
Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische
Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und
Altersmedizin

(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE ROLLE VON CALCINEURIN UND NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED
T CELLS IN DER KOLOREKTALEN KARZINOGENESE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
STEFANIE MUFF
aus Kiel

Kiel 2017

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Sebastian Zeißig

2. Berichtstatter: Prof. Dr. André Franke

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.11.2017

gez.: Priv.-Doz. Dr. Mark Ellrichmann

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms	1
1.2 Sporadische kolorektale Karzinome	1
1.3 Hereditäre kolorektale Karzinome	2
1.4 Entzündung in der kolorektalen Karzinogenese	3
1.5 Der Calcineurin-NFAT-Signalweg	4
1.5.1 Calcineurin	4
1.5.2 NFAT	5
1.5.3 Interaktion von Calcineurin und NFAT und ihre Rolle im kolorektalen Karzinom	5
1.6 Fragestellungen und Zielsetzungen	6
2 Material	8
2.1 Primer	8
2.2 Plasmide	8
2.3 Antikörper	9
2.4 Stimulanzien und Inhibitoren	10
2.5 Zelllinien	11
2.6 sh-RNA-Viren	12
2.7 Kits	13
2.8 Verbrauchsmaterialien	14
2.9 Puffer	16
2.10 Medien	17
2.11 Geräte und Apparaturen	18
3 Methoden	20
3.1 Mausmodelle	20
3.2 Zellkultur	22
3.3 Proteinextraktion aus Maus-Dünndarm und Zelllinien	22

3.3.1	Gesamtzelllysate von Zelllinien	22
3.3.2	Gesamtzelllysate von Maus-Dünndarm und humanen Kolonbiopsien	22
3.3.3	Fraktionierte Kern- und Zytoplasmalysate	22
3.4	Proteinquantifizierung	23
3.5	Western Blot-Analyse	23
3.6	RNA-Isolation aus Maus-Dünndarm und Zelllinien, cDNA-Synthese und quantitative Polymerase-Kettenreaktion	24
3.7	Luciferase Reporterassay	26
3.8	Generierung von <i>knockdown</i> -Zelllinien aus SW-707 mittels lentiviraler shRNA-Transduktion	27
3.9	Lentivirale Transduktion und antibiotische Selektion	27
3.9.1	Selektion von <i>knockdown</i> -Klonen	28
3.10	MTT-Assay	28
3.11	Wundheilungsassay	29
3.12	Durchflusszytometrie	29
3.12.1	Bromdesoxyuridin (BrdU)	29
3.12.2	PARP	29
3.13	Anfertigung von histologischen Schnitten und Immunfärbungen	30
3.13.1	Ki-67-Immunfluoreszenz	31
3.13.2	Cleaved Caspase-3-Immunfluoreszenz	31
3.13.3	Calcineurin B1-Immunhistochemie	31
3.14	Mikroskopie und Auswertung der histologischen Schnitte	32
3.15	Statistik	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Der Einfluss von intestinal-epitheliale Calcineurin auf Inzidenz und Wachstum intestinaler Tumoren im <i>Apc</i> ^{Min/+} -Modell	33
4.2	Proliferationsrate in Maus-Dünndarmtumoren	37
4.3	Apoptoserate in Maus-Dünndarmtumoren	39
4.4	Expression von NFAT in humanen Kolonkarzinomzelllinien	41
4.5	Zell-autonome Effekte einer Calcineurin- und NFATc3-Deletion in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien	42

4.5.1	Effekte einer Calcineurin- und NFATc3-Inhibition auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen	44
4.5.2	Effekte einer Calcineurin- und NFATc3-Inhibition auf die Apoptose	48
4.6	Einfluss von Toll-like-Rezeptor-Agonisten auf den Calcineurin-NFAT-Signalweg in intestinalen Epithelzellen	50
5	Diskussion	52
5.1	Intestinal-epitheliales Calcineurin fördert die Proliferation und hemmt die Apoptose von intestinalen Tumorzellen	53
5.2	TLR-Signale in der Aktivierung von epithelialelem Calcineurin und NFAT	54
5.3	Funktionelle Redundanz der NFAT-Familienmitglieder	57
6	Zusammenfassung und Perspektive	58
7	Literaturverzeichnis	59
8	Danksagung	65
9	Anhang	66
9.1	Erklärung Doktorarbeit	66
10	Lebenslauf	67

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Calcineurin B1-Deletion in Villin-exprimierenden Zellen.....	21
Abb. 2. Immunhistochemie-Färbung von Calcineurin B im Dünndarm von Wildtyp <i>Apc</i> ^{Min/+} -Mäusen.....	33
Abb. 3. Immunhistochemie-Färbung von Calcineurin B im Dünndarm von <i>Cnb1</i> ^{ΔIEC} ; <i>Apc</i> ^{Min/+} -Mäusen.	33
Abb. 4. Anzahl der Dünndarntumoren 18 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.....	35
Abb. 5. Größenverteilung der Dünndarntumoren 18 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.	35
Abb. 6. Anzahl der Mikroadenome im Dünndarm 6 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.	36
Abb. 7. Proliferationsrate in Dünndarntumoren 18 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.	37
Abb. 8. Repräsentative Ki-67-Färbungen in Dünndarntumoren 18 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.....	38
Abb. 9. Apoptoserate in Dünndarntumoren 18 Wochen alter Mäuse.....	39
Abb. 10. Repräsentative cleaved Caspase-3-Färbungen in Dünndarntumoren 18 Wochen alter Mäuse (100-fache Vergrößerung).	40
Abb. 11. Western Blot-Analyse der Expression von NFATc1-c4 in Gesamtzelllysaten kolorektaler Karzinomzelllinien.....	41
Abb. 12. Quantitative PCR für Calcineurin B1 (A) und NFATc3 (B) in nicht- transduzierten SW-707-Zellen und stabilen SW-707-Klonen mit der genannten shRNA-Expression.	43
Abb. 13. NFAT-abhängige Luciferase-Expression in nicht-transduzierten SW- 707-Zellen und stabilen SW-707-Klonen mit der genannten shRNA- Expression.....	43
Abb. 14. Proliferationsbestimmung von SW-707-Zellen mittels MTT-Assay.....	45
Abb. 15. Qualitative PCR von NFATc1 (A) und NFATc2 (B) in stabilen SW-707- Klonen mit der genannten shRNA-Expression.	46
Abb. 16. Wundheilungssassay in SW-707-Zellen.....	47
Abb. 17. PARP-Durchflusszytometrie zur Analyse der Apoptose von SW-707- Zellen.....	48

Abb. 18. Analyse der Sub-G ₀ /G ₁ -Population von SW-707-Zellen mittels BrdU-Durchflusszytometrie.....	49
Abb. 19. Luciferase-Assay der Zelllinie MODE-K nach Transfektion der Plasmide pNFAT-Luc oder pNF-κB-Luc und Stimulation mit Toll-like-Rezeptor-Agonisten.....	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Primer	8
Tabelle 2. Verwendete Plasmide	8
Tabelle 3. Verwendete Antikörper	9
Tabelle 4. Verwendete Stimulanzien und Inhibitoren.....	10
Tabelle 5. Verwendete Zelllinien.....	11
Tabelle 6. Verwendete Viren mit sh-RNA-Vektor.....	12
Tabelle 7. Verwendete Kits.....	13
Tabelle 8. Verwendete Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 9. Verwendete Puffer	16
Tabelle 10. Verwendete Medien	17
Tabelle 11. Verwendete Geräte und Apparaturen	18
Tabelle 12. Absteigende Alkoholreihe	30

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous polyposis coli
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CK 1	Casein-Kinase 1
CnA	Calcineurin A
CnB	Calcineurin B
COX-2	Cyclooxygenase-2
CsA	Ciclosporin A
DAB	Diaminobenzidin
DAMPs	damage associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSS	dextran sodium sulfate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
FBS	fötales bovines Serum
I κ B	Inhibitor of κ B
IL-6	Interleukin-6
Ionomycin	Io
JAK	Januskinase
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
HNPCC	hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase

loxP	locus of X-over of P1
LPS	Lipopolysaccharid
MAMPs	microbe-associated molecular patterns
MAP	Mitogen-Activated Protein
Min	multiple intestinal neoplasia
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF-κB	Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells
NP-40	Nonidet P-40
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	PBS mit Triton
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PLC	Phospholipase C
PIP ₂	Poly-Inositol-poly-Cytidin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B
Ras	Rat sarcoma
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS mit Triton
TLR	Toll-like-Rezeptor

T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Wnt	Wingless, Int-1

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

K. Peuker*, **S. Muff***, J. Wang, S. Kunzel, E. Bosse, Y. Zeissig, G. Luzzi, M. Basic, A. Strigli, A. Ulbricht, A. Kaser, A. Arlt, T. Chavakis, G. R. van den Brink, C. Schafmayer, J.-H. Egberts, T. Becker, M. E. Bianchi, A. Bleich, C. Rocken, J. Hampe, S. Schreiber, J. F. Baines, R. S. Blumberg and S. Zeissig, *Epithelial calcineurin controls microbiota-dependent intestinal tumor development.*

Nature Medicine **22**, 506–515, (2016)

**These authors contributed equally to this work*

Einleitung

1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom zählt zu den Krebserkrankungen mit den höchsten Inzidenzen in Deutschland. Bei Frauen ist es nach dem Mamma-Karzinom die zweithäufigste Entität, bei Männern steht es hinter dem Prostatakarzinom und Malignomen der Lunge an dritter Stelle [1]. Bei Männer wird die Diagnose im Mittel mit 71 Jahren gestellt, bei Frauen mit 75 Jahren [1]. Das kolorektale Karzinom zählt zu den Krebserkrankungen mit einer mittleren Prognose. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate hat sich zwar seit den 1980er Jahren von 45 % auf über 60 % deutlich verbessert, ist aber noch immer geringer als bei anderen häufigen Krebserkrankungen (Mamma-Karzinom 87 %, Prostata-Karzinom 93 %) [1]. Kolorektale Karzinome sind histologisch fast ausschließlich Adenokarzinome (96 %), selten treten auch andere histologische Typen auf [2]. 60 % der Karzinome sind im Rektum und Colon sigmoideum lokalisiert und mithilfe einer Rektosigmoidoskopie einsehbar [3].

Es ist mittlerweile eine Vielzahl an Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms bekannt. Zu den Risikofaktoren zählen Alter, erbliche familiäre Belastung, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und das Vorhandensein von Adenomen, solange diese nicht abgetragen werden [4-7]. Zu den Risikofaktoren, die mit dem Lebenswandel assoziiert sind, gehören eine fett- und fleischreiche Ernährung, Rauchen sowie regelmäßiger Alkoholkonsum [8-10].

Trotz der Möglichkeit zur Teilnahme an Früherkennungsmaßnahmen seit 2002 wird ein Großteil der kolorektalen Karzinome erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert [7]. Aus diesem Grund ist es notwendig, die molekulare Pathogenese des kolorektalen Karzinoms noch genauer aufzuklären. Nur so ist es möglich, Entstehungsmechanismen zu verstehen und gezielte Therapien zu entwickeln, um die Prognose der Betroffenen zu verbessern und die Heilungschancen zu vergrößern.

1.2 Sporadische kolorektale Karzinome

Den größten Anteil der kolorektalen Karzinome machen die sporadisch auftretenden Karzinome mit etwa 75 % aus [5]. Fast alle entstehen aus Adenomen entsprechend der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein und Fearon [11, 12]. Diese besagt,

dass in einem vorbestehenden Adenom sukzessive Mutationen in Onkogenen, Funktionsverluste von Tumorsuppressorgenen und chromosomale Deletionen auftreten. Im Verlauf nehmen Größe und Maß an Dysplasie des Adenoms zu, bis es schließlich maligne entartet. Initial ereignet sich oft die Mutation des Tumorsuppressorgens *Adenomatous polyposis coli (APC)*. Das APC-Protein ist Bestandteil eines Degradationskomplexes im Wnt-Signalweg und führt zum Abbau von β -Catenin. Ist die Funktion von APC durch eine Mutation gestört, akkumuliert β -Catenin im Zellkern und bewirkt ein persistentes Wnt-Signal [13, 14]. Bis zu 80 % aller Adenome und kolorektalen Karzinome weisen diese Mutation auf [15, 16]. Später mutieren häufig Onkogene wie *Rat sarcoma (RAS)* und es kommt zum Verlust des Tumorsuppressorgens *TP53*. Neben Mutationen und Deletionen spielen auch epigenetische Veränderungen wie Hyper- und Hypomethylierung von Genen in der Karzinomentstehung eine Rolle [12].

1.3 Hereditäre kolorektale Karzinome

Nur etwa 15 % der kolorektalen Karzinome entwickeln sich auf dem Boden einer hereditären Ursache [17]. Dazu zählen unter anderem das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Beim HNPCC, auch Lynch-Syndrom genannt, handelt es sich um einen autosomal-dominanten Erbgang. Die Ursache des HNPCC ist eine Mikrosatelliteninstabilität in DNA-Mismatch-Reparaturproteinen. Es entstehen dabei syn- oder metachron mehrere kolorektale Karzinome. Außerdem besteht ein erhöhtes Risiko für weitere Krebserkrankungen [18, 19]. Das HNPCC macht etwa 2-6 % aller kolorektalen Karzinome aus [5]. Bei der FAP kommt es durch eine autosomal-dominant vererbte Mutation zum Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *APC* und es entstehen hunderte bis tausende Adenome im Kolon und Rektum, sodass das Risiko der Entartung mindestens einer dieser Vorstufen nahezu 100 % beträgt [20]. Die FAP ruft weniger als 1 % der kolorektalen Karzinome hervor [5]. Außer den genannten Ursachen gibt es noch eine große Anzahl weiterer Syndrome und assoziierter Mutationen, die das Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms erhöhen.

1.4 Entzündung in der kolorektalen Karzinogenese

Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben ein statistisch deutlich erhöhtes Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Das Erkrankungsrisiko ist abhängig von der Dauer und der Schwere der chronischen Entzündung, die angegebenen Inzidenzen variieren jedoch zum Teil stark. Laut der bekanntesten Veröffentlichung mit Daten von 1925-1999 entwickeln 2 % der Patienten nach einer Krankheitsdauer von zehn Jahren ein kolorektales Karzinom, nach 30 Jahren sind es 18 % [21]. Andere Studien nennen eine Inzidenz von circa 1 % nach zehn Jahren Erkrankungsdauer und deutlich unter 10 % nach 30 Jahren [22].

Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass Entzündungs-assoziierte Signalwege auch ohne das Vorliegen einer offensichtlichen chronisch-entzündlichen Darmerkrankung eine wesentliche Rolle in der kolorektalen Karzinogenese spielen [23]. Zu den Mediatoren Entzündungs-assoziiierter Signalwege zählen unter anderem Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) und Nuclear Factor (NF)- κ B, die wichtige Aufgaben in myeloischen und lymphatischen Zellen inne haben.

Bei NF- κ B handelt sich dabei um eine Gruppe von Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Expression ihrer Zielgene wie IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) nehmen [24-27]. Der klassische NF- κ B-Signalweg wird über die Mikrobiota, Virusinfektionen oder inflammatorische Zytokine durch Rezeptoren wie den *receptor activator of nuclear factor kappa B* (RANK) oder Toll-like-Rezeptoren (TLR) aktiviert. NF- κ B besitzt wichtige immunologische Funktionen, reguliert Zellproliferation und Apoptose und wird auch in Zusammenhang mit Entzündungsinitiation, Autoimmun- und Krebserkrankungen gebracht [28]. In vielen humanen Tumoren sind NF- κ B-Gene oder die seiner Regulatoren mutiert. Dies führt zu einer konstitutiven Aktivität von NF- κ B mit pro-proliferativen und anti-apoptotischen Effekten [29, 30]. Darüber hinaus ist bekannt, dass NF- κ B auch die Entzündungs-assoziierte Tumorgenese fördert. Dies geschieht zum einen über zellintrinsische Effekte in den Enterozyten, zum anderen über Immunzellen und die Wirkung von Zytokinen [31-33].

STAT3 gehört zur Familie der STAT-Proteine, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren. Sie werden überwiegend durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und nehmen Einfluss auf Zellproliferation, -wachstum,

sowie –differenzierung und spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem [34]. In kolorektalen Karzinomen korreliert die Expression von aktiviertem STAT3 mit einer schlechten Prognose [35]. Viren und Bakterien können zu einer STAT3-Aktivierung führen und so ihr onkogenes Potential entfalten. So aktivieren Bakterienbestandteile den STAT3-Signalweg über Toll-like-Rezeptoren und triggern im Falle des enterotoxischen Bakterium *Bacteroides fragilis* über eine Colitis die Karzinogenese [36, 37]. IL-6 kann STAT3 auch direkt über gp130 und Januskinase (JAK) aktivieren und bewirkt eine chronische Entzündung, die zu einer entzündungsassoziierten Tumorgenese führen kann [38, 39].

Die Genese von sporadischen und hereditären Karzinomen unterscheidet sich in einigen Punkten von den Entzündungs-assoziierten Karzinomen, besonders in Hinblick auf den Stellenwert der inflammatorischen Signalwege. Dennoch gibt es auch deutliche Überschneidungen, die eine klare Trennung der Entitäten erschweren. So treten auch während der inflammatorischen Karzinogenese Mutationen in Genen wie *TP53* oder *APC* auf und sowohl sporadische als auch Entzündungs-assoziierte Karzinome scheinen durch die intestinale Mikrobiota beeinflusst zu werden [23]. Bemerkenswert ist weiter, dass auch sporadische Karzinome Eigenschaften von inflammatorischen Tumoren aufweisen, wie erhöhte proinflammatorische Zytokine oder eine Infiltration mit Entzündungszellen [23]. Weiter gibt es Evidenz dafür, dass inflammatorische Signalwege wie NF- κ B und STAT3 in nicht-inflammatorischen kolorektalen Karzinomen konstitutiv aktiviert sind [40, 41].

1.5 Der Calcineurin-NFAT-Signalweg

Der Calcineurin-NFAT-Signalweg ist ursprünglich aus seiner Rolle in T-Zellen des Immunsystems bekannt [42]. Neuere Erkenntnisse sprechen auch für eine Beteiligung in der Karzinomentstehung. Zunächst sollen beide Interaktionspartner einzeln vorgestellt werden.

1.5.1 Calcineurin

Calcineurin ist eine Calcium- und Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase und ein Heterodimer aus einer katalytischen A-Untereinheit (Calcineurin A, CnA) und einer regulatorischen B-Untereinheit (Calcineurin B, CnB). Calcineurin A kommt in drei Isoformen vor (α , β und γ), deren Expression je nach Gewebe variiert. Von Calcineurin B existieren zwei Isoformen, von denen Calcineurin B2 (CnB2) ausschließlich im Hoden exprimiert wird, Calcineurin B1 (CnB1) in allen

anderen Geweben [43-45]. Bei einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration binden Calciumionen an Calmodulin, welches auf diese Weise aktiviert wird. Weitere Calciumionen binden an die B-Untereinheit von Calcineurin und führen dort zu einer Konformationsänderung [46]. Die autoinhibitorische Domäne von CnA löst sich daraufhin ab und es kommt zu einer Teilaktivierung des Enzyms [47]. Nach Bindung eines Komplexes aus Calciumionen und Calmodulin an CnA geht das Enzym in seine katalytisch aktive Form über und kann andere Proteine dephosphorylieren [48]. Wichtige Interaktionspartner von Calcineurin stellen Transkriptionsfaktoren der Familie der *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) dar.

1.5.2 NFAT

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Proteinen und wurde zuerst in T-Zellen beschrieben, spielt aber ebenso eine bedeutende Rolle in weiteren Immunzellen und wird auch in Geweben außerhalb des Immunsystems exprimiert [49-51]. Alle Isoformen tragen eine DNA-Bindungsdomäne, die der entsprechenden Domäne der Rel-Familie ähnelt, und eine NFAT-Homologie-Region [52, 53]. Vier NFAT-Faktoren (NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4) werden über die intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert, die Aktivierung von NFAT5 erfolgt über osmotischen Stress der Zelle [54-56]. Durch Calcineurin dephosphoryliertes und somit aktiviertes NFAT transloziert in den Zellkern und nimmt Einfluss auf die Expression einer Vielzahl verschiedener Gene [57, 58]. NFAT wird im Kern durch Enzyme wie Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) und Casein-Kinase 1 (CK1) erneut phosphoryliert, geht dadurch in seine inaktive Form über und wird mittels Exportkinasen zurück in das Zytoplasma transportiert [59, 60]. NFAT-Proteine können als einzelne Transkriptionsfaktoren agieren oder aber im Komplex mit anderen an die DNA binden. Ein wichtiger Interaktionspartner von NFAT ist der Transkriptionsfaktor AP-1, mit dessen Hilfe sich die Stabilität der DNA-Bindung deutlich steigert [61, 62]. Kooperierende Transkriptionsfaktoren werden beispielsweise über *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Wege aktiviert [63].

1.5.3 Interaktion von Calcineurin und NFAT und ihre Rolle im kolorektalen Karzinom

Die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges wird beispielsweise über T- und B-Zell-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ausgelöst [64-66]. Experimentell kann der Signalweg über das Calcium-Ionophor Ionomycin und

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) aktiviert werden. Dabei bewirkt Ionomycin einen intrazellulären Calciumeinstrom und PMA führt zu einer Aktivierung von Co-Transkriptionsfaktoren über die Phospholipase C und den MAP-Kinase-Weg [67-69].

Die Immunsuppressiva Ciclosporin A (CsA) und FK506 hemmen durch Inhibition von Calcineurin auch die Aktivierung von NFAT-Faktoren und haben die Organtransplantation revolutioniert [70, 71]. Allerdings findet sich bei immunsuppressiv behandelten Patienten auch eine erhöhte Inzidenz an Malignomen. Besonders stark steigt die Inzidenz von Hautmalignomen und Lymphomen, aber auch die von kolorektalen Karzinomen ist erhöht [72]. Als Ursache dieses Phänomens gilt die Hemmung der Calcineurin-abhängigen Immunosurveillance durch T-Zellen über CsA beziehungsweise FK506 [73]. Im Gegensatz dazu scheint Calcineurin auf der Ebene der Karzinomzellen aber auch eine potentiell onkogene Wirkung zu besitzen. So ist Calcineurin in kolorektalen Karzinomen überexprimiert [74], während CsA *in vitro* die Proliferation der Tumorzellen hemmt [75]. Nachgewiesen ist ebenfalls eine Expression von NFATc1 und NFATc2 in humanen kolorektalen Karzinomzelllinien, wo sie unter anderem die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), einem bekannten onkogenen Faktor, regulieren [76]. Der Calcineurin-NFAT-Signalweg trägt somit über eine Calcineurin-abhängige Immunosurveillance zu einer protektiven, anti-onkogenen Rolle bei, während der Signalweg in Tumorzellen möglicherweise zellintrinsische onkogene Rollen vermitteln kann.

1.6 Fragestellungen und Zielsetzungen

Die genannten Beobachtungen machen deutlich, dass Calcineurin und NFAT auf unterschiedliche und teils gegensätzliche Weise in der kolorektalen Karzinogenese involviert sind. Die Mechanismen einer möglichen zellautonomen, onkogenen Rolle von Calcineurin und NFAT in Tumorzellen sind dabei nur unzureichend verstanden. Darüber hinaus sind bisherige Untersuchungen auf *in vitro*-Modelle beschränkt und die Bedeutung einer potentiellen onkogenen Rolle von Calcineurin und NFAT für das Tumorwachstum und die Tumorprogression sind nicht bekannt. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass auch sporadische Karzinome Eigenschaften der inflammatorischen Karzinogenese aufweisen. Vor diesem Hintergrund könnte die

Untersuchung des inflammatorischen Calcineurin-NFAT-Signalweges in sporadischen kolorektalen Karzinomen neue Erkenntnisse erbringen.

In dieser Arbeit soll die Frage geklärt werden, welchen Einfluss der Calcineurin-NFAT-Signalweg auf die kolorektale Tumorentstehung und das Tumorstadium *in vitro* und *in vivo* hat und welche Faktoren zur Aktivierung dieses Signalweges führen. Ziel ist es, einen möglichen neuen Signalweg in der kolorektalen Karzinogenese zu identifizieren und zu charakterisieren, um auf dieser Basis neue Ansätze für die Prävention und Therapie kolorektaler Karzinome entwickeln zu können.

2 Material

2.1 Primer

Tabelle 1. Verwendete Primer

(Bp = Basenpaare des Produkts, Tm = Schmelztemperatur in °C)

Primer	Sequenz (5´-3´; 3´-5´)	Bp	Tm (°C)
Humanes β -Actin	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	116	59
	AGCACTGTGTTGGCGTACAG		59
Humanes NFATc1	AGGAAGAACACACGGGTACG	143	60
	CTCTGCTTCTCCACCAGAGG		60
Humanes NFATc2	CACGGGGCAGAACTTTACAT	70	60
	CCCAAATTTGCTGTCCATCT		60
Humanes NFATc3	GCTCGACTTCAAACCTCGTCTT	96	60
	GATGCACAATCATCTGGCTCA		60
Humanes NFATc4	GAGGCGAGGAACTGGTACTG	64	60
	TCAATGAACACCACCTTGGA		60
Humanes Calcineurin B1	AGCTTGATTTGGACAATTCTGGT	60	60
	ACTCAGGCAGAGACATGAACT		60

2.2 Plasmide

Tabelle 2. Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Hersteller
pGL3-Basic	Promega
pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]	Promega
Plasmid 11783: NFAT/AP-1 3x luciferase	Addgene
pRL-TK	Promega

2.3 Antikörper

Tabelle 3. Verwendete Antikörper

Zielstruktur	Wirt	Hersteller
NFATc1 (Klon 7A6)	Maus	Santa Cruz Biotechnology
NFATc2 (Klon 4G6-G5)	Maus	Santa Cruz Biotechnology
NFATc3 (Klon F1)	Maus	Santa Cruz Biotechnology
NFATc4 (Klon H-74)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
Calcineurin B-Untereinheit	Maus	Sigma Life Science
β -Actin	Maus	Sigma-Aldrich
Ki-67	Maus	BD Pharmingen
Cleaved Caspase-3	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Alexa Fluor 488	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor 488	Kaninchen	Molecular Probes
IgG (HRP-gekoppelt)	Maus	Cell Signaling Technology
IgG (HRP-gekoppelt)	Kaninchen	Cell Signaling Technology

2.4 Stimulanzen und Inhibitoren

Tabelle 4. Verwendete Stimulanzen und Inhibitoren

Bezeichnung	Hersteller
5-Bromo-2'-deoxyuridine	Sigma-Aldrich
complete Mini, EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets	Roche
Ciclosporin A	Sigma-Aldrich
<i>Escherichia coli</i> -DNA	InvivoGen
Flagellin	InvivoGen
Halt Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail	Thermo Scientific
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Irinotecan	Apotheke UKSH, Campus Kiel
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Lipopolysaccharid (<i>E. coli</i>)	Sigma-Aldrich
MG-132	Calbiochem
Pam3CSK4	InvivoGen
plpC	Sigma-Aldrich
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Puromycin	Gibco
Zymosan	InvivoGen

2.5 Zelllinien

Tabelle 5. Verwendete Zelllinien

Name	Herkunftsgewebe	Bezugsquelle
HT-29	Humanes Kolon-Adenokarzinom	DSMZ (Braunschweig) oder ATCC (Manassas/USA)
Caco-2	Humanes Kolon-Adenokarzinom	
HCT-15	Humanes Kolon-Adenokarzinom	
HCT-115	Humanes Kolon-Adenokarzinom	
HCT-116	Humanes Kolon-Adenokarzinom	
SW-707	Humanes Kolon-Adenokarzinom	
SW-480	Humanes Kolon-Adenokarzinom	
LoVo	Humanes Kolon-Adenokarzinom	
Colo-320	Humanes Kolon-Adenokarzinom	
MODE-K	Immortalisierte Maus-Enterozyten	
Jurkat	Humane immortalisierte T-Zelllinie	

2.6 sh-RNA-Viren

Tabelle 6. Verwendete Viren mit sh-RNA-Vektor

Bezeichnung	Hersteller
MISSION pLKO.1-puro shRNA Lentiviral Clone, Calcineurin B1 Sequenz -56: CCGGGAGGTTTGCTTTCCGTATCTACTCGAGTAGATACGGAAAGCA AACCTCTTTTT Sequenz -58: CCGGGATACACAGTTACAGCAAATTCTCGAGAATTTGCTGTAAGT TGTATCTTTTT	Sigma-Aldrich
MISSION pLKO.1-puro shRNA Lentiviral Clone, NFATc3 Sequenz -30: CCGGGCCCAAGTATTCAAATTACATCTCGAGATGTAATTTGAATACT TGGGCTTTTT Sequenz -32: CCGGGCCAGATGATTGTGCATCCATCTCGAGATGGATGCACAATC ATCTGGCTTTTT	Sigma-Aldrich
MISSION pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control Transduction Particles	Sigma-Aldrich
MISSION pLKO.1-puro TurboGFP shRNA Control Transduction Particles	Sigma-Aldrich

2.7 Kits

Tabelle 7. Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cell Growth Determination Kit, MTT based	Sigma-Aldrich
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
EnVision+ System-HRP (DAB) For Use with Mouse Primary Antibodies	Dako
EnVision+ System-HRP (DAB) For Use with Rabbit Primary Antibodies	Dako
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen
FITC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×)	Thermo Fisher Scientific
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza
PE Mouse Anti-Cleaved PARP	BD Pharmingen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V	Biomol
DAPI Nucleic Acid Stain	Invitrogen
Dow Corning high-vacuum silicone grease	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	Carl Roth
Filterpapier Grad 3,6 µm Dicke	Whatman
FluorSave Reagent	Merck KGaA
Fötales bovines Serum	Biochrom
Formalin	VWR
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
Mayers Hämalaulösung für die Mikroskopie	Merck KGaA
L-Glutamin	PAA Laboratories
Magermilchpulver	Carl Roth
Novex Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X)	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Precision Plus Protein WesternC Standards	Bio-Rad
ProGel Tris-Glycerine 4-20% Fertiggele, 10/12/15 wells	Anamed Elektrophorese GmbH

Roti-PVDF Transfermembran, Porengröße 0,45 µm	Carl Roth
SignalStain® Ab Diluent	Cell Signaling Technology
SuperFrost® Plus Adhäsionsobjektträger	Th. Geyer
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin EDTA Lösung (10X)	PAA Laboratories
Via-Probe Cell Viability Solution	BD Biosciences
Xylol	VWR

2.9 Puffer

Tabelle 9. Verwendete Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Citratpuffer (pH = 6)	1,8 mM Citronensäure 8,3 mM Na-Citrat
EDTA-Puffer (pH = 9)	10 mM Tris 1 mM EDTA
Elektrophorese-Laufpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % SDS
PBS (pH = 7,4)	135 mM NaCl 1,3 mM KCl 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ 0,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	PBS 0,05 % Tween 20
Puffer A	10 mM HEPES, pH = 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT Phosphatase-Inhibitoren Protease-Inhibitoren
Puffer C	20 mM HEPES, pH = 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT Phosphatase-Inhibitoren Protease-Inhibitoren

Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % SDS 0,5 % Na-Deoxycholat 1 % Triton X-100 Phosphatase-Inhibitoren Protease-Inhibitoren
TBS (pH = 7,6)	140 mM NaCl 20 mM Tris
TBS-T	TBS 0,1 % Tween 20
Transferpuffer	240 mM Glycin 25 mM Tris 20 % Methanol

2.10 Medien

Tabelle 10. Verwendete Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM-Medium	DMEM High Glucose (4,5g/L) (PAA Laboratories) 10 % fetales bovines Serum 1% Penicillin/Streptomycin 20 mM L-Glutamin
RPMI-Medium	RPMI 1640 (Biochrom) 10 % fötales bovines Serum 1 % Penicillin/Streptomycin 20 mM L-Glutamin

2.11 Geräte und Apparaturen

Tabelle 11. Verwendete Geräte und Apparaturen

Bezeichnung	Hersteller
Biofuge fresco	Heraeus
Capsulefuge PMC-060	Tomy
CO ₂ -Inkubator BBD 6220	Heraeus
ebq 100 isolated-z	Leistungstechnik JENA
Gewebehomogenisatoren, verschiedene Größen	Wheaton
iCycler mit MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
Microplate Luminometer LB96V	Berthold
Mikroskop Axioplan 2 mit AxioCam	Zeiss
Mikrotom HM360	Microm
Mini-Wipptisch WT16	Biometra
Molecular Imager ChemiDoc XRS System	Bio-Rad
NanoDrop ND-1000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific
Opsys MR Microplate Reader	Dynex Technologies
Pipetten (1, 10, 100 µl)	Eppendorf
Power Pack P25	Biometra
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Heraeus

Stuart SRT6D Roller Mixer	Keison
Test-Tube-Rotator 34528	Snijders Scientific
Thermomixer 5436	Eppendorf
Varifuge 3.0R	Heraeus
Vortex-2 Genie	Scientific Industries
Wasserbad SW22	Julabo
XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System	Invitrogen

3 Methoden

3.1 Mausmodelle

Zur Charakterisierung der Rolle von intestinal-epitheliale Calcineurin in der kolorektalen Tumorentstehung wurden Untersuchungen im $Apc^{Min/+}$ -Mausmodell durchgeführt.

Das $Apc^{Min/+}$ -Modell basiert auf einer Keimbahnmutation des murinen Tumorsuppressorgens *Apc*, genannt *Min* für „multiple intestinal neoplasia“ [77]. Es handelt sich hierbei um eine Mutation mit vollständiger Penetranz. Mäuse, die die Mutation heterozygot tragen ($Apc^{Min/+}$), entwickeln spontan Adenome im gesamten Darm mit Schwerpunkt im Dünndarm. Eine Homozygotie der *Min*-Mutation in Mäusen ist embryonal letal. Mit zunehmendem Alter der Mäuse können sich einzelne Adenome über ein Carcinoma in situ bis zu einem Adenokarzinom weiterentwickeln, sie metastasieren aber nicht [78].

Die Mutation im murinen *Apc*-Gen ist homolog zu der Mutation im humanen *APC*-Gen, die zur Entwicklung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) führt. Betroffene entwickeln schon in einem frühen Alter hunderte Adenome im Dickdarm, die sich in Adenokarzinome weiterentwickeln können. Aufgrund des frühen Auftretens der Adenome und ihrer großen Anzahl beläuft sich das Risiko für Träger der Mutation, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, auf beinahe 100 % [79]. Eine ähnliche Mutation tritt auch in der Entwicklung spontaner kolorektaler Karzinome des Menschen auf, sodass sich die $Apc^{Min/+}$ -Mutation sowohl als Modell für hereditäre, als auch spontane kolorektale Karzinome eignet [80].

Um die Rolle von Calcineurin in der intestinalen Tumorentstehung zu untersuchen, wurden Mäuse mit einer intestinal-epithelialen Deletion von Calcineurin generiert. Dabei wurde mit Hilfe der Cre Recombinase ein Teil der kodierenden Sequenz von Calcineurin B1 entfernt und Calcineurin auf diese Weise funktionell deletiert.

Das Modell funktioniert nach dem Prinzip des Cre/loxP-Recombinationssystems, das sich von der Cre Recombinase (*cyclization recombination*) des Bakteriophagen P1 ableitet [81]. Das Enzym Cre Recombinase katalysiert die Exzision eines DNA-Abschnittes zwischen zwei gleichgerichteten Erkennungssequenzen, den sogenannten *locus of X-over P1* (loxP) sites. Um eine gewebspezifische Gen-

Deletion in Mäusen zu erreichen, benötigt man zwei verschiedene genetisch veränderte Mauslinien [82].

Mäuse der ersten Linie sind Träger der von loxP sites flankierten Gensequenz („gefloxt Mäuse“). In diesem Fall flankieren die loxP sites drei Exons des Gens für Calcineurin B1 (*Ppp3r1*). Die loxP sites liegen dabei selbst in Introns, sodass sie die kodierende Sequenz des Gens nicht verändern. In Mäuse der zweiten Linie wird ein Cre-Transgen eingeschleust, das unter Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors steht, in diesem Fall unter dem Promotor von Villin. Villin ist ein Strukturprotein des Bürstensaumes, welches primär in intestinalen Epithelzellen exprimiert wird [83]. Nach Kreuzung beider Linien führt die Cre Recombinase in allen Villin-exprimierenden Zellen zur Exzision der drei Zielexons und somit zu einer Deletion von etwa 83% der kodierenden Sequenz von Calcineurin B1. Dieses ist damit funktionslos und Calcineurin gewebsspezifisch funktionell deletiert.

In den durchgeführten Versuchen wurde jeweils der Phänotyp von Mäusen mit intestinal-epithelialer Calcineurin-Deletion (*Villin-Cre^{tg/+};Ppp3r1^{fl/fl}*) mit denen von Villin-*Cre*-negativen Kontrolltieren aus dem gleichen Wurf verglichen. Die Mäuse beider Gruppen waren heterozygote Träger der *Min*-Mutation des Tumorsuppressorgens *Apc* (*Apc^{Min/+}*), um intestinale Tumoren zu induzieren. Alle Mäuse wiesen den genetischen Hintergrund C57BL/6J auf.

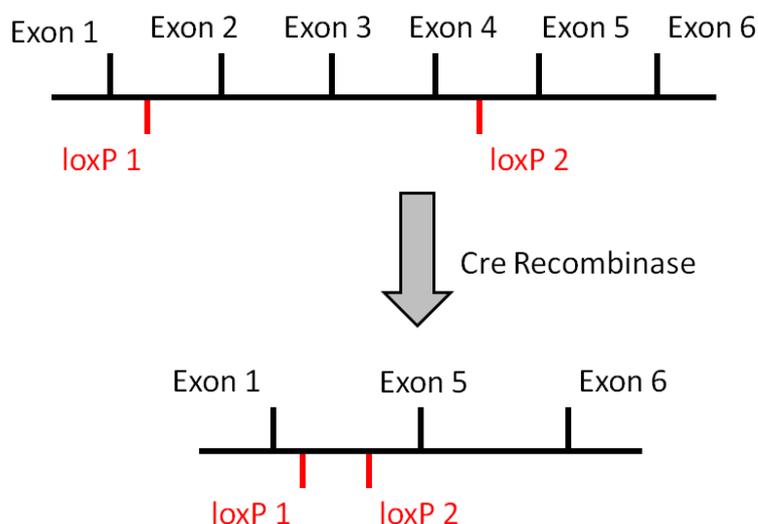


Abb. 1. Calcineurin B1-Deletion in Villin-exprimierenden Zellen.

In Villin-exprimierenden Zellen werden die Exons 2 bis 4 zwischen den loxP sites mit Hilfe der Cre-Recombinase im Gen für Calcineurin B1 entfernt.

3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und fünf-prozentiger -CO₂-Atmosphäre. Ein Mediumwechsel wurde, wenn in den Versuchsbeschreibungen nicht anders erwähnt, jeden zweiten Tag durchgeführt. Bei einer Konfluenz von etwa 70 % wurden die Zellen mittels Trypsin in phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) bei 37 °C abgelöst, ein Fünftel in 12 ml Medium resuspendiert und erneut in einer 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

Alle verwendeten Zelllinien zeigten keine Kontamination mit Mykoplasmen und wurden in regelmäßigen Abständen getestet.

3.3 Proteinextraktion aus Maus-Dünndarm und Zelllinien

Für die Durchführung von Western Blots und Immunpräzipitationen wurden aus Maus-Dünndarm und verschiedenen Zelllinien Proteinextrakte gewonnen. Je nach Zielsetzung des Versuches wurden dazu Gesamtzelllysate oder fraktionierte Kern- und Zytoplasmalysate hergestellt.

3.3.1 Gesamtzelllysate von Zelllinien

Bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % wurden die Zellen mit PBS (4 °C) gewaschen, danach in RIPA-Puffer mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren (500 µl Puffer pro 75 cm²) mittels Zellschaber auf Eis abgelöst und das Gemisch in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Gemisch wurde über 60 min bei 4 °C in einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 min und 13250 × g bei 4 °C zentrifugiert. Das Proteinlysate befand sich daraufhin im Überstand, wurde in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2 Gesamtzelllysate von Maus-Dünndarm

Die Gewebeproben wurden in Gewebehomogenisatoren aus Glas (Wheaton) in 300-900 µl RIPA-Puffer mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren (siehe oben), je nach Größe der Biopsie, zerrieben. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und wie die Gesamtzelllysate aus Zelllinien weiterprozessiert.

3.3.3 Fraktionierte Kern- und Zytoplasmalysate

Für die getrennte Analyse von Proteinen im Zellkern und im Zytoplasma wurden fraktionierte Kern- und Zytoplasmalysate hergestellt. Dafür wurden die

Zellkulturflaschen mit PBS (4 °C) gewaschen und die Flüssigkeit aspiriert. In eine 75 cm²-Flasche wurden 400 µl Puffer A gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und das Gemisch in ein 1,5 ml-Gefäß überführt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden 25 µl 10 % Nonidet P-40 (NP-40) in PBS hinzugegeben und das Lysat für 10 s auf einem Vortexer (Scientific Industries) gemischt. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 3625 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit der Zytoplasmafraktion wurde bei -80 °C gelagert, das Pellet in 1 ml Puffer A gewaschen und für 2 min bei 3625 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl Puffer C resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4 °C im Rotator wurden die Proben für 20 min bei 13250 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Kernfraktion) wurde abgenommen und wie das zytoplasmatische Lysat bei -80°C gelagert.

3.4 Proteinquantifizierung

Der Proteinkonzentration der Lysate wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt [84]. Als Reagenz diente der Bio-Rad Protein Assay Kit.

3.5 Western Blot-Analyse

Der Western Blot wird zur Detektion spezifischer Proteine aus einem Gewebe- oder Zelllysate verwendet. Denaturierte Proteine werden mittels Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend mittels Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid - Membran (PVDF) übertragen. Es folgt die Inkubation mit einem gegen das Zielantigen gerichteten Primärantikörper und nachfolgend einem gegen den Primärantikörper gerichteten *horseradish peroxidase*-gekoppelten (HRP, Meerrettichperoxidase) Sekundärantikörper. Die Chemilumineszenzreaktion der HRP mit einem Reagenz kann von einer Kamera aufgenommen und so das gesuchte Antigen detektiert werden.

Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde die notwendige Proteinmenge, wenn nicht anders erwähnt 20 µg, mit dem verwendeten Lysepuffer auf das gewünschte Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 2× bzw. 4× SDS-Ladepuffer gemischt. Dem Ansatz wurde Dithiothreitol (DTT) in einer finalen Konzentration von 200 µM hinzugefügt, welches reduktiv Disulfidbrücken von Proteinen spaltet. Die Denaturierung der Proteine erfolgte für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock.

Mit Hilfe einer Hamilton-Pipette wurden die Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels gefüllt. Die verwendeten SDS-Gradientengele (4-20 %) mit 10, 12 oder 15 Taschen stammten von der Firma Anamed (Bad Ems). Die Elektrophorese wurde in Kammern von Invitrogen durchgeführt.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte bei 125 V und dauerte etwa 90 min.

Nach Auftrennung im Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine zuvor in Methanol inkubierte PVDF-Membran transferiert. Dafür wurden Kammern von Invitrogen verwendet, der Aufbau entsprach den Herstellerangaben. Der Transfer erfolgte über 90 min bei 200 mA. Anschließend wurde die Membran 5 min in Tris-gepufferter Salzlösung mit 0,15 % Tween (TBS-T)-Puffer gewaschen.

Um unspezifische Bindungen zwischen der Membran und den später verwendeten Antikörpern zu verhindern, wurde die Membran für 90–120 min in TBST-Puffer mit 5 % Milchpulver beziehungsweise 5 % bovinem Serumalbumin (BSA), je nach Anforderungen des Primärantikörpers, inkubiert.

Über Nacht wurde die Membran in verdünntem Primärantikörper bei 4 °C in 5 % Milchpulver beziehungsweise 5 % BSA in TBST inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran drei Mal für 5 min gewaschen und der in 5 % Milchpulver in TBS-T gelöste Sekundärantikörper für 90 min hinzugegeben.

Nach drei weiteren Waschschritten mit TBST über je 5 min wurden die Signale mit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific) im Chemidoc XRS (Bio-Rad) entwickelt.

3.6 RNA-Isolation aus Maus-Dünndarm und Zelllinien, cDNA-Synthese und quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Ribonukleinsäure (ribonucleic acid, RNA)-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers für Gewebeproben beziehungsweise für Zellen. Die RNA wurde hierbei über ein System aus Wasch- und Trennsäulen unter Einsatz verschiedener Pufferlösungen und mehrerer Zentrifugationsschritte isoliert. Im letzten Schritt wurde die RNA in 30 µl reinstem Wasser (high performance liquid chromatography, HPLC-Wasser) gelöst. In allen Arbeitsschritten fanden nur Ribonuklease-freie Materialien und Lösungen Verwendung. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des NanoDrop-

Systems (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

Das Umschreiben von messenger RNA (mRNA) in complementary DNA (cDNA) wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription-Kit von Applied Biosystems (Carlsbad/USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Synthese von cDNA wurden von jeder Probe 2 µg RNA verwendet.

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) können DNA-Sequenzen vervielfältigt und quantifiziert werden und somit die Expression einzelner Gene auf RNA-Ebene analysiert werden. Dafür wird die RNA einer Probe in cDNA umgeschrieben und anschließend nach dem Prinzip der PCR vervielfältigt. Zusätzlich kommt der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I zum Einsatz, welcher mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) interkaliert. Der entstehende Komplex aus DNA und Fluoreszenzfarbstoff absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm.

Mit Zunahme der Ziel-DNA nimmt auch die dsDNA zu, an die SYBR Green I bindet, das Fluoreszenzsignal verstärkt sich und wird mit einem Detektor am Ende jedes Zyklus gemessen. In der exponentiellen Phase der PCR kann anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals auf die Quantität der gesuchten Ziel-DNA geschlossen werden. Für die relative Quantifizierung normiert man die Expression des gesuchten Gens mit der eines Referenzgens (*housekeeping gene*), welches in der Regel konstitutiv und konstant, unabhängig von äußeren Einflüssen, exprimiert wird. So können eventuelle Schwankungen in der eingesetzten RNA-Menge der Proben ausgeglichen werden. Für die Analyse der Genexpression in Mausproben und in humanen Zelllinien wurde β -Actin und in humanen Gewebeproben Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen verwendet. Als Reagenz für die qRT-PCR diente Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) und wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Alle verwendeten Primer wurden mit Hilfe von Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) auf eine spezifische Bindung an die gewünschte DNA-Sequenz hin untersucht und über die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen. Die PCR wurde in dem iCycler von Bio-Rad (Hercules, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Delta-Delta-Ct-Methode [85].

3.7 Luciferase Reportergenassay

Mit Hilfe des Luciferase Reportergen-Assays kann unter anderem die Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren bestimmt werden. Dabei transfiziert man Zellen transient mit einem Reportergen-Plasmid (Firefly-Luciferase), welches Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*)-Luciferase unter Kontrolle eines minimalen Promoters mit Bindungsstellen eines Transkriptionsfaktors von Interesse enthält. Die Transkriptionsfaktor-abhängig exprimierte Luciferase erzeugt nach Zugabe eines spezifischen Substrates ein Lumineszenzsignal, mit dessen Hilfe die Aktivität des Enzyms und dadurch auch des Transkriptionsfaktors quantifiziert werden kann. Zusätzlich werden die Zellen mit einem Transkriptionsfaktor-unabhängigen Reportergen-Plasmid (*Renilla reniformis*-Luciferase) transfiziert, um das Leuchtkäfer-Luciferase-Signal zu normieren.

Für einen Versuch wurden in einer 12 well-Platte 1×10^6 Zellen pro well ausgesät und erreichten innerhalb von 24 Stunden eine Konfluenz von ca. 90 %. Zu diesem Zeitpunkt erhielten die Zellen eine transiente Transfektion mittels Lipofectamin (Invitrogen, Carlsbad/USA) mit 0,8 µg/well des NFAT/AP-1 3x luciferase-Vektors (Addgene) und 0,3 µg/well des pRLTK-Luc-Vektors (Promega) als interne Transfektionskontrolle nach Herstellerangaben. Zur Differenzierung NFAT-abhängiger und -unabhängiger Effekte wurden unter den gleichen Bedingungen Zellen mit 0,8 µg/well pGL3Basic-Plasmid (Promega) statt pNFAT transfiziert. pGL3Basic enthält mit Ausnahme der NFAT-Bindungsstellen die gleichen Plasmidelemente wie pNFATLuc. Nach 16 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, nach 24 Stunden eine Stimulation mit unterschiedlichen Reagenzien über 10 Stunden bei 37 °C. Zur Stimulation beziehungsweise Inhibition von NFAT fanden PMA/Io und CsA Verwendung (siehe Einleitung). Außerdem erfolgte eine Stimulation mit verschiedenen Toll-like-Rezeptor (TLR)-Agonisten. Dazu zählten Lipopolysaccharide (LPS, Agonist von TLR4), das als Teil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien exprimiert wird und Zymosan, ein Glukan aus der Zellwand von Hefen (Agonist von TLR2). Weiter wurden Flagellin (Agonist von TLR5, Bestandteil begeißelter Bakterien) und DNA von *Escherichia coli* (Agonist von TLR9) als Stimulanzen genutzt. Das synthetische Lipopeptid Pam3CSK4 (Agonist von TLR1 und TLR2) sowie Poly-Inositol-poly-Cytidin (plpC, Agonist von TLR3), ein synthetisches Doppelstrang-RNA-Analogon, fanden ebenfalls Verwendung und sind bekannt dafür, zu einer Aktivierung von NF-κB zu führen [86].

Mittels des Dual-Luciferase Reporter Assays von Promega (Madison/USA) wurden die Zellen nach der Inkubation lysiert und die Luciferaseaktivität mit einem Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad) quantifiziert.

3.8 Generierung von *knockdown*-Zelllinien aus SW-707 mittels lentiviraler shRNA-Transduktion

Es wurden mittels lentiviraler *small hairpin RNA* (shRNA)-Transduktion *knockdown*-Zelllinien für NFATc3 und Calcineurin B1 sowie zwei Kontrollzelllinien erzeugt.

Ziel der Generierung dieser Zelllinien war eine dauerhafte und stabile Suppression der Expression dieser Gene. Dabei wurden die Zellen mit einem replikationsdefizienten Lentivirus der 3. Generation basierend auf pLKO.1 (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA) infiziert, welcher eine genspezifische shRNA-Sequenz unter Kontrolle des humanen U6-Promoters der RNA-Polymerase 3 exprimierte. Die genomische Integration der lentiviralen DNA führt dabei zur stabilen Expression der shRNA, welche nach Prozessierung zu einer *small interfering* (si) RNA zur Degradation komplementärer mRNAs führt.

3.9 Lentivirale Transduktion und antibiotische Selektion

Für die Generierung von stabilen SW-707-shRNA-Klonen wurden pLKO.1-basierte Lentiviren verwendet, die shRNA-Sequenzen des RNAi Consortium-Projektes exprimierten. Es wurden zwei unabhängige shRNA-Sequenzen für NFATc3, drei für Calcineurin B1, sowie als Kontrolle eine shRNA-Sequenz gegen das grün-fluoreszierende Protein (GFP) und eine shRNA ohne Ziel-Gen im Menschen (*scramble*) verwendet (Sequenzen siehe Tabelle 6).

Für jede Kondition wurden fünf Wells einer 96-well-Platte mit jeweils $1,6 \times 10^5$ SW-707-Zellen ausgesät und in der Anwesenheit von 8 µg/ml Polybrene und einer Virusmultiplizität (multiplicity of infection, MOI) von 10 infiziert.

Nach Inkubation im Brutschrank bei 37 °C erfolgte eine Trypsinierung der Zellen und erneute Aussaat mit 1:2750-facher Verdünnung in 10 cm-Schalen sowie Selektion mit 8 µg/ml Puromycin. Es erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Puromycin alle drei Tage und das Wachstum der Zellen wurde täglich unter dem Mikroskop überprüft.

Zehn Tage nach Zellaussaat erfolgte die Klonierung durch Trypsinierung mit autoklavierten Glaszylinder (6x8 mm, Hilgenberg, Malsfeld). Es erfolgte danach der

schrittweise Transfer in größere Kulturgefäße unter fortgesetzter Puromycin-Selektion.

3.9.1 Selektion von *knockdown*-Klonen

Um die Klone in Hinblick auf eine erfolgreiche Suppression der Zielgen-Expression hin zu überprüfen, wurde die Genexpression von zehn bis 20 Klonen jeder Kondition ermittelt. Der Effekt auf RNA-Ebene wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) detektiert. Für den Effekt auf Proteinebene wurden Western Blots von Gesamtzelllysaten analysiert. Um die Funktionalität des *knockdowns* zu überprüfen, wurden außerdem Luciferase-Assays durchgeführt und die Induzierbarkeit von NFAT über den Vektor NFAT/AP-1 3x Luciferase getestet. Für weitergehende Versuche wurden nur Klone verwendet, die eine Zielgenexpression auf RNA-Ebene und eine basale und Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA)- und Ionomycin (Io)-induzierte pNFAT-Luc-Aktivität von weniger als 10 % der Kontrolle aufwiesen. Die Kontrollklone (shRNA gegen GFP und scramble-Klon) zeigten keine Veränderung gegenüber nicht-transduzierten Zellen in diesen Assays.

3.10 MTT-Assay

Der Test basiert auf der Umwandlung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in Formazan (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) durch vitale Zellen und einem damit einhergehenden, photometrisch detektierbaren Farbumschlag [87]. Die Reduktionsreaktion ist dabei abhängig von der NADH/NADPH-Produktion durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums. Da diese Enzyme nur in lebenden Zellen aktiv sind, kann über die photometrische Detektion des Farbumschlages auf die Anzahl vitaler Zellen in einer Probe geschlossen werden und im Zeitverlauf somit auch auf die Proliferation und Expansion der Zellen.

Für den Assay wurden sechs 96-well-Platten mit jeweils einem Triplet jeder Zelllinie mit 1×10^3 Zellen/well ausgesät. Zusätzlich wurde ein Triplet ohne Zellen als Nullwert verwendet. Die Zellen erhielten RPMI-1640-Medium (10 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin). Am nächsten Tag erfolgte der erste Mediumwechsel, danach alle zwei Tage. Zwei Tage nach Aussaat wurde die Zellzahl der ersten Platte gemessen, danach alle zwei Tage eine weitere Platte. Das Vorgehen richtete sich nach den Herstellerangaben. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge bei 630 nm.

3.11 Wundheilungsassay

Zur Beurteilung der Proliferationsgeschwindigkeit von SW-707 und der *knockdown*-Klone wurden Wundheilungsassays durchgeführt.

Für jede Zelllinie wurde eine 10 cm-Zellkulturschale dicht ausgesät (Konfluenz von 95-100 %) und an drei Stellen mit einer autoklavierten 10 µl-Pipettenspitze eine circa 350 µm durchmessende strichförmige Läsion generiert. Nach Entfernung abgelöster Zellen durch Waschen wurde die „Wundheilung“ durch Messung der Distanz zwischen den Zellfronten nach 0, 12, 16, 20, 24, 36, 50, 64, 88 und 102 Stunden an allen drei Positionen ermittelt.

3.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zum Nachweis apoptotischer Zellen und zur Analyse des Zellzyklus verwendet. Die Durchflusszytometrie basiert darauf, dass Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von einzelnen Zellen in Suspension gemessen werden kann. Dabei werden die zu messenden Zellen in einem Pufferstrom durch den Strahlengang eines Lasers geleitet, welcher entsprechende Fluorophore anregen und deren Emission mithilfe von Detektoren erfassen kann.

3.12.1 Bromdesoxyuridin (BrdU)

Um eine Zellzyklus-Bestimmung durchzuführen und die Apoptoserate zu untersuchen, wurden die Zellen einer BrdU-Färbung unterzogen und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. BrdU ist ein Analogon des Thymidins und wird in seiner phosphorylierten Form anstelle von Desoxythymidintriphosphat in der S-Phase der Mitose in die neu synthetisierte DNA eingebaut.

Die Färbung mit dem FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen, Franklin Lakes/USA) sowie die Auswertung erfolgten nach Herstellerangaben, soweit nicht anders angegeben. Nach Trypsinierung und Zentrifugation wurden die Zellen zunächst in 2 ml Medium resuspendiert und in 15 ml-Röhrchen über 2 Stunden im Brutschrank inkubiert, um eventuelle Effekte der Trypsinierung auf den Zellzyklus auszugleichen. Erst danach wurden die Zellen für 45 min mit BrdU inkubiert.

3.12.2 PARP

Im Rahmen der Apoptose wird das Enzym Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP), welches an der DNA-Reparatur beteiligt ist, von Caspase-3 gespalten und verliert

somit seine Funktion. Zellen, die gespaltenes PARP-1 („cleaved PARP“) enthalten, durchlaufen somit die Apoptose. Mit Hilfe eines Phycoerythrin (PE)-gekoppelten, gegen cleaved PARP gerichteten Antikörpers können apoptotische Zellen markiert und per Durchflusszytometrie detektiert werden. Als Positivkontrolle wurden SW-707-Zellen über 12 Stunden mit 20 µg/ml Irinotecan behandelt, welches als Zytostatikum Apoptose induziert. Für die Färbung wurde PE Mouse Anti-Cleaved PARP (BD Pharmingen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.13 Anfertigung von histologischen Schnitten und Immunfärbungen

Gewebeproben, die einer histologischen Untersuchung unterzogen werden sollten, wurden direkt nach Entnahme in PBS gewaschen und anschließend für mindestens 24 Stunden in 10 % Formalin in PBS fixiert. Nach erfolgter Fixierung wurden die Gewebe in Paraffin eingebettet und mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt.

Vor Beginn der Färbung mussten die Schnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert werden. Dafür wurde, wenn nicht anders angegeben, folgendes Schema eingehalten.

Tabelle 12. Absteigende Alkoholreihe

3× 5 min Xylol
2× 3 min 100 % Ethanol
2× 3 min 95 % Ethanol in aqua dest.
2× 3 min 70 % Ethanol in aqua dest.
3× 5 min PBS

Nach der Entparaffinierung erfolgte eine Antigen-Demaskierung durch Erhitzung auf 95 °C über 20 min in 10 mM Citratpuffer (pH=6). Die durch die Fixierung entstandenen Quervernetzungen zwischen Proteinen wurden dabei aufgebrochen und Epitope wieder zugänglich gemacht. Nachdem die Schnitte wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, folgten drei 5-minütige Waschschrte in PBS. Anschließend wurden eventuell vorhandene endogene Peroxidasen blockiert, die zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führen können. Dafür wurden die Schnitte für 10 min in einer dreiprozentigen Wasserstoffperoxid-Lösung in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Es schlossen sich drei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min an. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Zellen im gleichen

Schritt zu permeabilisieren, wurden die Schnitte anschließend für 30 min in einer einprozentigen BSA-Lösung in PBS mit 0,2 % Triton X-100 (PBS-T) inkubiert. Nach dieser Vorbehandlung fand eine 60-minütige Inkubation mit dem Primärantikörper statt und nach drei Waschschritten in PBS über 5 min folgte die 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Dunkelheit. Alle Antikörperinkubationen erfolgten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Dem Sekundärantikörper wurde für die Kernfärbung 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in einer Verdünnung von 1:400 zugesetzt. Bei allen Färbungen erhielt ein Schnitt keinen Primärantikörper, wurde ansonsten aber wie das übrige Material behandelt und diente als Negativkontrolle. Nach drei letzten Waschprozeduren mit PBS wurden die Schnitte mit FluorSave Reagent eingebettet und bis zur Analyse dunkel und bei 4 °C gelagert.

3.13.1 Ki-67-Immunfluoreszenz

Ki-67 ist ein Protein, welches sich während der gesamten Zellteilung nachweisen lässt, nicht aber in ruhenden Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus [88]. Aus diesem Grund ist Ki-67 ein guter Marker für die Wachstumsfraktion in einem Gewebe.

Als Primärantikörper wurde ein Maus-Anti-Ki-67-Antikörper (BD Pharmingen) 1:250 verdünnt mit PBS-T eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente der Esel-Anti-Maus-Antikörper Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, USA) 1:1000 verdünnt mit PBS-T.

3.13.2 Cleaved Caspase-3-Immunfluoreszenz

Caspase-3 wird in apoptotischen Zellen durch extrinsische und intrinsische Liganden aktiviert. Cleaved Caspase-3 ist ein Spaltprodukt, das bei dieser Aktivierung entsteht [89, 90]. Somit ist die cleaved Caspase-3 ein guter Marker für Zellen, die gerade die Apoptose durchlaufen.

Als Primärantikörper wurde ein Kaninchen-Anti-Cleaved-Caspase-3-Antikörper (Cell Signaling Technology) 1:200 verdünnt mit PBS-T eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente der Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 1:1000 verdünnt mit PBS-T.

3.13.3 Calcineurin B1-Immunhistochemie

Das Enzym Calcineurin B1 findet sich unter normalen Umständen in Enterozyten des Darmes. In *knockout*-Mäusen, denen die B1-Untereinheit von Calcineurin fehlt, sollte aufgrund der selektiven Expression von Calcineurin B1 in Geweben jenseits des Hodens Calcineurin B nicht mehr in Enterozyten nachweisbar sein.

Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Maus-Anti-Calceineurin B-Antikörper (Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:100. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper aus dem Envision+ System-HRP (DAB)-Kit (Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Die Inkubationszeit betrug hier 45 min. Es folgte die Diaminobenzidin (DAB)-Chromogen-Reaktion nach Angaben des Herstellers, die Inkubationszeit betrug 5 min. Für die Kernfärbungen wurden die Schnitte circa 25 s in einer 1:3 Hämalaun-Lösung inkubiert und anschließend unter fließendem Wasser gewaschen. Zur Konservierung wurde die oben beschriebene Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt und die Schnitte mit Entellan (Merck KGaA) eingebettet. Die gefärbten Schnitte wurden bei 4 °C gelagert.

3.14 Mikroskopie und Auswertung der histologischen Schnitte

Für die histologische Auswertung wurde das Mikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit der Software AxioVision (Carl Zeiss) verwendet.

3.15 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, La Jolla/USA) erstellt.

Die Daten wurden mit dem D'Agostino-Pearson K^2 -Test auf eine Normalverteilung hin untersucht. Waren die Werte normalverteilt, wurden sie mit dem Zweistichproben-t-Test analysiert. Waren die Werte nicht normalverteilt, wurden sie mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test analysiert. Bei einer geringen Anzahl an Messwerten ($n < 20$) wurden die Daten mittels Zweistichproben-t-Test analysiert. Dabei wurde abgewogen, dass der t-Test auch bei nicht normalverteilten Daten relativ robust ist, wohingegen die nicht-parametrischen Tests bei kleinen Stichproben nur eine geringe Power besitzen [91].

Wurden mehrere Gruppen von Messwerten mit einer Kontrollgruppe verglichen, so wurde eine ANOVA-Analyse durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Der Einfluss von intestinal-epitheliale Calcineurin auf Inzidenz und Wachstum intestinaler Tumoren im $Apc^{Min/+}$ -Modell

Wir untersuchten zunächst den Einfluss von intestinal-epitheliale Calcineurin auf die Entstehung und das Wachstum intestinaler Tumore in Mäusen mit konditionaler intestinal-epithelialer Deletion von Calcineurin ($Villin-Cre^{tg/wt}; Ppp3r1^{fl/fl}$, im Folgenden $Cnb1^{\Delta IEC}$ -Mäuse genannt, siehe Methoden, Abb. 1, Abb. 2 und Abb. 3).



Abb. 2. Immunhistochemie-Färbung von Calcineurin B im Dünndarm von Wildtyp $Apc^{Min/+}$ -Mäusen.

Der Pfeil zeigt die erhaltene Färbung von Calcineurin B in der Lamina propria. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

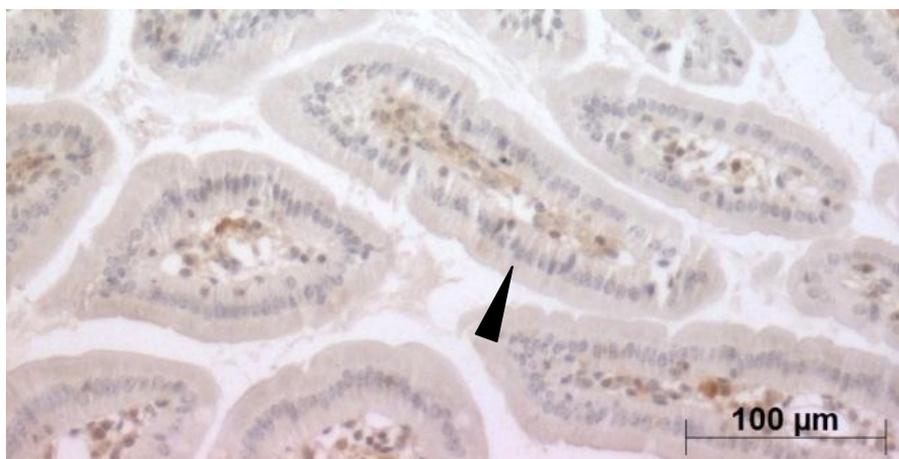


Abb. 3. Immunhistochemie-Färbung von Calcineurin B im Dünndarm von $Cnb1^{\Delta IEC}; Apc^{Min/+}$ -Mäusen.

Die Pfeilspitze zeigt auf das Epithel mit Verlust von Calcineurin B im Epithel. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Dazu wurde das $Apc^{Min/+}$ -Modell genetisch-induzierter intestinaler Tumore gewählt (siehe Kapitel 3.1) [78]. Dabei zeigte sich sowohl im Normalgewebe (Abb. 2, Abb. 3) als auch im Tumorgewebe (Daten nicht gezeigt), dass $Cnb1^{\Delta IEC};Apc^{Min/+}$ -Mäuse eine selektive Deletion von Calcineurin B im intestinalen Epithel, aber nicht in der Lamina propria aufweisen.

Zur Charakterisierung potentieller Effekte von intestinal-epithelialelem Calcineurin auf die Tumorzahldichte und das Tumorzahldichte wurde zunächst die Tumorzahldichte und -größe in $Cnb1^{\Delta IEC};Apc^{Min/+}$ -Mäusen im Vergleich zu Villin-Cre-negativen Kontrolltieren aus dem gleichen Wurf (littermates, im Folgenden als Wildtyp bezeichnet) bestimmt.

Die Analyse 18 Wochen alter Mäuse ergab eine signifikant reduzierte Tumorzahldichte von Mäusen mit intestinal-epithelialelem Calcineurin-Deletion im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen ($Cnb1^{\Delta IEC}$ $32,6 \pm 3,9$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts; im Folgenden jeweils Angabe in dieser Form) vs. Wildtyp $44,5 \pm 2,9$; $P=0,02$, Abb. 4). Darüber hinaus fanden sich bei der Analyse der Tumorzahldichte 18 Wochen alter Mäuse signifikant weniger große Tumoren (über 3 mm Durchmesser) in Mäusen mit intestinal-epithelialelem Calcineurin-Deletion ($Cnb1^{\Delta IEC}$ $1,7 \pm 0,3$ vs. Wildtyp $2,7 \pm 0,3$; $P=0,03$). Die reduzierte Tumorzahldichte in $Cnb1^{\Delta IEC};Apc^{Min/+}$ -Mäusen kann sowohl Ausdruck einer reduzierten Tumorzahldichte sein als auch eines reduzierten Tumorzahldichtes bei dem Tumoren in initialen, kleinsten und somit der Analyse entgehenden Stadien verbleiben. Zur weiteren Charakterisierung analysierten wir daher die Anzahl von Mikroadenomen in sechs Wochen alten Mäusen, das heißt einem Alter, in dem sich Tumoren erstmals formieren. Hier zeigte sich ein reduzierte Zahl von Mikroadenomen in $Cnb1^{\Delta IEC};Apc^{Min/+}$ -Mäusen im Vergleich zu $Cnb1$ -Wildtypieren ($Cnb1^{\Delta IEC}$ $5,7 \pm 0,6$ vs. Wildtyp $3,7 \pm 0,7$; $P=0,04$, Abb. 6). Die intestinal-epitheliale Deletion von Calcineurin B1 ist somit mit einem reduzierten Tumorzahldichte und einer reduzierten Tumorzahldichte verbunden.

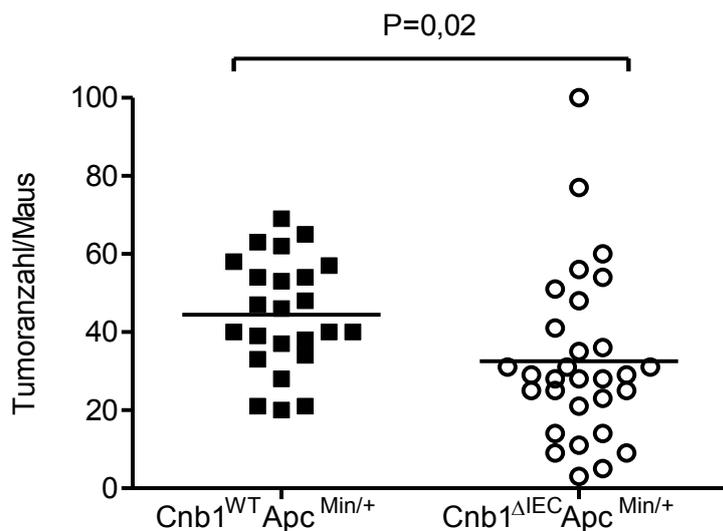


Abb. 4. Anzahl der Dünndarmtumoren 18 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.

Die Linie zeigt den Mittelwert. Der P-Wert wurde mittels Zweistichproben-t-Test errechnet. Jeder Datenpunkt stellt eine Maus dar.

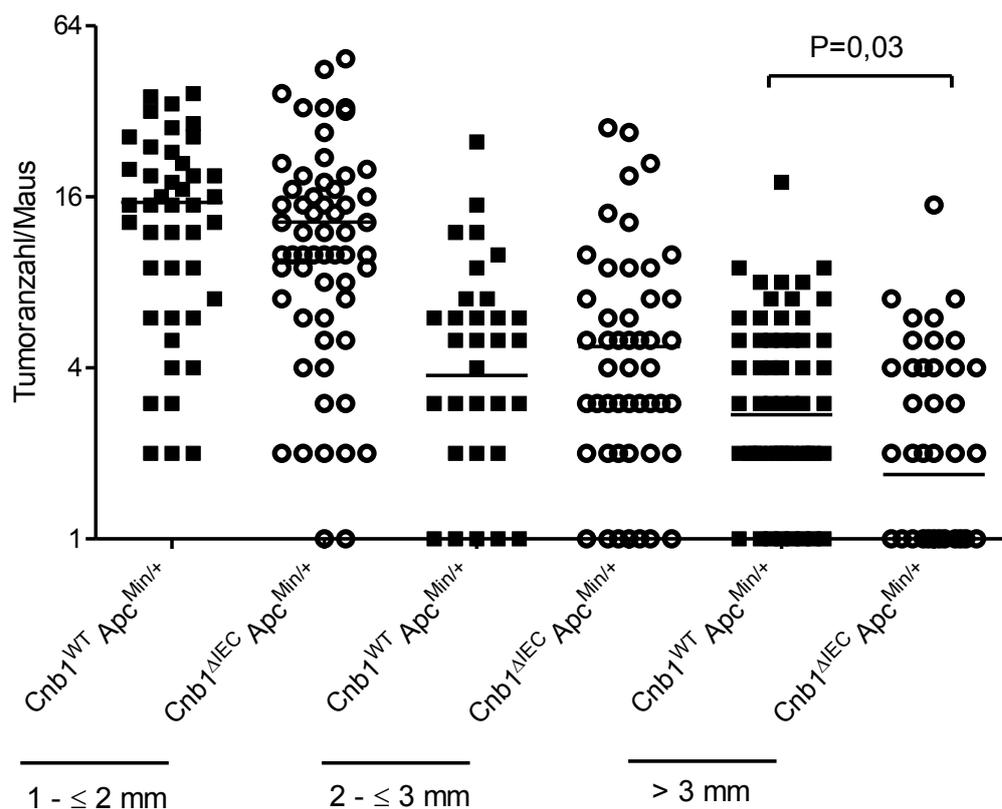


Abb. 5. Größenverteilung der Dünndarmtumoren 18 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.

Die Linie zeigt den Mittelwert. Der P-Wert wurde mittels Zweistichproben-t-Test errechnet. Innerhalb jeder Tumorgößengruppe stellt jeder Datenpunkt eine Maus dar. Die y-Achse ist in log₂-Schritten skaliert.

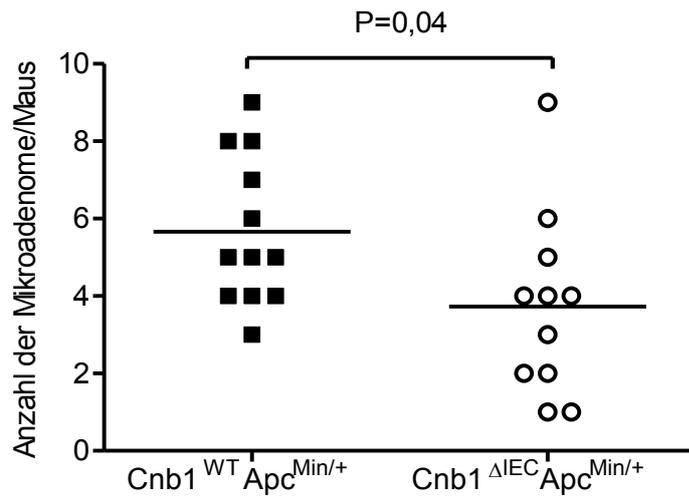


Abb. 6. Anzahl der Mikroadenome im Dünndarm 6 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.

Die Linie zeigt den Mittelwert. Der P-Wert wurde mittels Zweistichproben-t-Test errechnet. Jeder Datenpunkt stellt eine Maus dar.

4.2 Proliferationsrate in Maus-Dünndarmtumoren

Um zu untersuchen, ob das reduzierte Tumorstadium in $Cnb1^{\Delta IEC};Apc^{Min/+}$ -Mäusen durch eine Veränderung der Tumorpheriferation oder –apoptose vermittelt wird, wurde zunächst die Proliferationsrate in Dünndarmtumoren mittels Ki-67-Färbung in histologischen Schnitten analysiert. Ki-67 ist ein Protein, welches sich während der gesamten Zellteilung nachweisen lässt, nicht aber in ruhenden Zellen in der G_0 -Phase des Zellzyklus [88]. Dadurch ist Ki-67 gut geeignet, die Wachstumsfraktion in einem Gewebe darzustellen. Es wurde das Verhältnis Ki-67-positiver Tumorzellen zu allen Tumorzellen gebildet, die sich mittels DAPI anfärbten (Abb. 8). Aus diesem Verhältnis ließ sich die Proliferationsrate in den Tumoren ermitteln.

Dabei ergab sich eine signifikant höhere Proliferationsrate in Dünndarmtumoren von $Cnb1^{WT};Apc^{Min/+}$ -Mäusen im Vergleich zu $Cnb1^{\Delta IEC};Apc^{Min/+}$ -Mäusen ($Cnb1^{\Delta IEC}$ $35,6 \pm 5,5$ vs. Wildtyp $62,8 \pm 3,4$; $P < 0,001$, Abb. 7).

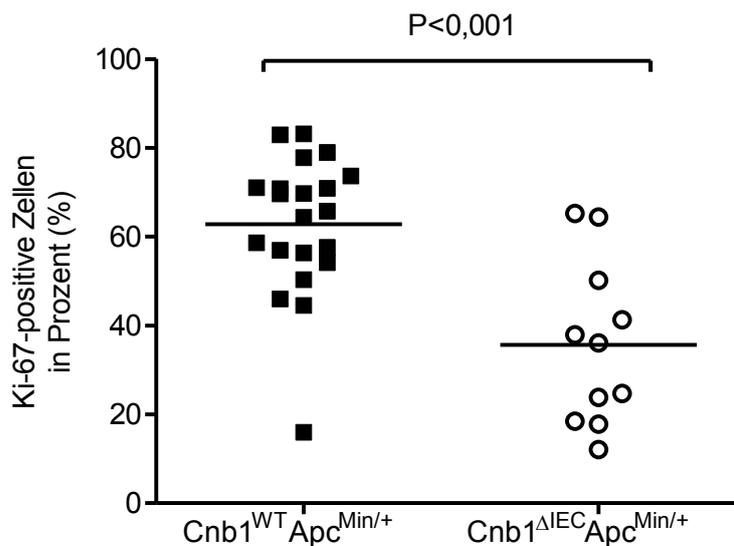


Abb. 7. Proliferationsrate in Dünndarmtumoren 18 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.

Gezeigt ist der Prozentsatz Ki-67-positiver Tumorzellen an allen Tumorzellen. Die Linie zeigt den Mittelwert. Der P-Wert wurde mittels Zweistichproben-t-Test errechnet. Jeder Datenpunkt stellt eine Maus dar.

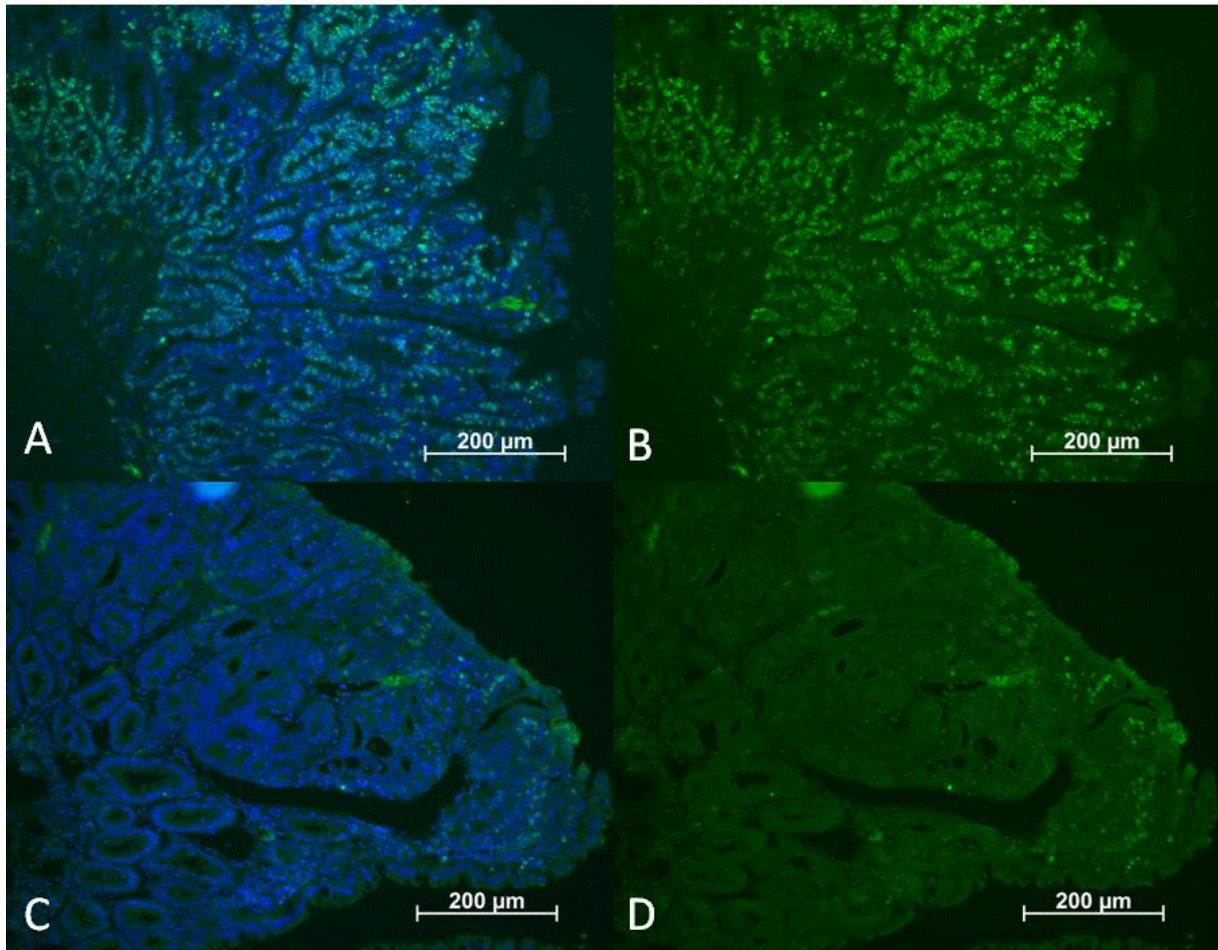


Abb. 8. Repräsentative Ki-67-Färbungen in Dünndarntumoren 18 Wochen alter Mäuse vom gezeigten Genotyp.

A-B) $Cnb1^{WT};Apc^{Min/+}$ -Maus mit (A) und ohne (B) Einblendung des DAPI-Signals.

C-D) $Cnb1^{\Delta IEC};Apc^{Min/+}$ -Maus mit (C) und ohne (D) Einblendung des DAPI-Signals.

Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

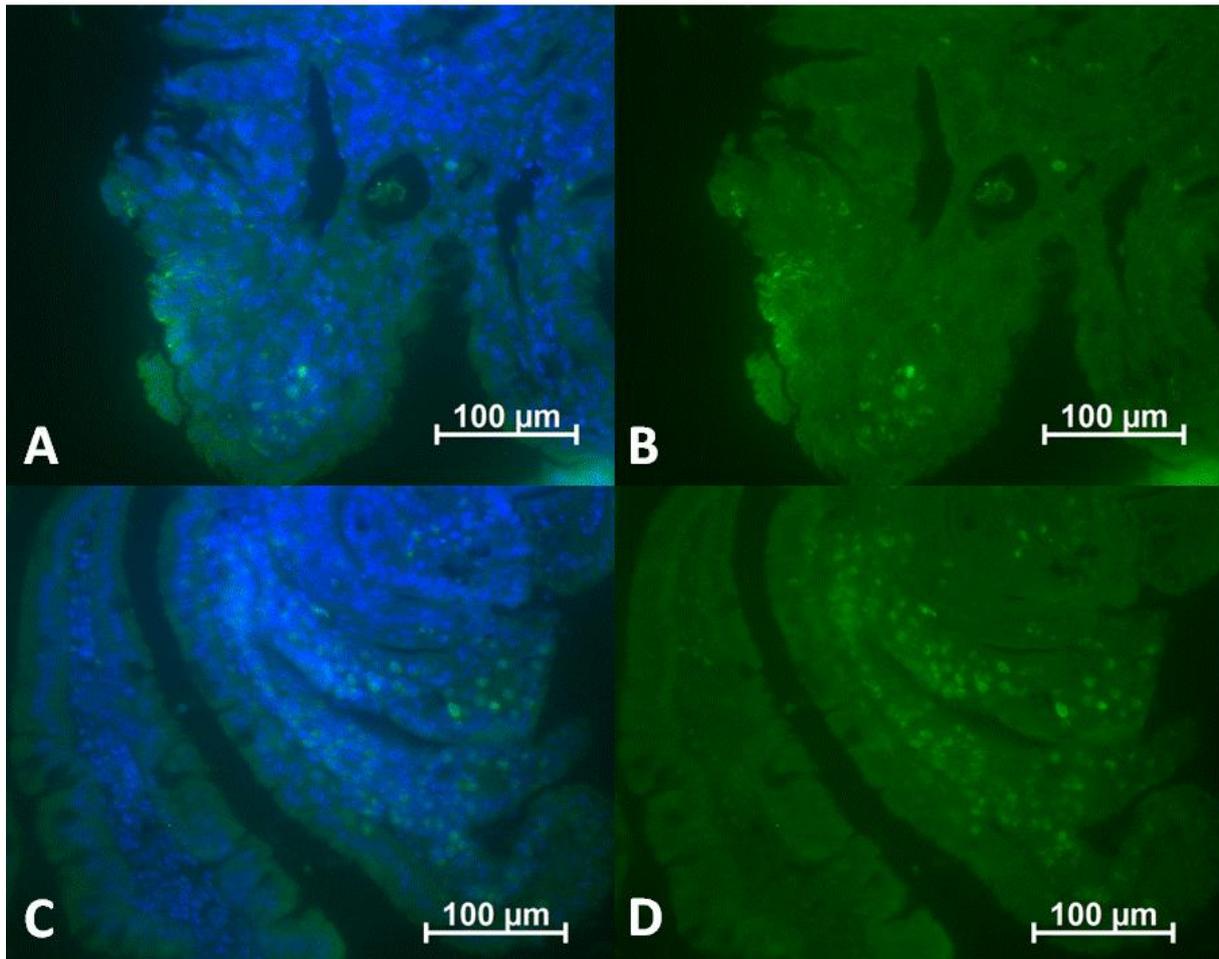


Abb. 10. Repräsentative cleaved Caspase-3-Färbungen in Dünndarntumoren 18 Wochen alter Mäuse (100-fache Vergrößerung).

A-B) $Cnb1^{WT};Apc^{Min/+}$ -Maus mit (A) und ohne (B) Einblendung des DAPI-Signals.

C-D) $Cnb1^{\Delta IEC};Apc^{Min/+}$ -Maus mit (C) und ohne (D) Einblendung des DAPI-Signals.

Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

4.4 Expression von NFAT in humanen Kolonkarzinomzelllinien

Um zu untersuchen, welche NFAT-Faktoren in humanen kolorektalen Karzinomen exprimiert werden, wurden Gesamtzelllysate von neun humanen Kolonkarzinomzelllinien (HT-29, Caco-2, HCT-15, HCT-115, HCT-116, SW-707, SW-480, LoVo und Colo-320) mittels Western Blot auf das Vorhandensein von NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4 untersucht (Abb. 11). Dabei zeigte sich eine konsistente Expression von NFATc3 in allen untersuchten Zelllinien. NFATc1 und NFATc2 waren nur in einzelnen Zelllinien exprimiert und NFATc4 ließ sich aufgrund schwacher Expression nur nach längerer Exposition darstellen. NFATc3 ist daher in kolorektalen Karzinomen die vorherrschend exprimierte NFAT-Isoform.

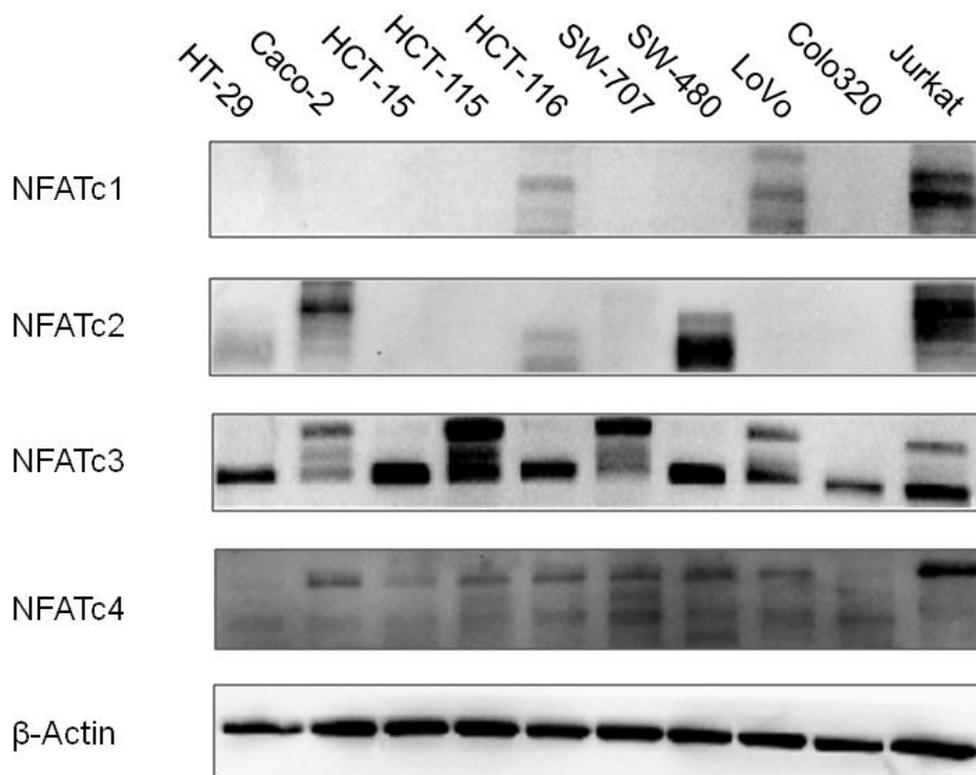


Abb. 11. Western Blot-Analyse der Expression von NFATc1-c4 in Gesamtzelllysaten kolorektaler Karzinomzelllinien.

Jurkat-Zellen, eine immortalisierte T-Zell-Zelllinie, dienten als Positivkontrolle der NFAT-Expression. β -Actin diente als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

4.5 Zell-autonome Effekte einer Calcineurin- und NFATc3-Deletion in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien

Im Mausmodell zeigten sich eine pro-proliferative und eine anti-apoptotische Wirkung von intestinal-epithelalem Calcineurin. Dabei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Interaktionen zwischen Tumorzellen und Stromazellen zu diesen Effekten beitragen.

Um zellintrinsische Effekte von Calcineurin und NFATc3 zu untersuchen, wurden SW-707-Zellen mit dominanter NFATc3-Expression (Abb. 11) in einem lentiviral basierten Ansatz mit shRNA gegen Calcineurin B1 oder NFATc3 transduziert und nachfolgend Einzelzellklone mit stabiler shRNA-Expression generiert. Das Ausmaß der Inhibition der Zielgen-Expression wurde per quantitativer PCR bestimmt und die funktionellen Effekte auf den Calcineurin- und NFAT-Signalweg in einem NFAT-abhängigen Luciferase Reportergen-Assay untersucht. Die Klone mit der stärksten Inhibition der Zielgen-Expression wurden für nachfolgende Versuche verwendet.

Um zu bestätigen, dass funktionelle Effekte der shRNA-Transduktion durch eine Regulation der entsprechenden Gene und nicht durch unspezifische Effekte der Transduktion vermittelt werden, wurden SW-707 außerdem mit einer shRNA-Sequenz ohne Zielgen im menschlichen Genom (*scramble*-shRNA) sowie mit einer shRNA gegen in SW-707 nicht exprimiertes grün fluoreszierendes Protein (GFP) transduziert.

Die Resultate zeigen, dass die Transduktion mit unspezifischer shRNA einen leichten Einfluss auf die Genexpression von Calcineurin und NFATc3 hatte, ohne jedoch in signifikanter Weise die Funktion von Calcineurin und NFAT zu beeinflussen (Abb. 12). Die Calcineurin- und NFATc3 shRNA-Klone wiesen wie erwartet eine deutliche Herabregulation der entsprechenden Gene im Vergleich zur *scramble*-Kontrolle auf (Abb. 12) und zeigten im Luciferase Reportergen-Assay nach Stimulation mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und Ionomycin eine ausgeprägte Beeinträchtigung der Calcineurin- und NFAT-Funktion (Abb. 13).

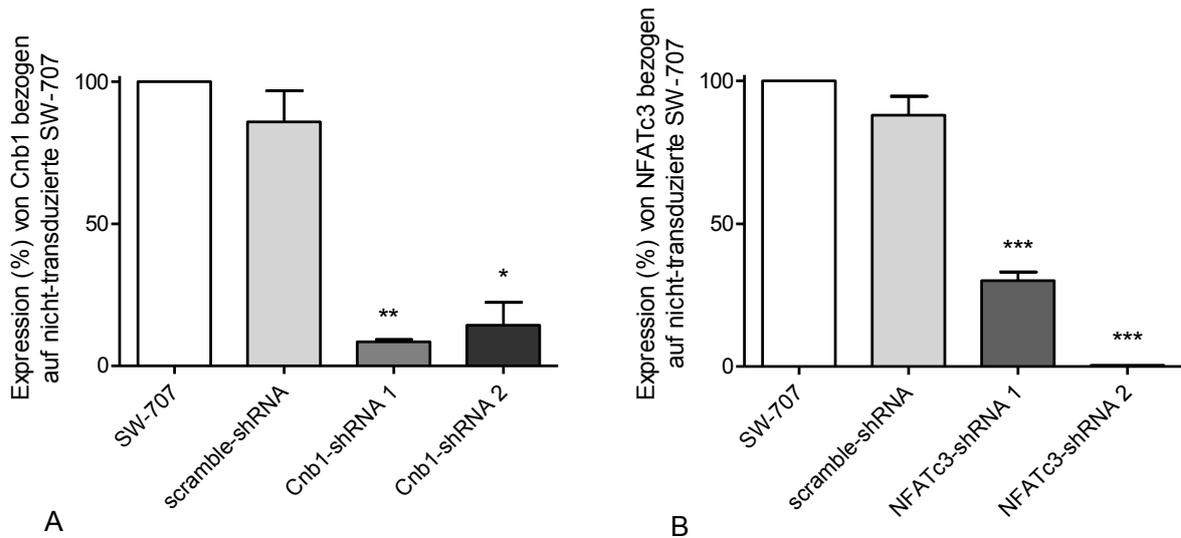


Abb. 12. Quantitative PCR für Calcineurin B1 (A) und NFATc3 (B) in nicht-transduzierten SW-707-Zellen und stabilen SW-707-Klonen mit der genannten shRNA-Expression.

Prozentuale Expression von Calcineurin B1 bzw. NFATc3, bezogen auf nicht-transduzierte SW-707, normalisiert auf die β -Actin-Expression. Angegeben sind die aus drei Messwerten berechneten Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes. Die P-Werte wurden mittels ANOVA-Varianzanalyse berechnet. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

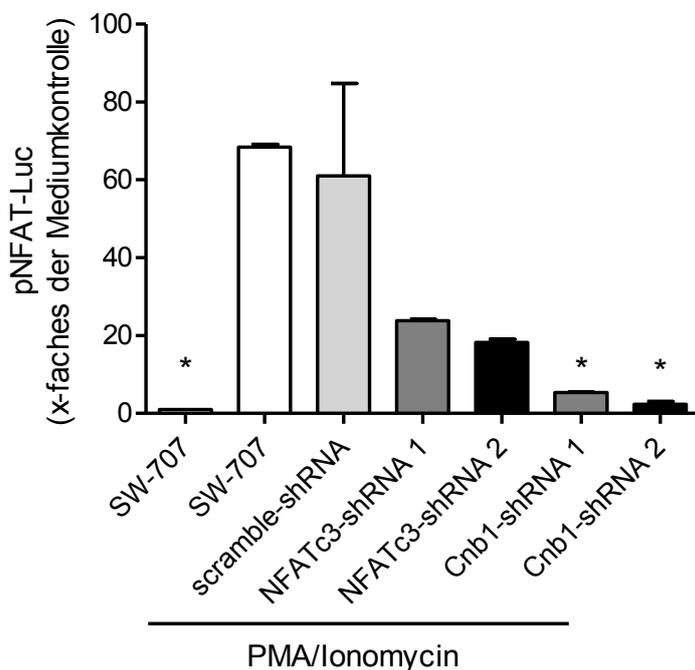


Abb. 13. NFAT-abhängige Luciferase-Expression in nicht-transduzierten SW-707-Zellen und stabilen SW-707-Klonen mit der genannten shRNA-Expression.

x-fache Luciferase-Expression (pNFAT-Luc) mit/ohne Stimulation mit PMA/Ionomycin über 10 Stunden, bezogen auf unstimulierte nicht-transduzierte SW-707. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes. Die P-Werte wurden mittels ANOVA-Varianzanalyse berechnet. * $P < 0,05$.

4.5.1 Effekte einer Calcineurin- und NFATc3-Inhibition auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen

Die Auswirkung des *knockdowns* von Calcineurin beziehungsweise NFATc3 auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen untersuchten wir zunächst mittels MTT-Assay. Der Test basiert auf der Umwandlung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Formazan) durch vitale Zellen und einem damit einhergehenden, photometrisch detektierbaren Farbumschlag.

Die MTT-Messung zeigte zunächst, dass eine chemische Calcineurin-Blockade durch Ciclosporin A zu einer reduzierten Tumorzellproliferation führt. Gleiche Resultate konnte mit einer shRNA-vermittelten Herabregulation der Calcineurin-Expression erreicht werden, während eine isolierte Herabregulation von NFATc3 zu einer weniger deutlichen Inhibition der Proliferation führte (Abb. 14).

Ab dem 10. Tag ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate des der mit CsA inhibierten SW-707-Zellen im Vergleich zu den nativen SW-707-Zellen messen (Tag 10 und Tag 12 $P < 0,001$). Dies trifft ebenso für den mit NFATc3-shRNA behandelten Zellklon zu (Tag 10 $P < 0,01$; Tag 12 $P < 0,001$). Der mit Cnb1-shRNA behandelte Zellklon weist bereits ab Tag 8 eine signifikant geringere Proliferationsrate als die nativen SW-707-Zellen auf (Tag 8, 10 und 12 $P < 0,001$).

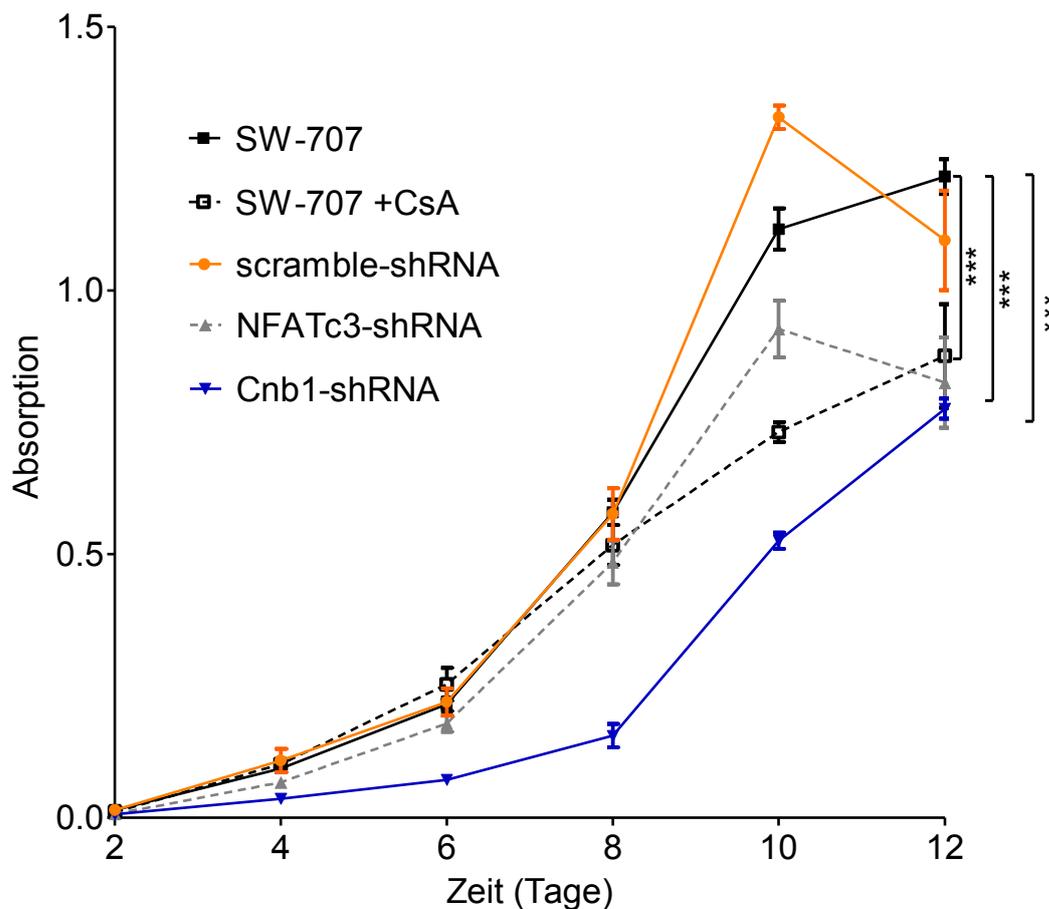


Abb. 14. Proliferationsbestimmung von SW-707-Zellen mittels MTT-Assay.

Proliferation von SW-707-Zellen mit und ohne Ciclosporin A (CsA)-Behandlung (1 μ g/ml) und mit/ohne stabile(r) Expression der genannten shRNAs. Angegeben sind die aus drei Messwerten berechneten Mittelwerte und der Standardfehler. Die P-Werte wurden jeweils pro Zeitpunkt mittels ANOVA-Varianzanalyse berechnet. ***P<0,001.

Aufgrund der geringer ausgeprägten Proliferationsveränderungen von NFATc3-shRNA-Klonen im Vergleich zu Cnb1-shRNA-Klonen trotz dominanter NFATc3-Expression in SW-707 wurde die NFAT-Expression auf RNA- und Proteinebene in shRNA-exprimierenden SW-707-Klonen charakterisiert. Hierbei zeigte sich eine kompensatorische Hochregulation von NFATc1 und NFATc2 auf RNA-Ebene (Abb. 15) und Proteinebene (Daten nicht gezeigt) in NFATc3-shRNA-Klonen. Gleiche Beobachtungen konnten für die Cnb1-shRNA-Klone gemacht werden (Daten nicht gezeigt), wobei kompensatorische Effekte einer NFAT-Induktion hier durch das Fehlen der Calcineurin-abhängigen Aktivierung von NFAT aufgehoben werden.

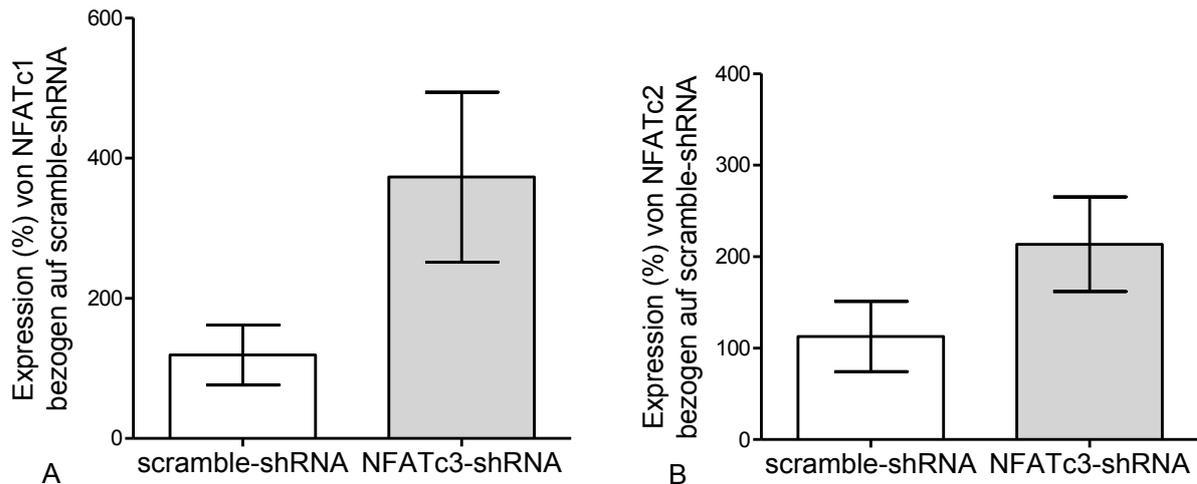


Abb. 15. Qualitative PCR von NFATc1 (A) und NFATc2 (B) in stabilen SW-707-Klonen mit der genannten shRNA-Expression.

Prozentuale Expression von NFATc1 (A) und NFATc2 (B) bezogen auf die Kontrolle scramble-shRNA, normalisiert auf die β -Actin-Expression. Angegeben ist der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes. Die P-Werte wurden mittels Zweistichproben-t-Test berechnet. $P > 0,05$.

Die Zellproliferation wurde darüber hinaus in einem Wundheilungsassay *in vitro* bestimmt. Dabei wurde in einer konfluenten Zellschicht eine definierte „Wunde“ gesetzt und die Zeit gemessen, die die Zellen benötigten, um wieder eine vollständige Konfluenz zu erreichen (Abb. 16). Auch hier zeigte sich, in Analogie zu den MTT-Resultaten, eine verzögerte Wundheilung bei shRNA-vermittelter Cnb1-Herabregulation. Dabei zeigte sich eine signifikant langsamere Wundheilung an den Messzeitpunkten zwischen 20 und 88 Stunden nach Defektsetzung. Die Wundheilung des GFP-shRNA-Kontrollklons unterschied sich bis auf einen Messpunkt nach 24 Stunden nicht signifikant von derer der nativen SW-707-Zellen. Die verlangsamte Wundheilung war maßgeblich durch NFATc3 vermittelt, da die shRNA-bedingte Inhibition der NFATc3-Expression gleichermaßen bis stärker im Vergleich zur Inhibition von Cnb1 in verzögerter Wundheilung resultierte.

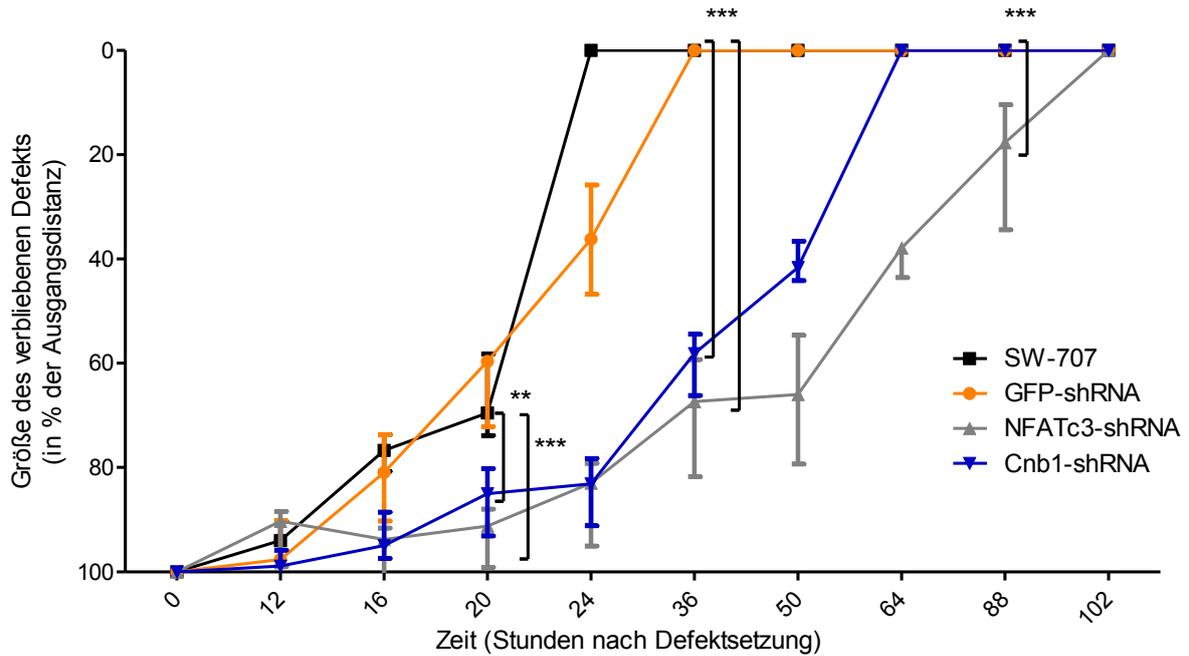


Abb. 16. Wundheilungsassay in SW-707-Zellen.

Wundheilung von SW-707-Zellen mit/ohne stabile(r) Expression der genannten shRNAs. Angegeben ist der Median mit der Range. Die P-Werte wurden mittels ANOVA-Varianzanalyse berechnet. An den Zeitpunkten 0, 12, 16 und 102 Stunden $P < 0,05$. Nach 20 Stunden $P < 0,01$ für Cnb1-shRNA und $P < 0,001$ für NFATc3-shRNA an den Zeitpunkten 24, 36, 50 und 64 Stunden $P < 0,001$ für Cnb1-shRNA und NFATc3-shRNA. Am Zeitpunkt 88 Stunden $P < 0,05$ für Cnb1-shRNA und $P < 0,001$ für NFATc3-shRNA. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.5.2 Effekte einer Calcineurin- und NFATc3-Inhibition auf die Apoptose

Positive Effekte auf das Tumorstadium können nicht nur durch Induktion der Tumorzellproliferation, sondern auch durch Inhibition der Tumorzellapoptose vermittelt werden. Daher wurde der Einfluss von Calcineurin und NFATc3 auf die zelluläre Apoptose mit einer durchflusszytometrischen Bestimmung der PARP-Spaltung und Quantifizierung der Sub-G₀/G₁-Population apoptotischer Zellen bestimmt. Mittels durchflusszytometrischer Detektion der PARP-Spaltung konnte der Anteil apoptotischer Zellen in den untersuchten Linien bestimmt werden (Abb. 17).

Unter basalen Bedingungen belief sich der Anteil apoptotischer Zellen von SW-707 auf 1,4 % ($1,39 \pm 0,57$) und steigerte sich nach Apoptose-Induktion durch Irinotecan auf 45 %. Der GFP-Kontrollklon besaß unter Basalbedingungen einen ähnlich hohen Anteil apoptotischer Zellen (2,1 %, $2,09 \pm 0,59$). Im Vergleich dazu zeigte der SW-707-Klon mit shRNA-vermittelter Inhibition der Calcineurin-Expression eine deutlich erhöhte Apoptoserate (8,9 %, $8,87 \pm 5,23$). Der NFATc3-Klon wies, am ehesten aufgrund einer kompensatorischen Induktion von NFATc1 und NFATc2 (Abb. 15), nur eine geringe Erhöhung der Apoptoserate (2,9 %, $2,93 \pm 0,25$) auf. Die beobachteten Effekte waren statistisch nicht signifikant.

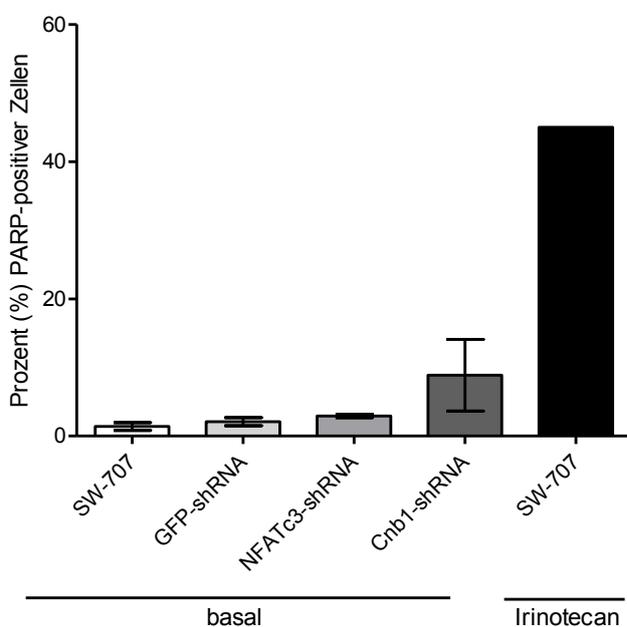


Abb. 17. PARP-Durchflusszytometrie zur Analyse der Apoptose von SW-707-Zellen.

Prozentsatz PARP-positiver SW-707-Zellen mit/ohne (basal) 12-stündige(r) Behandlung mit Irinotecan (20 µg/ml) sowie mit/ohne stabiler Expression der genannten shRNAs. Angegeben ist der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes. Die P-Werte wurden mittels Zweistichproben-t-Test berechnet und auf native SW-707-Zellen bezogen. $P > 0,05$.

Zur Bestätigung der mittels PARP-Spaltungsanalyse gewonnenen Daten wurde eine durchflusszytometrische Quantifizierung der Sub-G₀/G₁-Population (BrdU-negativ) durchgeführt (Abb. 18). Nicht-transfizierte SW-707-Zellen wiesen 0,4 % (0,44 ± 0,07) apoptotische Zellen auf, der GFP-Kontrollklon 0,6 % (0,61 ± 0,21). Auch hier zeigte sich eine deutlich erhöhte Apoptoserate in Klonen mit shRNA-vermittelter Inhibition der Calcineurin-Expression (1,2 %, 1,19 ± 0,24; P=0,039) bei geringer ausgeprägten Effekten einer NFATc3-Inhibition (0,6 %, 0,56 ± 0,07). Aufgrund der niedrigeren Sensitivität der Sub-G₀/G₁-Analyse im Vergleich zur PARP-Analyse zeigten sich hier insgesamt niedrigere Anteile apoptotischer Zellen bei vergleichbaren relativen Unterschieden zwischen den Gruppen.

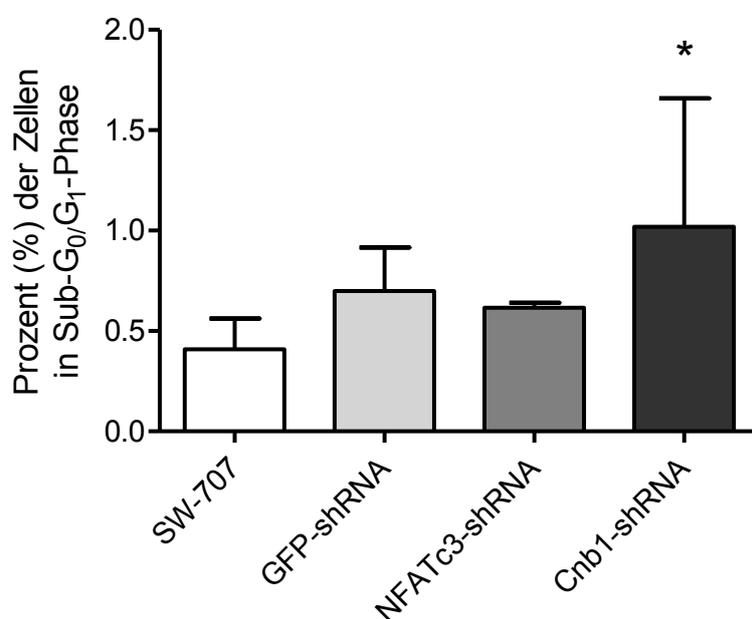


Abb. 18. Analyse der Sub-G₀/G₁-Population von SW-707-Zellen mittels BrdU-Durchflusszytometrie

Prozentuale Angabe der BrdU-negativer Sub-G₀/G₁ SW-707-Zellen mit/ohne stabile(r) Expression der genannten shRNAs. Angegeben ist der Mittelwert sowie der Standardfehler der Mittelwertes. Die P-Werte wurden mittels Zweichstichproben-t-Test berechnet. *P<0,05.

4.6 Einfluss von Toll-like-Rezeptor-Agonisten auf den Calcineurin-NFAT-Signalweg in intestinalen Epithelzellen

Während in T-Zellen die Stimulation des T-Zell-Rezeptors zur Aktivierung von Calcineurin und NFAT führt, war bislang nicht bekannt, welche Faktoren Calcineurin und NFAT in intestinalen Epithelzellen aktivieren. Da gezeigt werden konnte, dass TLR4-Signale NFAT in dendritischen Zellen aktivieren [92] und TLR-Liganden in substantieller Menge durch die intestinale Mikrobiota bereitgestellt werden, untersuchten wir, ob ähnliche Mechanismen in intestinalen Epithelzellen zum Tragen kommen. Daher wurden verschiedene Toll-like-Rezeptor-Agonisten auf ihre Fähigkeit überprüft, den Calcineurin-Signalweg *in vitro* in SW-707-Zellen zu aktivieren. Dafür wurde ein Luciferase Reporterassay nach Transfektion eines NFAT/AP-1-Reportergenkonstruktes oder eines NF-κB-Reporterplasmids in die Maus-Dünndarmepithelzelllinie MODE-K durchgeführt (Abb. 19).

Die Resultate zeigen, dass NFAT vor allem durch LPS, einen Agonisten des TLR4, sowie Pam3CSK4, einen Agonisten von TLR1 und TLR2, aktiviert werden kann. Die Stimulation mit LPS führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der NFAT-abhängigen Luciferase-Expression bis zum 3,5-fachen der Medium-Kontrolle. Pam3CSK4 führte bei einer Konzentration von 1 µg/ml zur stärksten NFAT-Aktivierung (2,7-Faches der Medium-Kontrolle). Die Resultate des pNF-κB-Luciferase-Plasmids als Positivkontrolle weisen daraufhin, dass einige der untersuchten Toll-like Rezeptoren in MODE-K stärker exprimiert sind als andere, beziehungsweise ein aktiveres Signalling aufweisen.

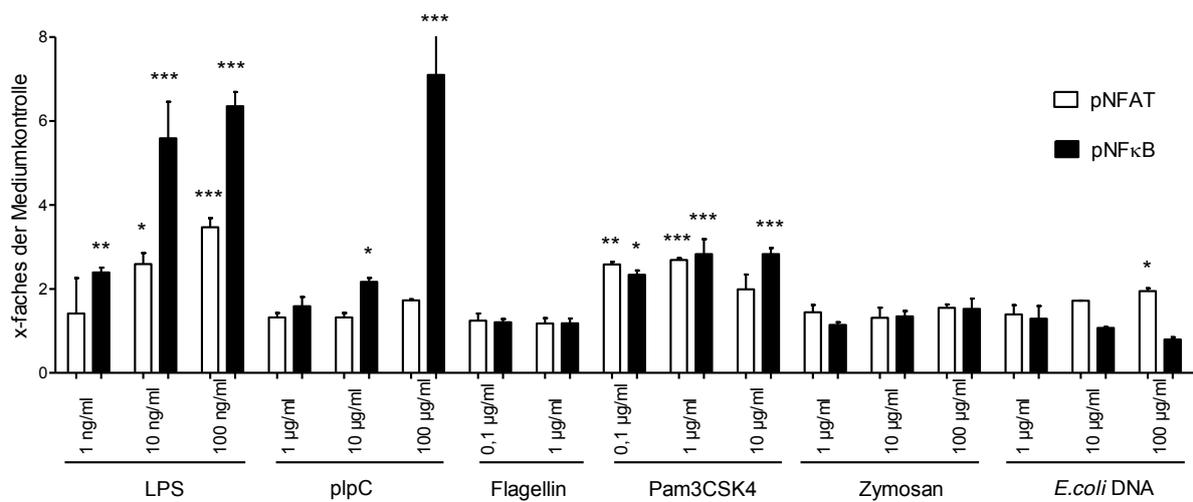


Abb. 19. Luciferase-Assay der Zelllinie MODE-K nach Transfektion der Plasmide pNFAT-Luc oder pNF-κB-Luc und Stimulation mit Toll-like-Rezeptor-Agonisten.

Expression der Firefly-Luciferase (pNFAT-Luc, pNF-κB-Luc), normiert auf Expression der Renilla-Luciferase (pRL-TK). Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion über 12 Stunden mit Medium oder den dargestellten TLR-Agonisten behandelt und anschließend für die Luciferase-Analyse aufgearbeitet. Angegeben ist der Median sowie der Interquartilsabstand. Berechnung der P-Werte mittels ANOVA-Varianzanalyse. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

5 Diskussion

Der Calcineurin/NFAT-Signalweg wurde erstmals in T-Zellen entdeckt und seine Funktionen sind insbesondere in lymphatischen Zellen gut charakterisiert [42]. Die NFAT-Transkriptionsfaktoren besitzen neben ihrer Funktion zur Regulation der IL-2-Expression in T-Zellen auch eine entzündungsfördernde sowie -modulierende Wirkung auf Zellen des angeborenen Immunsystems [93, 94]. Mittlerweile ist neben ihrer Bedeutung im Immunsystem auch bekannt, dass Calcineurin und NFAT ubiquitär in Zellen und Geweben außerhalb des Immunsystems exprimiert werden und hier essentielle Aufgaben erfüllen. So sind die NFAT-Transkriptionsfaktoren für die embryonale Herzentwicklung sowie die Hypertrophie von Kardiomyozyten essentiell. Werden sie inaktiviert, resultieren beispielsweise Herzklappenfehler und Vorhofseptumdefekte [95-97]. Zudem ist der Calcineurin/NFAT-Signalweg in der embryonalen Entwicklung des Nervensystems elementar wichtig. In Mausembryonen mit *knockout* von NFATc2, c3 und c4 ist das Axonwachstum massiv gestört [98]. Auch auf die Entwicklung und Homöostase des muskuloskelettalen Systems hat NFAT einen wesentlichen Einfluss. Die NFAT-Faktoren beeinflussen zum Teil gegensätzlich die Chondrogenese und spielen eine wesentliche Rolle in der Differenzierung und Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten [99-102].

Daten der letzten Jahre konnten zeigen, dass Calcineurin und NFAT in parenchymalen Tumorzellen exprimiert sind und teils aktiv zum Tumorwachstum beitragen. So sind NFAT-Faktoren in Pankreaskarzinomzellen exprimiert und fördern durch transkriptionelle Regulation von Onkogenen wie MYC, STAT3 und NF- κ B die Karzinogenese [103-105]. Zudem nehmen sie über die Transkription von Zellzykluskinasen wie Cyclin D Einfluss auf den Zellzyklus und die Mitose [105]. Im kolorektalen Karzinom konnte eine erhöhte Expression und Aktivität von Calcineurin nachgewiesen werden [74] und in kultivierten kolorektalen Karzinomzelllinien eine onkogene Rolle von NFAT durch transkriptionelle Regulation von MYC und Cyclooxygenase-2 belegt werden [106, 107]. Unklar blieb jedoch, ob diese Daten auf die Situation *in vivo* übertragbar sind, da die Inhibition von Calcineurin durch CsA in Patienten nach Organtransplantation mit einer erhöhten statt einer erniedrigten Inzidenz kolorektaler Karzinome verbunden ist [108].

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand neuer Mausmodelle erstmals gezeigt werden, dass epitheliales Calcineurin und NFAT Teil eines proinflammatorischen

Signalweges in kolorektalen Karzinomzellen und ihren adenomatösen Vorstufen darstellen und aktiv zur Tumorentstehung und zum Tumorwachstum *in vivo* beitragen. Die onkogenen Effekte dieses Signalweges werden dabei über eine positive Regulation der Zellproliferation sowie über eine Hemmung der Apoptose vermittelt. Verantwortlich für die Aktivierung des onkogenen Calcineurin- und NFAT-Weges ist hierbei die intestinale Mikrobiota und ihre Erkennung durch Toll-like-Rezeptoren [109]. Zusammenfassend konnte somit in der vorliegenden Arbeit und einer damit verbundenen Publikation [109] ein neuer, onkogener, intestinal-epithelialer Signalweg aufgezeigt werden, in dem Calcineurin und NFAT in Mikrobiota-abhängiger Weise als inflammatorische Mediatoren die kolorektale Karzinogenese fördern.

5.1 Intestinal-epitheliales Calcineurin fördert die Proliferation und hemmt die Apoptose von intestinalen Tumorzellen

Die Eigenschaften von intestinal-epitheliale Calcineurin wurden mittels Deletion des Gens für Calcineurin B1 im *Apc*^{Min/+}-Modell untersucht. Eine Keimbahnmutation des *APC*-Gens tritt in Tumoren von Patienten mit FAP auf, ist aber auch in Tumoren von Patienten mit sporadischen kolorektalen Karzinomen häufig [15, 16]. Aus diesem Grund bietet sich das *Apc*^{Min/+}-Modell sowohl für die Untersuchung familiärer als auch sporadischer kolorektaler Karzinome an.

Mäuse mit intestinal-epithelialer Deletion von Calcineurin zeigten, im Vergleich zu Calcineurin-suffizienten Tieren aus den gleichen Würfen, eine reduzierte Anzahl von Mikroadenomen im Alter von sechs Wochen sowie eine verringerte Anzahl von makroskopisch sichtbaren Adenomen im Alter von 18 Wochen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass intestinal-epitheliales Calcineurin sowohl die Tumorinitiation als auch das Tumorwachstum fördert. Diese Daten stehen in Einklang mit einer in den vergangenen Jahren beschriebenen onkogenen Rolle von Calcineurin und NFAT im Pankreaskarzinom und deuten auf eine entitätsübergreifende, tumorfördernde Funktion dieses Signalweges im Gastrointestinaltrakt hin [103, 110].

In histologischen Färbungen von Tumorgewebe von 18 Wochen alten *knockout*- und Wildtypmäusen wurden Proliferation und Apoptose quantifiziert. Dabei wurde der prozentuale Anteil proliferierender beziehungsweise apoptotischer Zellen in intestinalen Adenomen ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass Mäuse mit intestinal-

epithelialer Calcineurin-Deletion im Vergleich zu Calcineurin-suffizienten Tieren eine verminderte Proliferationsrate und eine erhöhte Apoptoserate aufweisen, die vermutlich die Grundlage für das reduzierte Tumorwachstum darstellen. Erkenntnisse aus dem Pankreaskarzinom belegen gleichermaßen eine pro-proliferative Wirkung von Calcineurin und NFAT. Dort nahm die Proliferationsrate nach Calcineurin-Inhibition *in vitro* deutlich ab, am ehesten vermittelt über Zellzyklusarrest [103]. Auch in kultivierten kolorektalen Karzinomzellen konnte gezeigt werden, dass *in vitro* nach Calcineurin-Inhibition eine Hemmung der Zellzyklus-Progression auftritt [75]. Für leukämische Zellen und humane Lymphome konnte ebenso nachgewiesen werden, dass eine Hemmung von Calcineurin zu einer erhöhten Apoptoserate führt [111].

Ein weiteres Ziel war herauszufinden, ob die Effekte auf Apoptose und Proliferation zellintrinsisch bedingt sind. Unter physiologischen Bedingungen können Tumorzellen mit tumorinfiltrierenden Zellen interagieren. So ist beispielsweise von Untersuchungen zum Mammakarzinom bekannt, dass Immunzellen das Tumorgewebe infiltrieren und Chemokine sezernieren, die Einfluss auf die Tumorzellinvasion bis hin zur Metastasierung haben können [112]. Für die *in vitro*-Untersuchungen wurden mittels lentiviraler shRNA-Transduktion stabile *knockdown*-Zelllinien für CnB1 und NFATc3 aus Einzelzellklonen der kolorektalen Karzinomzelllinie SW-707 generiert. Um den unspezifischen Einfluss der Transduktion auf die Zellen zu berücksichtigen, wurden die Ergebnisse auf Kontrollzelllinien, die mit einer shRNA gegen GFP beziehungsweise gegen eine zufällige Basensequenz (scramble) transduziert wurden, normalisiert. Entsprechend der Ergebnisse aus dem Mausmodell ließen sich auch in der Zellkultur eine gesteigerte Proliferation und eine verringerte Apoptose mit stabilen *knockdown*-Klonen reproduzieren. Die Effekte von epithelalem Calcineurin und NFAT können somit zumindest teilweise zellintrinsisch vermittelt werden.

5.2 TLR-Signale in der Aktivierung von epithelalem Calcineurin und NFAT

Toll-like-Rezeptoren sind ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems und erkennen nicht-mikrobielle Schädigungssignale wie *damage associated molecular patterns* (DAMPs) sowie als *microbe-associated molecular patterns* (MAMPs) bezeichnete mikrobielle Signale [113]. Für die Homöostase des intestinalen Epithels sind Toll-like-Rezeptoren von wesentlicher Bedeutung. Sie sind in der

Steuerung von Zellproliferation, IgA-Sekretion, der Aufrechterhaltung von *Tight junctions* und der Produktion von antimikrobiellen Peptiden beteiligt [113]. Einige TLR-Agonisten weisen eine ausgeprägte Schutzfunktion auf. So vermindert beispielsweise der TLR2-Agonist Pam3CSK4 den Schweregrad einer *dextran sodium sulfate* (DSS)-induzierten Kolitis im Mausmodell [114]. In Einklang damit ist die Deletion von MyD88, eines zentralen TLR-Adapters, verbunden mit einer deutlich erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer DSS-Kolitis. TLR-Signale sind somit involviert in der Regulation der intestinal epithelialen Proliferation und Regeneration. Darüber hinaus tragen Toll-like-Rezeptoren auch zur Regulation der kolorektalen Karzinogenese bei. So konnte gezeigt werden, dass die Deletion von MyD88 im *Apc^{Min/+}*-Mausmodell zu einer deutlichen Reduktion der Tumorgroße und Tumorzahl führt [115-117]. Diese Effekte werden neben TLR-vermittelter Signalgebung in hämatopoetischen Zellen vor allem auch von Epithel-intrinsischen TLR-Signalen vermittelt, die durch Regulation der epithelialen Proliferation und Apoptose das Tumorstadium steuern [116, 117]. Entsprechend stellt die Expression von TLR4 und MyD88 in kolorektalen Karzinomen auch einen negativen prognostischen Marker dar [118].

Mithilfe eines Luciferase Reporterassays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass insbesondere der TLR4-Agonist LPS sowie der TLR1- und TLR2-Agonist Pam3CSK4 die Expression von NFAT in kolorektalen Zelllinien stimulieren können. LPS als ein Bestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien und Pam3CSK4 als synthetisches Polypeptid stehen hier stellvertretend für bakterielle Bestandteile, die über Toll-like-Rezeptoren den Calcineurin/NFAT-Signalweg aktivieren können. Toll-like-Rezeptoren können jedoch sowohl endogene DAMPs als auch mikrobielle MAMPs erkennen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass Calcineurin das Wachstum kolorektaler Karzinomzellen auch *in vitro* in der Abwesenheit mikrobieller Signale fördert (Siehe 5.1). Diese Daten warfen die Frage auf, ob DAMPs oder MAMPs die für die Aktivierung von epithelalem Calcineurin verantwortlichen Faktoren darstellen. In weiterführenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir diesbezüglich zeigen, dass DAMPs als nicht-mikrobielle Schädigungssignale im Zellkulturmodell des Kolonkarzinoms in TLR-abhängiger Weise Calcineurin und NFAT aktivieren, was die Stimulation dieses Signalweges in der Abwesenheit mikrobieller Komponenten *in vitro* erklärt [109]. Im Gegensatz dazu stellen MAMPs als mikrobielle TLR-Agonisten den maßgeblich für die Calcineurin-

Aktivierung verantwortlichen Stimulus *in vivo* dar, während DAMPs hier von untergeordneter Bedeutung sind [109]. So konnten wir zeigen, dass die Deletion von MyD88 oder die Behandlung von Mäusen mit Breitspektrumantibiotika zu einer Inaktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges in intestinalen Tumoren führt und Calcineurin-abhängige Effekte auf das Tumorwachstum aufhebt [109]. Zusammengefasst kann onkogenes Calcineurin in kultivierten kolorektalen Karzinomzelllinien in auto- und/oder parakriner Weise durch DAMPs aktiviert werden, während mikrobielle TLR-Signale unter *in vivo*-Bedingungen den primären Stimulus für die Aktivierung von Calcineurin in Tumorzellen darstellen.

Während auch das gesunde intestinale Epithel eine Expression von Calcineurin und NFAT aufweist, liegt eine Aktivierung dieses Signalweges nur in intestinalen Tumoren vor [109]. Diese Beobachtung überrascht zunächst, vor allem in Hinblick auf die Calcineurin-Aktivierung durch ubiquitäre Signale der intestinalen Mikrobiota. In weiterführenden Arbeiten konnten wir jedoch zeigen, dass mehrere Mechanismen zur Tumor-spezifischen Aktivierung von Calcineurin und NFAT beitragen. So konnten wir und andere Arbeitsgruppen zeigen, dass bereits benigne intestinale Adenome eine epitheliale Barrierestörung aufweisen, die dazu führt, dass Bakterien die intestinale Mukosa infiltrieren [109, 119]. Dies stellt die Grundlage für die TLR-abhängige epitheliale Signaltransduktion dar. Darüber hinaus zeigen Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe eine deutlich erhöhte Expression von Toll-like-Rezeptoren, wodurch die TLR-Signalgebung in Tumorzellen weiter gefördert wird [109, 115-117]. Neben einer gestörten epithelialen Barriere und einer erhöhten Expression von Toll-like-Rezeptoren tragen möglicherweise auch Veränderungen in der Komposition der Mikrobiota im Bereich intestinaler Tumoren zur Aktivierung von Calcineurin und NFAT bei. So konnten wir zeigen, dass die Tumor-assoziierte Mikrobiota eine erhöhte Repräsentanz von Bakterien zeigt, die bekanntermaßen über die von intestinalen Tumorzellen exprimierte TLR4-Myd88-Achse erkannt werden [120, 121]. Zusammenfassend tragen Veränderungen der Stratifizierung und Komposition der Mikrobiota im Bereich von intestinalen Tumoren sowie eine erhöhte TLR-Expression von Tumorzellen zur spezifischen Aktivierung von Calcineurin und NFAT im Bereich intestinaler Tumore bei.

Weiteren Studien werden notwendig sein, um die Veränderungen der Mikrobiota im kolorektalen Karzinom vollständig zu erfassen und pathophysiologisch relevante Bakterienstämme zu identifizieren. Darüber hinaus müssen die

Schädigungsmechanismen besser verstanden sowie die entscheidenden Mediatoren und Metaboliten der Bakterien erkannt werden. Auch in Bezug auf die Stuhltransplantation sind weitere Erkenntnisse zu den Effekten der intestinalen Mikrobiota entscheidend. So könnten Risiken der Transplantation einer fremden Mikrobiota besser abgeschätzt werden. Zudem könnten sich mit einer gezielten Modulation der intestinalen Mikrobiota auch neue Möglichkeiten zur Prophylaxe und Behandlung des kolorektalen Karzinoms eröffnen.

5.3 Funktionelle Redundanz der NFAT-Familienmitglieder

Die *in vitro*-Untersuchungen an kolorektalen Karzinomzelllinien zeigten, dass die Deletion von Calcineurin B1 im Vergleich zur Deletion von NFATc3 mit stärkeren Effekten auf die Proliferation und Apoptose verbunden ist. Diese Beobachtungen sind vermutlich auf eine funktionelle Redundanz innerhalb der NFAT-Transkriptionsfaktorfamilie zurückzuführen. So konnte gezeigt werden, dass bei stabilem *knockdown* von NFATc3 sowohl NFATc1 als auch NFATc2 kompensatorisch in ihrer Expression hochreguliert werden (Abb. 15). Analog zu unseren Ergebnissen konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Phänotypen bei einer kombinierten Deletion von mehreren NFAT-Isoformen stärker ausgeprägt sind als bei Deletion eines einzelnen NFAT-Faktors [98, 122, 123]. So ist in T-Zellen die kombinierte Deletion von NFATc1 und NFATc2 notwendig, um einen Verlust der Zytokin-Produktion zu bewirken [123]. Ebenso führt erst die kombinierte Deletion von NFATc1, NFATc3 und NFATc4 zu ausgeprägten Defekten in der Axonentwicklung [124].

Auch im intestinalen Tumormodell der Maus konnten wir in weiterführenden Studien zeigen, dass die isolierte Deletion von NFATc3 im Vergleich zur Deletion von Calcineurin B1 mit geringeren Effekten auf das Tumorstadium verbunden ist, was auf eine kompensatorisch gesteigerte Expression anderer NFAT-Faktoren in diesen Tieren zurückzuführen ist [109]. Die Blockade der Calcineurin-vermittelten Aktivierung aller NFAT-Faktoren durch *in vivo*-Administration des inhibitorischen VIVIT Peptids [125] zeigte jedoch der Calcineurin-Deletion vergleichbare Effekte auf die Tumorentstehung und das Tumorstadium [109]. NFATc3 ist somit die in intestinalen Tumoren vorherrschend exprimierte NFAT-Isoform, während die Deletion von NFATc3 kompensatorische Effekte innerhalb der NFAT-Familie offenbart.

6 Zusammenfassung und Perspektive

In dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle von intestinal-epitheliale Calcineurin in der intestinalen Tumorentstehung *in vivo* untersucht. Dabei konnte anhand von Mäusen mit Keimbahnmutation des Tumorsuppressorgens *Apc* und konditionaler, intestinal-epithelialer Deletion von Calcineurin B1 gezeigt werden, dass Calcineurin im intestinalen Epithel in zentraler Weise zur Tumorentstehung und zum Tumorentstehung beiträgt. Epitheliales Calcineurin reguliert die Onkogenese durch eine Stimulation der zellulären Proliferation sowie eine Inhibition der Apoptose mit dem Resultat eines gesteigerten Tumorentstehung. Mikrobielle Toll-like Rezeptor-Agonisten können dabei den onkogenen Calcineurin-NFAT-Signalweg in kolorektalen Karzinomzelllinien aktivieren und sind, wie unsere weiterführenden Studien zeigen konnten, verantwortlich für das Calcineurin- und NFAT-abhängige Wachstum intestinaler Tumore *in vivo*.

Calcineurin und NFAT stellen damit zentrale Komponenten eines hier erstmals beschriebenen, onkogenen Signalweges im intestinalen Epithel dar, welcher in Mikrobiota-abhängiger Weise das intestinale Tumorentstehung durch Steuerung der epithelialen Proliferation und Apoptose reguliert. Zukünftige Studien werden notwendig sein um zu untersuchen, ob eine lokale intestinale Inhibition dieses Signalweges für die Prävention und Therapie des kolorektalen Karzinoms genutzt werden kann. Die Beobachtung einer gestörten epithelialen Barriere im Bereich intestinaler Adenome und Karzinome mit Infiltration der Mukosa durch kommensale Bakterien eröffnet dabei möglicherweise vielversprechende neue Aspekte durch Nutzung der Mikrobiota als therapeutisches Vehikel.

7 Literaturverzeichnis

1. Hentschel S, K.A., Luttmann S, Stegmaier C, Kaatsch P, Spix C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Krieghoff-Henning E, Kunz B, Penzkofer A, Tremel K, Wittenberg K, Baras N, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Franke M, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U (2013) *Krebs in Deutschland 2009/2010*.
2. Stewart, S.L., et al., *A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998–2001*. *Cancer*, 2006. **107**(S5): p. 1128-1141.
3. Cunningham, D., et al., *Colorectal cancer*. *The Lancet*, 2010. **375**(9719): p. 1030-1047.
4. de Jong, A.E., et al., *Prevalence of Adenomas among Young Individuals at Average Risk for Colorectal Cancer*. *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(1): p. 139-143.
5. Haggard, F.A. and R.P. Boushey, *Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors*. *Clinics in colon and rectal surgery*, 2009. **22**(4): p. 191-197.
6. Ries LAG, M.D., Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (1975-2005) *SEER Cancer Statistics Review*.
7. Baras N, B.B., Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Laudi A, Wolf U (2012) *Krebs in Deutschland 2007/2008*. **8**.
8. Boyle, P. and J.S. Langman, *Epidemiology*. *BMJ*, 2000. **321**(7264): p. 805-808.
9. Larsson, S.C. and A. Wolk, *Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies*. *International Journal of Cancer*, 2006. **119**(11): p. 2657-2664.
10. Zisman Al, et al., *Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: Implications for screening*. *Archives of Internal Medicine*, 2006. **166**(6): p. 629-634.
11. Vogelstein, B., et al., *Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development*. *New England Journal of Medicine*, 1988. **319**(9): p. 525-532.
12. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-767.
13. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004. **20**: p. 781-810.
14. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases*. *Developmental Cell*, 2009. **17**(1): p. 9-26.
15. Powell, S.M., et al., *APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis*. *Nature*, 1992. **359**(6392): p. 235-237.
16. Fearon, E.R., *Molecular Genetics of Colorectal Cancer*, in *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 6*, A.K. Abbas, S.J. Galli, and P.M. Howley, Editors. 2011, Annual Reviews: Palo Alto. p. 479-507.
17. Jackson-Thompson, J., et al., *Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998–2001*. *Cancer*, 2006. **107**(S5): p. 1103-1111.
18. Lynch Ht, et al., *Hereditary factors in cancer: Study of two large midwestern kindreds*. *Archives of Internal Medicine*, 1966. **117**(2): p. 206-212.
19. Lynch, H.T., T. Smyrk, and J.F. Lynch, *Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch syndrome)*. *International Journal of Cancer*, 1996. **69**(1): p. 38-43.
20. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. *Cell*, 1991. **66**(3): p. 589-600.
21. Eaden, J.A., K.R. Abrams, and J.F. Mayberry, *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis*. *Gut*, 2001. **48**(4): p. 526-535.
22. Kim, E.R. and D.K. Chang, *Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis*. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2014. **20**(29): p. 9872-9881.

23. Terzić, J., et al., *Inflammation and Colon Cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2101-2114.e5.
24. Jacobs, M.D. and S.C. Harrison, *Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex*. Cell, 1998. **95**(6): p. 749-758.
25. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-[kappa]B: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-6684.
26. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor*. Molecular and Cellular Biology, 1990. **10**(5): p. 2327-2334.
27. Shakhov AN, C.M., Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV., *Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages*. The Journal of Experimental Medicine, 1990. **171**(1): p. 35-47.
28. Haddad, J.J. and N.E. Abdel-Karim, *NF- κ B cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: Therapeutic pattern or pseudoregulation?* Cellular Immunology, 2011. **271**(1): p. 5-14.
29. Baldwin, A.S., *Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B*. The Journal of Clinical Investigation, 2001. **107**(3): p. 241-246.
30. Wang, C.-Y., et al., *NF- κ B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1680-1683.
31. Greten, F.R., et al., *IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer*. Cell, 2004. **118**(3): p. 285-296.
32. Schwitalla, S., et al., *Loss of p53 in Enterocytes Generates an Inflammatory Microenvironment Enabling Invasion and Lymph Node Metastasis of Carcinogen-Induced Colorectal Tumors*. Cancer Cell, 2013. **23**(1): p. 93-106.
33. Schwitalla, S., et al., *Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties*. Cell, 2013. **152**(1): p. 25-38.
34. Takeda, K. and S. Akira, *STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2000. **11**(3): p. 199-207.
35. Kusaba T, N.T., Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Inoue K, Nagayasu T, Sekine I., *Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer*. Oncology Reports, 2006. **15**(6): p. 1445-1451.
36. Kortylewski, M., et al., *Toll-like Receptor 9 Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Constrains Its Agonist-Based Immunotherapy*. Cancer Research, 2009. **69**(6): p. 2497-2505.
37. Wu, S., et al., *A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1016-1022.
38. Bollrath, J., et al., *gp130-Mediated Stat3 Activation in Enterocytes Regulates Cell Survival and Cell-Cycle Progression during Colitis-Associated Tumorigenesis*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 91-102.
39. Grivennikov, S., et al., *IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 103-113.
40. Sakamoto, K., et al., *Constitutive NF- κ B Activation in Colorectal Carcinoma Plays a Key Role in Angiogenesis, Promoting Tumor Growth*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(7): p. 2248-2258.
41. Corvinus FM, O.C., Moriggl R, Tsareva SA, Wagner S, Pfitzner EB, and e. al., *Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth*. Neoplasia, 2005. **7**(6): p. 545-55.
42. Crabtree, G.R., et al., *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science, 1988. **241**(4862): p. 202+.

43. Liu, L., et al., *Characterization of a human regulatory subunit of protein phosphatase 3 gene (PPP3RL) expressed specifically in testis*. *Molecular Biology Reports*, 2005. **32**(1): p. 41-45.
44. Klee CB, D.G., Hubbard MJ., *Calcineurin*. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1988. **61**: p. 149-200.
45. Rusnak, F. and P. Mertz, *Calcineurin: Form and Function*. *Physiological Reviews*, 2000. **80**(4): p. 1483-1521.
46. C B Klee, T.H.C., M H Krinks, *Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979. **76**(12): p. 6270–6273.
47. Hashimoto, Y., B.A. Perrino, and T.R. Soderling, *Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. **265**(4): p. 1924-1927.
48. Li, H., A. Rao, and P.G. Hogan, *Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins*. *Trends in Cell Biology*, 2011. **21**(2): p. 91-103.
49. Prieschl, E.E., et al., *A nuclear factor of activated T cell-like transcription factor in mast cells is involved in IL-5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation*. *The Journal of Immunology*, 1995. **154**(11): p. 6112-9.
50. Venkataraman, L., et al., *Cyclosporin-a sensitive induction of NF-AT in murine B cells*. *Immunity*, 1994. **1**(3): p. 189-196.
51. Park, J., A. Takeuchi, and S. Sharma, *Characterization of a New Isoform of the NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) Gene Family Member NFATc*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(34): p. 20914-20921.
52. Jain, J., et al., *A Similar DNA-binding Motif in NFAT Family Proteins and the Rel Homology Region*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(8): p. 4138-4145.
53. Luo, C., et al., *Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes*. *Molecular and Cellular Biology*, 1996. **16**(7): p. 3955-66.
54. Miyakawa, H., et al., *Tonicity-responsive enhancer binding protein, a Rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(5): p. 2538-2542.
55. López-Rodríguez, C., et al., *Bridging the NFAT and NF-κB Families: NFAT5 Dimerization Regulates Cytokine Gene Transcription in Response to Osmotic Stress*. *Immunity*, 2001. **15**(1): p. 47-58.
56. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function*. *Annual Review of Immunology*, 1997. **15**(1): p. 707-747.
57. Shibasaki, F., et al., *Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4*. *Nature*, 1996. **382**(6589): p. 370-373.
58. Chow, C.-W., M. Rincón, and R.J. Davis, *Requirement for Transcription Factor NFAT in Interleukin-2 Expression*. *Molecular and Cellular Biology*, 1999. **19**(3): p. 2300-2307.
59. Beals, C.R., et al., *Nuclear Export of NF-ATc Enhanced by Glycogen Synthase Kinase-3*. *Science*, 1997. **275**(5308): p. 1930-1933.
60. Zhu, J., et al., *Intramolecular Masking of Nuclear Import Signal on NF-AT4 by Casein Kinase I and MEKK1*. *Cell*, 1998. **93**(5): p. 851-861.
61. Jain, J., et al., *The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun*. *Nature*, 1993. **365**(6444): p. 352-355.
62. Jain, J., Z. Miner, and A. Rao, *Analysis of the preexisting and nuclear forms of nuclear factor of activated T cells*. *The Journal of Immunology*, 1993. **151**(2): p. 837-48.
63. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. *Genes & Development*, 2003. **17**(18): p. 2205-2232.
64. Loh, C., et al., *T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1*. *Molecular and Cellular Biology*, 1996. **16**(7): p. 3945-54.

65. Choi, M.S.K., et al., *Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4*. *Immunity*, 1994. **1**(3): p. 179-187.
66. Boss, V., D.J. Talpade, and T.J. Murphy, *Induction of NFAT-mediated Transcription by G-coupled Receptors in Lymphoid and Non-lymphoid Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(18): p. 10429-10432.
67. Liu, C. and T.E. Hermann, *Characterization of ionomycin as a calcium ionophore*. *Journal of Biological Chemistry*, 1978. **253**(17): p. 5892-4.
68. Nishizuka, Y., *Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses*. *The FASEB Journal*, 1995. **9**(7): p. 484-96.
69. Müller, M.R. and A. Rao, *NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(9): p. 645-656.
70. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. *Cell*, 1991. **66**(4): p. 807-815.
71. Shaw, K.T., et al., *Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(24): p. 11205-11209.
72. Adami, J., et al., *Cancer risk following organ transplantation: a nationwide cohort study in Sweden*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(7): p. 1221-1227.
73. Shankaran, V., et al., *IFN[gamma] and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1107-1111.
74. Lakshmikuttyamma, A., et al., *Increased expression of calcineurin in human colorectal adenocarcinomas*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005. **95**(4): p. 731-739.
75. Masuo, T., et al., *Cyclosporine A inhibits colorectal cancer proliferation probably by regulating expression levels of c-Myc, p21WAF1/CIP1 and proliferating cell nuclear antigen*. *Cancer Letters*, 2009. **285**(1): p. 66-72.
76. Duque, J., *Expression and Function of the Nuclear Factor of Activated T Cells in Colon Carcinoma Cells: INVOLVEMENT IN THE REGULATION OF CYCLOOXYGENASE-2*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(10): p. 8686-8693.
77. Su, L., et al., *Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene*. *Science*, 1992. **256**(5057): p. 668-670.
78. Moser, A.R., H.C. Pitot, and W.F. Dove, *A Dominant Mutation That Predisposes to Multiple Intestinal Neoplasia in the Mouse*. *Science*, 1990. **247**(4940): p. 322-324.
79. Bisgaard, M.L., et al., *Familial adenomatous polyposis (FAP): Frequency, penetrance, and mutation rate*. *Human Mutation*, 1994. **3**(2): p. 121-125.
80. Nishisho, I., et al., *Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Cancer Patients*. *Science*, 1991. **253**(5020): p. 665-669.
81. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988. **85**(14): p. 5166-5170.
82. Orban, P.C., D. Chui, and J.D. Marth, *Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. **89**(15): p. 6861-6865.
83. Robine, S., et al., *Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells?* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1985. **82**(24): p. 8488-8492.
84. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
85. Winer, J., et al., *Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes in Vitro*. *Analytical Biochemistry*, 1999. **270**(1): p. 41-49.

86. Anderson, K.V., *Toll signaling pathways in the innate immune response*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(1): p. 13-9.
87. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Journal of Immunological Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
88. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. *International Journal of Cancer*, 1983. **31**(1): p. 13-20.
89. Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, and E.S. Alnemri, *CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(49): p. 30761-4.
90. Tewari, M., et al., *Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase*. *Cell*, 1995. **81**(5): p. 801-809.
91. Krzywinski, M. and N. Altman, *Points of significance: Comparing samples[mdash]part I*. *Nat Meth*, 2014. **11**(3): p. 215-216.
92. Zanoni, I., et al., *CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation*. *Nature*, 2009. **460**(7252): p. 264-268.
93. Fric, J., et al., *NFAT control of innate immunity*. *Blood*, 2012. **120**(7): p. 1380-1389.
94. Greenblatt, M.B., et al., *Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2010. **207**(5): p. 923-931.
95. de la Pompa, J.L., et al., *Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum*. *Nature*, 1998. **392**(6672): p. 182-6.
96. Ranger, A.M., et al., *The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation*. *Nature*, 1998. **392**(6672): p. 186-90.
97. Molkenstin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 215-28.
98. Graef, I.A., et al., *Neurotrophins and Netrins Require Calcineurin/NFAT Signaling to Stimulate Outgrowth of Embryonic Axons*. *Cell*. **113**(5): p. 657-670.
99. Ranger, A.M., et al., *The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis*. *J Exp Med*, 2000. **191**(1): p. 9-22.
100. Tomita, M., et al., *Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(44): p. 42214-8.
101. Zhang, L., et al., *Osteoclastogenesis: the role of calcium and calmodulin*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2005. **15**(1): p. 1-13.
102. Choo, M.K., H. Yeo, and M. Zayzafoon, *NFATc1 mediates HDAC-dependent transcriptional repression of osteocalcin expression during osteoblast differentiation*. *Bone*, 2009. **45**(3): p. 579-89.
103. Buchholz, M., et al., *Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway*. *EMBO J*, 2006. **25**(15): p. 3714-3724.
104. Köenig, A., et al., *NFAT-Induced Histone Acetylation Relay Switch Promotes c-Myc-Dependent Growth in Pancreatic Cancer Cells*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(3): p. 1189-1199.e2.
105. König, A., M.E. Fernandez-Zapico, and V. Ellenrieder, *Primers on Molecular Pathways – The NFAT Transcription Pathway in Pancreatic Cancer*. *Pancreatology*, 2010. **10**(4): p. 416-422.
106. Singh, G., et al., *Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(35): p. 27241-50.
107. Duque, J., M. Fresno, and M.A. Iniguez, *Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(10): p. 8686-93.

108. Engels, E.A., et al., *Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients*. JAMA, 2011. **306**(17): p. 1891-901.
109. Peuker, K., et al., *Epithelial calcineurin controls microbiota-dependent intestinal tumor development*. Nat Med, 2016. **22**(5): p. 506-15.
110. Buchholz, M. and V. Ellenrieder, *An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis*. Cell Cycle, 2007. **6**(1): p. 16-9.
111. Medyouf, H., et al., *Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Nat Med, 2007. **13**(6): p. 736-741.
112. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. Nature, 2007. **449**(7162): p. 557-563.
113. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-144.
114. Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky, *Toll-Like Receptor 2 Controls Mucosal Inflammation by Regulating Epithelial Barrier Function*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1359-1374.
115. Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov, *Regulation of Spontaneous Intestinal Tumorigenesis Through the Adaptor Protein MyD88*. Science, 2007. **317**(5834): p. 124-127.
116. Lee, S.H., et al., *ERK activation drives intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice*. Nat Med, 2010. **16**(6): p. 665-670.
117. Scheeren, F.A., et al., *A cell-intrinsic role for TLR2-MYD88 in intestinal and breast epithelia and oncogenesis*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(12): p. 1238-48.
118. Wang, E.L., et al., *High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2010. **102**(5): p. 908-15.
119. Grivnennikov, S.I., et al., *Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth*. Nature, 2012. **491**(7423): p. 254-8.
120. Rallabhandi, P., et al., *Differential activation of human TLR4 by Escherichia coli and Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid A acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling*. J Immunol, 2008. **180**(2): p. 1139-47.
121. Liu, S. and T. Kielian, *Microglial activation by Citrobacter koseri is mediated by TLR4- and MyD88-dependent pathways*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5537-47.
122. Minami, T., *Calcineurin-NFAT activation and DSCR-1 auto-inhibitory loop: how is homeostasis regulated?* Journal of Biochemistry, 2014. **155**(4): p. 217-226.
123. Peng, S.L., et al., *NFATc1 and NFATc2 Together Control Both T and B Cell Activation and Differentiation*. Immunity. **14**(1): p. 13-20.
124. Graef, I.A., et al., *Signals Transduced by Ca²⁺/Calcineurin and NFATc3/c4 Pattern the Developing Vasculature*. Cell. **105**(7): p. 863-875.
125. Aramburu, J., et al., *Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A*. Science, 1999. **285**(5436): p. 2129-33.

8 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Zeißig für die Vergabe des Dissertationsthemas und die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Er stand mir jederzeit hilfsbereit zur Seite und hat mich geduldig an das wissenschaftliche Arbeiten und die Thematik herangeführt. Seine Begeisterung für die Forschung hat mich immer wieder aufs Neue motiviert.

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. Schreiber, Direktor der Klinik der für Innere Medizin I, UKSH Kiel für die Bereitstellung des Labors und die Möglichkeit, meine Experimente dort durchführen zu können.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Alexander Arlt und seiner Mitarbeiterin Frau Frauke Grohmann für die Hilfestellungen bei der Laborarbeit und der Fertigstellung der Dissertation sowie das Überlassen eines Arbeitsplatzes in ihrem Labor.

Besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. physiol. Marie-Luise Kruse für ihre Unterstützung bei der Fluoreszenzmikroskopie und bei technischen Fragen bedanken.

Der Arbeitsgruppe des Labors für gastrointestinale Immunologie sowie Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer und ihren Arbeitsgruppen möchte ich für die große Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Nike Müller und Frau Esther Bosse für die konstruktiven Diskussionen und viel Spaß bei der Laborarbeit. Nike Müller war mir zudem beim Korrekturlesen dieser Arbeit eine große Hilfe.

Zuletzt möchte ich aus ganzem Herzen meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung danken, ohne die mir weder das Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wären.

9 Anhang

9.1 Erklärung Doktorarbeit

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation mit dem Thema:

DIE ROLLE VON CALCINEURIN UND NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED
T CELLS IN DER KOLOREKTALEN KARZINOGENESE

abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Alle durchgeführten Experimente und Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien von und mit Genehmigung des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein und des Harvard Medical Area Standing Committee on Animals (Boston, MA, USA).

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefanie Muff
Geburtstag	08.09.1987
Geburtsort	Kiel
Anschrift	Goethestr. 28, 24116 Kiel
E-Mail	stefanie.muff@gmail.com

Schulbildung

08/1994 – 06/1998	Grund- und Hauptschule, Schönkirchen
08/1998 – 06/2007	Gymnasium Wellingdorf, Kiel

Studium

10/2007 – 12/2013	Studium der Humanmedizin, Christian-Albrechts-Universität Kiel
08/2009	1. Staatsexamen
08/2012 – 07/2013	Praktisches Jahr Pädiatrie – Städtisches Krankenhaus Kiel Innere Medizin – UKSH, Campus Kiel Chirurgie – imland Klinik, Rendsburg
12/2013	2. Staatsexamen und Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2014	Assistenzärztin zur Weiterbildung in der Inneren Medizin, Klinik für Innere Medizin I, UKSH Kiel
--------------	---

Dissertation

04/2010 – 04/2012	Praktische Arbeiten zur Dissertation im Labor für gastrointestinale Immunologie, UKSH, Campus Kiel
-------------------	---

Preise

02/2016	Promotionspreis der Norddeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie
---------	---

Publikationen

05/2016

K. Peuker, S. Muff et al.

“Epithelial calcineurin controls microbiota-dependent intestinal tumor development.”

Nature Medicine 22, 506–515, (2016)