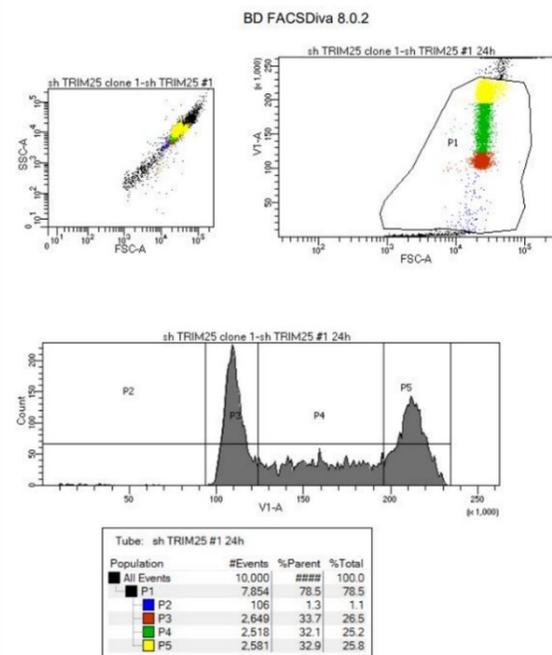
A.



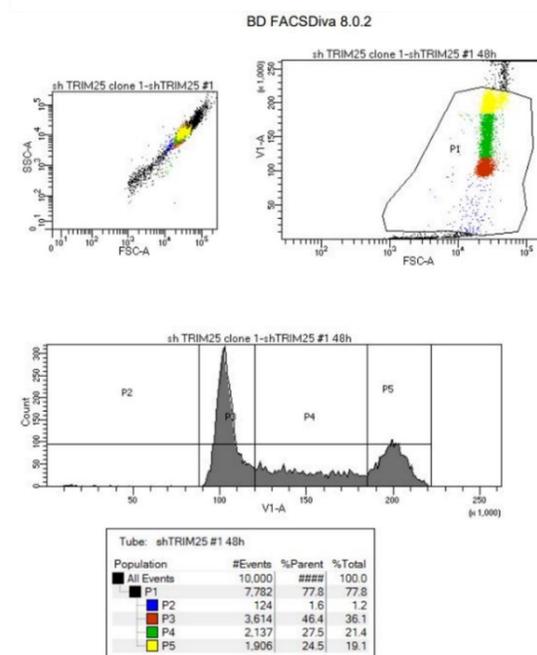
B.

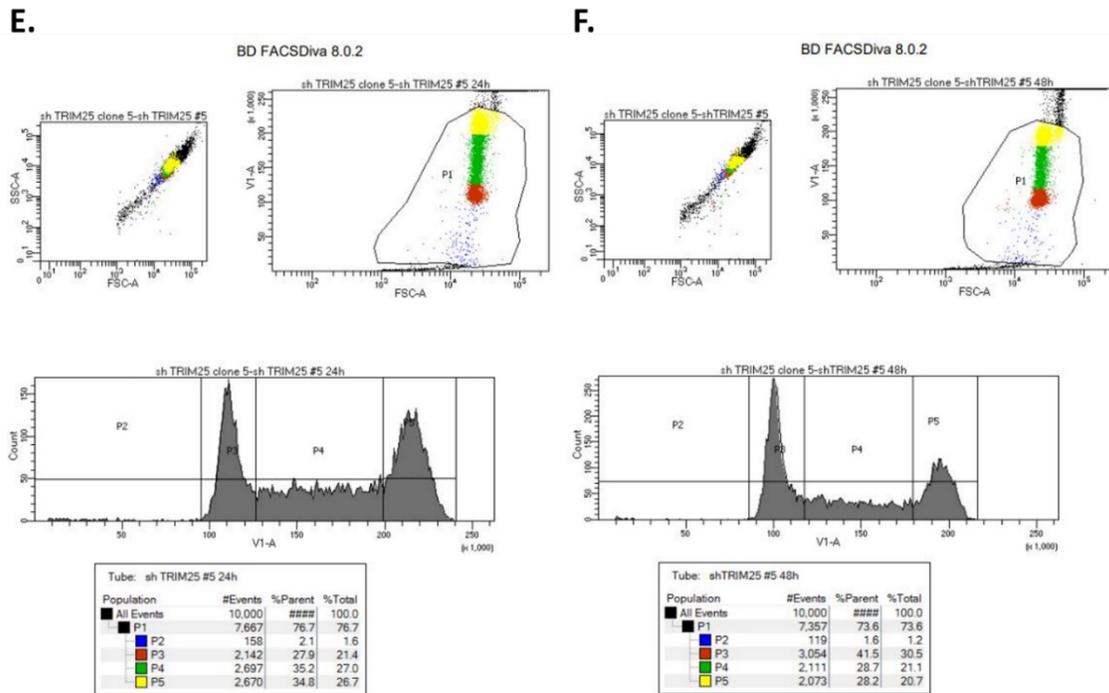


C.



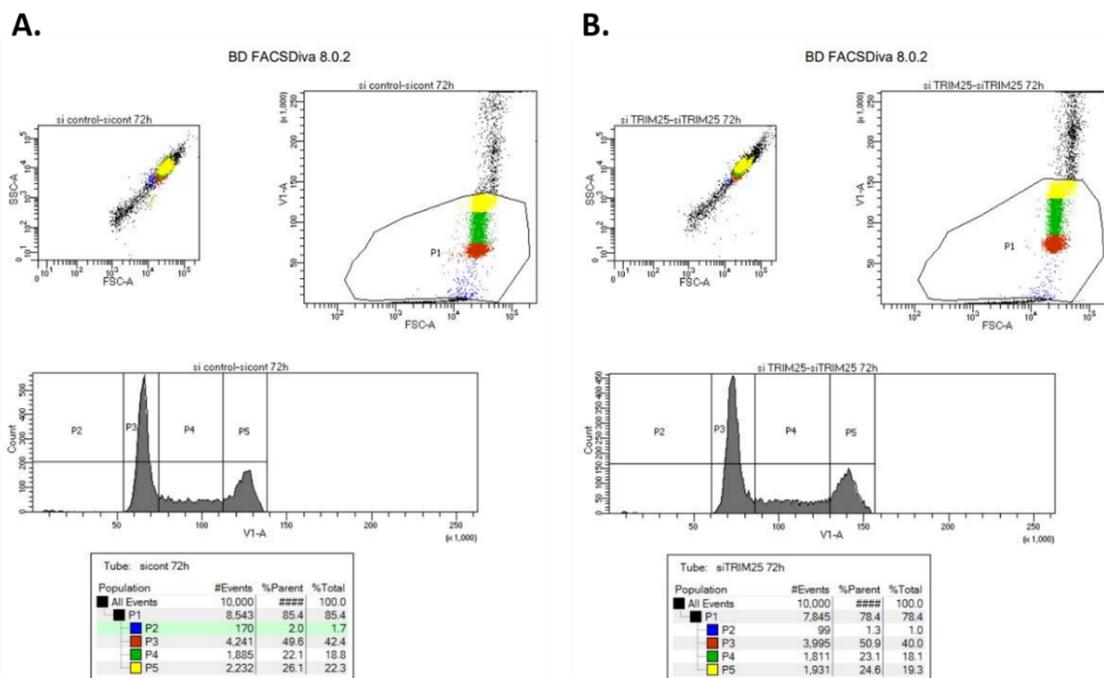
D.





Anhang 1. Gating der Zellzyklusanalysen bei stabilem TRIM25 Knockdown

A. shCtrl. 24 h, B. shCtrl. 48 h, C. shTRIM25 #1 24 h, D. shTRIM25 #1 48 h, E. shTRIM25 #5 24 h, F. shTRIM25 #5 48 h. P2 entspricht der Sub-G₁-Phase, P3 der G₁-Phase, P4 der S-Phase und P5 der G₂-Phase.



Anhang 2. Gating der Zellzyklusanalysen bei transientem TRIM25 Knockdown

A. siCtrl., B. siTRIM25. P2 entspricht der Sub-G₁-Phase, P3 der G₁-Phase, P4 der S-Phase und P5 der G₂-Phase.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung und funktionelle Analyse von humanen Kolonkarzinomzelllinien mit stabilem genetischem Knockdown von TRIM25

in dem Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Eberhardt mit Unterstützung durch Frau Dr. Kristina Stanke, Herr Dr. Usman Nasrullah und Frau Roswitha Müller ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Nasrullah U, Stanke K, Recknagel V, et al., The E3 Ligase TRIM25 Impairs Apoptotic Cell Death in Colon Carcinoma Cells via Destabilization of Caspase-7 mRNA: A Possible Role of hnRNPH1, *Cells*, 12(1), 201, 2023

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich während meines Studiums, bei der Arbeit im Labor sowie der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Josef Pfeilschifter, Direktor des Instituts für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M., welcher mir die Möglichkeit gegeben und die notwendigen Mittel zur Verfügung gestellt hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Eberhardt, meinem Doktorvater, danke ich besonders für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft während der Umsetzung der gesamten Doktorarbeit. Auch für die mühevollen Korrekturarbeiten sowie die stets geöffnete Tür möchte ich mich herzlich bedanken.

Meinen besonderen Dank spreche ich auch meiner gesamten Arbeitsgruppe aus, insbesondere Frau Dr. Kristina Stanke, meiner Betreuerin im Labor, Herrn Dr. Usman Nasrullah und Frau Roswitha Müller, für die vielen wertvollen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft, welche wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Einen Dank möchte ich an dieser Stelle auch an Herrn Dr. Gergely Imre für die Generierung der stabilen *Knockdown* Zellen richten.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die unermüdliche, uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums und meiner Doktorarbeit, welche mir die notwendige Ruhe und Sicherheit für die Erstellung dieser Arbeit gab. Auch meinen Geschwistern, Großeltern und Schwiegereltern möchte ich für die Rücksichtnahme, die steten Ermutigungen und die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit danken. Zuletzt möchte ich meinem zukünftigen Ehemann von Herzen danken, welcher mich schon seit mehr als einem Drittel meines Lebens stetig in all meinen Herausforderungen unterstützt und sich dabei selbst häufig verständnisvoll hintenanstellt.