

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. C.-T. Germer

**Der antiproliferative Effekt des epigenetischen BRD4-
Inhibitors JQ1 auf den proliferativen Phänotyp
humaner kolorektaler Karzinomzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Julia Kettler
aus Schweinfurt

Würzburg, März 2018



Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Harald Wajant

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Februar 2019

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	Das Protoonkogen <i>MYC</i>	2
1.3	<i>MYC</i> als Transkriptionsfaktor und epigenetischer Modulator.....	4
1.4	Die Bedeutung von <i>MYC</i> für die neoplastische Transformation.....	7
1.5	<i>MYC</i> bei der Adaption von Tumorzellen an Hypoxie.....	8
1.6	Der BRD4-Inhibitor JQ1	9
1.7	Ziele der Arbeit	10
2	Fragen	12
3	Methoden	13
3.1	Zelllinien	13
3.2	Zellkulturmedien	13
3.3	Zellkultur.....	14
3.4	Zellernte und Zellzählung	14
3.5	Inhibitoren.....	14
3.6	Kristallviolett-Assay	15
3.7	Experimentelles Design.....	15
3.8	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	16
3.9	Hypoxieversuche.....	17
3.10	Der antiproliferative Effekt von JQ1 in der Langzeitkultur	17
3.11	Western Blot.....	18
3.12	Reverse Transkriptase (RT) quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	20
3.13	Zellzyklusanalyse	22
3.14	Statistische Auswertung	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Der antiproliferative Effekt von JQ1.....	23
4.2	Der antiproliferative Effekt von JQ1 in Abhängigkeit der Tumorzellproliferation	25
4.3	Der antiproliferative Effekt von JQ1 in Hypoxie.....	26
4.4	Der antiproliferative Effekt von JQ1 in der Langzeitkultur	28
4.5	Der Einfluss von JQ1 auf die Expression von <i>MYC</i> und <i>p21</i>	30
4.6	Der Einfluss von JQ1 auf den Zellzyklus.....	33
4.7	Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei nicht-transformierten Zellen	34
5	Beantwortung der Fragen	36
6	Diskussion	38
6.1	Der antiproliferative Effekt von JQ1.....	38
6.2	Zum Wirkmechanismus von JQ1	39
6.3	Der Einfluss der Zellproliferation auf den antiproliferativen Effekt von JQ1	43
6.4	Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei nicht-transformierten Zellen	44
7	Ausblick	46
8	Zusammenfassung	47
9	Literaturverzeichnis	49
10	Abbildungsverzeichnis	58
11	Anhang	59

Danksagung

Curriculum Vitae

Abkürzungen

AML	Akute myeloische Leukämie
BCA	Bicinchoninsäure, Trivialname für eine Dicarbonsäure, die zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinen eingesetzt wird
bp	Basenpaare
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
E-box	enhancer box
ECL	Substrat für Western Blotting (enhanced chemiluminescence)
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
kDA	Kilodalton (10 ³ Dalton), atomare Masseneinheit (Molekülmasse)
L /mL / μ L	Liter / Milliliter (10 ⁻³ L) / Mikroliter (10 ⁻⁶ L); Einheit für das Volumen
log	Logarithmus
A / V	Einheitszeichen von Ampere (A), der elektr. Stromstärke, und Volt (V), der elektr. Spannung
mmHg	Millimeter Quecksibersäule, Maßeinheit des Druckes
mol	Einheitszeichen der Stoffmengenangabe Mol; entsprechend Millimol (mmol/L) Mikromol (μ mol/L) und Nanomol (nmol/L)
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Number (Anzahl), Angabe zur Anzahl biologischer Replika-te)
ng / nm	Nanogramm / Nanometer
U/min	Umdrehungen pro Minute
xg	Mehrfaches der Erdbeschleunigung (g); Maßeinheit der relativen Zentrifugalkraft rZ

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Mit der Bezeichnung »kolorektales Karzinom« werden Krebserkrankung des Dick- (Kolon) und Enddarms (Rektum) sowie seltene Karzinome des Analbereichs zusammengefasst. Histologisch handelt es sich hierbei mehrheitlich um ein Adenokarzinom (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2015)¹⁾. Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten onkologischen Erkrankungen weltweit und betrifft vor allem die Bevölkerung der westlich entwickelten Länder (Boyle P, Langman JS, 2000; Ferlay J, et al., 2015). In Deutschland ist Darmkrebs die dritthäufigste Krebserkrankung bei beiden Geschlechtern (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).

Das kolorektale Karzinom tritt überwiegend sporadisch (=spontan) auf, doch ist bei ca. 20 - 25 Prozent der Betroffenen eine familiäre Disposition nachzuweisen. Hierzu zählen hereditäre Karzinome, die dem polygenen Erbgang folgen, aber auch seltene Darmkrebssyndrome wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das „non-polypöse“ kolorektale Karzinom (HNPCC) mit stark positiver Familienanamnese, die monogen vererbt werden (Holinski-Feder E, Grabowski M, 2006).

Als Auslöser für die Entstehung kolorektaler Karzinome werden zahlreiche exogene Faktoren²⁾ (mit)verantwortlich gemacht, doch haben sich als wesentliche Risikofaktoren ein hohes Lebensalter und die Präsenz von Dickdarmpolypen erwiesen (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2015). So entwickelt sich bei ca. sechzig Prozent der Patienten (Tannapfel A et al., 2010) mit sporadisch adenomatösen Polypen aus diesen über eine Reihe von zellproliferationsfördernden Mutationen, wie in den

¹⁾ www.gekid.de.

²⁾ Dazu zählen ein übermäßiger Tabak- und Alkoholkonsum, ein reichlicher Verzehr von Fleisch und tierischen Fetten sowie eine pathologische Stoffwechsellage wie Adipositas und Bewegungsmangel. Auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn erhöhen das Risiko für ein kolorektales Karzinom (Johnson CM et al., 2013). Zudem scheinen opportunistische Bakterien in der Darmflora durch Auslösung entzündlicher Prozesse die Entstehung des kolorektalen Karzinoms zu begünstigen (McCoy AN et al., 2013).

Tumorsuppressorgenen *APC*³⁾ und *p53*⁴⁾ oder dem Onkogen *KRAS*⁵⁾, ein kolorektales Karzinom (Ashton-Rickardt PG et al., 1989; Fearon ER, Vogelstein B, 1990). Diese neoplastische Transformation wird als »Adenom-Karzinom-Sequenz« bezeichnet (Fearon ER, Vogelstein B, 1990). Seit Einführung der Vorsorgekoloskopie mit präventiver Entfernung von Darmpolypen ist die Erkrankungsrate deutlich rückläufig (Brenner H et al., 2016).

Das kolorektale Karzinom wird nach der TNM-Klassifikation⁶⁾ eingeteilt und stadienadaptiert therapiert (Herold G, 2014). Unabhängig von der anatomischen Lokalisation des Tumors (Kolon oder Rektum) wird primär die chirurgische Entfernung angestrebt. In Abhängigkeit vom Tumorstadium wird das operative Vorgehen mit einer neoadjuvanten oder adjuvanten Chemotherapie kombiniert. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt unabhängig vom Tumorstadium und Geschlecht ca. 65 Prozent (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

1.2 Das Protoonkogen *MYC*

Anfang der 1980er Jahre wurde das auf Chromosom 8 liegende hochkonservierte Protoonkogen *MYC* als zelluläres Homolog („c“, cellular) des viralen Onkogens *v-Myc* aus dem Retrovirusstamm MC29 des Geflügelleukosevirus („avian leukemia virus“) isoliert (Vennstrom B et al., 1982). Die Bezeichnung *MYC* leitet sich dabei von der Vogelkrankheit **Myelocytomatose** ab. Die Proteinfamilie *MYC* besteht neben *c-Myc* aus *S-*, *B-*, *N-* und *L-Myc*. Über *S-* und *B-Myc*, beide kommen in Nagetieren vor, ist bisher wenig bekannt. *N-* und *L-Myc* werden von Zellen des Neuro- und Retinoblastoms sowie von Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms exprimiert (Nau MM et al., 1985; Atchley WR, Fitch WM, 1995).

³⁾ Abkürzung für »Adenomatous polyposis coli«. Das durch dieses Gen codierte Protein ist an der Degradation von β -Catenin, einem Mediatorprotein des für die Zellentwicklung wichtigen Wnt-Signalweges, beteiligt. *APC* begrenzt die Proliferation des Epithels der Darmkrypten auf die Zellen des Kryptenbodens (Fodde R, 2002).

⁴⁾ Der Tumorsuppressor *p53* steht mit *p21* in Wechselwirkung und kann Zellzyklusarrest oder Apoptose einleiten (Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G, 2006).

⁵⁾ Abkürzung für »Kirsten rat sarcoma« Virus. Hierbei handelt es sich um ein GTP-bindendes Protein, das für die Proliferation von Krebszellen von großer Bedeutung ist (Kranenburg O, 2005).

⁶⁾ Die Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms basiert innerhalb der Klassifikation nach UICC (Union International Contre le Cancer) auf dem TNM-System. »T« bezeichnet die Ausdehnung des Primärtumors, »N« und »M« das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen bzw. hämatogenen Fernmetastasen.

Nachfolgend wird das Protein c-Myc als »MYC« und das Gen bzw. die mRNA als »MYC« bezeichnet.

Eine physiologische Expression von MYC ist in proliferierenden Zellen, embryonale wie adulte Zellen, nachzuweisen (Atchley WR, Fitch WM, 1995). Die Stärke der MYC-Expression wird dabei durch mitogene Signale wie Wachstumsfaktoren stark erhöht und ist in ruhenden Zellen kaum nachweisbar (Kelly K et al., 1983; Campisi J et al., 1984; Dean M et al. 1986; Waters CM et al. 1991). In sich teilenden Zellen fördert MYC die Progression der G1- und S-Phase des Zellzyklus⁷⁾ (Dean M et al. 1986; Waters CM et al. 1991; Nasi S et al., 2001) durch Aktivierung von in die Zellzyklusregulation eingebundenen Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) z. B. durch Hemmung des CDK-Inhibitorproteins p21⁸⁾ (Hermeking H et al. 2000; Seoane J, Le HV, Massagué J, 2002). Die Expression von MYC in den einzelnen Zellzyklusphasen ist dabei gleich (Hann SR et al. 1985).

Zusätzlich zu seinen die Zellproliferation fördernden Eigenschaften kann MYC die Zelldifferenzierung hemmen (Demeterco C et al., 2002; Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN, 2002), die Angiogenese modulieren (Baudino TA et al., 2002), den Zellmetabolismus (Eilers M, Eisemann RN, 2008) und die Funktion von Stammzellen beeinflussen (Laurenti E et al., 2009). Auch kann MYC an der Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) vor allem bei Nährstoffmangel (Evan GI et al., 1992) beteiligt sein durch Steigerung der Expression pro-apoptotischer (Zindy F et al., 1998; Eischen CM et al., 2001) und Reprimierung anti-apoptotischer Gene (Mitchell KO et al., 2000; Eischen CM, Packham G et al, 2001).

⁷⁾ Der Zellzyklus setzt sich aus Mitose- (M) und Interphase zusammen. Zur Interphase gehören die postmitotische G1-Phase, die Synthese- bzw. S-Phase und die prämitotische G2-Phase. In der G1- und G2-Phase überprüfen zelluläre Kontrollsysteme die DNA auf mögliche Schäden und entscheiden darüber, ob der Zellzyklus weiterläuft oder unterbrochen wird (Arretierung).

⁸⁾ p21 hält die Zelle durch Hemmung der CDKs bei DNA-Schäden in einer Ruhephase, damit Reparaturmechanismen greifen können (Xiong Y et al., 1993). Die Zelle arretiert dabei in der G0/G1-Phase und kann nicht in die S-Phase übergehen (Brugarolas J et al., 1995).

Die von MYC beeinflussten direkten Zielgene umfassen schätzungsweise 15 Prozent des menschlichen Genoms (Dang CV, et al. 2006). Eine erhöhte und deregulierte Expression von MYC weisen ca. 70 Prozent der humanen Tumoren auf (Erisman et al., 1985; Nau MM et al., 1985; Atchley WR, Fitch WM, 1995), weshalb dieses Protein in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor für die onkologische Forschung von besonderem Interesse ist.

1.3 MYC als Transkriptionsfaktor und epigenetischer Modulator

MYC verfügt als Transkriptionsfaktor über eine basische Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper Domäne (bHLH-LZ) in der C-terminalen Region (Abbildung 1). Über die Heterodimerisierung mit dem Protein MAX (**MYC associated Factor X**), das ebenfalls über ein bHLH-LZ-Motiv verfügt, ist MYC in der Lage, an die palindromische-Sequenz 5'-CACGTG-3' oder an weniger affine Sequenzen (5'-CANNTG-3') auf der DNA zu binden und die Genexpression zu induzieren (Blackwell TK et al., 1990; Dang CV, 2012). Eine Repression der Geneexpression vermittelt der MYC/MAX-Komplex in Verbindung mit dem Zinkfingerprotein Miz-1 (Schneider A et al., 1997; Kleine-Kohlbrecher D, Adhikary S, Eilers M, 2006). Vermutlich wird die Repression zusätzlich über MYC aktivierte Corepressoren mit DNA-Methyltransferaseaktivität erreicht (Brenner C et al., 2005).

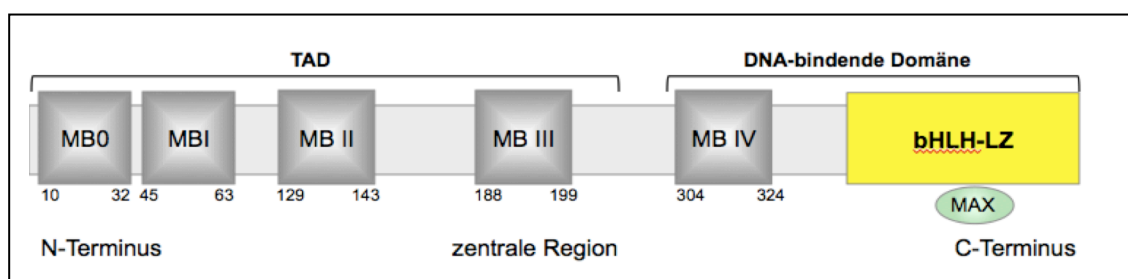


Abbildung 1.1: Übersicht über die funktionellen Bereiche im MYC-Protein. Die C-terminale bHLH-LZ-Domäne (Dang CV, 1999) heterodimerisiert mit MAX (siehe Text) und bindet an die Erkennungssequenz 5'-CANNTG-3' der DNA (nicht gezeigt). Die Transaktivierungsdomäne (TAD) mit der MYC Box (MB) I und II am N-Terminus führt zur Genaktivierung (siehe auch Text). MYC Box III liegt in der zentralen Region von MYC und ist als Repressor der Transkription und als negativer Regulator der Apoptose beschrieben (Herbst et al., 2005). MYC Box IV spielt bei der Zelltransformation, Apoptose und DNA-Bindung eine Rolle (Cowling VH et al., 2006). Jüngste Daten beschreiben eine MYC BOX 0, die verantwortlich ist für Apoptose und Transformation (Zhang Q et al. 2017). Eigene Darstellung inspiriert von Cole MD, Cowling VH, 2008; Zhang Q et al., 2017.

MYC vermittelt die kooperative Bindung zwischen DNA und anderen Proteinen, indem es als Bindeglied wirkt. Auf diese Weise rekrutiert MYC den positiven Transkriptionselongationsfaktor b (p-TEFb), der über die Cyclin-abhängige Kinase 9 (CDK9) die Arretierung der RNA Polymerase II beendet (Cole MD, Cowling VH, 2008; Rahl PB et al., 2010) und die Transkription induziert (Abbildung 1.2). Die durch MYC vermittelte Steigerung der Transkription in Tumorzellen wird als transkriptionelle Amplifikation bezeichnet, die vermutlich die Tumorzellproliferation verstärkt, indem MYC auch an weniger affine E-box-Sequenzen bindet (Lin CY et al., 2012, Rahl PB, Young RA, 2014). Zudem aktiviert MYC die Polymerase I und III, die die nichtkodierenden rRNAs und tRNAs für die Proteinbiosynthese und ribosomale Biogenese synthetisieren (Grandori C et al., 2005; Kenneth NS et al., 2007). Somit kann MYC als universeller Transkriptionsverstärker angesehen werden, der Zellproliferation und maligne Dedifferenzierung fördert (Rahl PB et al. 2010; Lin CY et al., 2012; Nie Z et al., 2012).

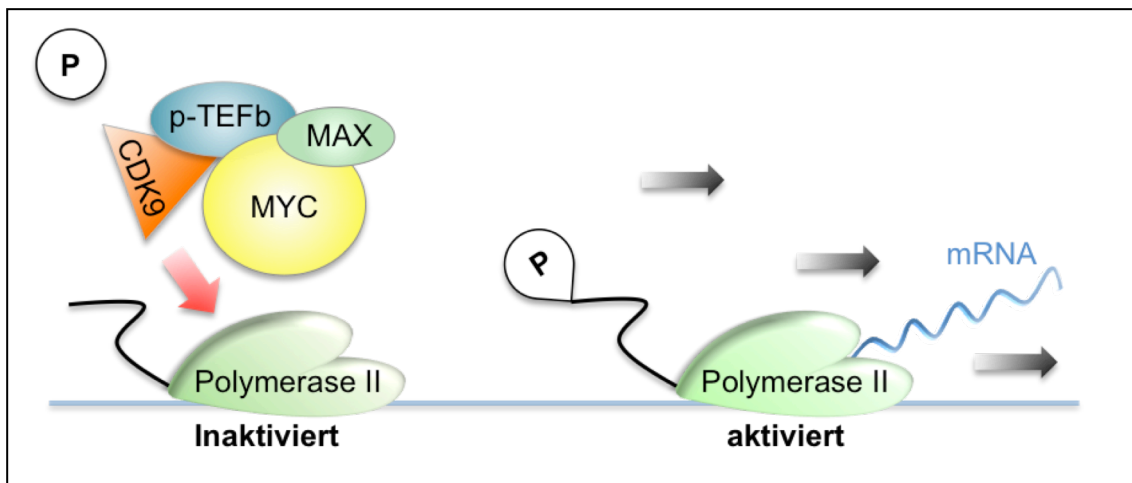


Abbildung 1.2: MYC aktiviert die Polymerase II und fördert die Transkription. Dazu bindet der MYC/MAX-Komplex den positiven Transkriptionselongationsfaktor b (p-TEFb), der durch CDK9 die inaktive Polymerase II phosphoryliert und damit aktiviert (siehe auch Text). Eigene Darstellung inspiriert von Cole MD, Cowling VH, 2008.

In seiner zweiten Funktion als epigenetischer Modulator steigert MYC auf vielfältige Art die Transkription und Translation von Genen und damit die Genaktivierung (Amente S, Lania L, Majello B, 2011). Hierzu weist MYC verschiedene funktionelle Bereiche auf (Abbildung 1.1). Am N-Terminus befindet sich eine

Transaktivierungsdomäne (TAD)⁹⁾ mit MYC Box I und MYC Box II (Abbildung 1.1). Hierbei handelt es sich um zwei hochkonservierte Regionen. MYC Box I spielt unter anderem bei der Degradation von MYC eine Rolle und MYC Box II ist vor allem für die Genaktivierung von Bedeutung und determiniert die biologischen Funktionen von MYC (Stone J et al., 1987). Über MYC Box II bindet MYC den Cofaktor TRRAP¹⁰⁾ und humane Histonacetyltransferasen (HATs) (Abbildung 1.3) wie die in der Literatur gut beschriebene GCN5 Acetylase des STA-GA¹¹⁾-Komplexes (Mc Mahon SB et al., 1998; Mc Mahon SB et al. 2000). HATs steigern die Transkriptionsaktivität, indem sie die Chromatinstruktur der DNA durch Acetylierung auflockern und die Promoterregion für Transkriptionsfaktoren zugänglich machen (Sterner DE, Berger SL, 2000). MYC kann außerdem das Muster der Genexpression durch Hemmung von mikroRNAs beeinflussen. Diese kleinen nichtkodierenden RNAs verringern sowohl die Stabilität der mRNA als auch ihre Translation (Akao Y et al., 2006). Durch posttranskriptionelle Stabilisierung der mRNA mit einer 5'-Cap-Methylierung ist MYC an der Steigerung der Translation beteiligt (Cowling VH, Cole MD, 2007).

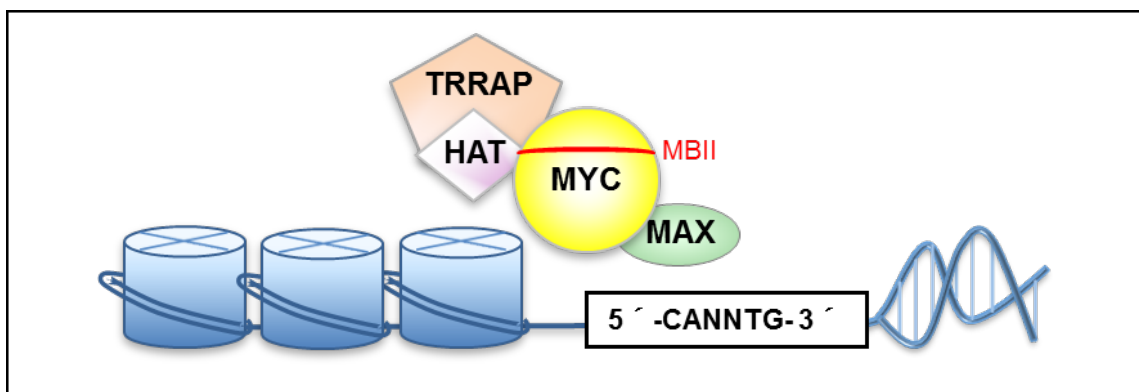


Abbildung 1.3: MYC reguliert die Genexpression als Transkriptionsfaktor und epigenetischer Modulator. Um als Transkriptionsfaktor wirken zu können, muss die Chromatinstruktur geöffnet werden (»Chromatin-remodeling«). Hierzu rekrutiert MYC in Verbindung mit MAX Histonacetylasen (HATs) und TRRAP (»transformation/transcription domain-associated protein«). MBII: MYC Box II. Eigene Darstellung inspiriert von Pelengaris S et al., 2002.

⁹⁾ Bereich eines Transkriptionsfaktors, der mit anderen Faktoren in Wechselwirkung tritt und die Transkription aktiviert (Giguère V et al., 1986).

¹⁰⁾ Abkürzung für »Transformation/transcription domain-associated protein«.

¹¹⁾ SPT3-TAF9-GCN5-Acetylase.

1.4 Die Bedeutung von MYC für die neoplastische Transformation

Eine deregulierte Expression von MYC fördert in Interaktion mit anderen Onkogen-Produkten wie RAS nahezu sämtliche, für eine neoplastische Transformation notwendigen biologischen Vorgänge (Abbildung 1.4). Bereits in den 1980er Jahren wurde die Genamplifikation von *MYC* bei Zellen des kolorektalen Karzinoms nachgewiesen (Alitalo K et al., 1983; Finley et al., 1989). Ursächlich hierfür sind Mutationen im *MYC*-Gen, die durch Chromosomentranslokationen (Rearrangement) entstehen. Dabei sind Mutationen im *MYC*-Gen nicht zwingend Voraussetzung für die Überexpression (Levens D, 2008). Erisman et al. wiesen bereits 1985 eine erhöhte *MYC*-Expression in Adenokarzinomzellen des Kolons unabhängig von Rearrangement und Genamplifikation nach (Erisman MD et al., 1985). Die *MYC*-Expression kann beispielsweise auch über den Wnt-Signalweg¹²⁾ aktiviert werden (He TC et al., 1998). Bei bis zu 80 Prozent der kolorektalen Karzinome ist dieser Signalweg durch den Verlust des Tumorsuppressors APC (Kapitel 1.1) dereguliert und *MYC* überexprimiert (Wilkins JA, Sansom OJ, 2008). Untersuchungen von Hutter et al. zum Einzelnukleotid-Polymorphismus („single nucleotide polymorphism“, SNP) des 8q24 Locus auf Chromosom 8 haben Polymorphismen in diesem Bereich als Risikofaktor für die kolorektale Karzinogenese identifiziert (Hutter CM et al., 2010). Die Regionen enthalten vermutlich epigenetisch verstärkende Marker (Enhancer) und interagieren gewebeabhängig über die Chromatinstruktur mit *MYC*.

Die Expression von *MYC* kann auch zur Induktion von Apoptose führen und damit tumorsuppressiv wirken (Evan GI et al., 1992, Packham G, Cleveland JL, 1994; Seoane J, Le HV, Massagué J, 2002), doch dominiert in Tumorzellen sein onkogenes Potential (Abbildung 1.4). Entscheidend dafür, welche der beiden Eigenschaften überwiegt, scheint der Anteil an *MYC*-Protein in der Zelle zu sein. Ein „gering erhöhter“ Anteil an *MYC*-Protein fördert eher die Zellproliferation, während ein „stark erhöhter“ Anteil an *MYC* dagegen über den Arf/p53-

¹²⁾ Einer der zahlreichen Signaltransduktionswege, die der Zelle es ermöglicht, auf äußere Signale zu reagieren.

Signalweg¹³⁾ die Zelle für Apoptose sensibilisiert (Murphy JD et al., 2008; Chen D et al., 2013). In kolorektalen Tumorzellen ist allerdings die Induktion von Apoptose über den Arf/p53-Signalweg häufig gestört (Chaar I et al., 2014). Auch deregulierte anti-apoptotische Faktoren limitieren die tumorsuppressive Wirkung von MYC (Kelly PN et al., 2011) und transformierte Zellen reagieren stärker auf proliferationsfördernde als auf pro-apoptotische MYC-Signale (McMahon SB, 2014).

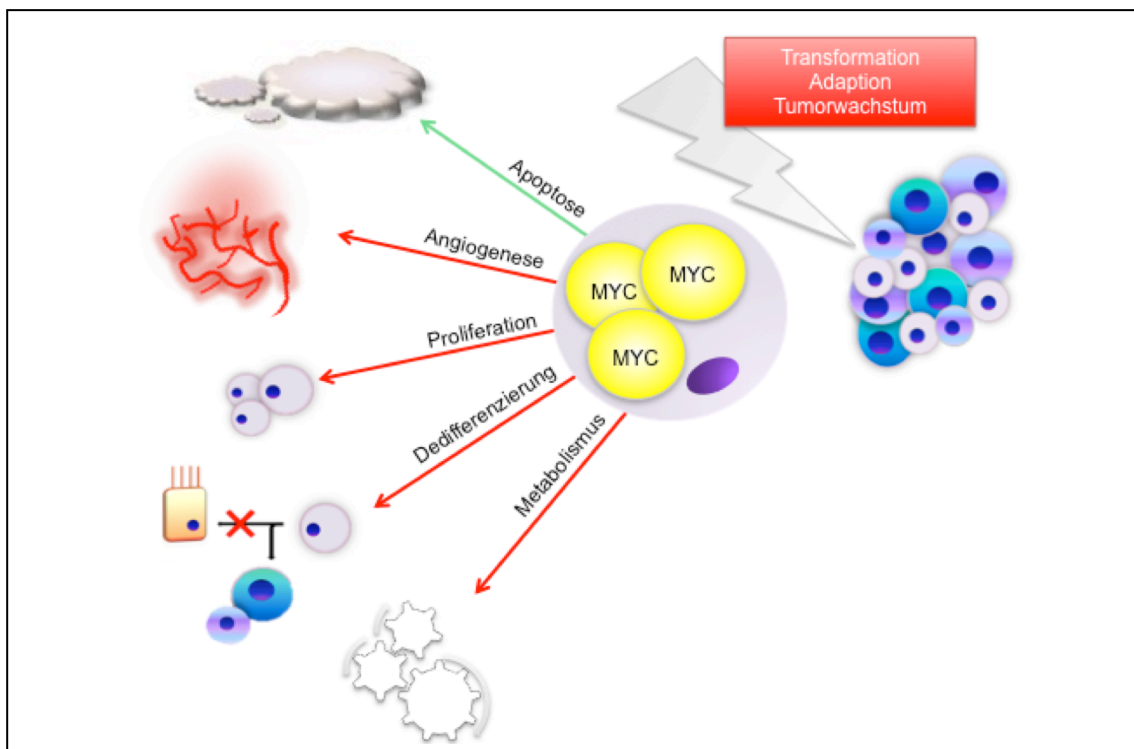


Abbildung 1.4: Die deregulierte Expression von MYC fördert die Tumorgene. Eine deregulierte Expression von MYC steigert die Transkription MYC-beeinflusster Gene und führt zu unkontrollierter Zellproliferation. Zusätzlich adaptiert MYC den Tumorstoffwechsel an limitierende Bedingungen in einem soliden Tumor wie Tumorphypoxie, hemmt die Zelldifferenzierung und fördert Angiogenese. In dieser „onkogenen“ Situation kommt die Apoptose-induzierende Wirkung von MYC nicht zum Tragen (Oster SK, 200). Eigene Darstellung auf Basis von Literaturdaten.

1.5 MYC bei der Adaption von Tumorzellen an Hypoxie

In soliden Tumoren führt das Missverhältnis von gebildeten Blutgefäßen zur Tumormasse oft zu einer verminderten Gewebeversorgung mit Sauerstoff, was als Tumorphypoxie bezeichnet wird (Vaupel P et al., 1989; Vaupel P, Mayer A,

¹³⁾ Ein über die Proteine Arf (alternatives Leseraster des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 2a, Cdkn2a) und p53 vermittelter Tumor-Suppressor-Signalweg, der in der Erkennung und Eliminierung zellulärer Schäden eine zentrale Rolle spielt.

2007). MYC unterstützt die Adaption des Tumorstoffwechsels an hypoxische Bedingungen durch Steigerung der Glykolyse («hyperaktive Glykolyse») ¹⁴⁾ (Shim H et al, 1997; Osthus RC et al., 2000, Kim JW et al., 2007; Locasale JW, Cantley LC, 2011), unterliegt aber selbst einer durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1 α (HIF-1 α) vermittelten Degradation. Dies führt zur Reduktion von Zellproliferation und Biosynthesen und fördert damit das Überleben der Tumorzellen in Hypoxie (Keith B et al., 2011, WJ Wong et al., 2013). Zusätzlich beeinflusst MYC die Neubildung von Blutgefäßen durch Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF ¹⁵⁾ (Kim JW, Dang CV, 2006; Kim JW et al., 2007).

1.6 Der BRD4-Inhibitor JQ1

Die zur Stoffklasse der Thienodiazepine gehörende niedermolekulare Verbindung oder »small molecule« JQ1 bindet an BRD4 ¹⁶⁾, einem Mitglied der Familie der *Bromodomain and extra-terminal* (BET)-Proteine mit einer charakteristischen Bromodomäne, die Erkennungssequenzen für acetylierte Lysine aufweist. Hierüber bindet BRD4 an Histone und steuert die Genexpression (Delmore JE et al., 2011). Zudem verfügt BRD4, das von Zellen in der Teilung vor allem in der frühen G1-Phase unter Einfluss von Wachstumsfaktoren exprimiert wird, über eine eigene Kinaseaktivität und kann die RNA-Polymerase II für die Transkription aktivieren (Maruyama T et al., 2002; Devaiah BN et al., 2011). Ebenso aktiviert BRD4 zahlreiche Interaktionspartner in der späten Mitose wie z. B. den Transkriptionselongationsfaktor p-TEFb (Abbildung 1.2). Die Zellprogression wird vermutlich dadurch gefördert (Yang Z, He N, Zhou Q, 2008; Jang MO, 2005). Darüber hinaus acetyliert BRD4 auch selbst Histone und öffnet die Chromatinstruktur für die Genexpression (BN Devaiah et al. 2016).

JQ1 lagert sich kompetitiv mit hoher Spezifität an die Bromodomäne von BRD4 und verhindert die Interaktion von BRD4 mit dem Chromatin. Die in Zelllinien

¹⁴⁾ Die Anpassung von Krebszellen an hypoxische Bedingungen geht einher mit einer starken Laktatbildung auch bei Anwesenheit von Sauerstoff; dies wurde bereits 1923 von Otto Warburg beobachtet.

¹⁵⁾ Abkürzung für »vascular endothelial growth factor«.

¹⁶⁾ Abkürzung für »Bromodomain-containing protein 4«.

des Plattenepithelkarzinoms und Xenograft-Tumoren beobachtete gesteigerte Differenzierung und verminderte Proliferation wird auf die Behandlung mit JQ1 zurückgeführt (Filippakopoulos P et al., 2010). Vermutlich greift JQ1 während der Mitose oder des M/G1-Übergangs¹⁷⁾ in die Regulierung zahlreicher Zielgene von BRD4 ein. So sank in Zellen des Multiplen Myeloms bereits vier Stunden nach Zugabe von JQ1 der Gehalt an *MYC*-Transkript auf ca. zwei Prozent, gleichzeitig erhöhte sich die Expression des Tumorsuppressors *p21* (Kapitel 1.2) um das Vierhundertfache. Die Zellen arretierten in der G0/G1-Phase und wurden in Apoptose überführt (Mertz JA et al., 2011). Die durch JQ1 vermittelten biologischen Effekte sind im Detail noch nicht vollständig verstanden. So korreliert der antiproliferative Effekt von JQ1 nicht in allen untersuchten Zelllinien mit einer verringerten Expression von *MYC*, sondern wie z. B. in Osteosarkom-Zellen mit einem Rückgang von *FOSL1*, einem wichtigen Transkriptionsfaktor bei der Osteoblasten-Differenzierung (Baker EK et al., 2015). JQ1 wurde bisher erfolgreich *in vitro* und *in vivo* an Zellen verschiedener Tumorentitäten getestet (Delmore JE et al., 2011; Mertz JA et al., 2011; Asangani IA et al., 2014; Fowler T et al., 2014; Shao Q et al., 2014). Dabei zeigte JQ1 *in vivo* eine gute Verträglichkeit.

1.7 Ziele der Arbeit

Der antiproliferative Effekt des BRD4-Inhibitors JQ1 wurde seit seiner Entwicklung im Jahr 2010 an verschiedenen Tumorentitäten vor allem des lymphatischen und blutbildenden Systems nachgewiesen (Kapitel 1.6). Ziel der Arbeit war deshalb, den antiproliferativen Effekt von JQ1 an fünf humanen kolorektalen Karzinomzelllinien im Vergleich zu nicht-transformierten Kontrollzellen (Fibroblasten) zu untersuchen. Für die Untersuchungen *in vitro* wurden Bedingungen gewählt, die charakteristisch für die Situation in einem soliden Tumor sind, hierzu gehört u. a. die Tumorphoxie. Während in normalen Geweben überwiegend eine physiologische Sauerstoffkonzentration zwischen 2 und 11 Prozent vorherrscht, ist Tumorgewebe in aller Regel mit Sauerstoff unterversorgt. Dabei sind intratumorale Sauerstoffkonzentrationen von 5 und 1 Prozent repräsentativ

¹⁷⁾ Siehe auch Fußnote ⁷⁾.

(Vaupel P et al., 1989; Vaupel P, Mayer A, 2007). Es ist bekannt, dass Strahlen- und Chemotherapie in Hypoxie weniger wirksam sind (Gray LH et al., 1953; Yoshida S et al., 2009). Daher sollte der antiproliferative Effekt von JQ1 mit dem von 5-FU, ein für die Therapie des kolorektalen Karzinoms zugelassenes Zytostatikum (Poon MA et al., 1989), in Hypoxie (5 bzw. 1 Prozent Sauerstoff) verglichen werden.

Die Stärke des antiproliferativen Effektes von JQ1 scheint im Wesentlichen vom Ausmaß der durch JQ1-vermittelten MYC-Depletion abhängig zu sein (Fowler T et al. 2014). Andererseits konnte für JQ1 auch ein von MYC unabhängiger antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden (Baker EK et al., 2015). Deshalb war es Ziel, den Einfluss von JQ1 auf die Expression von MYC-Protein und *MYC*-mRNA zu untersuchen. Als negativer Regulator von p21, ein den Zellzyklus kontrollierendes Protein (Kap. 1.2), sollte ein abnehmender zellulärer Gehalt an MYC zu einer Zunahme an *p21*-mRNA führen, mit der Konsequenz, dass die Zellen im Zellzyklus arretieren. Dieser Zusammenhang sollte ebenfalls untersucht werden.

Zusätzlich sollte in einer kleinen Versuchsserie der antiproliferative Effekt von JQ1 mit dem des MYC-Inhibitors 10058-F4 verglichen werden. Dessen Wirkungsweise basiert auf einer Hemmung der Dimerisierung von MYC mit MAX (Abbildung 1.3), wodurch die Funktion von MYC als Transkriptionsfaktor inhibiert wird (Yin X et al., 2003; Gomez-Curet I, 2006; Guo J et al., 2009). Eine Abnahme von *MYC*-mRNA durch 10058-F4 wurde bereits gezeigt (Gomez-Curet I, 2006).

2 Fragen

Zellen humaner kolorektaler Karzinomzelllinien (RKO, Colo678, HCT116, HT29, LS174T) und nicht-transformierte Fibroblasten (NHDF) wurden mit dem »small molecule« JQ1 *in vitro* inkubiert. Folgende Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

- 1) JQ1 kann auf epigenetischer Ebene über BRD4 die MYC-Expression beeinflussen, während 10058-F4 die Bindung von MYC an seinen Bindungspartner MAX verhindert und dadurch die Funktion von MYC als Transkriptionsfaktor hemmt. Weist JQ1 einen antiproliferativen Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen auf und wie stark ist dieser im Vergleich zum MYC-Inhibitor 10058-F4?
- 2) Tumorgewebe ist in aller Regel mit Sauerstoff unterversorgt und intratumorale Sauerstoffkonzentrationen von 5 und 1 Prozent haben sich als repräsentativ erwiesen. Wirkt JQ1 auch bei diesen Sauerstoffkonzentrationen antiproliferativ und wie stark ist dieser Effekt im Vergleich zum Zytostatikum 5-FU?
- 3) Tumorzellen weisen aufgrund optimaler Kulturbedingungen eine starke Zellproliferation *in vitro* auf, die aber für die Situation *in vivo* nicht repräsentativ sein muss. Beeinflusst die Stärke der Tumorzellproliferation den antiproliferativen Effekt von JQ1 und wie verhält sich dieser in der Langzeitkultur (144 Stunden)?
- 4) Wesentlich für die Stärke des antiproliferativen Effektes von JQ1 scheint das Ausmaß der durch JQ1 vermittelten MYC-Depletion zu sein. Korreliert der antiproliferative Effekt von JQ1 bei kolorektalen Karzinomzellen auf einer Reduktion von MYC Protein bzw. MYC mRNA? Steigert JQ1 die Expression des von MYC reprimierten Zielgens *p21* und führt die gesteigerte Expression von *p21* zu einer Arretierung des Zellzyklus?

3 Methoden

3.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden fünf humane kolorektale Karzinomzelllinien aus dem Bestand des Forschungsbereichs für Experimentelle Viszeralchirurgie der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg und nicht maligne humane Fibroblasten (NHDF, PromoCell GmbH) untersucht. Die kolorektalen Karzinomzelllinien weisen verschiedene Mutation auf (Tabelle 3.1). Alle Zellen wachsen adhärent und waren zum Zeitpunkt der Untersuchung frei von Mykoplasmen (nicht gezeigt).

Tabelle 3.1: Angaben zum Genstatus von *TP53* und *KRAS* für die in dieser Arbeit untersuchten humanen kolorektalen Karzinomzelllinien. WT: Wildtyp, MUT: Mutation, TP53: Das für p53 kodierende Gen.

Zelllinie	<i>TP53</i>	<i>KRAS</i>
Colo678	WT	MUT
HCT116	WT	MUT
LS174T	WT	MUT
HT29	MUT	WT
RKO	WT	WT

3.2 Zellkulturmedien

Als Kulturmedium für die kolorektalen Karzinomzelllinien Colo678, LS174T und RKO wurde RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen verwendet (Endkonzentration): Penicillin G (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL; Kat.-Nr.: 15140122 (Pen/Strep)), L-Glutamin (2 mmol/L; Kat.-Nr.: 25030081), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/L; Kat.-Nr.: 11360070), Natrumpyruvat (1 mmol/L), nicht-essentielle Aminosäuren (1 %, Kat.-Nr.: 11140050) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Kat.-Nr.: 10270-106); alle Reagenzien von Gibco, ThermoFisher Scientific. Die Zelllinien HCT116 und HT29 wurden in McCoy Medium (ThermoFisher Scientific, Kat.-Nr.: 26600-023) mit den gleichen Zusätzen kultiviert. Humane Fibroblasten wurden in »Fibroblast Growth« Medium 2 (PromoCell GmbH, Kat.-Nr.: C-23020) mit 8 mmol/L Glukose, 2 % FCS, 1 % Penicillin und Streptomycin sowie mit den beiden humanen Wachstumsfaktoren Fib-

roblastenwachstumsfaktor (1 ng/mL) und insulinähnlicher Wachstumsfaktor (5 µg/mL) kultiviert.

3.3 Zellkultur

Die kolorektalen Karzinomzellen (Tabelle 3.1) wurden in „mittleren“ Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Greiner Bio-One) bei Standardbedingungen von 37°C, 21% Sauerstoff, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Zellinkubator bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90 % in ihrem jeweiligen Medium kultiviert (Kapitel 3.2). Fibroblasten wurden ebenfalls in mittleren Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellkulturmedien (Kapitel 3.2) wurden alle drei bis vier Tage gewechselt. Die maximale Anzahl an Zellpassagen betrug 15.

3.4 Zellernte und Zellzählung

Für die Zellernte wurde das Zellkulturmedium (Kapitel 3.2) abgesaugt und die Zellen mit 5 mL 0,05 % Trypsin in HBSS (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Kat.-Nr.: SH30236.01) für 10 Minuten inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 50 mL PBS (»phosphate buffered saline«; Gibco, ThermoFisher Scientific, Kat.-Nr.: 70013-016) aufgenommen und für 6 Minuten bei 397 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in RPMI 1640 Medium (10 % FCS) resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Marienfeld GmbH, Kat.-Nr. 0640010). Hierzu wurden die Zellen mit 0,04 % (Endkonzentration) Trypanblau (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: T8154) gefärbt. Tote Zellen wurden mit Trypanblau angefärbt und nicht gezählt.

3.5 Inhibitoren

3.5.1 JQ1

Für eine Stammlösung von 1 mmol/L wurden 5 mg JQ1 (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: SML0974, 249,35 g x mol⁻¹) in 11,1 mL DMSO (Sigma-Aldrich, Katalog Nr.: D5879) gelöst. Hieraus wurden Verdünnungsreihen zwischen 2 µmol/L und 7,8 x 10⁻³ µmol/L hergestellt. Die maximale DMSO-Konzentration betrug 0,2 % bei einer Konzentration an JQ1 von 2 µmol/L.

3.5.2 10058-F4

Für eine Stammlösung von 1 mmol/L wurden 5 mg 10058-F4 (Sigma-Aldrich, Katalog Nr.: F3680, $249,53 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$) in 2 mL DMSO gelöst und mit 18 mL RPMI 1640 (10 % FCS) aufgefüllt. Hieraus wurden Verdünnungsreihen zwischen 150 und 2,3 $\mu\text{mol/L}$ hergestellt. Die maximale DMSO-Konzentration betrug 1,5 % bei einer Konzentration an 10058-F4 von 150 $\mu\text{mol/L}$.

3.5.3 5-Fluoruracil (5-FU)

Die Stammlösung (10^{-2} mol/L) wurde von der Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg hergestellt. 5-FU wurde in der in Vorversuchen ermittelten IC_{50} -Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ verwendet (nicht gezeigt). Das Zytostatikum 5-FU hemmt als Antimetabolit die RNA- und DNA-Synthese.

3.6 Kristallviolett-Assay

Der Kristallviolett-Assay ist ein kolorimetrischer Test zum Nachweis vitaler Zellen. Kristallviolett bindet an DNA, wobei sich der Anteil an gebundenem Farbstoff proportional zur Zellzahl verhält. Für den Assay wurde das Medium aus der Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One, Kat.-Nr.: 655180) abgesaugt und die Zellen mit 100 μL Methanol pro Vertiefung fixiert. Nach 10 Minuten wurde der Überstand entfernt und 100 μL Kristallviolett-Lösung (0,25 % in PBS (Kapitel 3.4) mit 25 % Methanol; Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: C32675-25g) pro Vertiefung für 10 Minuten hinzugegeben. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch viermaliges Spülen der Zellkulturschale mit destilliertem Wasser aus den Vertiefungen ausgewaschen und die Zellkulturschale anschließend 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Mit 200 μL 10 % Essigsäure (Sigma-Aldrich) pro Vertiefung wurde der gebundene Farbstoff in Lösung gebracht (30 Minuten auf einem Wippschüttler). Die optische Dichte wurde mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.

3.7 Experimentelles Design

5×10^3 Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One) wurden mit jeweils 200 μL Medium für 16 Stunden in einem Zellinku-

bator bei Standardbedingungen (Kapitel 3.3) kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 200 μ L Medium mit JQ1, 10058-F4 oder 5-FU in der jeweiligen Verdünnungsstufe (Kapitel 3.5) ersetzt. Die Zellkulturschalen wurden anschließend für 24, 48 oder 72 Stunden in einem Zellinkubator bei Standardbedingungen (Kapitel 3.3) inkubiert und die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay (Kapitel 3.6) bestimmt. Für jede Verdünnungsstufe wurden bis zu 6 Parallelwerte (technische Replikate) angesetzt und mindestens 3 Versuchsserien (biologische Replikate) durchgeführt. Zur Normalisierung der Anzahl vitaler Zellen auf die Ausgangszellzahl wurde die Aussaat nach 16 Stunden in Kultur mit dem Kristallviolett-Assay (Kapitel 3.6) bestimmt. Zusätzlich wurde die Anzahl vitaler Zellen auf die Anzahl unbehandelter Zellen (=Nullkontrolle) normalisiert. Die Ergebnisse wurden mit dem Software-Programm GraphPad PRISM 6.0 graphisch und statistisch ausgewertet.

Zur Bewertung der antiproliferativen Effekte der Inhibitoren (Kapitel 3.5) wurden folgende Grenzwerte (»Cutoffs«) basierend auf Schwankungen bei der Bestimmung der Zellzahl zwischen biologischen Replikaten festgelegt:

- ➔ kein antiproliferativer Effekt bei Schwankungen der Zellzahl zwischen 85 und 115 %.
- ➔ geringer antiproliferativer Effekt bei einer Abnahme der Zellzahl auf mehr als 85 % und weniger als auf 50 %.
- ➔ starker antiproliferativer Effekt bei einer Abnahme der Zellzahl auf mehr als 50 %.

3.8 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die halbmaximale inhibitorische Konzentration oder IC₅₀ gibt die Konzentration an, bei der 50 Prozent der Zellen in ihrer Zellproliferation gehemmt sind. Je stärker der antiproliferative Effekt eines Inhibitors ist, desto kleiner ist sein IC₅₀. Ermittelt wurden die IC₅₀-Werte der beiden »MYC-Inhibitoren« für die genannten Verdünnungsstufen (Kapitel 3.5). Berechnet wurde der IC₅₀ mit dem Software-Programm GraphPad PRISM 6.0 mit der Gleichung »log (inhibitor) vs. normalized response«. Die Graphen zeigen bei halblogarithmischer Darstellung

einen sigmoidalen Kurvenverlauf (»log Inhibitorkonzentration versus Anzahl vitaler Zellen«). IC₅₀-Werte außerhalb der höchsten getesteten Konzentrationsstufe an Inhibitor (Kapitel 3.5) wurden nicht berechnet.

3.9 Hypoxieversuche

Hypoxieversuche wurden in einer Hypoxiewerkbank (Coy Laboratory Products) bei 5 % Sauerstoff (5% CO₂ und 90 % Stickstoff) und 1 % Sauerstoff (5 % CO₂ und 94 % Stickstoff) für 72 Stunden durchgeführt. Mit dem Nachweis der Expression des Hypoxiemarkers Carboanhydrase IX (CAIX) wurden die Bedingungen in der Hypoxiekammer überprüft (nicht gezeigt).

3.10 Der antiproliferative Effekt von JQ1 in der Langzeitkultur

Die Zellen wurden ausplattiert (Kapitel 3.7) und mit JQ1 inkubiert (Abbildung 3.1). Nach 72 Stunden wurde JQ1 mit dem Zellkulturmedium (Kapitel 3.2) entfernt und durch frisches Medium mit und ohne JQ1 ersetzt. Das Zellkulturmedium der Nullkontrolle wurde ebenfalls gewechselt. Die Anzahl vitaler Zellen wurde nach weiteren zwei bis drei Tagen (Inkubationsdauer von insgesamt 120 bzw. 144 Stunden) mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Kapitel 3.6 und Abbildung 3.1).

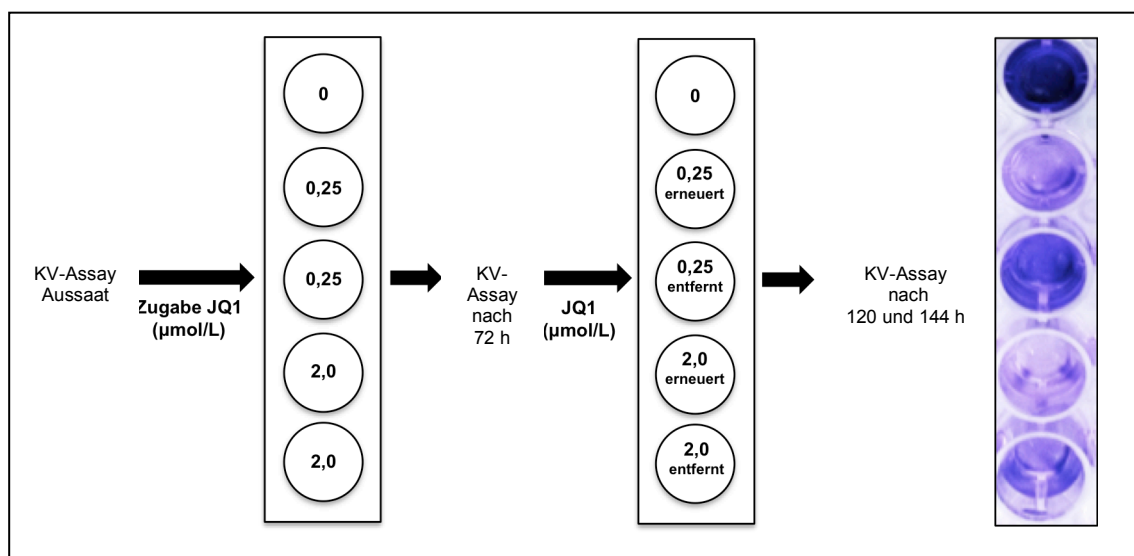


Abbildung 3.1: Repräsentatives Ergebnis zum antiproliferativen Effekt von JQ1 in der Langzeitkultur. An der Farbeintensität ist deutlich zu erkennen, dass nach Entfernen von JQ1 aus den Zellkulturen die Zellproliferation wieder einsetzte (gezeigt für RKO). Die kolorektalen Karzinomzellen wurden in ihrem jeweiligen Medium (mit 10 % FCS) kultiviert (Kapitel 3.2).

3.11 Western Blot

Die Analysemethode Western Blot ermöglicht in Kombination mit der hochauflösenden **Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese** (SDS-PAGE) den spezifischen immunologischen Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch.

1x10⁶ Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen (Greiner Bio-One, Kat.-Nr.: 657 160) wurden zweimal mit 200 µL PBS (Kapitel 3.4) gespült („gewaschen“), 100 µL Lyse-Puffer (Tabelle 3.2) zugegeben und mit einem Zellschaber (Sarstedt, Kat.-Nr.:83.1832) vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Das Lysat wurde mit einem Ultraschall-Homogenisator (Bandelin Sonoplus HD 2070) bei einer Amplitude von 30 % zweimal für jeweils 30 Sekunden zum weiteren Zellaufschluss homogenisiert.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme.

Puffer	Komponente	Endkonzentration (Volumen)
Lyse-Puffer (1 % SDS, pH 7,6)	HEPES ^{a)} (238,30 g/mol) EDTA ^{b)} (372,2 g/mol) NaF ^{c)} (41,99 g/mol) SDS ^{d)} (288,4 g/mol)	25 mmol/L 2 mmol/L 25 mmol/L 10 %
Auftragepuffer nach Laemmli (4x, pH 4,6)	Tris-HCl ^{e)} (0,5 mmol/L) SDS (10 %) 2-Mercaptoethanol (>99 %) Glycerol (99,5 %) Bromphenolblau (0,1 %)	0,125 mmol/L (0,25 mL) 4 % (0,4 mL) ca. 5 % (0,05 mL) 19,9 % (0,2 mL) 0,01 % (0,1 mL)
SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	Tris (121,4 g/mol) (ultrapure, Sigma) Glycin (75,07 g/mol) SDS (288,4 g/mol)	3,1 g/L 14,4 g/L 1 g/L
Towbin-Puffer (pH 8,3)	Tris (ultrapure, Sigma) Glycin (75,07 g/mol) Methanol (>99,8 %)	25 mmol/L 152 mmol/L 20 %
TBS (10x)	Tris (ultrapure, Sigma) NaCl ^{f)} HCl ^{g)} (1 mol/L) nach Verdünnung Tween 20 zugeben	24,2 g/L 80 g/L 0,04 mol/L (38 mL/L) 0,05-1 %

^{a)} 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; ^{b)} Ethylendiamintetraessigsäure (Komplexbildner); ^{c)} Natriumfluorid (Natriumsalz der Fluorwasserstoffsäure); ^{d)} Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate), anionisches Tensid; ^{e)} Kurzbezeichnung für Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Puffersubstanz); ^{f)} Natriumchlorid (Kochsalz); ^{g)} Chlorwasserstoff (in Wasser gelöst: Salzsäure).

Der Proteingehalt von Mess- und Standardproben wurde mit dem BCA-Proteinassay (Pierce, ThermoFisher Scientific, Kat.-Nr.: 23227) bei 570 nm bestimmt. Die Proben (jeweils 15 µg) wurden mit ca. 10 µL Laemmli-Puffer (Tabelle 3.2) vermischt, bei 99°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf das Gel (Bio-rad, Kat.-Nr.: 456-1084) aufgetragen sowie zusätzlich 3 µL vorgefärbter Proteinmarker (Protein Marker V, PeqLab VWR, Kat.-Nr.: 272210) für den Größenbereich von 10 bis 250 kDa. Die Proben wurden bei 100 V für 1 Stunde im Gel aufgetrennt und mit Towbin-Puffer (Tabelle 3.2) bei 170 mA für 90 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll) übertragen. Die Membran wurde für 1 Stunde in TBS-T (Tris-buffered-saline with tween 20) (Tabelle 3.2) mit 5 % Milchpulver inkubiert und danach 3 mal mit TBS-T gewaschen.

Die Primärantikörper (Tabelle 3.3) wurden über Nacht bei 4°C auf einem Wippschüttler im Dunkeln inkubiert. Am Folgetag wurde die Nitrocellulosemembran 3 mal mit TBS-T (s. oben) gewaschen, der Sekundärantikörper (polyclonal-goat-anti-rabbit-Immuglobulin, HRP-konjugiert¹⁸⁾, Dako, Kat.-Nr.: E0432) in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBS-T hinzugegeben und für 1 Stunde auf einem Wippschüttler im Dunkeln inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde die mit TBS-T gewaschene Nitrocellulosemembran für jeweils 1 Minute in den ECL-Lösungen 1 und 2 (GE Healthcare Europe GmbH, Kat.-Nr.: 2232) inkubiert und die Chemolumineszenz detektiert.

Tabelle 3.3: Die für den Western Blot verwendeten Primärantikörper.

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung	Größe (kDa)
MYC [Y69]	Abcam	Ab32072	1:1 000	57
GAPDH-71.1 ^{a)}	Sigma-Aldrich	G9295	1:10 000	37
β-Aktin AC-15	Sigma-Adrich	A3854	1:10 000	42

^{a)} Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Enzym der Glykolyse.

¹⁸⁾ Meerrettichperoxidase.

3.12 Reverse Transkriptase (RT) quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Eine Million Zellen wurden mit 1 mL Trizol (Invitrogen GmbH, Kat.-Nr.: 15596-026) lysiert und nach 10-minütiger Inkubation bei 4°C 200 µL Chloroform (Carl Roth GmbH und Co. KG, Kat.-Nr.: UN1888) zugegeben. Nach Mischen (Vortex-Schüttler) wurde die Probe für weitere 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Phasen wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 16 060 xg und 4°C getrennt (Biofuge fresco, Heraeus, Thermo Fisher Scientific). Die obere wässrige Phase mit der Gesamt-RNA wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues steriles Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µL Isopropanol (Merck, Kat.-Nr.: 1.09634.1000) über Nacht bei -20°C gefällt. Die RNA wurde bei 13 684 xg und 4°C für 10 Minuten pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 mL 75 % Ethanol (Merck, Kat.-Nr.: 1.00980.0500) gewaschen bevor es bei 5 354 xg und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt, das RNA-Pellet bei 37°C für 10 Minuten getrocknet und mit 45 µL RNA "storage solution" (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr.: AM7000) für 10 Minuten bei 57°C in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 1400 U/min gelöst. Die isolierte Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.12.1 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 600 ng RNA mit Hilfe des iScript-Kits (BioRad, Kat.-Nr.: 170-8891) in einem Gesamtvolumen von 20 µL in cDNA bei folgendem Temperaturprofil umgeschrieben: 5 Minuten bei 25°C, 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 85°C.

3.12.2 qPCR

Für die quantitative PCR wurde der MESA Green qPCR MasterMix Kit (Eurogentec, RT-SY2X-03+NRWOU) verwendet. Die Primerpaare (Tabelle 3.5) wurden mit TE-Puffer, pH 7.0 (Ambion, Kat.-Nr.: AM9861) auf 100 pmol/µL eingestellt und in einer Endkonzentration von 200 nmol/L dem Reaktionsansatz (Tabelle 3.5) zugegeben. Die Reaktion wurde in einem PCR-Cycler (CFX96, BioRad) und der Steuerungssoftware CFX Manager (Version 2.0, BioRad) bei fol-

gendem Temperaturprofil durchgeführt: 5 Minuten bei 95°C (ein Zyklus) danach 15 Sekunden bei 95°C (40 Zyklen), 1 Minute bei 60°C (40 Zyklen) und 5 Minuten bei 72°C (ein Zyklus).

Die Transkription von *MYC* und *p21* mRNA wurde auf die Expression der beiden Referenzgene β -Aktin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA) mit der $\Delta\Delta Cq$ -Methode relativ berechnet (Pfaffl MW, 2001). Die beiden Referenzgene zeigen eine stabile Expression für die getesteten Zelllinien und wurden aus einer Reihe von Referenzgenen aufgrund ihres M-Werts (Vandesompele J et al., 2002) ausgewählt (nicht gezeigt). Mit einem Schmelztemperaturprofil zwischen 54°C und 95°C wurde die Einheitlichkeit der Amplifikate überprüft (Nachweis bzw. Ausschluss von Primerdimer-Artefakten). Zusätzlich wurden die aufgereinigten Amplifikate sequenziert (Microsynth Seqlab), um ihre Übereinstimmung mit der Zielsequenz zu bestätigen (nicht gezeigt).

Tabelle 3.4: qPCR Reaktionsansatz (25 μ L).

Komponente	Volumen (μ L)
Mesa Green 2fach	12,5
Primer (jeweils 5 μ mol/L)	1
dH ₂ O	9,5
cDNA (1:5 vorverdünnt)	2

Die Effizienz der Enzymreaktion wurde mit Verdünnungsreihen der cDNA (1:5 bis 1:160) bestimmt. Sie lag zwischen 95 % und 115 % (nicht gezeigt). Die Effizienz errechnet sich aus der Steigung der Geraden »log Produktmenge versus Cq-Zyklus («cycle of quantification« oder Cq)«. Für eine Effizienz von E=1 (2^n gilt dann nahezu für die Enzymreaktion) ist der Betrag für die Steigung der Geraden 3,32 (mit negativer Orientierung). Mit abnehmender Effizienz wird der Betrag für die Steigung größer (Pfaffl, MW, 2001).

Tabelle 3.5: Primerpaare. bp: Basenpaare, for: Forward Primer, rev: Reverse Primer.

Gen	PubMed-ID	Größe (bp)	Primer (Sequenz 5' → 3')	
MYC	NM_002467.4	102	for rev	CAC CAG CAG CGA CTC TGA GAT CCA GAC TCT GAC CTT TTG
p21	NM_000389.4	80	for rev	GGA TTC GCC GAG GCA CCG AG GCC GCA TGG GTT CTG ACG GA
β-Aktin	NM_001101.3	70	for rev	CCT CGC CTT TGC CGA TCC CAC GAA AGC AAT GCT ATC AC
PPIA ¹⁹⁾	NM_021130.3	82	for rev	GCT GGA CCC AAC ACA AAT GG CAA ACA CCA CAT GCT TGC CA

3.13 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde durchflusszytometrisch (FACScan™, Becton Dickinson) mit Propidiumjodid (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: P4170-10MG) durchgeführt. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass Zellen während des Zellzyklus einen unterschiedlichen Gehalt an DNA aufweisen²⁰⁾ (Brockhoff et al., 2007). Für die Analysen wurden 1×10^6 Zellen in 300 µL PBS (Kapitel 3.4) mit 700 µL Ethanol (-20°C) für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL 4°C kaltem PBS wurden die fixierten Zellen für sechs Minuten zentrifugiert (1.500 xg), der Überstand verworfen und die Zellen mit 300 µL PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µL RNase (1 mg/mL) (Sigma-Adrich, Kat.-Nr.: R6513-10MG) wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 15 µL Propidiumjodid (1 mg/mL) gefärbt und nach fünf Minuten im Durchflusszytometer gemessen. Die Messergebnisse wurden mit dem Programm WinMDI, Versionen 2.8 ausgewertet (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

3.14 Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung (einfaktorielle Varianzanalyse, one-way-Anova) mit Post-hoc-Test (Dunnett's multiple comparisons) wurde mit GraphPad PRISM 6.0 durchgeführt. Gezeigt sind der Mittelwert und das 95 % Konfidenzintervall bzw. die Standardabweichung. Das Signifikanzniveau p wurde auf 0,05 festgesetzt.

¹⁹⁾ Abkürzung für »Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase A«.

²⁰⁾ Vollständiger Chromosomensatz (G1-Phase), doppelter Chromosomensatz (Ende S-Phase), einfacher Chromosomensatz (Ende G2-Phase).

4 Ergebnisse

4.1 Der antiproliferative Effekt von JQ1

Mit der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration, auch als IC_{50} bezeichnet, ist die Stärke des antiproliferativen Effektes von JQ1 objektiv bestimmbar: Je stärker der antiproliferative Effekt von JQ1, desto kleiner war die halbmaximale inhibitorische Konzentration (Abbildung 4.1).

Für die untersuchten fünf kolorektalen Karzinozelllinien war ein IC_{50} -Wert für JQ1 nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden zu bestimmen. Für eine Inkubationszeit von 48 Stunden war dies nur für die drei Zelllinien RKO, Colo678 und HCT116 möglich. Für HT29 und LS174T lag der IC_{50} noch über der maximalen Konzentration von 2 $\mu\text{mol/L}$ JQ1. Dies zeigt, dass der antiproliferative Effekt von JQ1 bei diesen beiden Zelllinien geringer war, was auch die höheren IC_{50} -Werte nach einer Inkubation von 72 Stunden bestätigen. Für die nicht transformierten Kontrollzellen war auch nach dieser Inkubationszeit der IC_{50} nur zu schätzen, da der Anteil vitaler Zellen über 50 % lag (Tabelle 4.1). Aus diesen Daten (Tabelle 1) lässt sich ein selektiver antiproliferativer Effekt von JQ1 für kolorektale Karzinomzellen ableiten.

Tabelle 4.1: Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei kolorektalen Karzinomzellen und Fibroblasten (NHDF). Die IC_{50} -Werte für JQ1 ($\mu\text{mol/L}$) sind als Mittelwert mit dem entsprechenden 95 %-Konfidenzintervall (CI) für eine Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden angegeben.

	IC_{50} (48 Stunden)		IC_{50} (72 Stunden)	
	Mittelwert	95% CI	Mittelwert	95% CI
RKO	0,75	0,47-1,10	0,27	0,20 -0,34
Colo678	0,71	0,49-1,04	0,58	0,47-0,72
HCT116	1,34	1,13-1,6	0,78	0,62-0,99
HT29	>2	--	0,90	0,77-1,06
LS174T	>2	--	1,05	0,72-1,51
NHDF	>2	--	>2	--

Folgende Konzentrationen an JQ1 wurden festgelegt: RKO: 0,25 $\mu\text{mol/L}$, Colo678 und HCT116: 0,5 $\mu\text{mol/L}$, HT29 und LS174T: 1 $\mu\text{mol/L}$.

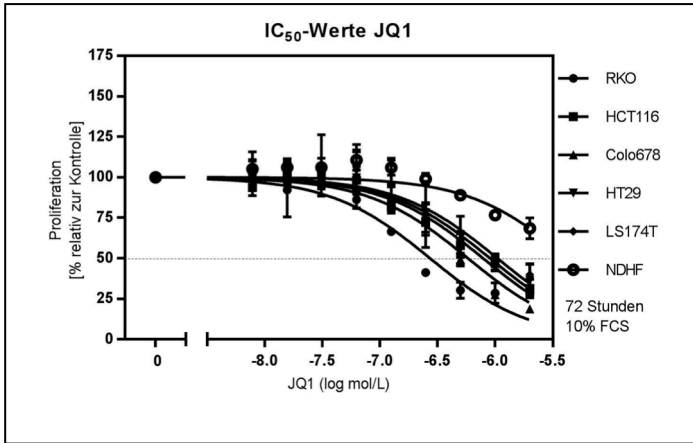


Abbildung 4.1: Graphische Darstellung zum Zusammenhang zwischen der Konzentration an JQ1 und der Zellproliferation. Der sigmoidale Kurvenverlauf, der charakteristisch ist für diesen Zusammenhang, verdeutlicht die Notwendigkeit den IC_{50} (und nicht den IC_{100}) zu bestimmen. Gezeigt sind die Daten für eine Inkubationszeit von 72 Stunden. $n = 2-4$ biologische Replikate (Kapitel 3.7), GraphPad Prism 6.0.

Wie unter »Ziele der Arbeit« (Kapitel 1.7) thematisiert, wurde auch der antiproliferative Effekt von 10058-F4 für eine Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden bestimmt (Tabelle 4.2). Dabei fiel auf, dass die IC_{50} -Werte von 10058-F4 um einen Faktor von bis zu 142 höher lagen als für JQ1 (Tabelle 4.1). Aufgrund der höheren Wirksamkeit von JQ1 wurde in den nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich der antiproliferative Effekt von JQ1 näher untersucht.

Tabelle 4.2: Der antiproliferative Effekt von 10058-F4 bei kolorektalen Karzinomzellen und Fibroblasten (NHDF). Die IC_{50} -Werte von 10058-F4 ($\mu\text{mol/L}$) sind als Mittelwert und dem entsprechenden 95 %-Konfidenzintervall (CI) für eine Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden angegeben.

	IC_{50} (48 Stunden)		IC_{50} (72 Stunden)	
	Mittelwert	95% CI	Mittelwert	95% CI
LS174T	38,3	29,5-81,6	44,7	25,6-78,1
HCT116	46,7	32,3-67,8	36,5	26,6-49,9
RKO	66,8	55,7-84,6	38,4	26,6-55,1
Colo678	>75	--	>75	--
HT29	>75	--	>75	--
NDHF	>75	--	>75	--

4.2 Der antiproliferative Effekt von JQ1 in Abhängigkeit der Tumorzellproliferation

Der antiproliferative Effekt von JQ1 wurde bei starker und schwacher Tumorzellproliferation bestimmt. Hierzu wurden die Zellen in Medium mit 10 und 1 Prozent FCS inkubiert (Abbildung 4.2).

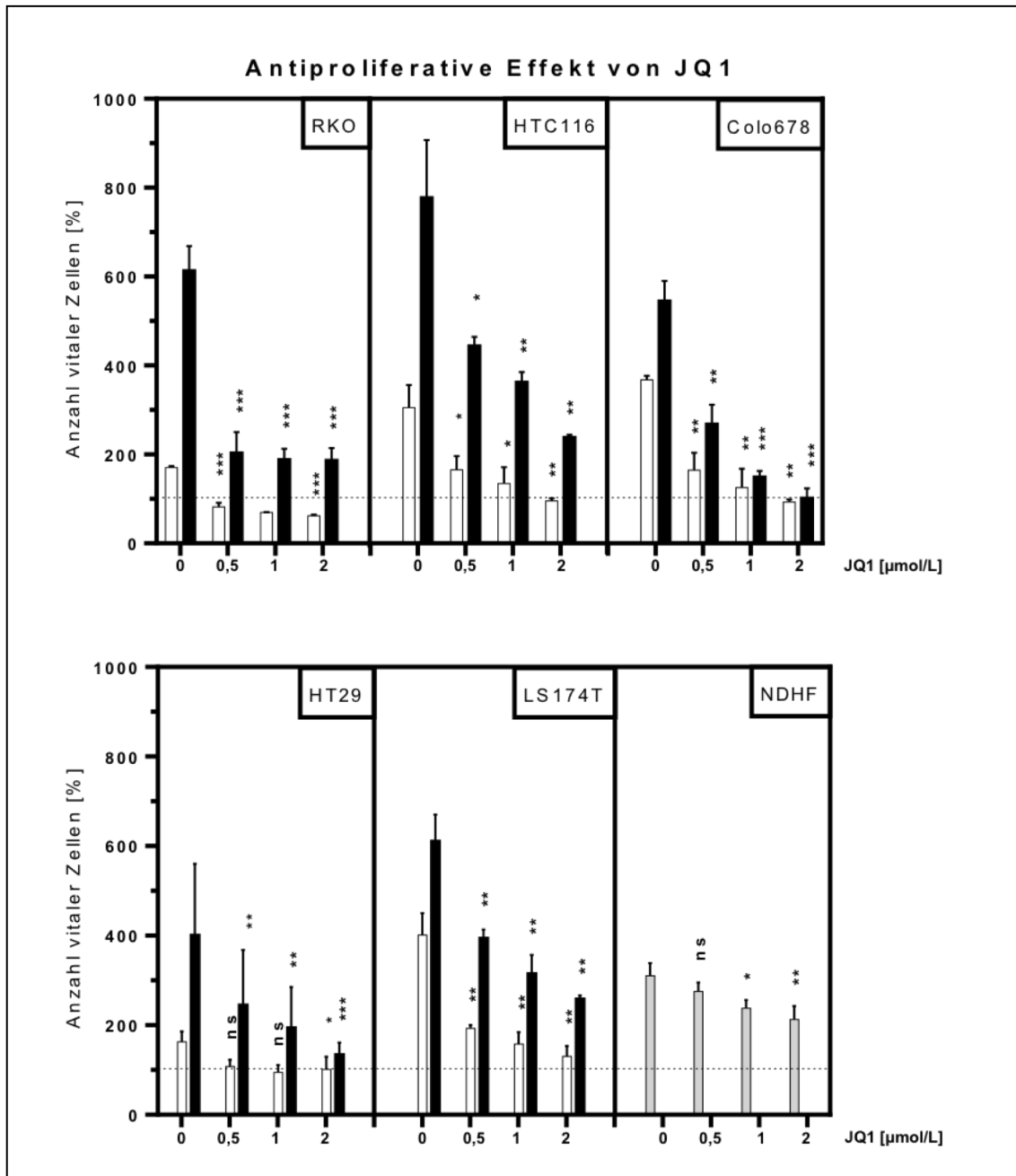


Abbildung 4.2: Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei starker (10 % FCS) und schwacher (1 % FCS) Tumorzellproliferation. Gezeigt sind die Daten für eine Inkubationszeit von 72 Stunden. Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei 10 % FCS (schwarze Balken) basiert auf einer verzögerten Zellproliferation (Zytostase), weshalb der Anteil vitaler Zellen weniger stark zu-

nahm. Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei 1 % FCS (weiße Balken) verzögerte ebenfalls die Zunahme der Zellzahl, die sich zudem bei vier der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien unter die Ausgangszellzahl (=Aussaat, gestrichelte Linie bei 100 %) verringerte; dieses Ergebnis lässt zelltoxische Effekte von JQ1 erkennen. Ein schwacher zytostatischer Effekt von JQ1 wurde auch bei Fibroblasten beobachtet. Die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium kultiviert (Kapitel 3.2). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p > 0,5$ (nicht signifikant, n. s.) im Vergleich zur Nullkontrolle, $n = 2-4$ biologische Replikate (Kapitel 3.7). Zu den Verdopplungszeiten siehe Abbildung A1 im Anhang.

Der bei starker Tumorzellproliferation (10 % FCS) auf Zytostase basierende antiproliferative Effekt von JQ1 war für die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien deutlich nachweisbar (Abbildung 4.2). Auch bei schwacher Tumorzellproliferation (1 % FCS) war ein antiproliferativer Effekt von JQ1 nachzuweisen (Abbildung 4.2 und Tabelle A1 im Anhang), der bei vier der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien auf Zytotoxizität basierte.

4.3 Der antiproliferative Effekt von JQ1 in Hypoxie

Um die Situation der Tumorphypoxie (Kapitel 1.5) auch *in vitro* nachstellen zu können, wurden die Zellen bei milder Hypoxie (5 % Sauerstoff) und starker Hypoxie (1 % Sauerstoff) inkubiert.

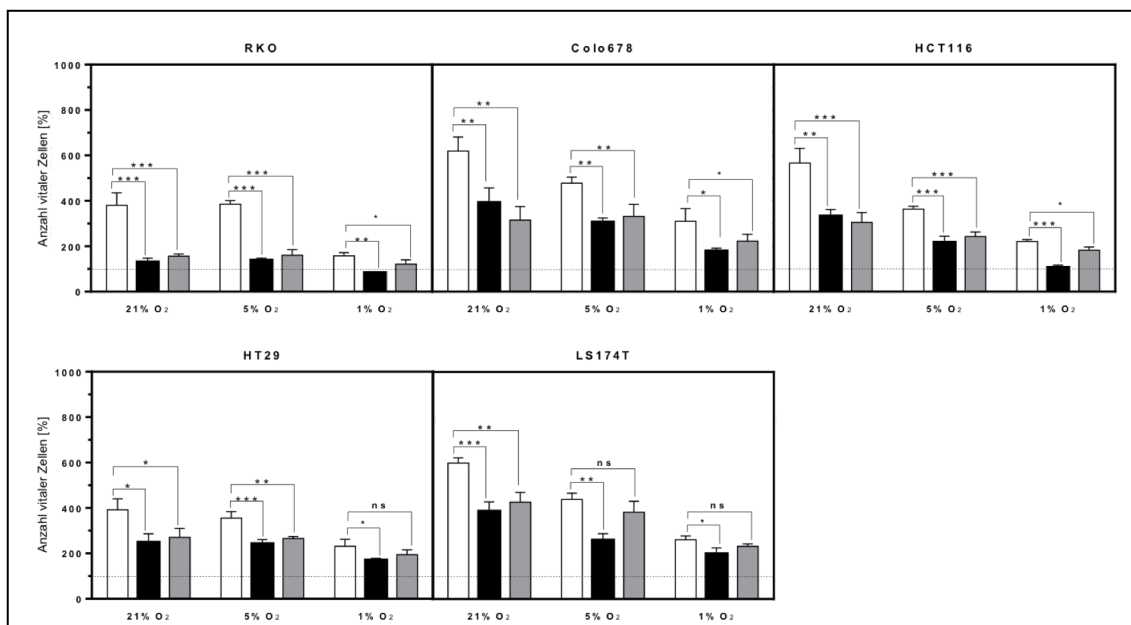


Abbildung 4.3: Der antiproliferative Effekt von JQ1 in Hypoxie im Vergleich zu 5-FU. Die Zellen wurden für 72 Stunden bei Normoxie (21 % Sauerstoff), milder Hypoxie (5 % Sauerstoff) und starker Hypoxie (1 % Sauerstoff) mit JQ1 inkubiert. Nullkontrolle (weiß), 5 µmol/L 5-FU (grau), JQ1 (schwarz): RKO 0,25 µmol/L, Colo678 und HCT116 0,5 µmol/L, HT29 und LS174T 1 µmol/L (Kapitel 4.1). Im Gegensatz zu Kapitel 4.2 wurden die Zellen ausschließlich in Zellkul-

turmedium (Kapitel 3.2) mit 10 % FCS kultiviert. Die Anzahl vitaler Zellen ist auf die Aussaat (=100 %) normalisiert. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p > 0,5$ (nicht signifikant, n.s.), $n = 2-4$ biologische Replikate (Kapitel 3.7).

Der antiproliferative Effekt von JQ1 war ebenfalls bei 5 % und 1 % Sauerstoff (Hypoxie) nachweisbar, wobei die Stärke deutlich variierte und teilweise auch stärker war als der von 5-FU (Abbildungen 4.3 und 4.4).

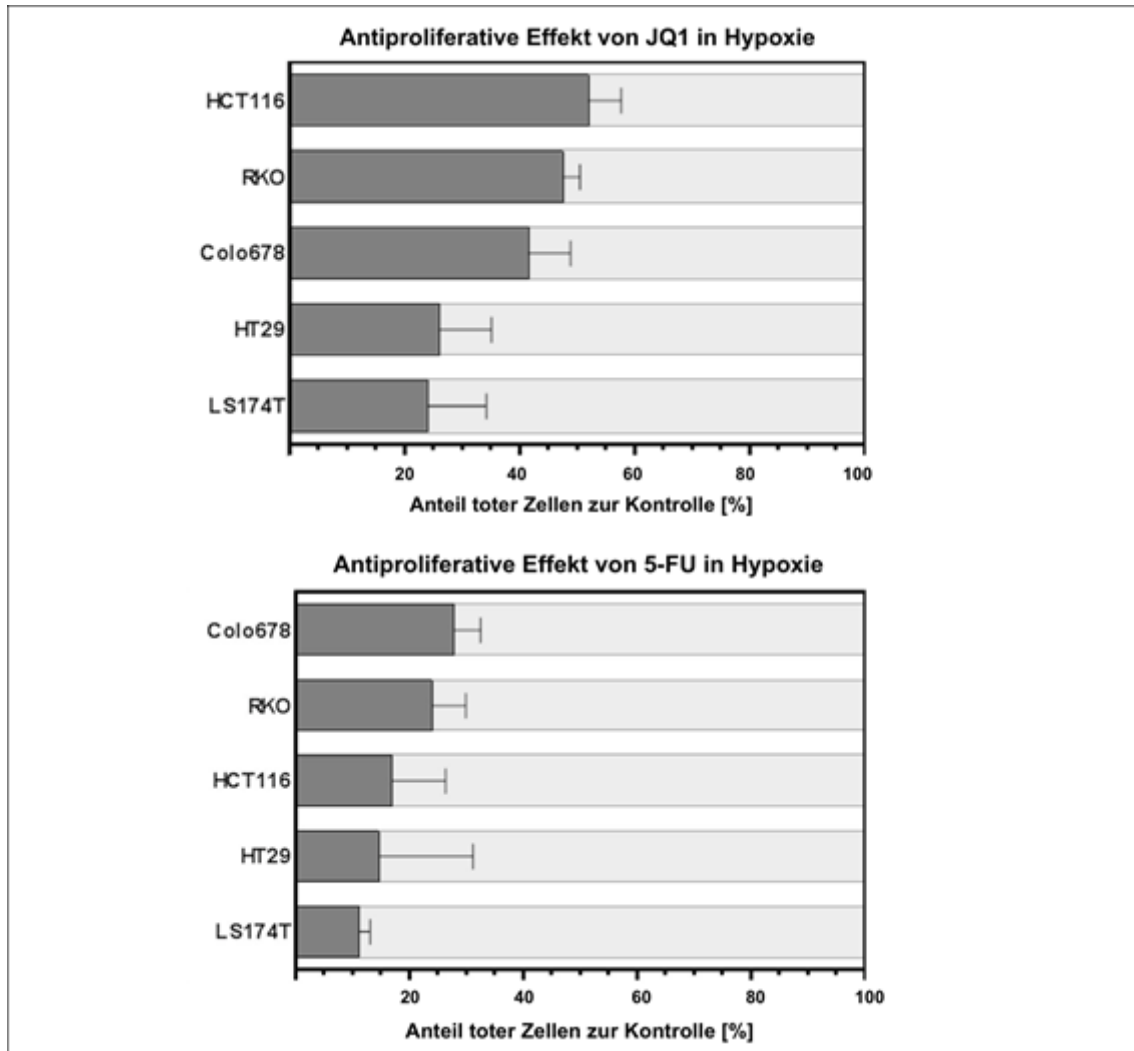


Abbildung 4.4: Der antiproliferative Effekt von JQ1 und 5-FU in Hypoxie (1% O₂). Gezeigt ist der prozentuale Anteil an toten (dunkelgrau) und vitalen (hellgrau) Zellen bezogen auf die Nullkontrolle (unbehandelte Zellen). Im Gegensatz zu Kapitel 4.2 wurden die Zellen ausschließlich in Zellkulturmedium (Kapitel 3.2) mit 10 % FCS kultiviert. JQ1 wirkte auf HCT116 stark antiproliferativ (> 50 % tote Zellen). 5-FU zeigte keinen antiproliferativen Effekt bei HCT116, HT29 und LS174T (Anteil toter Zellen: <15 % (Kapitel 3.6)). Der antiproliferative Effekt von 5-FU war somit bei allen kolorektalen Karzinomzelllinien geringer als der von JQ1; $n = 3$ biologische Replikate (Kapitel 3.7). Siehe auch Tabelle A1 und Abbildung A2 im Anhang.

Bei den Versuchen in Hypoxie wurde JQ1 in den Konzentrationen zugegeben, die sich an den bei 21 % Sauerstoff bestimmten IC_{50} -Werten orientierten (Kapitel 4.1). Der durch JQ1 in Hypoxie induzierte Anteil toter Zellen betrug zwischen 20 und 50 % (Abbildung 4.4). 5-FU erreichte dagegen einen Anteil an toter Zellen von maximal 30 % bei zwei der fünf kolorektalen Karzinomzellen (Abbildung 4.4). Bei HCT116, HT29 und LS174T bewegte sich der Anteil toter Zellen um 15 % und befand sich damit mit im Bereich der festgestellten Schwankung zwischen biologischen Replikaten (Kapitel 3.6) und erscheint damit ohne biologische Relevanz.

4.4 Der antiproliferative Effekt von JQ1 in der Langzeitkultur

Als nächstes wurde überprüft, ob der antiproliferative Effekt von JQ1 auch in der Langzeitkultur nachzuweisen ist. Hierzu wurde das Versuchsdesign angepasst (Kapitel 3.10). Nach 72-stündiger Inkubation mit JQ1 wurde das Medium durch frisches Medium mit und ohne JQ1 ersetzt und der Anteil vitaler Zellen nach einer Kulturdauer von insgesamt 144 Stunden ermittelt (Abbildung 4.5).

Der antiproliferative Effekt von JQ1 war nach einer Inkubationszeit von sowohl 72 als auch 144 Stunden nachweisbar (Abbildung 4.5). Dies setzte aber die Präsenz von JQ1 im Kulturmedium während der gesamten Inkubation voraus. Wurde dagegen JQ1 aus den Kulturen entfernt („rausgewaschen“), nahm dagegen die Zellzahl zu. Auch führte eine weitere Zugabe an JQ1 zu keiner Steigerung des antiproliferativen Effektes. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass mit den für diese Untersuchungen gewählten Konzentrationen an JQ1 eine Sättigung erreicht wurde, bei der sämtliche Bromodomänen der BRD4-Proteine vermutlich blockiert sind (Kapitel 1.6). Zudem scheint bei 21 % Sauerstoff der blockierende Effekt nicht dauerhaft zu sein und die Zellen werden auch nicht wesentlich irreversibel geschädigt werden; im Ggs. zu den Ergebnissen in Hypoxie (Abbildung 4.3 und 4.4).

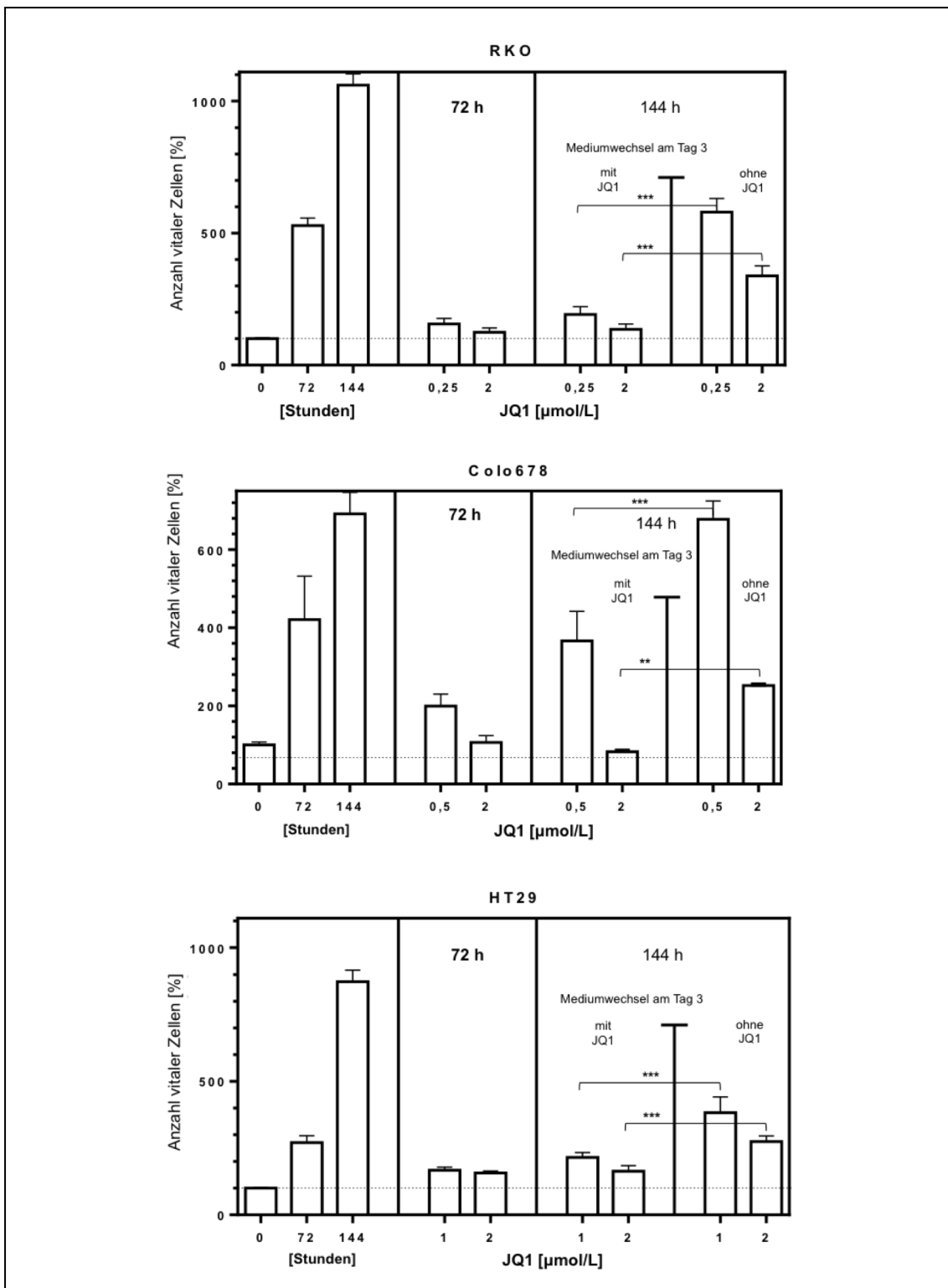


Abbildung 4.5: Der antiproliferative Effekt von JQ1 in der Langzeitkultur (144 Stunden). JQ1 reduzierte die Anzahl vitaler Zellen nach 72 und 144 Stunden. Wurde JQ1 dagegen nach 72 Stunden entfernt, stieg die Anzahl vitaler Zellen nach drei Tagen wieder an (Zeitpunkt 144 h). $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Die Daten wurden auf die „Null“-Kontrolle (ohne JQ1) normalisiert, $n = 2-4$ biologische Replikate (Kapitel 3.7). Die jeweils erste Konzentration an JQ1 (0,25; 0,5 und 1,0 $\mu\text{mol/L}$) orientiert sich an den IC_{50} -Werten für jede Zelllinie (Kapitel 4.1), während 2,0 $\mu\text{mol/L}$ die für diese Arbeit höchste Konzentration an JQ1 darstellt.

4.5 Der Einfluss von JQ1 auf die Expression von MYC und p21

Die quantitative Auswertung zum zellulären MYC-Proteingehalt (Abbildung 4.6) belegt einen durch JQ1 ausgelösten Rückgang um bis zu 89 % (für Colo678).

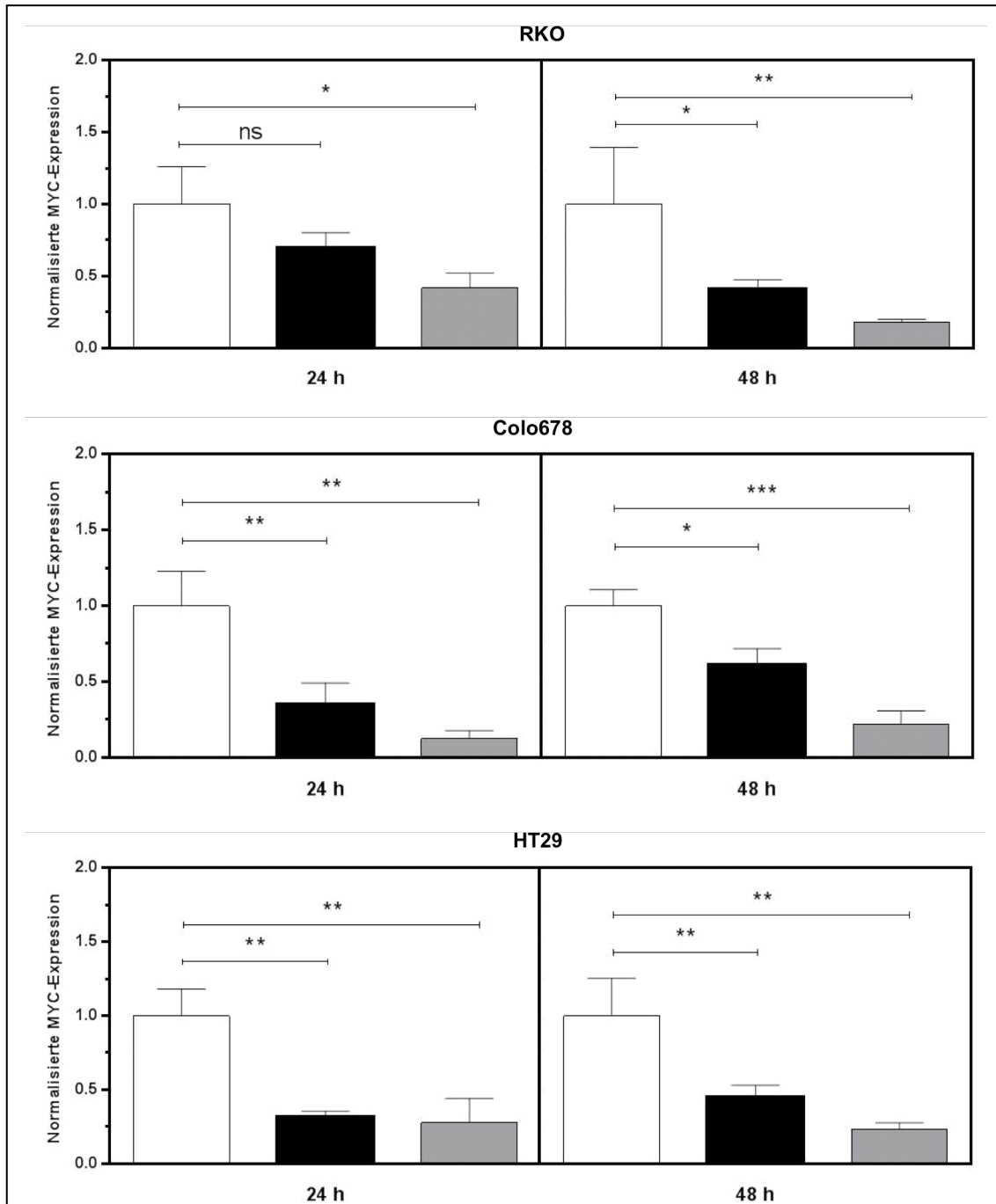


Abbildung 4.6: Der konzentrationsabhängige Effekt von JQ1 auf den zellulären Gehalt an MYC-Protein. Der MYC-Proteingehalt wurde auf die Nullkontrolle (ohne JQ1; weißer Balken) normalisiert. Schwarzer Balken: RKO 0,25 µmol/L, Colo678 0,5 µmol/L, HT29 1 µmol/L JQ1. Grauer Balken: 2 µmol/L JQ1. p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p > 0,5 (n.s., nicht signifikant), n = 3 biologische Replikate (Kapitel 3.7).

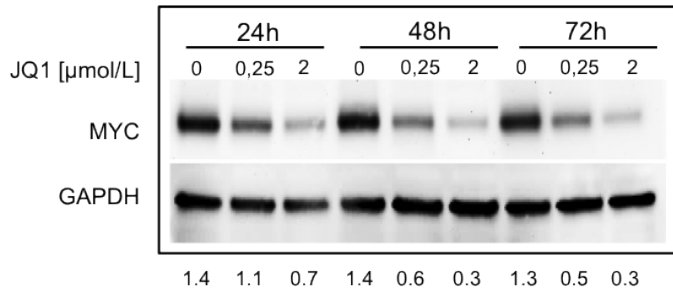


Abbildung 4.7: Die durch JQ1 vermittelte Abnahme an MYC-Protein. Der konzentrationsabhängige Einfluss von JQ1 auf die MYC-Expression ist repräsentativ für RKO gezeigt. Zu den Ergebnissen der anderen Zelllinien siehe auch Abbildung A3 im Anhang.

Auch die Aktivität des *MYC*-Gens wurde durch JQ1 beeinflusst wie die Abnahme der Transkription von *MYC*-mRNA zeigt (Abbildung 4.8).

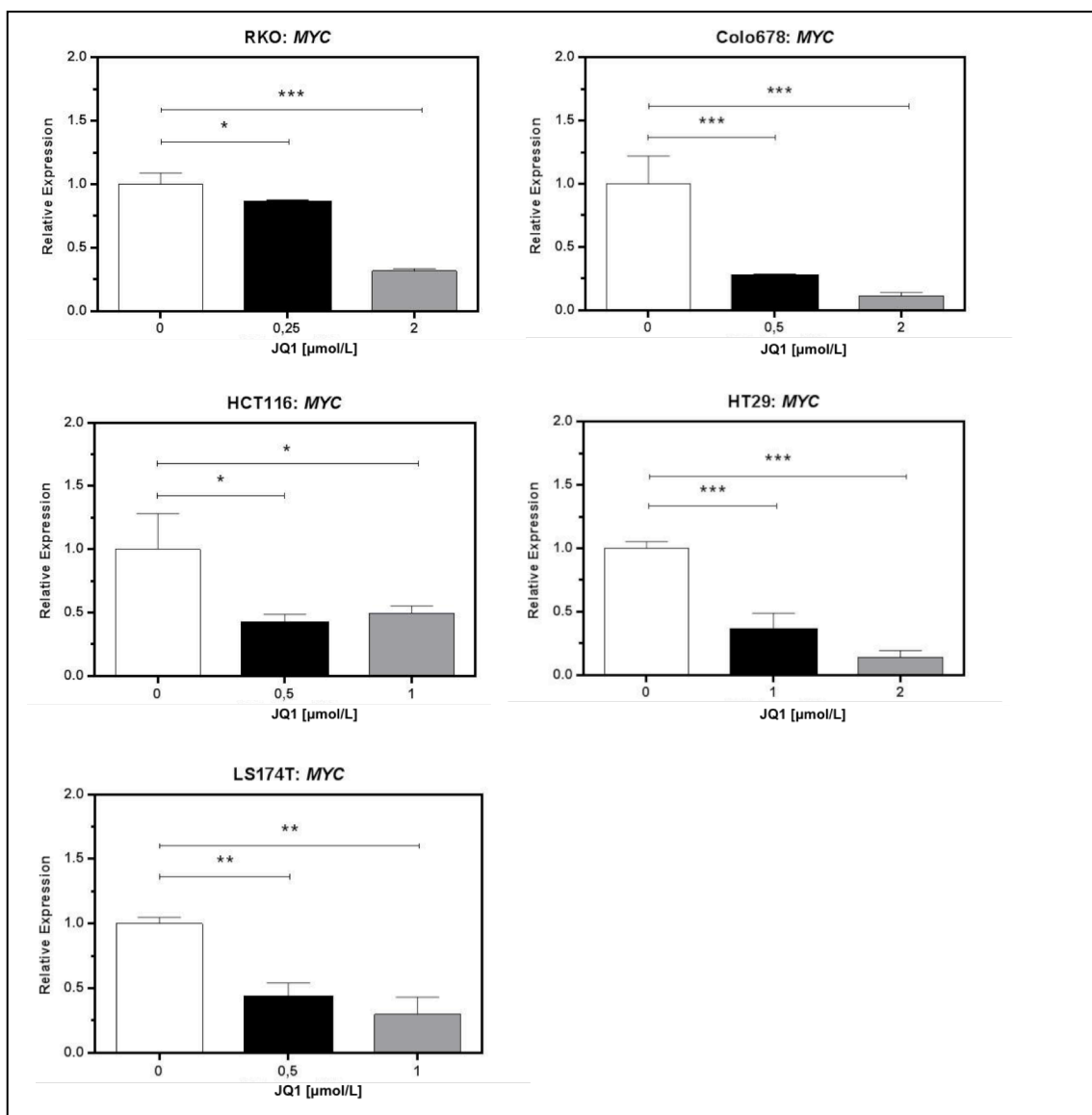


Abbildung 4.8: Der konzentrationsabhängige Effekt von JQ1 auf die Transkription von MYC mRNA. Darstellung der relativen *MYC*-Expression normalisiert auf die „Null“-Kontrolle

(ohne JQ1). Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für eine Inkubationszeit von 24 Stunden. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,01$ (***), $p > 0,5$, $n = 3$ biologische Replikate (Kapitel 3.7). Siehe auch Abbildung A4 im Anhang.

Der Tumorsuppressor *p21* hemmt das Zellwachstum und wird durch MYC reprimiert (Kapitel 1.2). Die nachgewiesene erhöhte Transkription von *p21*- mRNA bestätigt indirekt den inhibierenden Effekt von JQ1 auf die Expression von MYC (Abbildung 4.9). Am stärksten war der Anstieg von *p21*-mRNA in LS174T und Colo678 (und zwar um das bis zu 3,6-fache).

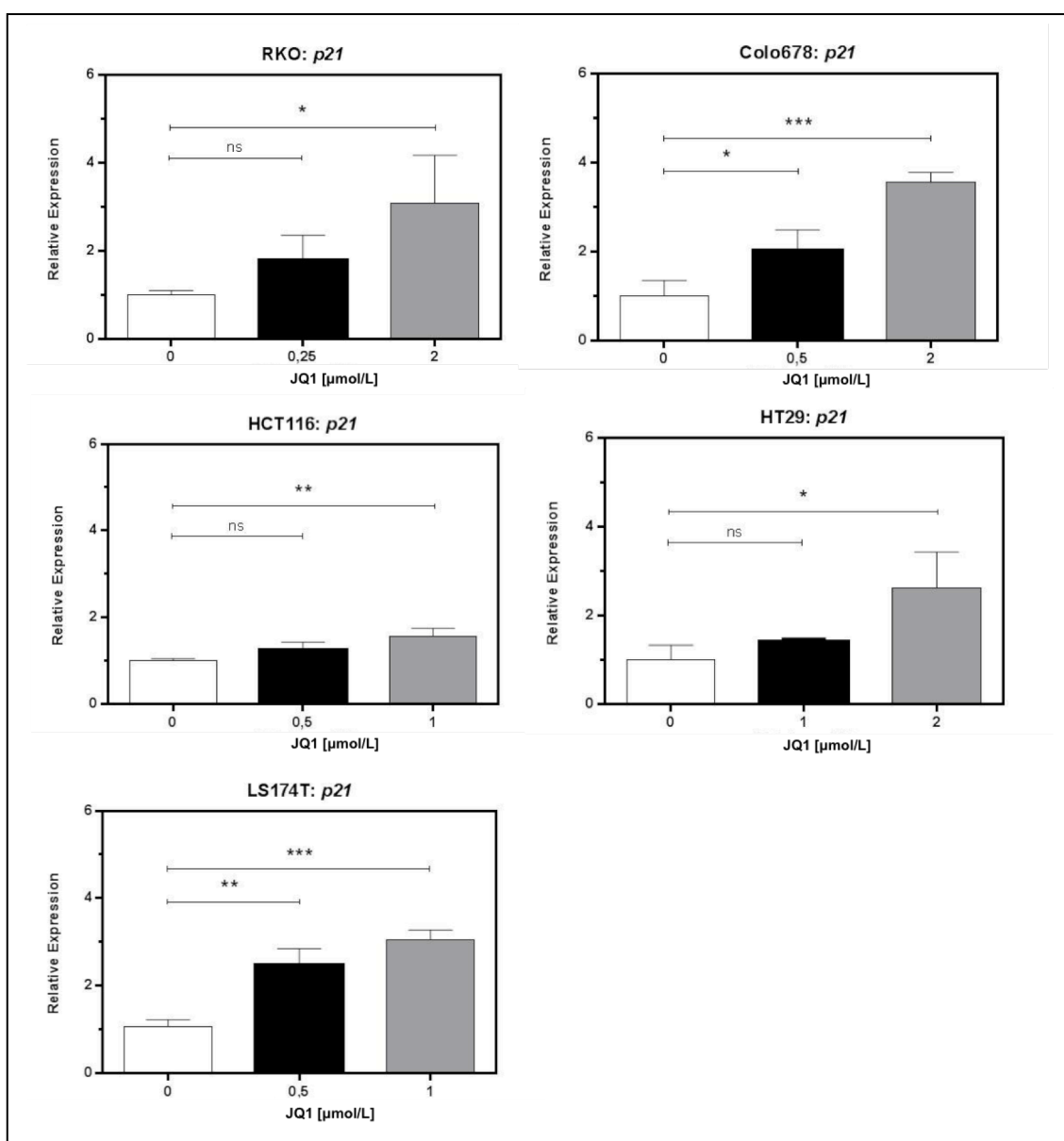


Abbildung 4.9: Der konzentrationsabhängige Effekt von JQ1 auf die Transkription von *p21* mRNA. Darstellung der relativen *p21*-Expression normalisiert auf die „Null“-Kontrolle (ohne

JQ1). Die Ergebnisse sind gezeigt für eine Inkubationszeit von 24 Stunden. *P21* erhöhte sich am stärksten in Colo678. Hier war der inhibierende Effekt auf die Expression von MYC Protein und *MYC* mRNA am deutlichsten (Abbildungen 4.7 und 4.8). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p > 0,5$ (n. s., nicht signifikant), $n = 3$ biologische Replikate (Kapitel 3.7). Für die hypoxische Situation wurde ebenfalls ein Einfluss von JQ1 auf die Transkription von *MYC* und *p21* mRNA gezeigt (Abbildung A5 im Anhang).

4.6 Der Einfluss von JQ1 auf den Zellzyklus

JQ1 beeinflusst die Expression von *MYC* und *p21* und somit vermutlich auch den Zellzyklus. Hierzu wurde der Zellzyklus untersucht (Abbildung 4.10).

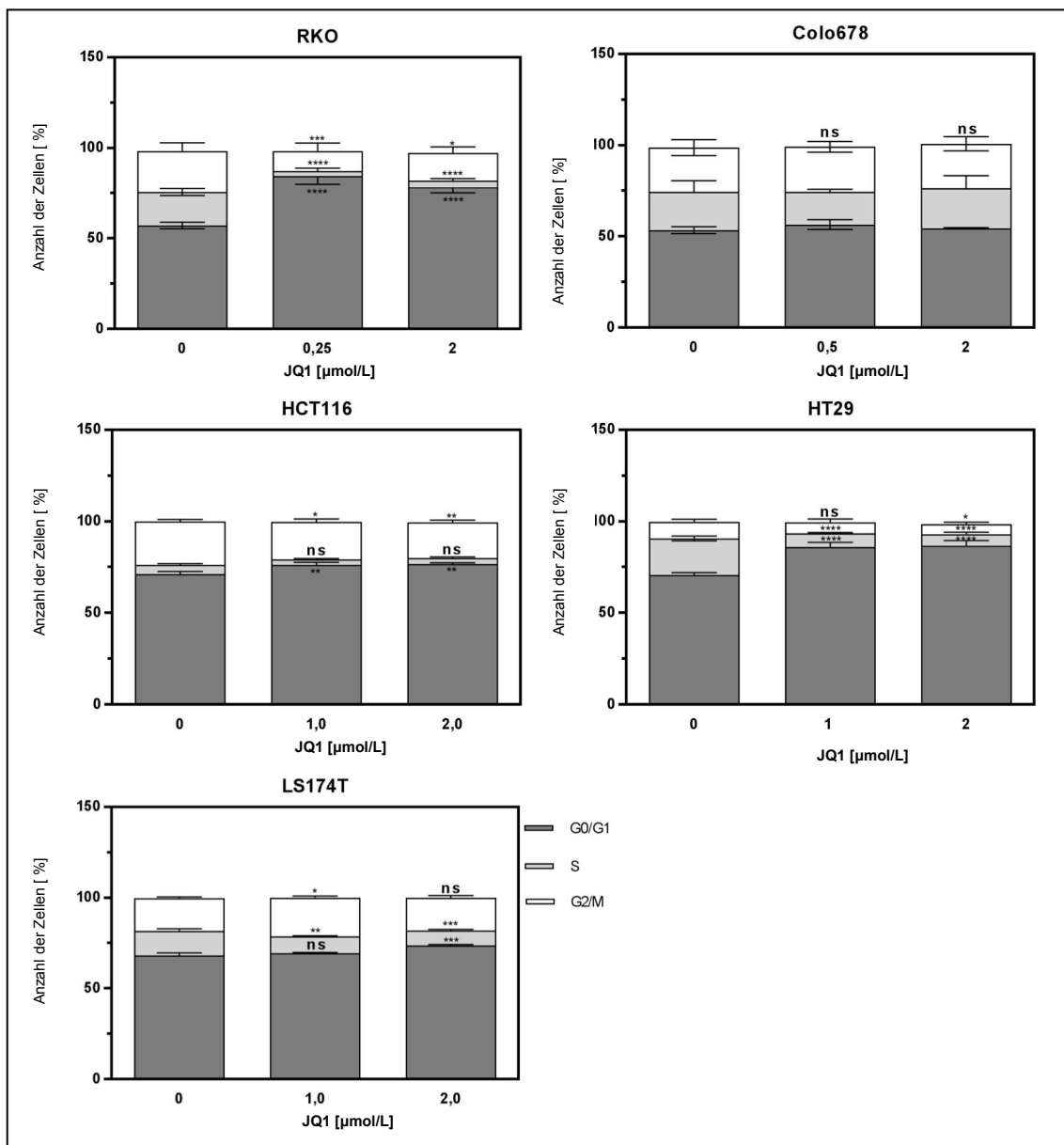


Abbildung 4.10: Der Einfluss von JQ1 auf den Zellzyklus kolorektaler Karzinomzellen. Vier der fünf 5 Zelllinien zeigten einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase nach 24-stündiger

Inkubation mit JQ1. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p > 0,5$ (n.s., nicht signifikant), $n = 3$ biologische Replikate (Kapitel 3.7).

Vier der fünf kolorektalen Tumorzelllinien, die für 24 Stunden mit JQ1 behandelt wurden, arretierten in der G0/G1-Phase und der Anteil der Zellen in der G2- bzw. S-Phase nahm ab. Der fehlende Zellzyklusarrest von Colo678 Zellen ist mit den Daten dieser Arbeit nicht zu erklären, zumal JQ1 auch in diesen Zellen die Transkription von *MYC* mRNA (zusätzlich zum Protein) und *p21* mRNA deutlich beeinflusste (Abbildung 4.6, 4.8 u. 4.9).

4.7 Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei nicht-transformierten Zellen

Der bei kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesene antiproliferative Effekt von JQ1 war bei nicht-transformierten Zellen nicht bzw. deutlich geringer (Abbildung 4.11).

Zusätzlich zum geringeren antiproliferativen Effekt von JQ1 bei Fibroblasten ist kein Einfluss auf die Transkription von *MYC* mRNA und *p21* mRNA und die Menge an MYC-Protein nachzuweisen (Abbildung 4.11). Diese Daten stützen die Auffassung, dass JQ1 bei Fibroblasten und kolorektalen Karzinomzellen unterschiedlich wirkt.

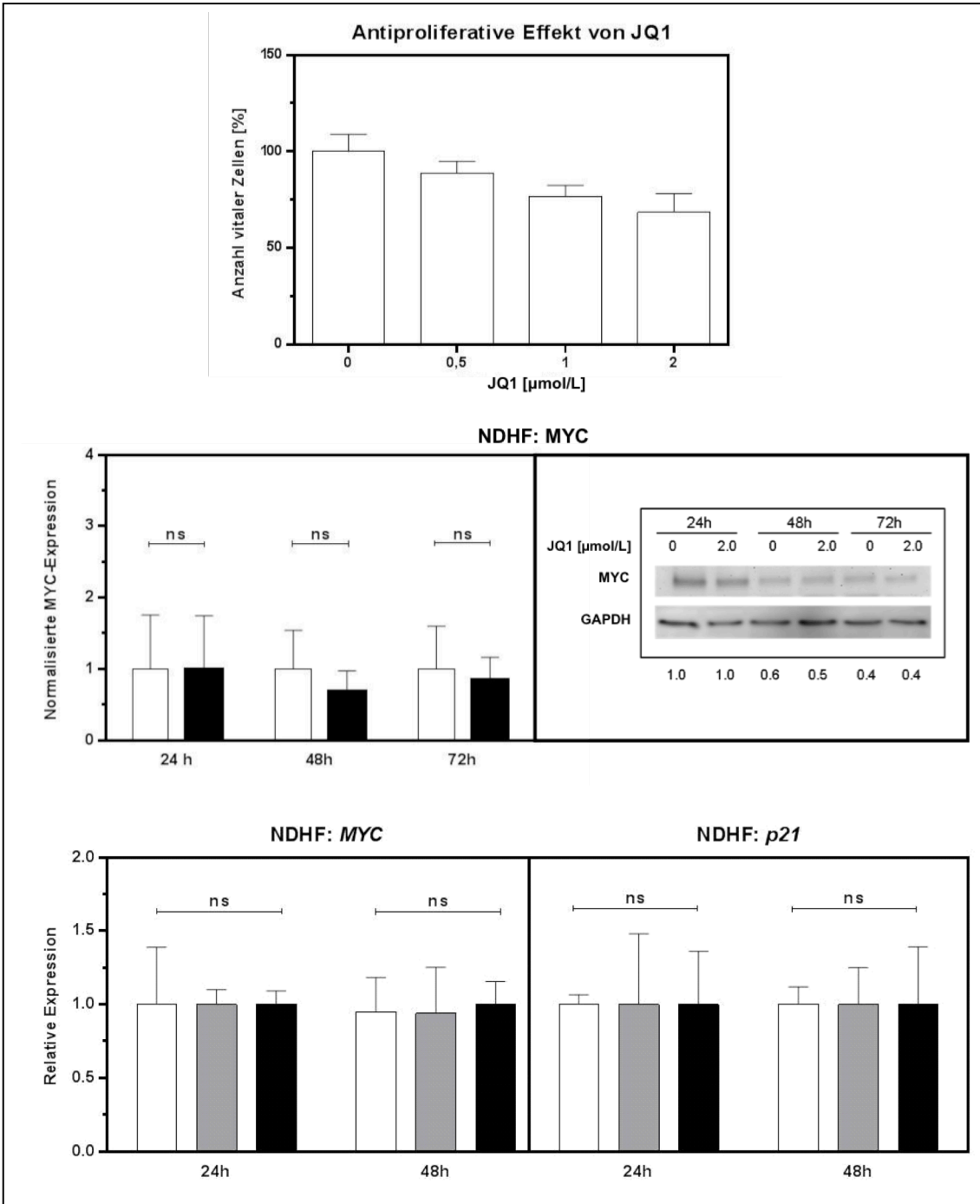


Abbildung 4.11: Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei Fibroblasten (NHDF). Der antiproliferative Effekt von JQ1 ist gezeigt hinsichtlich der Anzahl vitaler Zellen und der Expression von MYC-Protein, MYC mRNA und p21 mRNA. JQ1 reduzierte die Anzahl vitaler Fibroblasten um maximal 30 % und veränderte kaum die Expression von MYC-Protein, MYC-mRNA und p21-mRNA nach 24 und 48 Stunden in Kultur. $p > 0,5$ (n. s., nicht signifikant), $n = 3$ biologische Replikate (Kapitel 3.7). Die relative Expression von MYC mRNA und p21 mRNA bei 1 $\mu\text{mol/L}$ (grauer Balken) bzw. 2 $\mu\text{mol/L}$ JQ1 (schwarzer Balken) wurde auf die Expression der „Null“-Kontrolle (Fibroblasten ohne JQ1, weißer Balken) normalisiert.

5 Beantwortung der Fragen

- 1) JQ1 kann auf epigenetischer Ebene über BRD4 die MYC-Expression beeinflussen, während 10058-F4 die Bindung von MYC an seinen Bindungspartner MAX verhindert und dadurch die Funktion von MYC als Transkriptionsfaktor hemmt. **Weist JQ1 einen antiproliferativen Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen auf und wie stark ist dieser im Vergleich zum MYC-Inhibitor 10058-F4?**

Der antiproliferative Effekt von JQ1 war bei den untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien stärker als der von 10058-F4. Die IC_{50} -Werte für JQ1 waren bis um den Faktor 143 geringer als für 10058-F4 (Tabelle 4.1 und 4.2).

- 2) Tumorgewebe ist in aller Regel mit Sauerstoff unterversorgt und intratumorale Sauerstoffkonzentrationen von 5 und 1 Prozent haben sich als repräsentativ erwiesen. **Wirkt JQ1 auch bei diesen Sauerstoffkonzentrationen antiproliferativ und wie stark ist dieser Effekt im Vergleich zum Zytostatikum 5-FU?**

JQ1 wirkte auch in Hypoxie antiproliferativ und reduzierte die Anzahl vitaler Zellen um 20 bis 50 %. Damit war der antiproliferative Effekt von JQ1 in Hypoxie bei drei von fünf Tumorzelllinien stärker als der von 5-FU (Abbildung 4.4).

- 3) Tumorzellen weisen aufgrund optimaler Kulturbedingungen eine starke Zellproliferation *in vitro* auf, die aber für die Situation *in vivo* nicht repräsentativ sein muss. **Beeinflusst die Stärke der Tumorzellproliferation den antiproliferativen Effekt von JQ1 und wie verhält sich dieser in der Langzeitkultur (144 Stunden)?**

Der antiproliferative Effekt von JQ1 war bei starker und schwacher Tumorzellproliferation vergleichbar stark, ebenso war er in der Langzeitkultur nachweisbar. Hier war der antiproliferative Effekt von JQ1 von dessen Präsenz während der gesamten Inkubationszeit abhängig (Abbildung 4.5). Wurde JQ1 dagegen aus den Kulturen entfernt, setzte die Zellproliferation wieder ein (und damit eine Zunahme der Zellzahl). Dieses Ergebnis lässt den Rückschluss zu, dass JQ1 die Bromodomäne von BRD4 nicht dauerhaft blockiert und die Zellen hierdurch nicht irreversibel geschädigt werden.

- 4) Wesentlich für die Stärke des antiproliferativen Effektes von JQ1 scheint das Ausmaß der durch JQ1 vermittelten MYC-Depletion zu sein. **Korreliert der antiproliferative Effekt von JQ1 bei kolorektalen Karzinomzellen auf einer Reduktion von MYC Protein bzw. MYC mRNA? Steigert JQ1 die Expression des von MYC reprimierten Zielgens *p21* und führt die gesteigerte Expression von *p21* zu einer Arretierung des Zellzyklus?**

In den untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien verringerte JQ1 die Expression von MYC-Protein und *MYC*-mRNA sowie die Expression des durch MYC reprimierten Targetgens *p21*. Zudem war für vier der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien ein Zellzyklusarrest in G0/G1 nachzuweisen (Abbildung 4.10). Diese Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang hin zwischen dem antiproliferativen Effekt von JQ1 und den nachgewiesenen Veränderungen bei der Expression von *MYC* und *p21* (Abbildung 4.8 und 4.9). Bei nicht-transformierten Zellen war der antiproliferative Effekt von JQ1 geringer (Abbildung 4.11).

6 Diskussion

6.1 Der antiproliferative Effekt von JQ1

In einer Vielzahl an Publikationen wurde der antiproliferative Effekt von JQ1 bei verschiedensten Tumorzelllinien beschrieben (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Literaturrecherche zum antiproliferativen Effekt von JQ1 bei verschiedenen Tumorzelllinien. Auswahl an Publikationen, in denen IC₅₀-Werte angegeben sind. IC₅₀ in µmol/L, Ø: durchschnittlich.

Publikation	Tumorzelllinien	IC ₅₀
Mertz JA et al., 2011	Leukämie- und Lymphomzellen	0,05 – 0,1
Zuber J et al., 2011	AML-Zellen	0,5
Asangani IA et al., 2014	Zellen des Prostatakarzinoms ^{*)}	0,05 – 0,2
Tolani B et al., 2014	Zellen verschiedener Lymphomentitäten	0,2 – 1
Qiu H et al., 2015	Zellen des Ovarialkarzinoms	0,1 – 0,4
Baker EK et al., 2015	Zellen des Osteosarkoms	0,04 – 0,4
Ma Y et al., 2016	Zellen des kolorektalen Karzinoms	0,09 – 2,9 ^{**) (Ø: 0,3)}

^{*)} Positiver Androgenrezeptor-Status. ^{**) im Durchschnitt 0,3 µmol/L. Zum Vergleich: der Durchschnitt der IC₅₀-Werte der in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinomzellen betrug 0,7 µmol/L (Tabelle 6.2).}

In der vorliegenden Arbeit konnte für JQ1 ein antiproliferativer Effekt bei fünf getesteten humanen kolorektalen Karzinomzelllinien nachgewiesen werden (Tabelle 4.1). Diese wurden zufällig ausgewählt und wiesen Unterschiede im *p53* und *KRAS* Status auf (Tabelle 3.1). Beide Gene sind an der neoplastischen Transformation zur Karzinomentstehung beteiligt (Kapitel 1.1).

In einer kleinen Versuchsserie wurde der antiproliferative Effekt von JQ1 mit dem des MYC-Inhibitors 10058-F4 verglichen (Tabelle 6.2). 10058-F4 blockiert die Interaktion von MYC mit seinem Bindungspartner MAX (Kapitel 1.3) und hemmt damit die Funktion von MYC als Transkriptionsfaktor (Yin X et al., 2003; Gomez-Curet I et al., 2006; Guo J et al., 2009). Die Wirkungsweise von JQ1 dagegen liegt auf epigenetischer Ebene durch Blockade der Bromodomäne von BRD4 (Kapitel 1.6). Dadurch verhindert JQ1 die Interaktion zwischen BRD4 und acetylierten Lysinen am Chromatin und damit das »Chromatin-remodeling« als

Voraussetzung für eine Genexpression. Der Vergleich der antiproliferativen Effekte auf Basis der IC₅₀ (Kapitel 3.8) von 10058-F4 und JQ1 zeigt, dass JQ1 wesentlich effektiver wirkt als 10058-F4 und zwar um einen Faktor von bis zu 140 (Tabelle 6.2). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit keine weiteren Versuche mit 10058-F4 durchgeführt.

Tabelle 6.2: Vergleich der IC₅₀-Werte (µmol/L) für JQ1 und 10058-F4 für die in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien.

	JQ1	10058-F4	Faktor ¹⁾
Colo678	0,58	>75	129
HCT116	0,78	36,5	46,8
HT29	0,90	>75	83,3
LS174T	1,05	44,7	42,6
RKO	0,27	38,4	142,2

¹⁾ Verhältnis IC₅₀ von 10058-F4 zu JQ1 (IC₅₀ 10058-F4 / IC₅₀ JQ1).

6.2 Zum Wirkmechanismus von JQ1

In der Literatur ist der Effekt des BRD4-Inhibitors JQ1 auf das »Chromatinremodelling« gut beschrieben (Kapitel 1.6). Dabei scheint der durch JQ1 induzierte antiproliferative Effekt im Wesentlichen auf einer Inhibition der MYC-Expression zu beruhen (Tabelle 6.3). Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit für humane kolorektale Karzinomzellen gezeigt (Kapitel 4.5). Aber nicht jede untersuchte Tumorzelllinie, insbesondere von solchen Tumoridentitäten, die solide Tumore bilden, war eine durch JQ1 über BRD4 vermittelte Verringerung der MYC-Expression nachzuweisen. So wird der antiproliferative Effekt von JQ1 in Zellen des Osteosarkoms über eine BRD4-vermittelte Suppression von *FOSL1*²¹⁾ wirksam (Baker EK et al., 2015). Auch in Zellen des Adenokarzinoms der Lunge führte JQ1 zu einer verringerten Expression des BRD4-Targets *FOSL1* anstelle von *MYC* (Lockwood WW et al., 2012). Der Grund dafür, dass beim MYC-abhängigen proliferativen Phänotyp von Zellen des Osteosarkoms und Adenokarzinoms die MYC-Expression auf epigenetischer Ebene nicht zwangsläufig durch BRD4 reguliert wird, ist nicht bekannt.

²¹⁾ Dereguliertes *FOSL1* (FOS like 1) steuert Zellproliferation, Differenzierung und Transformation in Tumorzellen (Lord KA et al., 1993).

Für die in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinomzellen scheint der antiproliferative Effekt von JQ1 in Zusammenhang mit einer reduzierten Expression von MYC zu stehen. Verringerte sich der zelluläre Gehalt an MYC Protein bzw. MYC mRNA durch JQ1, so nahm auch die Anzahl vitaler Zellen deutlich ab (Abbildung 4.6 und 4.7). Mit einem verringerten Gehalt an MYC stieg die Expression von *p21* mRNA an und zwar um das bis zu 3,6-fache (Abbildung 4.9). Der reprimierende Effekt von MYC auf sein Targetgen *p21* ist in der Literatur gut beschrieben (Coller HA et al., 2000). Auch in Zellen des Multiplen Myeloms führte ein durch JQ1 verringerter Anteil von MYC zu einem Anstieg von *p21* (Mertz JA et al., 2011). Für die Repression von *p21* durch MYC wird der Transkriptionsfaktor Miz1 (Kapitel 1.3) benötigt, der MYC an die *p21*-Promoterregion dirigiert und abhängig bzw. unabhängig von p53²²⁾ die Expression von *p21* unterdrückt (Seoane J, Le HV, Massagué J, 2002).

Die beiden durch JQ1 induzierten Phänomene, Zellzyklusarrest und Apoptose, sind in der Literatur beschrieben (Tabelle 6.3). Dabei scheint der Zellzyklusarrest in Verbindung mit einer gesteigerten Expression von *p21* mRNA zu stehen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigten bei vier der fünf Tumorzelllinien eine signifikante Zunahme an Zellen in der G0/G1-Phase (Abbildung 4.10). Dass auch Zellen der Linie HT29 mit mutiertem p53 (Muller PA et al., 2013) im Zellzyklus arretierten wie Zellen mit Wildtyp p53, was bisher nur für Wildtyp p53 beschrieben ist (Yu J et al., 1999), deutet darauf hin, dass JQ1 auch unabhängig von Wildtyp p53 den Zellzyklusarrest einleitet. Dies ist denkbar, da bekannt ist, dass weitere Transkriptionsfaktoren wie SP1/SP3²³⁾ (Gartel AL et al., 2001) oder TGF- β ²⁴⁾ (Seoane J, Le H, Massagué J, 2002) mit MYC interagieren und so *p21* reprimieren. Durch die JQ1-vermittelte Abnahme von MYC könnten solche Interaktionen gestört sein, da MYC als Interaktionspartner fehlt, wodurch auch das Ausmaß der Reprimierung von *p21* in JQ1 behandelten Zellen unabhängig von Wildtyp p53 abnimmt. Dieser mögliche alternative Weg wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

²²⁾ p53 aktiviert bei DNA-Schäden *p21*, indem es an dessen Promotorregion bindet und Genexpression induziert.

²³⁾ Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie, die mit MYC vermutlich über dessen zentrale Region Komplexe bilden (Gartel AL et al., 2001).

²⁴⁾ Transforming growth factor beta.

Tabelle 6.3: Literaturrecherche zum Wirkmechanismus von JQ1 bei verschiedensten Tumorzelllinien. Auswahl an Publikationen mit Daten zum Zellzyklusarrest und/oder Apoptose-Nachweis. +: Nachweis (mit folgender Graduierung: mäßig (+/-); stark (++)), Ø: kein Nachweis.

Publikation	Tumorzelllinien	Wirkmechanismus			
		Expression ↓	Expression ↑	Nachweis von	
				G0/G1-Arrest	Apoptose
Delmore JE et al., 2011	Multiples Myelom	MYC, MYC-Zielgene		+	+/-
Mertz JA et al., 2011	Leukämie, Lymphome	MYC	p21	+	++
Zuber J et al., 2011	AML	MYC, MYC, BRD4		+	+
Tolani B et al., 2014	verschiedene Lyphomentitäten	MYC		+	+
Asangani IA et al., 2014	Prostatakarzinom	MYC, ERG ²⁵⁾ , PSA, Bcl-xL ²⁶⁾		+	+
Shao Q et al., 2014	Merkelzellkarzinom	MYC	p21, p27 ²⁷⁾ , p57 ²⁸⁾	+	Ø
Qiu H et al., 2015	Ovarialkarzinom	MYC, MYC-Zielgene,	p21, kaum p27	+	+
Baker EK et al., 2015	Osteosarkom	FOSL1, kein MYC		Ø	+
Zhang HT et al., 2017	Chondrosarkom	MYC, Bcl-xL, Cyclin E2 ²⁹⁾ , BRD4, p53 (nukleär), YAP ³⁰⁾	p21, p27, Cyclin D1 ³¹⁾	+	+
Ma Y et al., 2017	Kolorektales Karzinom	MYC, MYC MYC-Zielgene Bcl-xL, Bcl-2, hTert ³²⁾	p21	+	+/-

Die Frage, inwieweit der durch JQ1 verursachte G0/G1-Arrest zur Induktion von Apoptose führt bzw. inwieweit sich beide Phänomene unabhängig voneinander ausbilden, wird kontrovers diskutiert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführ-

²⁵⁾ ERG ist ein Transkriptionsfaktor der ETS-Familie, der durch TMPRSS2-ERG Genfusion überexprimiert vorliegt und in Zellen des Prostatakarzinoms MYC aktiviert und PSA (Prostataspezifisches Antigen) inhibiert (Sun C et al., 2008).

²⁶⁾ Bcl-xL (B-cell lymphoma extra large) ist ein und Transmembranprotein der Bcl-2-Familie in den Mitochondrien und wirkt anti-apoptisch (Korsmeyer SJ, 1995).

²⁷⁾ Zellzyklusinhibitor.

²⁸⁾ Zellzyklusinhibitor.

²⁹⁾ Cyclin E2 steuert den Zellzyklus am G1/S-Übergang (Gudas JM et al., 1999).

³⁰⁾ Yes-associated protein inhibiert die p21-Transkription (Muramatsu T et al., 2011).

³¹⁾ Cyclin D1 steuert den Zellzyklus am G1/S-Übergang (Baldin V et al., 1993).

³²⁾ Human Telomerase Reverse Transcriptase erhält Telomere und schützt vor Apoptoseinduktion (Wyatt HDM et al., 2009).

te Literaturrecherche zu den molekularen Mechanismen des durch JQ1 ausgelösten antiproliferativen Effektes lässt einen Zusammenhang zwischen einer p21-Überexpression und der Induktion von Apoptose in verschiedenen Tumorentitäten erkennen (Tabelle 6.3). Zur Induktion von Apoptose scheinen höhere Konzentrationen an JQ1 (Li GQ et al., 2016; Wang L et al. 2016) oder längere Inkubationszeiten (Zhang HT et al. 2017) notwendig zu sein. Wurden Tumorzellen über 48 Stunden kontinuierlich mit JQ1 behandelt, führte die über p21 induzierte Zellarretierung schließlich zu Apoptose (Zhang HT et al., 2017). Für diese Situation konnten Zhang HT et al. eine Hemmung der Expression von MYC- und anti-apoptotischem Bcl-xL-Protein zeigen. Doch scheint die Beteiligung von p21 an der Induktion von Apoptose nicht uneingeschränkt zu sein und so sind Situationen beschrieben worden, bei der eine p21-Überexpression sogar die Induktion von Apoptose hemmte (Gartel AL, Tyner AL, 2002). Dies könnte erklären, weshalb eine JQ1-vermittelte Induktion von p21 in Zellen des Merkelzellkarzinoms zum Zellzyklusarrest, nicht aber in Apoptose führte (Shao Q et al., 2014). Zunehmend weisen Daten darauf hin, dass JQ1 abhängig (Li GQ et al., 2016) und unabhängig von MYC (Hogg SJ et al., 2016) sowohl pro- als auch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie epigenetisch beeinflusst und dadurch den programmierten Zelltod einleiten kann.

Inwieweit der in kolorektalen Karzinomzellen durch Inkubation mit JQ1 induzierte Zellzyklusarrest, der mit einer verringerten MYC-Expression (sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene) und einer Induktion der p21-Expression assoziiert ist, in Apoptose führt, war im Rahmen dieser Arbeit nicht zu klären. Erste Ansätze zum Nachweis aktivierter («cleaved») Caspase 3 waren ohne Erfolg. Somit bleibt die Darstellung zum Wirkmechanismus von JQ1 in kolorektalen Karzinomzellen vorerst unvollständig (Abbildung 6.1).

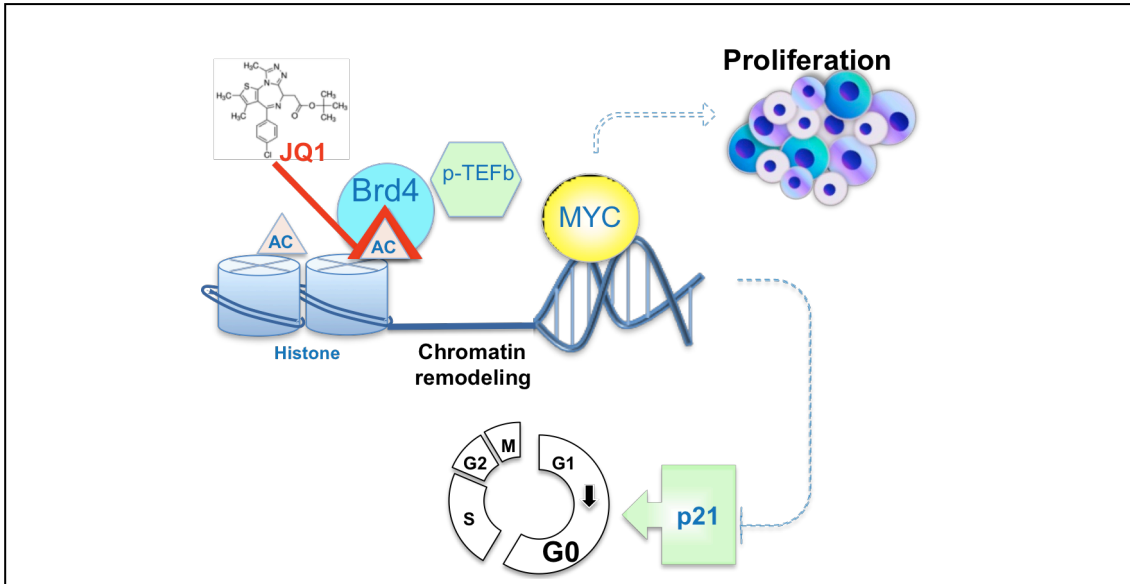


Abbildung 6.1: Zum möglichen Wirkmechanismus von JQ1 in kolorektalen Karzinomzellen. JQ1 reduziert durch Inhibition von BRD4 die Expression von MYC. Die proliferationsfördernde Wirkung von MYC nimmt ab (gestrichelter Pfeil). Gleichzeitig wird die MYC-assoziierte Hemmung des Tumorsuppressors *p21* aufgehoben (gestrichelte Verbindung) und der Zellzyklusarrest wird eingeleitet. Graphische Darstellung auf Basis eigener Ergebnisse und Literaturrecherche inspiriert von Zhang C et al., 2016.

6.3 Der Einfluss der Zellproliferation auf den antiproliferativen Effekt von JQ1

Als ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit kann der Nachweis eines antiproliferativen Effektes von JQ1 sowohl bei stark proliferierenden als auch weniger stark proliferierenden Zellen gesehen werden (Abbildungen 4.2). Dies wurde durch Variation der Konzentration an FCS im Kulturmedium (Kapitel 3.2) bzw. durch Kultivierung der Zellen in Hypoxie (Kapitel 3.9) erreicht. So führte der antiproliferative Effekt von JQ1 z. B. bei langsam wachsenden RKO-Zellen (Verdopplungszeit von ca. 85 Stunden bei 1 % FCS) (Abbildung A1 im Anhang) zu einer Abnahme vitaler Zellen um bis zu 65 Prozent (Abbildung 4.4). Die Stärke des antiproliferativen Effektes von JQ1 bei Zellen mit geringer Proliferation und schnell proliferierenden Zellen mit Verdoppelungszeiten von ca. 30 Stunden ist vergleichbar. Hier führte JQ1 zu einer Abnahme vitaler Zellen um bis zu 70 Prozent (Abbildung 4.2).

Auch in Hypoxie zeigten kolorektale Karzinomzellen eine verminderte Zellproliferation (Abbildung 4.4), vermutlich um Ressourcen für die allerwichtigsten

Zellfunktionen zu sichern (Keith B et al., 2011, WJ Wong et al., 2013). In Geweben solider Tumoren herrscht oft ein Mangel an Sauerstoff und so sind Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) von weniger als 5 mmHg (dies entspricht einer Sauerstoffkonzentration $< 0,7 \%$) gemessen worden (Brown M, Wilson WR, 2004). Insbesondere fortgeschrittene Tumoren weisen zahlreiche, heterogen verteilte hypoxische Areale auf, die Angiogenese, Dedifferenzierung, Invasion und Metastasierung begünstigen (Vaupel P, Kallinowski F u. Okunieff P, 1989; Vaupel P u. Mayer A, 2007; Gordan JD et al., 2007). Hypoxische Bereiche in Tumoren erschweren eine effektive Krebstherapie, da das Ansprechen der in diesen Bereichen befindlichen Zellen auf Zytostatika als Ursache ihrer geringeren Proliferation geringer ist. Es ist bekannt, dass Zytostatika einen starken antiproliferativen Effekt bei eher stark als langsam proliferierenden Zellen zeigen (Brown JM, 2000). Geringe Proliferationsraten charakterisieren vor allem Zellen im Zentrum eines soliden Tumors, da dieser Bereich einen Mangel an Nähr- und Sauerstoff aufweist (Kapitel 1.5), was die Ausbildung von Nekrosen begünstigt (Gross R, 1972). Auch eine mangelnde Blutversorgung begrenzt den Zugang von Zytostatika zu Zellen im Bereich hypoxischer Areale (Brown JM, 2000). Relevant für die klinische Situation ist zudem, dass eine gesteigerte Expression von Zellzyklusinhibitoren wie p21 die Ausbildung von Resistenzen gegenüber z. B. 5-FU in Hypoxie begünstigen (Yoshida S et al., 2009). So arretieren Zellen durch p21 verstärkt im Zellzyklus und 5-FU, das vor allem in der S-Phase wirkt, bleibt wirkungslos. Während der antiproliferative Effekt von 5-FU in Hypoxie im Vergleich zu 21 Prozent Sauerstoff abnahm (Abbildung 4.4), war dies für JQ1 nicht der Fall (Abbildungen 4.3 und 4.4). Damit kann JQ1 die über HIF-1 α vermittelte Degradation von MYC in Hypoxie (Kapitel 1.5) noch steigern und der Tumorzelle somit einen wichtigen Regulator von Stoffwechsel und Proliferation (Shim H et al, 1997; Osthus RC et al., 2000, Kim JW et al., 2007) entziehen, was möglicherweise das therapeutische Potential von JQ1 noch steigert.

6.4 Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei nicht-transformierten Zellen

Die interessante Frage, warum JQ1 die Proliferation von Tumorzellen deutlich stärker als die von nicht-transformierten Fibroblasten hemmt, ließ sich mit die-

ser Arbeit nicht beantworten. Zumindest können Unterschiede in der Stärke der Zellproliferation von transformierten und nicht-transformierten Zellen als Begründung ausgeschlossen werden. JQ1 wirkte bei allen kolorektalen Tumorzelllinien antiproliferativ, selbst wenn die Proliferation dieser Zellen durch Änderungen der Konzentration an FCS oder durch Inkubation in Hyoxie verringert war (Kapitel 6.3).

JQ1 beeinflusste die deregulierte Expression von MYC in Tumorzellen (Abbildung 4.7), aber nicht die physiologische MYC-Expression in Fibroblasten (Abbildung 4.11). Das deutet darauf hin, dass JQ1 tatsächlich selektiv Mediatoren solcher Signalwege beeinflusst, die mit einer deregulierten MYC-Expression in Zusammenhang stehen. Um eine deregulierte MYC-Expression zu beeinflussen, scheint es unerheblich zu sein, ob diese durch Mutationen des *MYC*-Gens oder durch Störungen auf posttranslationaler Ebene zustande kommt (Tolani B et al., 2014).

Als Beispiel für einen deregulierten Mediator, der für JQ1 ein selektives Target in transformierten Zellen darstellt, ist BRD4. So ist die Überexpression von BRD4 in transformierten kolorektalen Zellen sowie dessen Rolle bei der Tumorgenese bekannt (Hu Y et al., 2015). Diese BRD4-Überexpression erklärt sicherlich nicht ausschließlich, wann eine transformierte Zelle sensitiv auf JQ1 reagiert und wann nicht. Dies wird von zahlreichen unterschiedlichen epigenetischen Mechanismen abhängig sein. So konnte gezeigt werden, dass der epigenetische Verstärker (Superenhancer) CCAT1³³⁾ durch JQ1 weniger exprimiert wird und folglich die Transkription von *MYC* abnimmt. Je höher der Anteil an CCAT1 desto stärker wurde *MYC* in kolorektalen Zellen mit hypermethylierten CPG-Inseln³⁴⁾ inhibiert und desto sensitiver reagierte die Zelle auf JQ1. CCAT1 wird daher als Bio-Marker für Patienten diskutiert, die von der Behandlung mit BET-Inhibitoren profitieren könnten (Mc Cleland ML et al., 2016).

³³⁾ Colon Cancer Associated Transcript 1 (Long non-coding RNA) reguliert MYC epigenetisch in kolorektalen Karzinomzellen (Xiang JF et al., 2014).

³⁴⁾ Abkürzung für Cytosin-Phosphatidyl-Guanin. Eine Geninaktivierung durch Hypermethylierung von CpG-Inseln an Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen ist tumorassoziiert (Esteller M, 2002).

7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der antiproliferative Effekt von JQ1 an fünf kolorektalen Tumorzelllinien gezeigt. Die Frage, inwieweit JQ1 Apoptose induziert, wird kontrovers diskutiert (Tabelle 6.3). Erste eigene Untersuchungen hierzu waren ohne Ergebnis, weshalb untersucht werden sollte, welche MYC-Targetgene (Kapitel 1.2) durch JQ1 beeinflusst werden, insbesondere solche, die den Zellzyklusarrest fördern.

Der antiproliferative Effekt von JQ1 war auch bei verringerter Proliferation von Tumorzellen nachweisbar (Kapitel 4.2 und 4.3). In eigenen Vorversuchen war kein synergistischer Effekt zwischen JQ1 und 5-FU nachzuweisen (nicht gezeigt). Diesem klinisch relevanten Aspekt sollte in weiterführenden Untersuchungen nachgegangen werden. Außerdem sollte geprüft werden, ob JQ1 durch Induktion von p21 die Ausbildung von Resistenzen gegenüber 5-FU begünstigt, wie dies Daten vermuten lassen (Yoshida S et al., 2009).

JQ1 wurde bisher erfolgreich *in vitro* und *in vivo* an Zellen verschiedener Tumorentitäten getestet, dabei zeigte JQ1 *in vivo* eine gute Verträglichkeit (Kapitel 1.6). Deshalb sollten weiterführende Untersuchungen auch an Tiermodellen des kolorektalen Karzinoms, wie Xenograft-Modelle mit humanen kolorektalen Karzinomzellen bzw. genetische Modelle wie der APCMin-Maus, durchgeführt werden.

Inhibitoren wie JQ1, die die Bromodomäne von BRD-Proteinen blockieren, haben sicherlich dazu beigetragen, dass das Interesse am Chromatin zugenommen hat, um die Möglichkeit zu prüfen, auch auf epigenetischer Ebene selektive antiproliferative Effekte zu induzieren. Aktuell werden Anstrengungen unternommen, in Tumorzellen BRD-Proteine selektiv durch Rekrutierung zelleigener Ubiquitin-Ligasen abzubauen (Zengerle M et al., 2015). Auch dies sollte untersucht werden.

8 Zusammenfassung

Der für die Zellmembran permeable, niedermolekulare Inhibitor JQ1 bindet an die Bromodomäne von BRD4, ein auf epigenetischer Ebene agierendes Protein. JQ1 verhindert die Interaktion zwischen BRD4 und acetylierten Lysinen am Chromatin und damit das »Chromatin-remodeling« als Voraussetzung für die Genexpression.

Der antiproliferative Effekt des BRD4-Inhibitors JQ1 wurde bisher bei verschiedenen Tumorentitäten vor allem des lymphatischen und blutbildenden Systems gezeigt. Ziel der Arbeit war deshalb, den antiproliferativen Effekt von JQ1 an fünf humanen kolorektalen Karzinomzelllinien im Vergleich zu nicht-transformierten Kontrollzellen (Fibroblasten) zu untersuchen. Für die Untersuchungen *in vitro* wurden Sauerstoffkonzentrationen von 5 und 1 Prozent gewählt, die repräsentativ für die Situation in einem soliden Tumor sind. Zusätzlich wurde der antiproliferative Effekt von JQ1 für stark und schwach proliferierende Tumorzellen und für die Situation in der Langzeitkultur bestimmt.

Der antiproliferative Effekt von JQ1, angegeben als IC_{50} , lag bei den fünf untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien in einer Größenordnung zwischen 0,27 und 1,05 mmol/L im Vergleich zu Fibroblasten mit $> 2 \mu\text{mol/L}$. JQ1 verringerte die Expression von MYC auf Protein- und mRNA-Ebene und steigerte die Transkription des durch MYC negativ regulierten Zielgens *p21*. Diese Steigerung um das bis zu Vierfache korrelierte mit einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase in vier der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien. Darüber hinaus war der antiproliferative Effekt von JQ1 bei starker und schwacher Tumorzellproliferation nachweisbar, sowie in Hypoxie, wo JQ1 wirksamer war als 5-FU. In der Langzeitkultur war der antiproliferative Effekt von JQ1 von dessen Präsenz in der Kultur abhängig. Wurde JQ1 aus den Kulturen entfernt, setzte die Zellproliferation wieder ein. Dies zeigt, dass ein Großteil der Zellen durch die Inkubation mit JQ1 nicht irreversibel geschädigt wurde.

Der antiproliferative Effekt des BRD4-Inhibitors JQ1 scheint bei kolorektalen Karzinomzellen auf einer epigenetisch vermittelten Inhibition einer deregulierten MYC-Expression zu basieren, wodurch der Übergang von einem proliferativen zu einem antiproliferativen Phänotyp ermöglicht wird. Inwieweit hierdurch die Tumorzelle in Apoptose überführt wird, ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

9 Literaturverzeichnis

- Akao** Y, Nakagawa Y, Naoe T. Let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(5): 903-906.
- Alitalo** K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM. Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-mnc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 1707-1711.
- Amente** S, Lania L, Majello B. Epigenetic reprogramming of Myc target genes. *Am J Cancer Res* 2011; 1(3): 413-418
- Asangani** IA, Dommeti VL, Wang X, Malik R, Cieslik M, Yang R, Escara-Wilke J, Wilder-Romans K, Dhanireddy S, Engelke C, Iyer MK, Jing X, Wu XM, Cao X, Qin ZS, Wang S, Feng FY, Chinnaiyan AM. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature* 2014; 510: 278-282.
- Ashton-Rickardt** PG, Dunlop MG, Nakamura Y, Morris RG, Purdie CA, Steel CM, Evans HJ, Bird CC, Wylie AH. High frequency of APC loss in sporadic colorectal carcinoma due to breaks clustered in 5q21-22. *Oncogene* 1989; 4: 1169-1174
- Atchley** WR, Fitch WM. Myc and Max: Molecular evolution of a family of proto-oncogene products and their dimerization partner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 10217-10221.
- Baldin** V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993, 7(5): 812-821.
- Baudino** TA, Mc Kay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, Davis AC, Ihle JN, Cleveland JL. C-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* 2002; 16(19): 2530-2543.
- Baker** EK, Taylor S, Gupte A, Sharp PP, Walia M, Walsh NC, Zannettino AC, Chalk AM, Burns CJ, Walkley CR. BET inhibitors induce apoptosis through a MYC independent mechanism and synergise with CDK inhibitors to kill osteosarcoma cells. *Sci Rep* 2015; 5: 10120.
- Blackwell** TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 1990; 250(4984): 1149-1151.
- Boyle** P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *British Medical Journal* 2000; 321(7264): 805-808.
- Brenner** C, Deplus R, Didelot C, Lorient A, Viré E, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, de Launoit Y, Di Croce L, Fuks F. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J* 2005; 24(2): 336-346.
- Brenner** H, Schrotz-King P, Holleczer B, Katalinic A, Hoffmeister M. Declining bowel cancer incidence and mortality in Germany – an analysis of time trends in the first ten years after the introduction of screening colonoscopy. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 101-106.
- Brockhoff** G: DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie. Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* Basel, Karger, 2007; 604-646

- Brown JM.** Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Molecular Medicine Today* 2000; 6(4): 157-162
- Brown JM, Wilson WR.** Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004, 4(6): 437-447.
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ.** Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995; 377(6549): 552-557.
- Campisi J, Gray HE, Pardee AB, Dean M, Sonenshein GE.** Cell-Cycle Control of c-myc but not c-ras Expression is lost following chemical transformation. *Cell* 1984; 36: 241-247
- Chaar I, Amara S, Elamine OE, Khiari M, Qunissi D, Khalfallah T, Ben Hmida A, Mzabi S, Bouraoui S.** Biological significance of promoter hypermethylation of p14/ARF gene: relationships to p53 mutational status in Tunisian population with colorectal carcinoma. *Tumour Biol* 2014; 35(2): 1439-1449.
- Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D.** Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* 2009; 157(2): 220-233.
- Chen D, Kon N, Zhong J, Zhang P, Yu L, Gu W.** Differential effects on ARF stability by normal vs. oncogenic levels of c-Myc expression. *Molecular Cell* 2013; 51 (1): 46-56.
- Cole MD, Cowling VH.** Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain during transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9: 810-815.
- Cole MD, Cowling VH.** Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. 2008; 9(10): 810-815.
- Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR.** Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7): 3260-3265.
- Cowling VH, Chandriani S, Whitfield ML, Cole MD.** A Conserved Myc Protein Domain, MBIV, Regulates DNA Binding, Apoptosis, Transformation, and G2 Arrest. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26(11): 4226-4239.
- Cowling VH, Cole MD.** The Myc Transactivation Domain Promotes Global Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Independently of Direct DNA Binding. *Molecular and Cellular Biology* 2007; 27(6): 2059-2073.
- Dang CV.** C-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis and Metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(1): 1-11.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F.** The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology* 2006; 16: 253-264.
- Dang CV.** MYC on the path to cancer. *Cell* 2012; 149(1): 22-35.
- Dean M, Levine RA, Ran W, Kindy MS, Sonenshein GE, Campisi J.** Regulation of c-myc Transcription and mRNA Abundance by Serum Growth Factors and Cell Contact. *The Journal of Biological Chemistry* 1986; 261(20): 9161-9166.
- Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastiris E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J, Chesi M, Schinzel AC, Mc Keown MR, Heffernan TP, Vakoc CR, Bergsagel PL, Ghobrial IM, Richardson PG, Young RA, Hahn WC, Anderson KC, Kung AL, Bradner JE, Mitsiades CS.** BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011; 146(6): 904-917.

- Demeterco** C, Itkin-Ansari P, Tyrberg B, Ford LP, Jarvis RA, Levine F. C-Myc Controls Proliferation Versus Differentiation in Human Pancreatic Endocrine Cells. *JCEM* 2002; 87(7): 3475-3485.
- Devaiah** BN, Case Borden C, Gegonne A, Hsu CH, Chen Q, Meerzaman D, Dey A, Ozato K, Singer DS. BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. *Nature Structural & Molecular Biology* 2016; 23: 540-548.
- Devaiah** BN, Lewis BA, Cherman N, Hewitt MC, Albrecht BK, Robey PG, Ozato K, Sims RJ, Singer DS. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109(18): 6927-6932.
- Eilers** M, Eisenmann RN. Myc's broad reach. *Genes Dev.* 2008; 22: 2755-2766.
- Eischen** CM, Packham G, Nip J, Fee BE, Hiebert SW, Zambetti GP, Cleveland JL. Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 2001; 20(48): 6983-6993.
- Eischen** CM, Roussel MF, Korsmeyer SJ, Cleveland JL. Bax Loss Impairs Myc-Induced Apoptosis and Circumvents the Selection of p53 Mutations during Myc-Mediated Lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 2001; 21(22):7653-7662.
- Erisman** MD, Rothberg PG, Diehl RE, Morse CC, Spandorfer JM, Astrin SM. Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. *Mol Cell Biol* 1985; 5(8): 1969-1976.
- Esteller** M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: abooming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21(35): 5427-5440.
- Evan** GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69(1): 119-128.
- Finley** GG, Schulz NT, Hill SA, Geiser JR, Pipas JM, Meisler AI. Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer. *Oncogene* 1989; 4(8): 963-971
- Filippakopoulos** P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468:1067–1073.
- Fearon** ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-767.
- Ferlay** J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015; 136(5): E359-E386.
- Fodde** R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38(7): 867-71.
- Fowler** T, Ghatak P, Price DH, Conaway R, Conaway J, Chiang CM, Bradner JE, Shilatifard A, Roy AL. Regulation of MYC Expression and Differential JQ1- Sensitivity in Cancer Cells. *PLOS one* 2014; 9(1): e87003.
- Gartel** AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(8): 639-649.
- Gartel** AL, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hax N, Najmabadi F, Tyner AL. Myc represses the p21^(WAF1/CIP1) promoter and interacts with SP1/Sp3. *PNAS* 2001; 98(8): 4510-4515.
- Giguère** V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1986; 46(5): 645-652

- Gomez-Curet I**, Perkins RS, Bennett R, Feidler KL, Dunn SP, Kreuger LJ. C-Myc inhibition negatively impacts lymphoma growth. *J Pediatr Surg* 2006; 41(1): 207-211.
- Grandori C**, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ. C-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nature Cell Biology* 2005; 7: 311-318.
- Gray LH**, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26: 638-648.
- Gross R**: „Fortschritte in der Chemotherapie von Tumoren“, in: Schlegel B (Hrsg.): Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin. 78. Kongress, gehalten zu Wiesbaden. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH 1972, S. 93-105.
- Gudas JM**, Payton M, Thukral S, Chen E, Bass M, Robinson MO, Coats S. Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. *Mol Cell Bio* 1999; 19(1): 612-622.
- Guo J**, Parise RA, Joseph E, Egorin MJ, Lazo JS, Prochownik EV, Eisenman JL. Efficacy, pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of the Myc-Max disruptor, 10058-F4 [Z,E]-5-[4-ethylbenzylidene]-2-thioxothiazolidin-4-one, in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 63(4): 615-625.
- Hayward WS**, Neel BG, Astrin SM. Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* 1981; 290: 475-480.
- Hann SR**, Thompson CB, Eisenman RN. C-Myc oncogene protein synthesis is independent of cell cycle in human and avian cells. *Nature* 1985; 314(6009): 366-369.
- He TC**, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* 1998; 281(5382): 1509-1512.
- Herbst A**, Hemann MT, Tworkowski KA, Salghetti SE, Lowe SW, Tansey WP. A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* 2005; 6(2): 177-183.
- Herold G** und Mitarbeiter: „Kolonreales Karzinom“, in: Herold G (Hrsg.): Innere Medizin. Köln 2014; 488-493.
- Hermeking H**, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Matyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *PNAS* 2000, 97(5): 2229-2234.
- Hogg SJ**, Newbold A, Vervoort SJ, Cluse LA, Martin BP, Gregory GP, Lefebure M, Vidacs E, Tothill RW, Bradner JE, Shortt J, Johnstone RW. BET Inhibition Induces Apoptosis in Aggressive B-Cell Lymphoma via Epigenetic Regulation of BCL-2 Family Members. *Mol Cancer Ther* 2016; 15(9): 2030-2041.
- Holinski-Feder E**, Grabowski M. Erbliches nicht polypöses kolorektales Karzinom - HNPCC. *Medgen* 2006; 18: 246-253.
- Hu Y**, Zhou J, Ye F, Xiong H, Peng L, Zheng Z, Xu F, Cui M, Wie C, Wang X, Wang Z, Zhu H, Lee P, Zhou M, Jiang B, Zhang DY. BRD4 Inhibitor Inhibits Colorectal Cancer Growth and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2015; 16(1): 1928-1948.
- Hutter CM1**, Slattery ML, Duggan DJ, Muehling J, Curtin K, Hsu L, Beresford SA, Rajkovic A, Sarto GE, Marshall JR, Hammad N, Wallace R, Makar KW, Prentice RL, Caan BJ, Potter JD, Peters U. Characterization of the association between 8q24 and colon cancer: gene-environment exploration and meta-analysis. *BMC Cancer* 2010; 10: 670.

- Jang** MK, Mochizuki K, Zhou M, Jeong HS, Brady JN, Ozato K. The Bromodomain Protein Brd4 Is a Positive Regulatory Component of P-TEFB and Stimulates RNA Polymerase II Dependent Transcription. *Molecular Cell* 2005; 19(4): 523-534.
- Johnson** MC, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. *Cancer Causes Control* 2013; 24(6): 1207-1222.
- Jostes** Sina, Nettersheim D, Fellermeier M, Schneider S, Hafezi F, Honecker F, Schuchmacher V, Geyer M, Kristiansen G, Schorle H. The bromodomain inhibitor JQ1 triggers growth arrest and apoptosis in testicular germ cell tumours in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2017; 21(7). 1300-1314.
- Juin** P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G. C-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 1999; 13(11): 1367-1381
- Keith** B, Johnson RS, Simon MC. HIF-1 α and HIF-2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews cancer* 2011; 12: 9-22.
- Kelly** K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 1983; 35: 603-610.
- Kelly** PN, Grabow S, Delbridge AR, Strasser A, Adams JM. Endogenous Bcl-xL is essential for Myc-driven lymphomagenesis in mice. *Blood* 2011; 118(24): 6380-6386.
- Kenneth** NS, Ramsbottom BA, Gomez-Roman N, Marshall L, Cole PA, White RJ. TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(38): 14917-14922.
- Kim** JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 2006; 66: 8927-8930.
- Kim** JW, Gao P, Liu YC, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively Induce Vascular Endothelial Growth Factor and Metabolic Switches Hexokinase 2 and Pyruvate Dehydrogenase Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 2007; 27: 7381-7393.
- Kleine-Kohlbrecher** D, Adhikary S, Eilers M. Mechanisms of transcriptional repression by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 302: 51-62.
- Knoepfler** PS, Cheng PF, Eisenman RN. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 2002; 16(20): 2699-2712.
- Korsmeyer** SJ. Regulators of Cell Death. *Trends in Genetics* 1995; 11(3): 101-105.
- Kranenburg** O. The KRAS oncogene: past, present, future. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756(2): 81-82.
- Lacroix** M, Toillon RA, Leclercq G. P53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(2): 293-325
- Laurenti** E, Wilson A, Trumpp A. Myc's other life: stem cells and beyond. *Cell Biology* 2009; 21(6): 844-854.
- Li** GQ, Guo WZ, Zhang Y, Seng JJ, Zhang HP, Ma XX, Zhang G, Li J, Yan B, Tang HW, Li SS, Wang LD, Zhang SJ. Suppression of BRD4 inhibits human hepatocellular carcinoma by repressing MYC and enhancing BIM expression. *Oncotarget* 2016; 7(3): 2462-2474.
- Lin** CY, Lovén J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Transcriptional Amplification in Tumor Cells with Elevated c-Myc. *Cell* 2012; 151(1): 56-67.

- Levens D.** How the c-myc promoter works and why it sometimes does not. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008; 39: 41-43.
- Locasale JW, Cantley LC.** Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab.* 2011; 14 (4), 443-451.
- Lockwood WW, Zejnullahu K, Bradner JE, Varmus H.** Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(47): 19408-19413.
- Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA.** Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 1993; 13(2): 841-851.
- Ma Y, Wang L, Neitzel LR, Loganathan SN, Tang N, Qin L, Crispi EE, Guo Y, Knapp S, Beauchamp RD, Lee E, Wang J.** The MAPK Pathway Regulates Intrinsic Resistance to BET Inhibitors in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23(8): 2027-2037.
- Maruyama T, Farina A, Dey A, Cheong J, Bermudez VP, Tamura T, Sciortino S, Shuman J, Hurwitz J, Ozato K.** A Mammalian bromodomain protein, brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase. *Mol Cell Biol* 2002, 22(18): 6509-6520.
- Matzuk MM, McKeown MR, Filippakopoulos P, Li Q, Ma L, Agno JE, Lemieux ME, Picaud S, Yu RN, Qi J, Knapp S, Bradner JE.** Small-Molecule Inhibition of BRDT for Male Contraception. *Cell* 2013; 150(4): 673-684.
- Mc Clelland ML, Mesh K, Lorenzana E, Chopra VS, Segal E, Watanabe C, Haley B, Mayba O, Yaylaoglu M, Gnad F, Firestein R.** CCAT1 is an enhancer-templated RNA that predicts BET sensitivity in colorectal cancer. *J Clin Invest* 2016; 126(2): 639-652.
- Mc Coy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO.** Fusobacterium Is Associated with Colorectal Adenomas. *PLoS One* 2013; 8(1): e53653.
- Mc Mahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD.** The Novel ATM-Related Protein TRRAP Is an Essential Cofactor for the c-Myc and E2F Oncoproteins. *Cell* 1998; 94(3): 363-374.
- Mc Mahon SB, Wood MA, Cole MD.** The Essential Cofactor TRRAP Recruits the Histone Acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* 2000; 20(2): 556-562.
- Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele DA, Bergeron L, Sims RJ.** Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(40): 16669-16674.
- Muller PA, Trinidad AG, Timpson P, Morton JP, Zanivan S, van den Berghe PV, Nixon C, Karim SA, Caswell PT, Noll JE, Coffill CR, Lande DP, Sansom OJ, Neilsen PM, Norman JC, Vousden KH.** Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion. *Oncogene* 2013; 32(10): 1252-1265.
- Murphy JD, Junttila MR, Pouyet L, Karnezis A, Shchors K, Bui DA, Brown-Swigart L, Johnson L, Evan GI.** Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell* 2008; 14 (6): 447-457.
- Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J.** YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma. *Cardinogenesis* 2011; 32(3): 389-398.
- Nasi S, Ciarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L.** Making decisions through Myc. *FEBS Letters* 2001; 490(3): 153-162

- Nau** MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF, Minna JD. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 1985; 318(6041): 69-73.
- Nie** Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, Wang R, Green DR, Tessarollo L, Casellas R, Zhao K, Levens D. C-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 2012; 151(1): 68-79.
- Oster** SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ. The Myc oncogene: marvelously complex. *Adv Cancer Res* 2002; 84: 81.
- Osthus** RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 2000; 275(29): 21797-21800.
- Packham** G, Cleveland JL. c-Myc and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1242: 11-28.
- Pfaffl** MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; 29(9): e45.
- Poon** MA, O'Connell MJ, Moertel CG, Wieand HS, Cullinan SA, Everson LK, Krook JE, Mailliard JA, Laurie JA, Tschetter LK. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1407-1418
- Pelengaris** S, Khan M, Evan G. C-Myc: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 764-776.
- Qiu** H, Jackson AL, Kilgore JE, Zhong Y, Chan LLY, Gehrig PA, Zhou C, Bae-Jump VL. JQ1 suppresses tumor growth downregulating LDHA in ovarian cancer. *Oncotarget* 2015; 6(9): 6915-6930.
- Rahl** PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, Mc Cuine S, Burge CB, Sharp PA, Young RA. C-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 2010; 141(3): 432-445.
- Rahl** PB, Young RA. MYC and Transcription Elongation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4(1): a020990.
- Robert Koch-Institut** und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe 2013.
- Robert Koch-Institut** und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Ausgabe 2015.
- Schneider** A, Peukert K, Eilers M, Hänel F. Association of Myc with the zinc-finger protein Miz-1 defines a novel pathway for gene regulation by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997; 224: 137-146.
- Seoane** J, Le H, Massagué J. Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 2002; 419: 729-734.
- Shao** Q, Kannan A, Lin Z, Stack BC, Suen JY, Gao L. BET Protein Inhibitor JQ1 Attenuates Myc-Amplified MCC Tumor Growth In Vivo. *Cancer Research* 2014; 74: 1-13.
- Shim** H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. C-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(13): 6658-6663.
- Sterner** DE, Berger SL. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(2): 435-459.
- Stone** J, de Lange T, Ramsay G, Jakobovits E, Bishop JM, Varmus H, Lee W. Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 1987; 7(5): 1697-1709.

- Sun C**, Dobi A, Mohamed A, Li H, Thangapazham RL, Furusato B, Shaheduzzaman S, Tan SH, Vaidyanathan G, Whitman E, Hawksworth DJ, Chen Y, Nau M, Patel V, Vahey M, Gutkind JS, Sreenath T, Petrovics G, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S. TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene* 2008; 27(40): 5348-5353
- Tannapfel A**, Neid M, Aust D, Baretton G. The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways precursor lesions. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107(43): 760-766
- Tolani B**, Gopalakrishnan R, Punj V, Matta H, Chaudhary PM. Targeting Myc in KSHV-associated primary effusion lymphoma with BET bromodomain inhibitors. *Oncogene* 2014; 33(22): 2928-2937.
- Vandesompele J**, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2000; 3(7): RESEARCH0034.
- Vaupel P**, Kallinowski F, Okunieff P (1989). Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Research*, 49: 6649-6465.
- Vaupel P**, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Reviews* 2007; 26: 225-239.
- Vennstrom B**, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 1982; 42(3): 773-779.
- Wang L**, Wu X, Huang P, Lv Z, Qi Y, Wei X, Yang P, Zhang F. JQ1, a small molecule inhibitor of BRD4, suppresses cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2016; 36(4): 1989-1996.
- Waters CM**, Littlewood TD, Hancock DC, Moore JP, Evan GI. C-Myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene* 1991; 6(5): 797-805.
- Wilkins JA**, Sansom OJ. C-Myc is a critical mediator of the phenotypes of Apc loss in the intestine. *Cancer Res* 2008, 68(13): 4963-4966.
- Wong WJ**, Qiu B, Nakazawa MS, Quing G, Simon MC. MYC degradation under low O₂ tension promotes survival by evading hypoxia induced cell death. *Molecular and Cell Biology* 2013; 33(17): 3494-3504.
- Wyatt HDM**, Tsang AR, Lobb DA, Beattie TL. Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Q169 Is Essential for Telomerase Function In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* 4(9): e7176.
- Xiong Y**, Hannon GJ, Zhang H, Cass D, Kobayashi R, Beach D. P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366(6456): 701-704
- Yang Z**, He N, Zhou Q. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2008; 28(3): 967-976.
- Yin X**, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. Low molecular weight inhibitors of Myc/Max interaction and function. *Oncogene* 2003; 22: 6151-6159.
- Yoshida S**, Ito D, Nagumo T, Shirota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncology* 2009; 45(2): 109-115.

- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(25): 14517-14522.
- Zengerle M, Chan KH, Ciulli A.** Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem Biol.* 2015; 10(8): 1770-7.
- Zhang C, Su ZY, Wang L, Shu L, Yang Y, Guo Y, Pung D, Bountra C, Kong AN.** Epigenetic blockade of neoplastic transformation by bromodomain and extra-terminal (BET) domain protein inhibitor JQ-1. *Biochem Pharmacol* 2016, 117: 35-45
- Zhang HT, Gui T, Sang Y, Yang J, Li YH, Liang GH, Li T, He QY, Zha ZG.** The BET Bromodomain Inhibitor JQ1 Suppresses Chondrosarcoma Cell Growth via Regulation of YAP/p21/c-Myc Signaling. *J Cell Biochem* 2017; 118(8): 2182-2192.
- Zhang Q, West-Osterfield K, Spears E, Li Z, Panaccione A, Hann SR.** MB0 and MBI Are Independent and Distinct Transactivation Domains in MYC that Are Essential for Transformation. *Genes* 2017; 8(5): 134
- Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF.** Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 1998; 12(15): 2424-2433.
- Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, Magoon D, Qi J, Blatt K, Wunderlich M, Taylor MJ, Johns C, Chicas A, Mulloy JC, Kogan SC, Brown P, Valent P, Bradner JE, Lowe SW, Vakoc CR.** RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 2011; 478(7370): 524-528.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Übersicht über die funktionellen Bereiche im MYC-Protein. Eigene Darstellung.....	4
Abbildung 1.2:	MYC aktiviert die Polymerase II und fördert die Transkription. Eigene Darstellung.....	5
Abbildung 1.3:	MYC reguliert die Genexpression als Transkriptionsfaktor und epigenetischer Modulator. Eigene Darstellung.....	6
Abbildung 1.4:	Deregulierte Expression von MYC fördert die Tumorgenese. Eigene Darstellung.....	8
Abbildung 3.1:	Repräsentatives Ergebnis zum antiproliferativen Effekt von JQ1 in der Langzeitkultur. Eigene Darstellung.....	17
Abbildung 4.1:	Graphische Darstellung zum Zusammenhang zwischen der Konzentration an JQ1 und der Zellproliferation.....	24
Abbildung 4.2:	Der antiproliferative Effekt von JQ1 bei starker (10 % FCS) und schwacher (1 % FCS) Tumorzellproliferation.....	25
Abbildung 4.3:	Der antiproliferative Effekt von JQ1 in Hypoxie im Vergleich zu 5-FU....	26
Abbildung 4.4:	Der antiproliferative Effekt von JQ1 und 5-FU in Hypoxie (1% O ₂).....	27
Abbildung 4.5:	Der antiproliferative Effekt von JQ1 in der Langzeitkultur (144 Stunden).....	29
Abbildung 4.6:	Der konzentrationsabhängige Effekt von JQ1 auf den zellulären Gehalt an MYC-Protein.....	30
Abbildung 4.7:	Die JQ1 vermittelte Abnahme an MYC-Protein.....	30
Abbildung 4.8:	Der konzentrationsabhängige Effekt von JQ1 auf die Transkription von MYC mRNA.....	31
Abbildung 4.9:	Der konzentrationsabhängige Effekt von JQ1 auf die Transkription von p21 mRNA.....	32
Abbildung 4.10:	Der Einfluss von JQ1 auf den Zellzyklus kolorektaler Karzinomzellen.....	33
Abbildung 4.11:	Der antiproliferative Effekt von JQ1 auf die Anzahl vitaler Zellen und die Expression von MYC-Protein, MYC mRNA und p21 mRNA bei Fibroblasten (NHDF).....	35
Abbildung 6.1:	Zum möglichen Wirkmechanismus von JQ1 in kolorektalen Karzinomzellen. Eigene Darstellung.....	43

11 Anhang

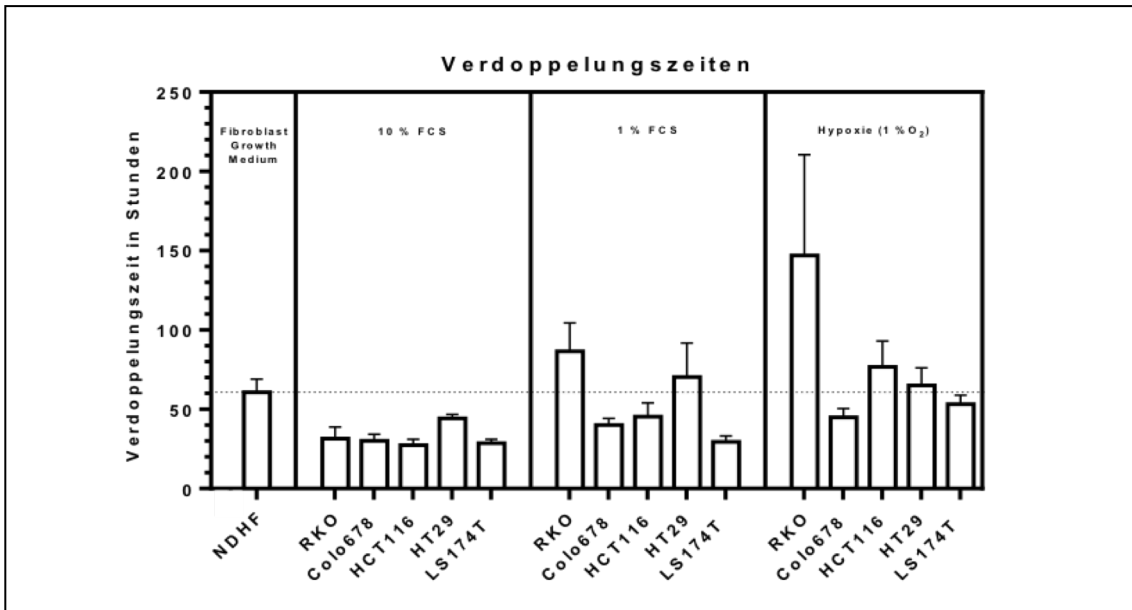
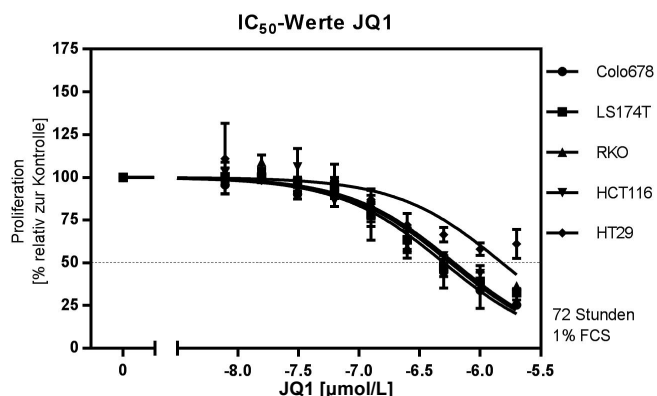


Abbildung A1: Verdoppelungszeiten kolorektaler Karzinomzelllinien und Fibroblasten (NDHF). Gezeigt sind die Verdopplungszeiten in Stunden für unterschiedliche Kulturbedingungen: 10 % FCS und 21 % Sauerstoff; 1 % FCS und 21 % Sauerstoff und in Hypoxie bei 10 % FCS. n = 3 biologische Replikate (Kapitel 3.7). In Ergänzung zu Kapitel 4.2.

	IC ₅₀	
	MW	95% CI
Colo678	0,50	0,41-0,61
LS174T	0,57	0,48-0,67
RKO	0,58	0,44-0,76
HCT116	0,61	0,48-0,77
HT29	>2	-----

Tabelle A1: IC₅₀-Werte von JQ1 für die schwache Tumorzellproliferation. Die IC₅₀ sind für eine Inkubationszeit von 72 Stunden bei 1 % FCS gezeigt. In Ergänzung zu Kapitel 4.2. IC₅₀ in µmol/L. MW: Mittelwert.

Abbildung A2: Graphische Darstellung der IC₅₀-Werte von JQ1 bei schwacher Tumorzellproliferation. Gezeigt für eine Inkubationszeit von 72 Stunden und 1 % FCS. Prism 6.0, n = 2-4 biologische Replikate. In Ergänzung zu Kapitel 4.2.



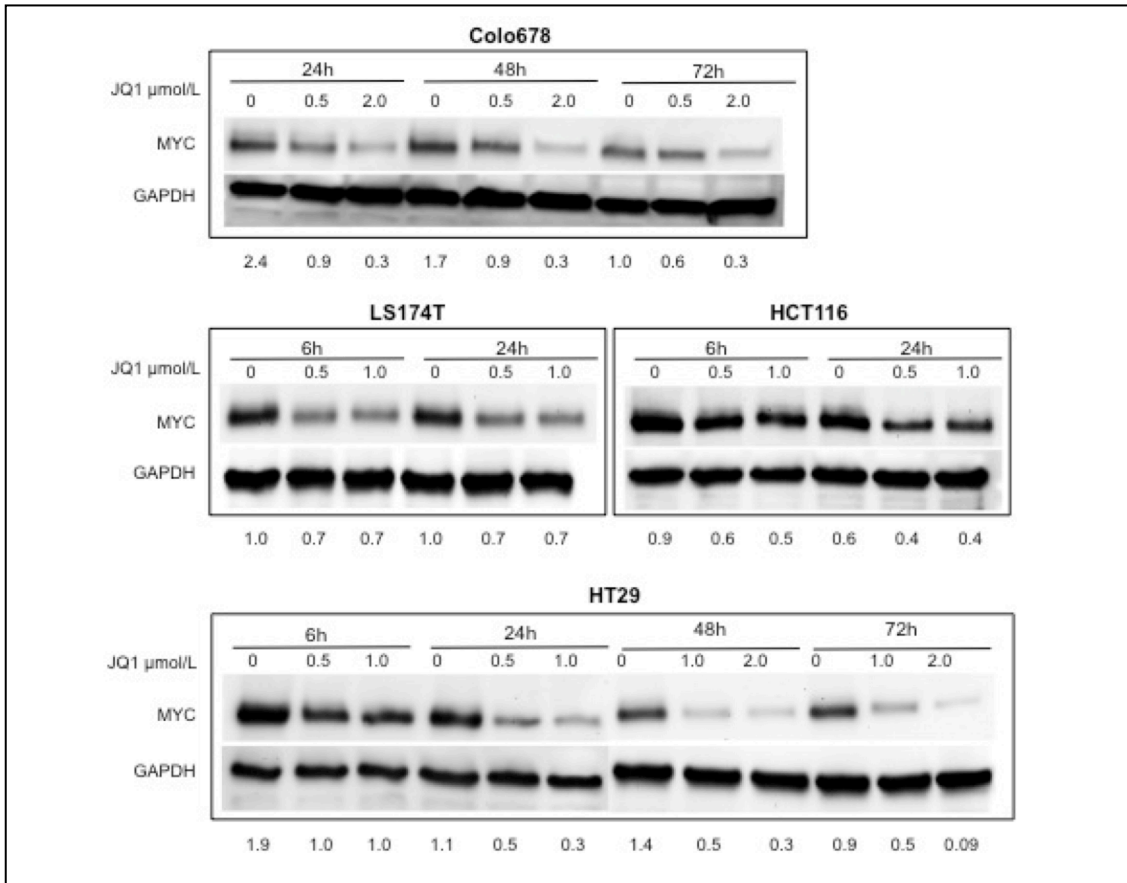


Abbildung A3: Der durch JQ1 vermittelte Rückgang an MYC-Protein. In Ergänzung zu Abbildung 4.7. Der konzentrationsabhängige Einfluss von JQ1 auf die MYC-Expression ist für unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten gezeigt.

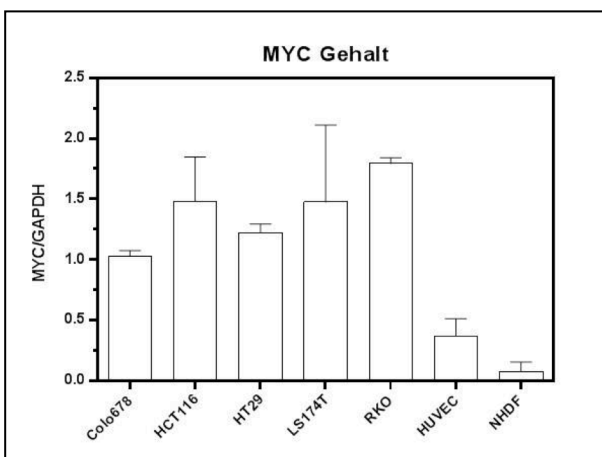


Abbildung A4: Deregulierte MYC-Expression in kolorektalen Karzinomzelllinien. MYC ist in kolorektalen Karzinomzellen im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen (HUVEC, NDHF) überexprimiert. Normalisierte relative Expression von $n = 3$ biologischen Replikaten aus unterschiedlichen Zellpassagen. In Ergänzung zu Kapitel 4.5.

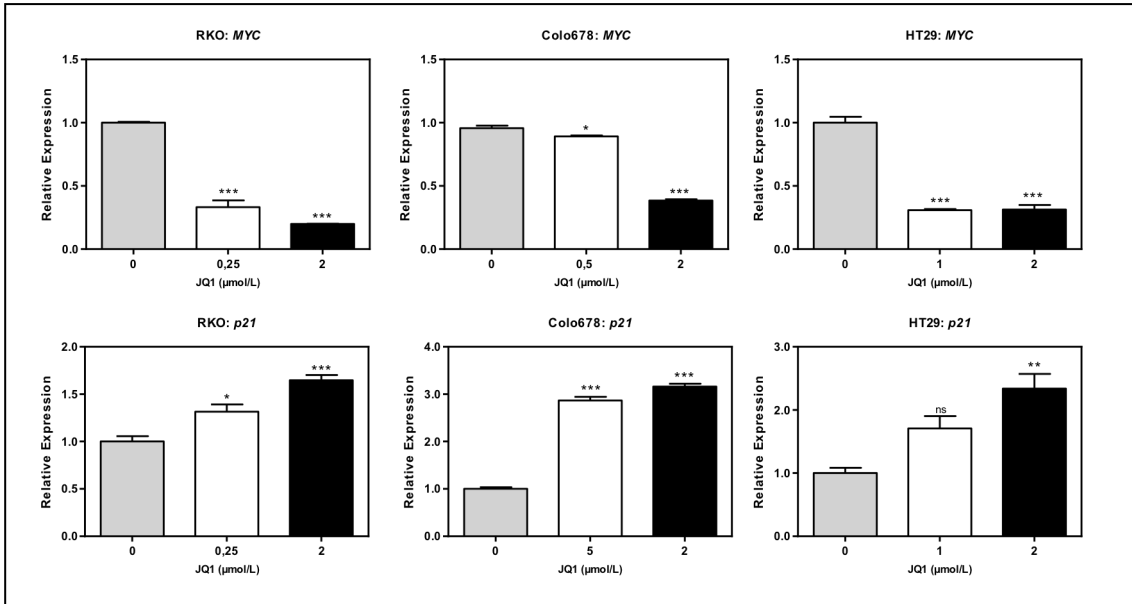


Abbildung A5: JQ1 beeinflusst in Hypoxie ebenfalls die Expression von *MYC* und *p21* mRNA. Mit JQ1 behandelte Zellen zeigten eine verminderte *MYC*- und erhöhte *p21*-Expression in Hypoxie (1 % Sauerstoff). One-Way-Anova, Dunnett's multiple comparisons, n = 3 biologische Replikate (Kapitel 3.7). In Ergänzung zu Kapitel 4.5.

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Experimentellen Chirurgie I der Chirurgischen Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer, Direktor der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg, und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Armin Wiegering danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit unter besten Arbeitsbedingungen zu erstellen und die Vergabe des Dissertationsthemas.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto, Leiter der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik I, für die ausgezeichnete Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit und Kongressvorbereitungen. Belebende Diskussionen weckten Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten. Seine zuverlässige Unterstützung, Geduld und Anregungen ermöglichten ein konstruktives und kreatives Arbeiten und erst das Gelingen dieser Arbeit.

Frau Manuela Schneider, Frau Bettina Mühling und Frau Monika Koospal danke ich sehr für die praktische Unterstützung im Labor und die unermüdliche Hilfsbereitschaft, die bedeutend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Weiterhin danke ich Frau Lorraine Stevenson-Knebel für die organisatorischen Dinge.

Frau Prof. Dr. rer. hum. biol. U. Kämmerer, Leiterin des Forschungsbereichs der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg, danke ich für die Bereitstellung der Hypoxiewerkbank und Frau M. Kapp für die freundliche Einarbeitung.

Meinen höchsten Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und mich in jeder Situation liebevoll unterstützen.

Curriculum Vitae
