



Regulation von c-MYC durch CIP2A im kolorektalen Karzinom

Regulation of c-MYC by CIP2A in colorectal cancer

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie

Vorgelegt von

Gisela Maria Schwarz

aus

Tübingen

Spaichingen **2022**

Eingereicht am: xx.xx.2022

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Wolfgang Kastenmüller

1. Betreuer: Prof. Martin Eilers

2. Betreuer: Prof. Peter Gallant

3. Betreuer: Dr. Steffi Herold

4. Betreuer: Prof. Armin Wiegering

Tag der Disputation: ausstehend

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Denk, S.; Schmidt, S.; Schurr, Y.; Schwarz, G.; Schote, F.; Diefenbacher, M. et al. (2020): CIP2A regulates MYC translation (via its 5'UTR) in colorectal cancer. In: *International journal of colorectal disease*. DOI: 10.1007/s00384-020-03772-y

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kolorektales Karzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms.....	1
1.1.2	Die Rolle von c-MYC im kolorektalen Karzinom	2
1.2	Der Transkriptionsfaktor MYC und dessen Regulation	4
1.2.1	MYC-Proteine	4
1.2.2	Wirkungen von MYC auf die Zelle.....	5
1.2.3	Aufbau und Wirkweise des MYC-Proteins.....	6
1.2.4	Transkription und transkriptionelle Regulation von MYC	8
1.2.5	Translation und translationelle Regulation von MYC.....	9
1.2.6	Regulation des Abbaus von MYC.....	11
1.3	Proteinphosphatase 2A	13
1.4	Das Onkoprotein CIP2A	14
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2	Materialien.....	16
2.1	Zelllinien, Nährmedium, Bakterien	16
2.1.1	Zelllinien.....	16
2.1.2	Nährmedium	16
2.1.3	Bakterien.....	17
2.1.4	Bakterien Nährmedium.....	17
2.2	Nukleinsäuren	17
2.2.1	siRNA und shRNA	17
2.2.2	Plasmide	18
2.2.3	Primer für die quantitative Realtime PCR.....	18
2.2.4	Primer für PCR-Amplifikation von shRNA-Klonierung	18

2.2.5	Sequenzierprimer pInducer11	19
2.3	Antikörper.....	19
2.3.1	Primäre Antikörper.....	19
2.3.2	Sekundäre Antikörper.....	20
2.3.3	Sonstige Antikörper.....	20
2.4	Inhibitoren und Antibiotika	20
2.5	Standards, Kits, Enzyme, Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	20
2.5.1	Standards	20
2.5.2	Kits, Enzyme, Chemikalien.....	21
2.5.3	Puffer und Lösungen	22
2.6	Geräte, Gebrauchsmaterialien und Software	25
2.6.1	Geräte und Gebrauchsmaterialien	25
2.6.2	Software.....	29
3	Methoden.....	30
3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	Transformation von E. coli-Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation.....	30
3.1.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E. coli.....	30
3.1.3	Extraktion von RNA.....	31
3.1.4	cDNA-Herstellung.....	31
3.1.5	Quantitative Realtime PCR	31
3.1.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	32
3.1.7	Messen von Nukleinsäurekonzentration.....	33
3.1.8	PCR-Amplifizierung und Verdau durch EcoRI und XhoI von shCIP2A-Oligos und pInducer11	33
3.1.9	Sequenzierungen.....	34

3.2	Zellbiologische Methoden	34
3.2.1	Zellkultivierung	34
3.2.2	Zellen passagieren	34
3.2.3	Zellen einfrieren	35
3.2.4	Zellen auftauen	35
3.2.5	Zellen ernten	35
3.2.6	siRNA Transfektion.....	35
3.2.7	Virusherstellung, Infektion von HEK293-Zellen und Transfektion der shCIP2A in HCT116 p53+/+ -Zellen	36
3.2.8	Wachstumskurve	36
3.2.9	BrdU/PI-Durchflusszytometrie.....	37
3.2.10	Zellzyklusberechnung	38
3.2.11	Kristallviolett Färbung.....	39
3.2.12	Züchten von Einzelzellklonen	39
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	40
3.3.1	Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten.....	40
3.3.2	Messung der Proteinkonzentrationen	40
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
3.3.4	Western Blot	41
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Herstellung einer Zelllinie HCT116 mit Doxycyclin-induzierbarer shCIP2A	43
4.2	Einfluss von CIP2A auf das Wachstum von Zellen.....	44
4.2.1	Zelldichte in HCT116 Zellen nach CIP2A-Knockdown.....	45
4.2.2	Zellwachstum nach CIP2A-Knockdown	45
4.3	CIP2A hat keinen Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein	47
4.3.1	Hemmung der Translation durch Cycloheximid	47

4.3.2	Hemmung des Abbaus von MYC-Protein durch Okadasäure, MG132 und in gentechnisch veränderten Zellen mit fehlender Ubiquitinligase FBWX7	48
4.4	CIP2A reguliert die Translation von MYC Protein	52
5	Diskussion	55
5.1	CIP2A-depletierte Zellen zeigen einen Wachstumsnachteil	55
5.2	CIP2A hat keinen Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein	55
5.3	CIP2A hat einen Einfluss auf die Translation von MYC Protein	57
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis	63
	Appendix	73
I	Abkürzungsverzeichnis	73
II	Abbildungsverzeichnis	76
III	Tabellenverzeichnis	77
	Curriculum Vitae	78
	Danksagung	80
	Eidesstaatliche Erklärung	81
	Anhang	82
	Abdruckgenehmigung Abb. 1.1:	82
	Abdruckgenehmigung Abb. 1.2:	83
	Abdruckgenehmigung Abb. 1.4	84

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Mit ca. 30.000 Neuerkrankungen pro Jahr und Geschlecht ist das kolorektale Karzinom die zweit- bzw. dritthäufigste Tumorentität in Deutschland [1]. Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms zeigte sich in den letzten Jahren rückläufig, was am ehesten auf die verbesserte Früherkennung und Entfernung von Adenomen mittels der Koloskopie zurückzuführen ist; die Inzidenz der *In-situ*-Karzinome stieg an [2,3]. Als Risikofaktoren gelten eine geringe körperliche Aktivität, einseitige Ernährung mit nur unzureichender Ballaststoffaufnahme, Tabak- und Alkoholkonsum, sowie eine positive Familienanamnese und verschiedene Syndrome, die mit einem erhöhten Risiko für das kolorektale Karzinom einhergehen [4–6]. Bei Erstdiagnose liegt das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 70 Jahren. Das relative 5-Jahres Überleben liegt bei 63%; in absoluten Zahlen starben in Deutschland im Jahr 2013 12.085 Frauen und 13.608 Männer an Darmkrebs [2]. Insgesamt sank die Zahl der Todesfälle im Zeitraum vom Jahr 2000 bis 2018 von ca. 28 700 auf 24 200 pro Jahr in Deutschland [3]. Bei 18 % (Rektumkarzinom), bzw. 25 % (Kolonkarzinom) der Patienten bestehen bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen. Besonders häufig ist hierbei die Leber betroffen [4]. Therapeutisch steht die chirurgische *En-Bloc*-Resektion beim operablen Kolonkarzinom ohne, bzw. mit operablen Lungen- oder Lebermetastasen an erster Stelle, während beim Rektumkarzinom je nach Stadium eine neoadjuvante Chemotherapie, gefolgt von einer Operation, durchgeführt wird [4]. Während früher 10-20 % der betroffenen Patienten für eine Resektion der Metastasen infrage kam, konnte diese Zahl mittlerweile um weitere 10 % gesteigert werden. Heutzutage können mithilfe verschiedener Techniken auch Lebermetastasen reseziert werden, welche zuvor noch als nicht-resektabel galten, da die verbleibende Restleber nicht ausreichen würde. Zu den Techniken gehören u.a. die Pfortaderembolisation und die zwei- oder mehrzeitige Leberresektion. Das Ziel dieser Eingriffe besteht darin, vor der geplanten Resektion einen Hypertrophiereiz auf das gesunde Lebergewebe zu setzen, um so ausreichend gesundes und funktionsfähiges Lebergewebe

nach der Resektion erhalten zu können. Ungeklärt ist jedoch, ob es so auch zu einem Hypertrophiereiz der Metastasen kommt [7,8].

Durch die zunehmenden Möglichkeiten der Gensequenzierung, können mittlerweile genauere Aussagen über die genetischen Veränderungen von Tumorzellen gemacht werden. Unterschieden werden sogenannte „driver“ und „passenger“ Mutationen. Während die Zelle auf dem Boden einer „driver“ Mutation einen Wachstumsvorteil erlangt, hat eine „passenger“ Mutation keinen Einfluss auf das Tumorwachstum. Die initiale „driver“ Mutation im kolorektalen Karzinom findet sich meist im APC-Gen. Im Laufe der Zeit kommen weitere „driver“ Mutationen anderer Gene hinzu und führen so zur malignen Entartung und raschem Wachstum der Zellen. Von der Entstehung eines Adenoms bis zur Entwicklung eines Karzinoms vergehen so ca. 10 Jahre. Dieses Wissen macht man sich zum einen in der Früherkennung zunutze, wo die Zeitspanne der sogenannten „Adenom-Karzinom-Sequenz“ für die Vorsorge-Koloskopie genutzt wird, zum anderen offenbart die Identifikation der „driver“ Mutationen potenzielle therapeutische Angriffspunkte [4,9] (Abb. 1.1).

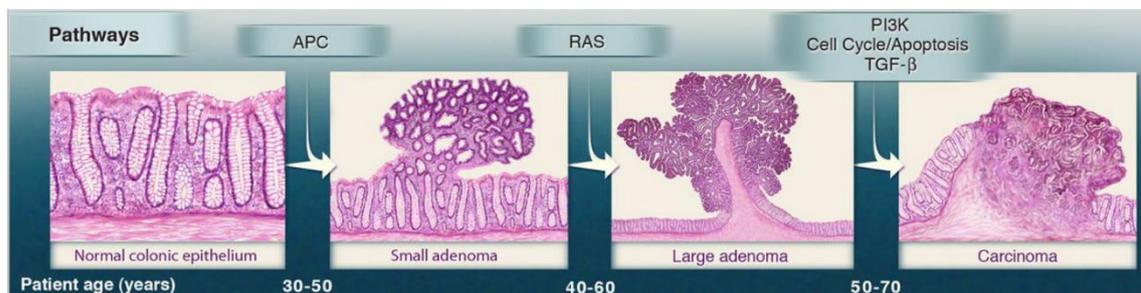


Abb. 1.1: Entstehung eines Karzinoms. Die Bilderfolge zeigt die Entstehung eines Adenoms, resultierend in ein invasives Karzinom. Die darüberstehenden Mutationen und das Patientenalter sind beispielhaft (aus: [9]).

1.1.2 Die Rolle von c-MYC im kolorektalen Karzinom

Für das kolorektale Karzinom konnten mittlerweile einige „driver“ Mutationen gefunden werden. Eine sehr gute Übersicht dazu bietet der Cancer Genome Atlas, welcher 2012 zur Thematik der Molekulargenetik des Kolon- und Rektumkarzinoms im Magazin „Nature“ veröffentlicht wurde. Hierbei werden, abhängig von der Zahl der Mutationen, die hypermutierten und nicht-hypermutierten Kolonkarzinome unterschieden.

Hypermuiert sind ca. 16 % der kolorektalen Karzinome. Diese weisen eine Mikrosatelliteninstabilität auf, sowie Mutationen der Mismatch-Reparaturgene und der Polymerase ϵ .

Die Mehrzahl bilden die nicht-hypermuierten Karzinome. Als die acht am häufigsten veränderten Gene konnten *APC*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *SMAD4*, *TCF7L2* und *NRAS* identifiziert werden.

In 93 % aller kolorektalen Karzinome, und damit am häufigsten verändert, ist der WNT-Signalweg. Veränderungen finden sich unter anderem durch Inaktivierung von *APC*, Aktivierung von *CTNNB1*, oder auch durch Mutationen von *FBXW7*. Insgesamt wurden 16 veränderte Gene gefunden, welche auf den WNT-Signalweg wirken; oft lag gleichzeitig eine Mutation von *APC* vor. Weitere, häufig betroffene Signalwege sind der PI3K- und RAS-MAPK-Signalweg, sowie der TGF β - oder der p53-Signalweg. Trotz dieser Vielfalt der Gene und Signalwege, welche im kolorektalen Karzinom mutiert und betroffen sein können, ist auffällig, dass annähernd 100% und damit fast alle der kolorektalen Karzinome, Änderungen in der Transkription der Zielgene von c-MYC (im Folgenden MYC) aufweisen. Abbildung 1.2 zeigt die gefundenen Veränderungen im kolorektalen Karzinom (gesamter Abschnitt: [10]. Im Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass die, durch Verlust des APC-Genes hervorgerufenen Veränderungen, wie gestörte Differenzierung, Proliferation und Apoptose der intestinalen Zellen, durch zusätzlichen Verlust von MYC wieder normalisiert werden können [11].

Damit nimmt MYC eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms ein und stellt ein mögliches Therapieziel dar.

Einleitung

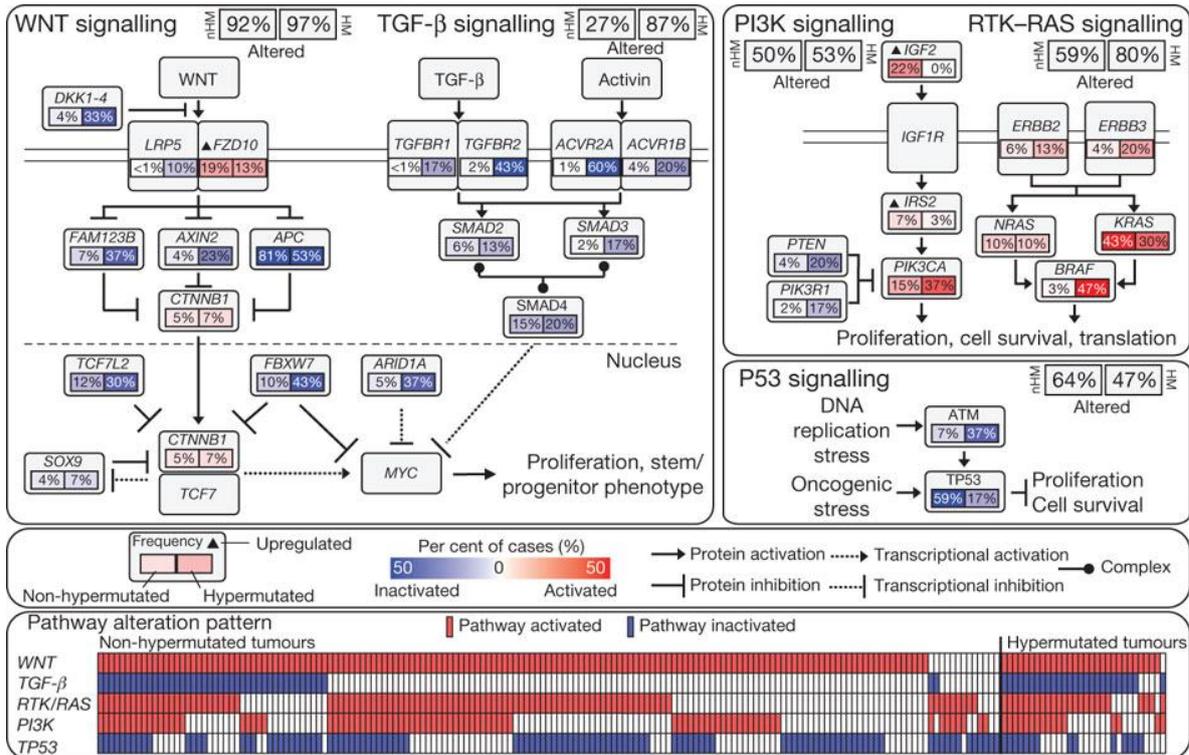


Abb. 1.2.: Darstellung der möglichen genetischen Veränderungen des kolorektalen Karzinoms. Die Abkürzungen nHM bzw. HM stehen für non-hypermuted bzw. hypermutated. Die Farben zeigen ob es sich um aktivierende oder nicht-aktivierende Veränderungen handelt. In 92 bzw. 97 % der Karzinome ist der WNT-Signalweg verändert. In 27 bzw. 87 % ist der TGF-β-Signalweg betroffen. In knapp der Hälfte der kolorektalen Karzinome finden sich Mutationen im PI3K-Signalweg. Ebenso sind in 59 bzw. 80 % der Fälle der RTK-RAS- und in 64 bzw. 47 % der Fälle der p53-Signalweg betroffen (aus: [10]).

1.2 Der Transkriptionsfaktor MYC und dessen Regulation

1.2.1 MYC-Proteine

MYC wurde in den 1980er Jahren erstmals mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Der Name leitet sich ab von der Myelozytomatose, welche schon in den 1960er Jahren als eine, durch Viren ausgelöste Erkrankung entdeckt wurde. So wird eine Überexpression von MYC im Zervixkarzinom beispielsweise durch das Humane Papilloma Virus hervorgerufen [12]. Für das Plasmozytom bei Mäusen und das Burkitt-Lymphom beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass eine Translokation für die Überexpression des MYC-Gens verantwortlich ist, dagegen handelt es sich im kolorektalen Karzinom um eine Amplifikation des MYC-Gens [13].

Es sind noch weitere Mitglieder der MYC-Familie bekannt: MYCN ist z.B. im Neuroblastom aber auch im Mammakarzinom überexprimiert, MYCL z.B. im kleinzelligen Bronchialkarzinom und Ovarialkarzinom [13].

MYC ist das am häufigsten amplifizierte Onkogen in Tumoren des Menschen [14]. Durch Inhibition von MYC, z.B. mittels siRNA oder dem small-molecule MYC-Inhibitor 10058 F4, kann das Tumorstadium *in vitro* gehemmt werden [15]. Umgekehrt, kann durch Überexpression von MYC Tumorstadium generiert werden. Tumore mit überexprimiertem MYC sprechen teils besser auf Chemotherapeutika an; der hierdurch induzierte Zelltod ist MYC-abhängig [16].

1.2.2 Wirkungen von MYC auf die Zelle

Es gibt schätzungsweise 30.000 potenzielle MYC-Bindestellen im menschlichen Genom, ca. 15-20% der Gene sind an MYC gebunden. Deren Transkription wird dabei nicht zwangsläufig durch MYC verändert, was auf die komplexe und bis heute nicht geklärte Wirkweise von MYC hindeutet [17,18]. Durch die Umwelt bekommt die Zelle je nach Verfügbarkeit von Nährstoffen, Wärme oder Zellstress Informationen darüber, ob sie differenzieren oder wachsen soll [19,20]. In der ruhenden Zelle wird nur wenig MYC exprimiert; bei Eintritt der Zelle in den Zellzyklus steigt die Expression rasch an und fällt dann auf ein basales Level während des Zellzyklus ab [15]. Kommt es zu einer Deregulation von MYC, beginnt die Zelle unkontrolliert zu wachsen [19,21]. Darüber hinaus induziert MYC durch die Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Vaskulogenese. Dies ist für die Tumorstadium und Metastasierung des Tumorgewebes unentbehrlich [22]. MYC fördert u.a. die durch DNA-Schäden hervorgerufene p53-induzierte Apoptose [23–25], verhindert die Zelladhäsion [26] und erhöht den Stoffwechsel der Zelle [27–30]. Die Wirkung von MYC ist letztendlich abhängig vom Zell- und Gewebetyp [17]. Die genannten Wirkungen von MYC auf die Zelle sind in Abb.1.3 dargestellt.

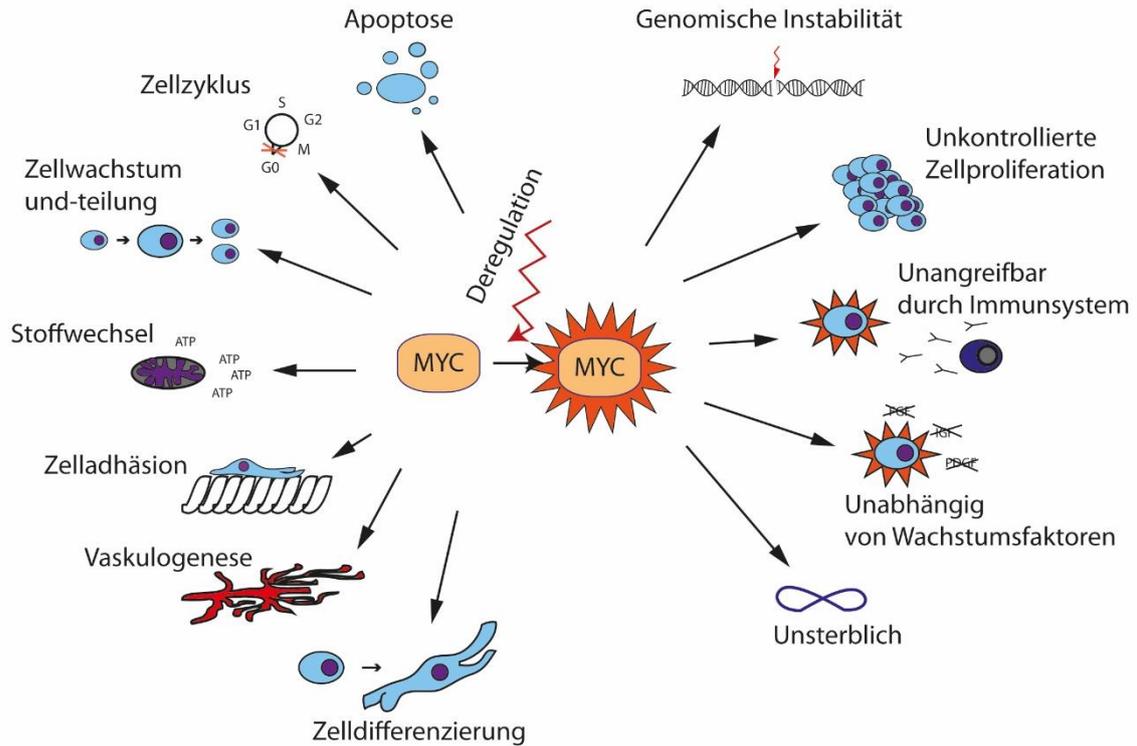


Abb. 1.3: Wirkungen von MYC auf die Zelle. Links sind die physiologischen Wirkungen von MYC dargestellt, rechts die wichtigsten Wirkungen des deregulierten MYC. Durch Überexprimierung von MYC kommt es zur erhöhten und unkontrollierten Zellproliferation, zu einem Vorantreiben des Zellzyklus, zu einem gesteigerten Stoffwechsel, zur Vaskulogenese und zu einer Hemmung der Zelldifferenzierung und -adhäsion (angelehnt an [16])

1.2.3 Aufbau und Wirkweise des MYC-Proteins

MYC-Protein besteht aus einem C- und einem N-Terminus. Mit dem C-Terminus kann MYC mit MAX (MYC associated Factor X), über einen basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (BR/HLH/LZ) DNA-Zielsequenzen erkennen [31]. Der N-Terminus und die zentrale Region enthalten die MYC-Box-Sequenzen 0-IV (MB 0-IV), die mit jeweils unterschiedlichen Proteinen interagieren und u.a. eine Rolle in der Proteinstabilität und Transkriptionsaktivierung, sowie Apoptose spielen [15,18,31,32]. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass in MBIII deletierten Zellen die Apoptose und zudem die zytotoxische Effektivität von Etoposid gesteigert werden kann [33]. In der proliferierenden Zelle bildet MYC mit seinem Partnerprotein MAX ein Dimer und bindet an die E-Box-Sequenz (CACA/GTG) der DNA. MAX ist im Gegensatz zu MYC im Überschuss vorhanden und bildet in der ruhenden oder sich differenzierenden Zelle Komplexe mit MAD oder MNT [34]. Sind MYC-MAX so an die DNA gebunden, soll die Transkription unter Einbeziehung eines Ko-Aktivator-Komplexes, welcher TRRAP und eine Histon-Acetyl-Transferase wie

GCN5 enthält, aktiviert oder auch unterdrückt werden [35,36]. Unter anderem nimmt die Expression von p21, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen, oder p15, welches den Zellzyklus hemmt, ab. Dagegen steigt die Expression von VEGF, Cyclin D1 und D2, die Cyclin-abhängige Kinase 4 oder auch HDAC2, ein Suppressor der Zelldifferenzierung, durch MYC an [34,37–41]. Bisher ging man davon aus, dass so hunderte bis tausende Gene durch überexprimiertes MYC reguliert werden [42]. Jedoch bleibt der genaue Wirkmechanismus von MYC weiterhin unklar. Wie bereits oben geschrieben ist bekannt, dass MYC-MAX an E-Box-reiche DNA binden, umgekehrt findet man aber an Promotoren von Genen, die durch MYC kontrolliert werden, teilweise keine E-Box-Sequenzen. Aufgrund vieler, scheinbar nicht-konklusiver Daten werden aktuell verschiedene Modelle über die Wirkweise von MYC diskutiert. Da nur ein Bruchteil der Gene, an denen MYC gebunden ist, durch MYC reguliert scheint, ist dies ein Anhalt für eine Gen-spezifische Regulation. Mit der Erkenntnis, dass die globale mRNA-Transkription während der Mitose durch MYC gesteigert wird und diese MYC-abhängig ist, hat sich das Modell mit MYC als „globalen Amplifier“ entwickelt, welches die onkogene Funktion von MYC hierin sieht. Ein drittes Modell sieht die unterschiedliche Transkriptionsregulation durch MYC der unterschiedlichen Affinität von MYC-MAX an die DNA geschuldet: werden bei physiologischen MYC-Leveln nur wenige Gene mit hoher Affinität transkribiert, ändert sich dies mit höheren Konzentrationen, bei denen auch Gene mit niedriger Affinität transkribiert werden. Ein viertes Modell beschreibt den Einfluss von MYC auf die RNA Polymerase II. Die Anwesenheit von MYC kann die RNA Polymerase II aktivieren und aus dem „promotorproximal pausing“ in die Elongationsphase bringen. Zudem kann MYC auf niedrige Ribonukleotidspiegel (z.B. bei fehlendem Glutamin) mit einer Hemmung der Transkription reagieren, hierdurch soll MYC mit anderen Proteinen auch eine „R-Loop-Formation“ während der Replikation und Transkription verhindern und so die Effizienz der Proteinsynthese erhöhen. „R-Loop-Formationen“ sind dreisträngige Nukleinsäuren, die sich aus DNA und RNA bilden. Die Onkogenität von MYC wird in diesem Modell in einer gesteigerten Transkriptionseffizienz gesehen; zudem kann MYC auf veränderte Ribonukleotidspiegel reagieren und die Zellen so vor der Apoptose schützen (gesamter Abschnitt: [18]).

1.2.4 Transkription und transkriptionelle Regulation von MYC

Das primäre MYC-Transkript besteht aus drei Exons, wobei nur Exon 1 und Exon 2 für das MYC-Protein kodieren. MYC-Transkription wird meistens durch die zwei Hauptpromotoren P1 und P2 gestartet. Diese MYC-mRNA macht 25% und 75% aus [43]. Als regulatorisches Element in der proximalen Region ist das NHE III₁-Element beschrieben, welches ca. 130bp aufwärts des P1-Promotors sitzt. Es kann verschiedene Formen annehmen kann und so als Einzel- oder Doppelstrang positiv, aber als G-Quadruplex oder iMotif (kurze, sich wiederholende DNA-Abschnitte, welche eine biologische Funktion erfüllen [44]) ebenso negativ auf die Transkriptionseffizienz wirken [17,45,46]. Außerdem gibt es das weiter proximal gelegene FUSE (Far upstream element). Während der Transkription wird es einsträngig und Proteine, wie das FUSE-Bindeprotein (FBP) und der FBP-interagierende Repressor (FIR) können daran binden und so die Transkriptionseffizienz beeinflussen (Abb.1.3) [17].

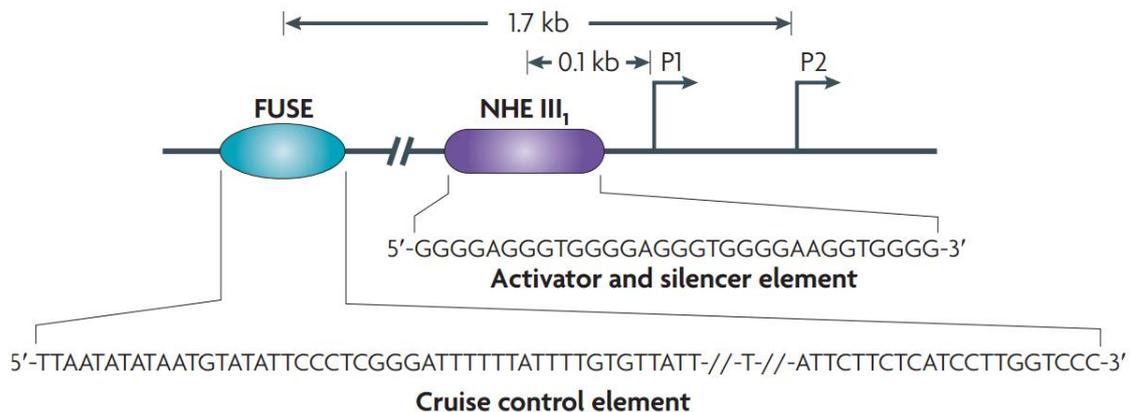


Abb. 1.4: Transkription von MYC. NHEIII kann je nach Form Transkription vorantreiben oder hemmen, FUSE funktioniert als Geschwindigkeitsregler (aus: Brooks und Hurley, 2009).

Die Expression von MYC wird außerdem beeinflusst durch Wachstumsfaktoren, wie PDGF und EGF, Interleukine, den NFκB-Signalweg oder T-Zell-Faktor (TZF). Diese binden nicht an eine bestimmte DNA-Struktur, sondern binden an viele verschiedene Stellen, wobei diese Bindungen häufig nur sehr schwach sind [43]. Im kolorektalen Karzinom werden sogenannte single nucleotide polymorphisms (SNP) beschrieben, welche unter anderem die Affinität des TZF an die DNA erhöhen sollen, und so zu einer Überexpression von MYC führen [43,47]. Der Translations-Initiations-Faktor eIF4E erkennt und bindet schon während der Transkription an die 7-Methylguanosin-Cap-Struktur, welche in der 5'UTR liegt, exportiert

die mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma und liefert sie dem eIF4F-Initiations-Komplex. So wird verhindert, dass MYC-mRNA den Zellkern ungezielt verlassen kann. Dabei befindet sich 68% des eIF4E im Zellkern und beteiligt sich so am Export verschiedener mRNA, welche die 4E-sensitive Region, bestehend aus 50 Nukleotiden in der 3'UTR, enthalten [48,49].

1.2.5 Translation und translationelle Regulation von MYC

Die MYC-mRNA besteht aus verschiedenen Anteilen: die 5'Untranslatierte Region (5'UTR), die für das MYC-Protein kodierende Sequenz (CDS) und die 3'-Untranslatierte Region (3'UTR). In der 5'UTR befindet sich der Translationsstart, die 3'UTR ist Angriffspunkt von MicroRNAs, wie z.B. Let-7 miRNA oder mir17-19b, welche als Tumorsuppressor wirken [20,50,51]. Die Translation von MYC wird durch Cap-abhängige Mechanismen gesteuert und kann durch Rapamycin (über mTOR (Mammalian Target of Rapamycin)) gehemmt werden [52]. Interessanterweise, hat Rapamycin im normalen Darmgewebe jedoch keinen Effekt auf Apoptose oder Proliferation [53]. Es ist außerdem bekannt, dass die 5'UTR ein IRES (Internal Ribosome Entry Side) enthält, über welches die Translation ebenso starten kann [54]. Die mTOR Serin/Threonin Proteinkinase dient als Vermittler von Informationen wie Zellstress, Verfügbarkeit von Nährstoffen und Vorhandensein von Wachstumsfaktoren. Dadurch kann in der Zelle die Balance zwischen anabolischen, z.B. Proteinsynthese, und katabolischen Prozessen, z.B. Autophagie, gehalten werden [55]. Im kolorektalen Karzinom ist mTOR häufig aktiviert. mTOR Complex 1 ist ein „downstream target“ des PI3K/RAS-Signalweges und kann durch Phosphorylierungen von eIF4E-Bindeprotein (4EBP1) und der p70S6 ribosomalen Kinase (S6K) die Proteinsynthese vorantreiben [56]. 4EBP1 ist unter normalen zellulären Bedingungen an eIF4E gebunden, dadurch kann die Translation nicht starten. Sobald 4EBP1 aber phosphoryliert ist, löst es sich von eIF4E und eIF4E bindet an das Gerüstprotein eIF4G [57]. Die Translation startet mit Bindung des Präinitiationskomplex, welcher aus der 40S-Untereinheit des Ribosoms, der geladenen Met-tRNA und den eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) besteht, an die m⁷G-Cap-Struktur der mRNA der 5'UTR. Diese Bindung wird durch eIF4E und den eIF4F-Komplex, welcher aus RNA-Helikase eIF4A und eIF4G besteht, ermöglicht. Der PIK scannt die mRNA nun auf das AUG-Startkodon, welches für Methionin kodiert [20,58].

Einleitung

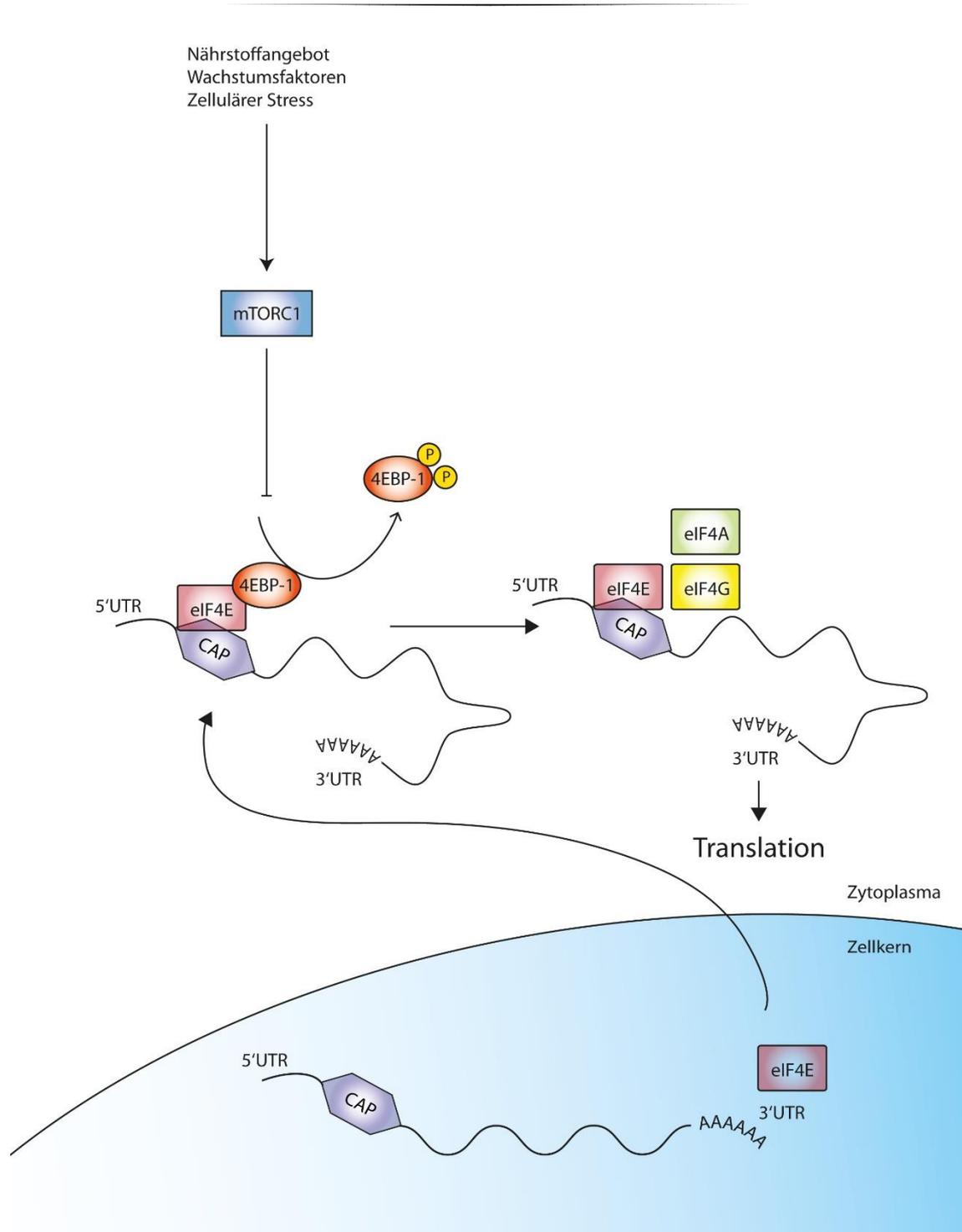


Abb. 1.5: CAP-abhängige Translation von MYC. mTORC1 treibt je nach Vorhandensein von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren die Translation voran oder bremst sie. mTORC1 phosphoryliert 4EBP1, dieses dissoziiert daraufhin von eIF4E. eIF4E bildet mit dem Gerüstprotein eIF4G und der RNA-Helikase eIF4A einen Komplex und der Präinitiationskomplex kann nun die RNA auf das Startkodon AUG scannen und die Translation starten (modifiziert nach [20]).

Durch Inaktivierung der eIFs kann die Translation z.B. bei Nährstoffmangel inhibiert werden. Ebenso können mRNA-Bindeproteine oder MicroRNA (miRNA) an die 3'UTR

binden und eIF-Inhibitions-Faktoren rekrutieren [20]. Der limitierende Faktor in der Translationsinitiation ist die Menge an vorhandenem eIF4E. Deshalb gilt eIF4E als Onkogen, welches in Tumoren häufig überexprimiert ist. Dabei kann es die mRNA bestimmter Proteine entweder vermehrt aus dem Zellkern exportieren oder direkt auf die Translationseffizienz wirken [59]. Eine Hypothese ist, dass es sogenannte „starke“ und „schwache“ mRNA gibt. Die „starken“, wie z.B. β -actin, werden bei nur geringer Menge an vorhandenem eIF4E fast zu 100% translatiert, bei den „schwachen“, wie z.B. MYC, nimmt die Translation mit der Menge an eIF4E zu. Die Menge von eIF4E kann entweder durch vermehrte Expression von eIF4E, verminderte Expression von 4EBP1 oder vermehrte Phosphorylierung von 4EBP1 zunehmen [57]. Eine wichtige Rolle spielt außerdem der Phosphorylierungsstatus von eIF4E an S206. Kann eIF4E nicht phosphoryliert werden, nimmt der Export von mRNA sowie die Transformationsfähigkeit durch eIF4E ab [60]. Inwieweit die Translationseffizienz durch diese Phosphorylierung beeinflusst wird ist allerdings unklar [57]. Jedoch ist eIF4E nicht der einzige Faktor, welcher in Tumoren hochreguliert sein kann: auch die RNA-Helikase eIF4A oder andere Elongationsfaktoren können betroffen sein [61].

1.2.6 Regulation des Abbaus von MYC

MYC unterliegt in der Zelle einer strengen Regulation und weist eine Halbwertszeit von ungefähr 25 Minuten auf [62,63]. Für die Stabilität von MYC ist der Phosphorylierungsstatus von Threonin58 und Serin62 entscheidend. Stabiles MYC ist nur an Serin62 phosphoryliert, durch zusätzliche Phosphorylierung an Threonin58 wird es abgebaut [63]. Die Phosphorylierungen sind Ras-abhängig: über RAF aktiviert es Mitogen-aktivierte Phosphatasen, welche MYC an Serin62 phosphorylieren und hemmt, über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) -Signalweg, die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), welche MYC an Threonin58 phosphoryliert. Zusammengefasst heißt dies, dass MYC durch aktiviertes Ras stabilisiert wird [34,63,64]. Instabil wird MYC sobald es an beiden Stellen, Threonin58 und Serin62, phosphoryliert ist und mittels dieser Phosphorylierungen der Abbau initiiert wird. Durch Bindung der Protein Phosphatase 2A leitet dies die Ubiquitinierung von MYC durch die Ubiquitin E3-Ligase SCF^{FBW7} (Im Weiteren wird diese Ubiquitinligase FBW7 genannt) mit anschließender proteasomaler Degradation ein [34]. Insgesamt sind mehrere E3-Ubiquitinligasen bekannt, welche Einfluss

Einleitung

auf MYC-Stabilität haben, jedoch ist die Ubiquitinligase FBW7 die am beste untersuchte [65]. Zudem ist bekannt, dass in FBW7-defizienten Zellen sowohl die MYC-Konzentration, als auch die MYC-Halbwertszeit deutlich erhöht ist [66].

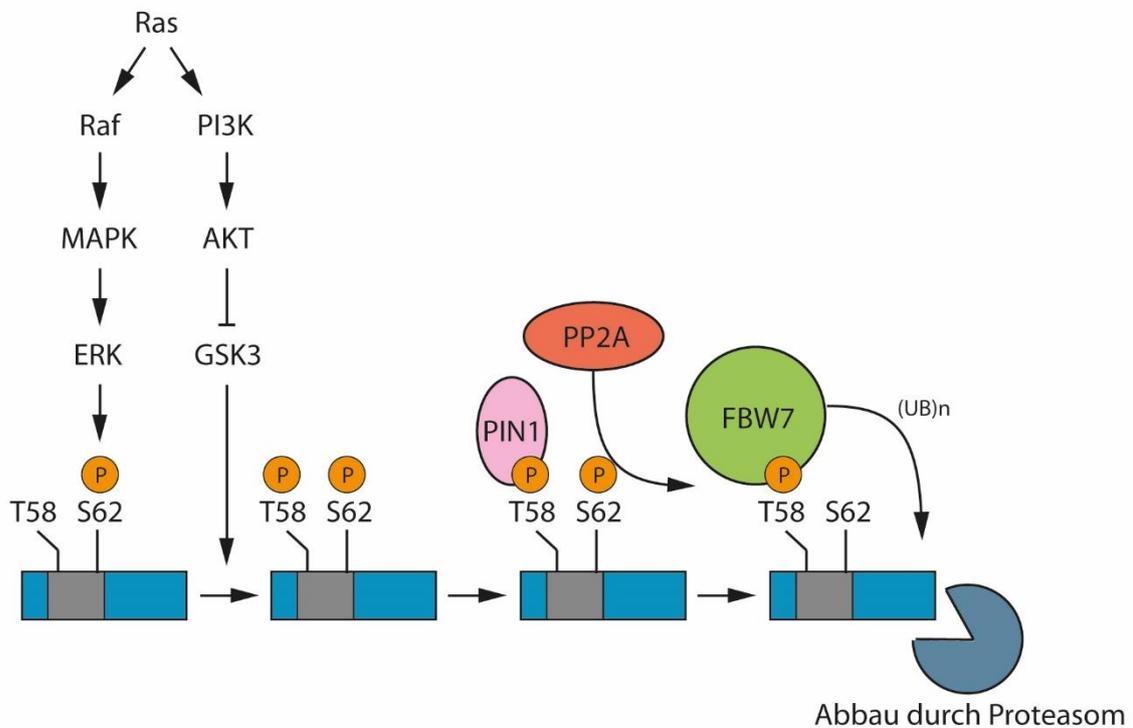


Abb. 1.6: Abbau von MYC. Ras-abhängig wird MYC durch Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK und ERK) an Serin62 (S62) und durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) an Threonin58 (T58) phosphoryliert. Die Phosphorylierung an T58 destabilisiert MYC, denn nun kann die Prolyl-Isomerase (PIN1) daran binden, es kommt zur Isomerisierung von Prolin59 und die Serin/Threonin-Phosphatase Proteinphosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert MYC an S62. Anschließend wird MYC durch die Ubiquitin E3-Ligase SCFFBW7 durch Ubiquitinierung für den nun folgenden proteasomalen Abbau markiert (angelehnt an Adhikary und Eilers, 2005).

1.3 Proteinphosphatase 2A

Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) ist eine Serin-Threonin-Phosphatase mit einer katalytischen, einer strukturgebenden und einer regulierenden Untereinheit. Sie wirkt in der Zelle als Tumorsuppressor und ist in Tumoren häufig inhibiert. Während des Zellzyklus kontrolliert sie den Übergang von der G1- in die S-Phase, wirkt dabei antiproliferativ und pro-apoptotisch, unter anderem durch Inhibierung der ERK-Kinasen [67]. Auf das MYC-Protein wirkt sie, durch Dephosphorylierung von Serin62, destabilisierend und zusätzlich, durch Dephosphorylierung von eIF4E, hemmend auf die Translation von MYC [34,68]. Mit diesen tumorinhibierenden Eigenschaften gilt die Induktion von PP2A als möglicher Angriffspunkt in der Therapie von Karzinomen. Für die Leukämie konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Wiederherstellung der Funktion von PP2A Tumorzellen absterben, während die gesunden Zellen nicht beeinflusst werden [67].

1.4 Das Onkoprotein CIP2A

CIP2A, oder KIAA1524, wurde als Cancerogener Inhibitor der PP2A (CIP2A) erstmals 2007 beschrieben. In HeLa-Zellen (Zervixkarzinom) konnte gezeigt werden, dass CIP2A als Inhibitor der PP2A die Dephosphorylierung von MYC-Protein an Serin62 verhindert, welches infolgedessen nicht mehr abgebaut wird. CIP2A schützt demnach MYC-Protein vor dem Abbau und stabilisiert es dadurch [69].

Auch in verschiedenen Zellenlinien des kolorektalen Karzinoms konnte gezeigt werden, dass es durch Knockdown von CIP2A zu einem Verlust von MYC-Protein, nicht aber von MYC-mRNA, kommt. Zusätzlich zeigen die Zellen ein verlangsamtes Wachstum [70].

CIP2A ist nicht nur im kolorektalen Karzinom, sondern in vielen Karzinomen, wie der Chronisch myeloischen Leukämie, dem Mammakarzinom, dem Magenkarzinom oder auch dem Ovarialkarzinom überexprimiert [71–75]. Dabei ist die Überexpression von CIP2A im Mammakarzinom und im kolorektalen Karzinom mit einem aggressiveren Tumorwachstum und einer verschlechterten 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert. CIP2A gilt damit als unabhängiger prognostischer Faktor [70,73]. Zusätzlich konnte im Mammakarzinom ein Zusammenhang zwischen der Expression von CIP2A und der Lymphknotenmetastasierung, Fernmetastasierung, der Tumorgröße und dem histologischen Grad nachgewiesen werden [76]. Wie es in den einzelnen Karzinomen zu einer Überexpression von CIP2A kommt, ist größtenteils noch unklar. In KRAS-mutierten Zelllinien des kolorektalen Karzinoms (HCT116 and SW620) konnte die Expression von CIP2A durch Inhibition von MEK1/2 gesenkt werden [70]. Für das Zervixkarzinom wurde gezeigt, dass die Expression von CIP2A mit dem HPV16 E7-Level assoziiert ist [77].

Wird CIP2A aus Zellen depletiert, sind diese Zellen vergleichsweise kleiner, außerdem reguliert CIP2A die Proliferation und Morphologie von Zellen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass CIP2A positiv auf die mTORC1-Aktivität wirkt und so anabolische Prozesse fördert [55].

In gesunden Zellen ist CIP2A nur gering exprimiert [78].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

In knapp 100 % aller kolorektalen Karzinome findet sich dereguliertes MYC und stellt damit ein potenzielles Therapieziel dar. Durch die Hemmung von MYC kann das Tumorstadium *in vitro* gebremst werden, jedoch bestehen noch viele Unklarheiten über die genauen Angriffspunkte von MYC und machen daher eine zielgerichtete Therapie bisher schwierig. CIP2A wird im normalen, gesunden Gewebe praktisch nicht exprimiert, spielt aber in der Genese vieler Tumorentitäten eine Rolle. Durch Inhibition von CIP2A kann MYC ebenfalls gehemmt werden. Damit stellt CIP2A einen möglichen Angriffspunkt in der zielgerichteten Tumorthherapie dar.

Mittels shCIP2A und siCIP2A soll in der Zellkultur untersucht werden, welche Effekte CIP2A auf Zellen des kolorektalen Karzinoms hat. Des Weiteren soll überprüft werden, ob CIP2A, wie im Zervixkarzinom, den Abbau von MYC hemmt und so MYC vor dem Abbau schützt oder ob es die Transkription oder Translation von MYC mRNA bzw. Protein reguliert. Für die Versuche wurde eine kolorektale Karzinom Zelllinie HCT116 p53+/+ verwendet.

2 Materialien

2.1 Zelllinien, Nährmedium, Bakterien

2.1.1 Zelllinien

HCT116

Humane Kolonkarzinomzelllinie
p53+/+ Wildtyp und FBXW7-/-

Vier Zelllinien HCT116 p53+/+
Wildtyp mit DOX-induzierbaren
MYC-Konstrukten (pInd21):

- cds
- 3'UTR + cds
- 5'UTR + cds
- 5'UTR + cds + 3'UTR

HEK293T

Humane embryonale Nieren Zelllinie

2.1.2 Nährmedium

DMEM (Gibco by Life Technologies)

10% (v/v) Fetales Kalbsserum
1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin
(100.000 U/ml, PAA)

DMEM (Gibco by Life Technologies)

10% (v/v) Fetales Kalbsserum
Glutamin
Ohne Methionin

2.1.3 Bakterien

XL1 blue

2.1.4 Bakterien Nährmedium

LB-Medium	1% (w/v)	Baktotrypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	1% (w/v)	NaCl
LB-Agar	1% (w/v)	Baktotrypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	1% (w/v)	NaCl
	1,5% (w/v)	Agar
Ampicillin	100µg/ml	

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 siRNA und shRNA

Tab. 2.1: siRNA und shRNA

siRNA/shRNA	Sequenzinformation	Quelle
siCTR	ON-TARGETplus SMARTpool	Dharmacon
siCIP2A	ON-TARGETplus KIAA1524 siRNA SMARTpool	Dharmacon
shCHIP2A	KIAA1524.779 TGCTGTTGACAGTGAGCGCCGGCACAATCT TTCTGTTCAATAGTGAAGCCACAGATGTATT GAACAGAAAGATTGTGCCGATGCCTACTGC CTCGGA	

2.2.2 Plasmide

pInducer 11 (miR-RUG)

Induzierbarer lentiviraler Vektor für Gen-Silencing

2.2.3 Primer für die quantitative Realtime PCR

Tab. 2.2: Primer für die quantitative Realtime PCR

Primer	Vorwärts 3'-5'	Rückwärts 5'-3'
β2MG	GTGCTCGCGCTACTCTCTC	GTCAACTTCAATGTCGGAT
CIP2A	GAACAGATAAGAAAAGAGT TGAGCATT	CGACCTTCTAATTGTGCCTTTT
c-myc	CACCAGCAGCGACTCTGA	GATCCAGACTCTGACCTTTTGC
MYCend for/ HA- Tag rev	AAGAGGACTTGTTGCGGAA A	AGCGTAATCTGGAACATCGT
MYC 5'UTR	TTACAACACCCGAGCAAGG A	TTCAGAGAAGCGGGTCCTG

2.2.4 Primer für PCR-Amplifikation von shRNA-Klonierung

Tab. 2.3: Primer für PCR-Amplifikation von shRNA-Klonierung

Primer	Sequenz forward	Sequenz reverse
mirE AMP	TACAATACTCGAGAAGGTA TATTGCTGTTGACAGTGAG CG	TTAGATGAATTCTAGCCCCTTGA AGTCCGAGGCAGTAGGCA

2.2.5 Sequenzierprimer pInducer11

Tab. 2.4: Sequenzierprimer pInducer11

Primer	Sequenz forward	Sequenz reverse
pInd. 11	CAACAGAAGGCTCGAGAAGG	CGCGTGTTTAAACGCATTA G

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

Tab. 2.5: Primäre Antikörper

Antikörper	Proteingröße (kDA)	Verdünnung	Typ	Hersteller
CIP2A	90	1:1000	Rb, p	BETHYL (A301-454A)
c-myc	67	1:1000	Rb, p	Santa Cruz (N262, sc-764)
c-myc	67	1:10.000	Rb, m	Abcam (Y69, ab32072)
Cyclin D1		1:1000	Ms, m	Thermo Fisher (DCS-11)
Cyclin D2	34	1:1000	Ms, m	Santa Cruz (DCS-3, sc-56305)
HA-Tag	3	1:10.000	Rb, p	Abcam (ab9110)
Vinculin	116	1:10.000	Ms, m	Santa Cruz (H10, s25336)
Beta-actin	42	1:10.000	Ms, m	Sigma Aldrich (Klon AC-15, A5441)
Alpha-Tubulin	55	1:10.000	Rb, p	Santa Cruz (sc-12462)

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 2.6: Sekundäre Antikörper

Zweiter Antikörper	Daten
Anti-Rabbit 800CW	Ziege-Anti-Kaninchen (Li-Cor #C41021-04)
Anti-mouse 680 RD	Ziege-Anti-Maus (Li-Cor #C40624-02)
Anti-Rabbit-HRP	Affe-Anti-Kaninchen Antikörper, gekoppelt an HRP (Amersham NA 934)
Anti-Mouse-HRP	Schaf-Anti-Maus Antikörper, gekoppelt an HRP (Amersham NA 931)

2.3.3 Sonstige Antikörper

Tab. 2.7: Sonstige Antikörper

Antikörper	Daten
Anti-BrdU	FITC anti-BrdU, Mouse IgG1; Biozol

2.4 Inhibitoren und Antibiotika

Cycloheximid (Sigma-Aldrich)	100µg/ml in Ethanol
MG132 (Calbiochem/Merck)	10µM in Ethanol
Okadasäure, Natriumsalz (Calbiochem/Merck)	20nM in Ethanol
Doxycyclin (Sigma-Aldrich)	1mg/ml in Ethanol

2.5 Standards, Kits, Enzyme, Chemikalien, Puffer und Lösungen

2.5.1 Standards

Materialien

Protein-Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180kDa; Thermo Fisher Scientific
DNA-Marker	1kb DNA Ladder; Invitrogen

2.5.2 Kits, Enzyme, Chemikalien

DNA Extraktions Kit (Maxipräparation)	PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit; Thermo Fisher Scientific
³⁵ S-Methionin	Hartmann Analytics
Albumin Fraktion V ≥95%, pulv.	Carl Roth
Bicinchoninic Acid solution	Sigma Aldrich
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England BioLabs
EcoRI (20.000U/ml)	New England BioLabs
Fetal Bovine Serum	Biochrome
GlycoBlue™ Coprecipitant (15 mg/mL)	Life Technologies Thermo Scientific
Isopropanol/ 2-Propanol	Carl Roth
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	Life Technologies GmbH
Milchpulver	Carl Roth
MluI (10.000U/ml)	New England BioLabs
M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer	Promega
M-MLV Reverse Transkriptase (200U/μl)	Promega
Opti-MEM®	Gibco, Life Technologies
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich

Materialien

peqGOLD TriFast™	Peqlab
Primer “random”	Sigma-Aldrich (Roche)
RiboLock Rnase Inhibitor (40U/μl)	Life Technologies GmbH
ROX Reference Dye	Thermo Scientific
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England BioLabs
Tango buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Wasser, steril	Aqua ad iniectabilia, Berlin Chemie Menarini
XhoI (20.000U/ml)	New England BioLabs
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research

2.5.3 Puffer und Lösungen

1-2% Agarose Gel	1-2g Agarose 100ml 1xTAE 5μl Ethidiumbromid (10mg/ml)
4% Sammelgel	4% Acrylamid 125mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
7,5 – 10% Laufgel	7,5 – 10% Acrylamid 375mM Tris-HCl, pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED

Materialien

Blockierungslösungen für PVDF-Membranen	LiCor-Blocking solution 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T
Bradford Lösung	8,5% Phosphorsäure 4,75% Ethanol 0,01% Coomassie brilliant blue
DNA Ladepuffer 6x	10mM EDTA; pH10 0,2% (w/v) Orange G 40% (w/v) Sukrose
Kristallviolettlösung	0,1 % (w/v) Kristallviolett in 20 % (v/v) Ethanol
Lysepuffer (L7) (Invitrogen)	0.2 M NaOH 1% (w/v) SDS
PBS 1x	137mM NaCl 2,7mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ HPO ₄
Präzipitationspuffer (N3) (Invitrogen)	3.1 M Potassium acetate, pH 5.5
Resuspensionspuffer (R3) (Invitrogen)	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM EDTA
RIPA Lysepuffer	50 mM Tris; pH 7,4 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 0,5% (w/v) DOC

Materialien

	0,1% (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer	25mM Tris-base 250mM Glycin 0,1% SDS
SDS-Probenpuffer Laemmli (3x)	187,5mM Tris pH 6,8 30% (v/v) Glycin 6% SDS 0,03% Bromphenolblau 2M β -Mercaptoethanol
TAE 50x	2M Trisbase, pH 8,0 5,7% Essigsäure 50mM EDTA
TBS-T	25mM Tris, pH 7,4 0,2% Tween-20 140mM NaCl
Transferpuffer	15% Methanol 20mM Tris 150mM Glycin 0,01% SDS
Trypsinlösung	0,25% Trypsin 5mM EDTA 22,3mM Tris pH 7,4 125mM NaCl
Einfriermedium	10% DMSO

Materialien

	20% FBS
	70% DMEM-Medium (mit 1% Penicillin-Streptomycin, 10% FBS)
cDNA-Synthese Mix	10µl 5xMMB-Puffer 21,8µl steriles Wasser 5µl dNTP (2,5mM) 2µl Random Primer 0,2µl RNaseInhibitor 1µl M-MLV Reverse Transkriptase
PBS-T	1x PBS 0,5% (v/v) Tween-20

2.6 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

2.6.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

96-Well Platte für qRT-PCR	MicroAmp® EnduraPlate™ Optical 96-Well Reaction Plates; Applied Biosystems
Blottank	Tank Elektrobloetter Web™ S, peqLab
Blotting-Kassetten	Farblich kodiert (Anode/Kathode), peqLab
Blottingpapier	330g/m ² ; Laborversand A. Hartenstein
CO ² Inkubator	BBD6220 CO ₂ -Inkubator; Thermo Scientific, Heraeus
Drehrad	Stuart Rotator SB2
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™ II, Biosciences
Eismaschine	Scotsman AF 80
Gefriertruhe -80°C	HeraFreeze; Heraeus

Materialien

Gelelektrophorese-Kammer	BioRad Mini-PROTEAN® Tetra System
Glaschflaschen und Messzylinder	Schott
Handschuhe	StarGuard Comfort, StarLab
Heizblock	Dry Bath Incubator; StarLab
Kamera	Blackfly 2.3 MP Mono USB3 Vision (Sony Pregius IMX249) BFLY-U3-23S6M; Point Grey
Kühlschrank -20°C	Liebherr Comfort
Kühlschrank 4°C	Siemens
Küvetten	Halb-Mikro-Küvette, Polystyrol; Sarstedt
Lichtquelle für Fluoreszenzmikroskopie	Lichtquelle HXP 120
Magnetrührer	KMO2 basic, IKA Labortechnik
Membranen 45µm	EMD Millipore Immobilon™-P PVDF 45µm Poren Transfer Membranes EMD Millipore Immobilon™-FL PVDF Transfer Membranes
Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf Tube)	Biosphere® SafeSeal Microtube 1,5 bzw 2,0ml; Sarstedt
Mikroskop	Axiovert 40 CFL; Zeiss
Mikrowelle	LG
PCR-Thermocycler	StepOnePlus™ Real-Time PCR System Thermo Scientific
Photometer	Ultrospec 3100 pro UV/visible, Amersham Biosciences Multiskan Ascent, Thermo Labsystems

Materialien

Pipetten	Pipetman: 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl; Gilson
	Multikanal 10µl, 200µl: Transferpette®; Brand
Pipettenspitzen	10µl 96 Stück fertig gesteckt in Box, Sarstedt 200µl TipOne Starlab 1000µl TipOne Starlab
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro; Brand
Röhrchen (Tubes) 15 bzw. 50ml	Konischer Boden, CELLSTAR®, Schraubverschluss blau, Natur, Graduiert, Schriftfeld, Steril; Greiner Bio-One
Röhrchen 14ml	Falcon™ Round-Bottom Polypropylene Tubes
Rollenmischer	CAT RM 5
Schüttelinkubator	Multitron Standard; Infors HAT
Schüttler	Eppendorf Mixer 5432
Spannungsquellen	BioRad PowerPac™ HC 250V/3.0A/300W Consort EV series power supplies EV243, output 0-400 V, 0-300 mA, 0- 50 W, Sigma-Aldrich
Spektralphotometer	NanoDrop 1000; Thermo Scientific
Sterilwerkbank	HeraSafe; Heraeus
Thermocycler für cDNA-Synthese	C1000 Touch™ Thermal Cycler, BioRad S1000™ Thermal Cycler, BioRad

Materialien

	Mastercycler® pro mit vapo.protect™ concept, Eppendorf
Universalschüttler	SM-30 (Edmund Bühler GmbH)
UV-Licht-Tisch	peqLab
Vortex	Vortex Genie 2; Scientific Industries
Waage	SI-234A; Denver Instrument
Wasser, aufgereinigt	Milli-Q® Integral Wasseraufbereitungssystem, incl. Q- Pod Element, Millipore
Wasserbad	5M-5M; Julabo
Western Blot Detektion	Odyssey CLx; LiCor LAS-4000; Fujifilm Global
Zellkratzer	Sarstedt Cell Scraper 16 bzw. 25cm
Zellzählung	CASY Cell Counter; Innovatis Neubauer Zählkammer
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5424 Eppendorf Centrifuge 5424 R Eppendorf Centrifuge 5430 Multifuge 1S-R; Heraeus VWR Galaxy MiniStar Beckman Coulter Avanti® J-26 XP
Zellkulturschalen	Greiner
96-Well, 24-Well, 6-Well, 6cm, 10cm, 15cm	
Einfrierröhrchen	Cryo.s™ aus Polypropylen 2ml, Greiner bio-one
Gefrierbehälter	Mr.Frosty™, Thermo Fisher Scientific
PCR-Röhrchen	0,2 ml, 8er „Non-Flex“ PCR-Streifen; Starlab

2.6.2 Software

Quantifizierung Proteinbanden	ImageJ
Verfassen der Arbeit	Microsoft Word 2013
Tabellen, Rechnen, Diagramme	Microsoft Excel 2013
Überprüfen der Oligonukleotidsequenzen	ApE, A Plasmid Editor

Ansonsten wurde die vom jeweiligen Gerätehersteller installierte oder mitgelieferte Software verwendet.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation von E. coli-Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation

Um die Plasmid-DNA in die Bakterien einzubringen, wurde der E. Coli Stamm XL1 blue verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Anschließend an eine 30minütige Inkubationszeit auf Eis erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz für 30 min schüttelnd bei 37°C gelagert. Nach Abzentrifugation der Bakteriensuspension und Resuspension in 100 µl LB-Medium wurde der Ansatz auf eine antibiotikahaltige LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei der Plasmidaufreinigung in größerem Maßstab wurde statt der Agarplatten 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium verwendet.

3.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E. coli

Von den gewachsenen Kolonien wurden je sechs Stück pro Platte gepickt und je 4ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit den so erhaltenen Einzelklonen angeimpft. Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 37°C (schüttelnd). Nach Abzentrifugation wurde das Bakterienpellet zuerst in 200 µg Resuspensionspuffer aufgenommen, anschließend dann je 200 µl Lyse- und Präzipitationspuffer dazugegeben. Es erfolgte die erneute Zentrifugation für 5 min/20.000xg/4°C. Die DNA befand sich nun im Überstand, welcher in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl Isopropanol vermischt wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation für nun 20 min wurde das so erhaltene DNA-Pellet mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen und danach in 30 µl destilliertem Wasser resuspendiert.

Die nun anschließende Maxi-Präparation wurde freundlicherweise von Frau Renate Metz übernommen und mithilfe des PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Es wurden die gleichen Pufferlösungen, wie oben bei der Minipräparation beschrieben, verwendet und die DNA am Ende in destilliertem Wasser gelöst (Konzentration 1 µg/µl). Gelagert wurde die DNA-Lösung bei -20 °C.

3.1.3 Extraktion von RNA

Für die Isolation von RNA wurde das Phenol- und Guanidinisothiocyanathaltige peqGold TriFast™ von peqLab verwendet. Die geernteten Zellen wurden mit 900µl peqGold TriFast™ in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt und 200µl Chloroform dazugegeben. Dieser Mix wurde ungefähr 10 Sekunden geschüttelt und anschließend mit 20.000rpm bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert.

Nun haben sich mehrere Phasen gebildet, wobei nur von der oberen, wässrigen Phase 380µl abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt wurden. 380µl Isopropanol und 1µl GlycoBlue wurden dazugemischt und anschließend mit 20.000rpm bei 4°C eine halbe Stunde zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das RNA-Pellet wurde mit 80%-igem Ethanol dreimal gewaschen, luftgetrocknet und mit sterilem Wasser auf eine Konzentration $\leq 1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

3.1.4 cDNA-Herstellung

cDNA wurde mittels einer Reverse Transkriptase-Reaktion hergestellt, wobei es für jede Probe eine Kontrolle ohne Zugabe von Reverse Transkriptase gab. 2µg RNA wurde zu 10µl mit sterilem Wasser verdünnt und in 0,2ml-PCR Röhren pipettiert. Um die Sekundärstrukturen aufzulösen wurde 10 Minuten bei 65°C im cDNA-Cycler inkubiert und anschließend 40µl cDNA-Synthesemix hinzugegeben.

Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Inkubationsschritte durchlaufen: 10 Minuten bei Raumtemperatur, 50 Minuten bei 37°C und abschließend 15 Minuten bei 70°C.

Für die weitere Verwendung wurde die so erhaltene cDNA mit 500µl sterilem Wasser verdünnt, in 1,5ml Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.5 Quantitative Realtime PCR

Die quantitative Realtime PCR wird genutzt um die Menge vorhandener mRNA in den Zellen zu messen. Je nach Qualität der cDNA-Synthese kann nur eine Aussage über den Mindestgehalt der mRNA gemacht werden. Deshalb wird von jeder Probe die mRNA-Menge eines Haushaltsgens bestimmt und dies in Relation zu der gesuchten mRNA-Menge gesetzt. Bei einem Haushaltsgen geht man davon aus, dass es in den Proben keiner

Regulation unterliegt. In den qRT-PCRs dieser Arbeit wurde zum Abgleich die mRNA des Haushaltsgens β 2MG bestimmt.

Von jeder Probe wurden Triplikate gemessen und zum Ausschluss unerwünschter DNA-Amplifikationen außerdem eine No-RT-Kontrolle (cDNA-Synthese-Mix ohne Reverse Transkriptase). Daten (C_T -Wert) wurden in jedem Zyklus bei 72°C ermittelt und gespeichert. In eine 96-Well Platte wurde je 10 μ l der cDNA pipettiert, dazu je 7 μ l SYBR-Green Master Mix, 1 μ l Primer Mix (forward und reverse, je 10 μ M) und 2 μ l steriles Wasser.

Vor Start der qRT-PCR wurden die Proben zentrifugiert (20.000rpm/ 30 Sekunden).

PCR-Programm

95°C 15'

95°C 60s /

60°C 20s / 38 Zyklen

72°C 15s /

95°C 60s

60°C 30s

95°C 30s

Für die relative mRNA-Expression wurden die von der Computer Software ermittelten RQ-Werte verwendet. RQmin und RQmax definieren die Abweichungen beim Vergleich mehrerer Proben.

RQ-Werte wurden von der Software mit folgender Formel berechnet:

$$RQ = 2^{(\Delta\Delta CT)}$$

RQmin und RQmax werden mithilfe eines Algorithmus errechnet, wobei das statistische Konfidenzintervall 95% beträgt.

3.1.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Das 1-2%-ige (w/v) Agarosegel wurde immer frisch hergestellt. Dazu wurden Agarose, TAE-Puffer und Ethidiumbromid in der Mikrowelle erhitzt bis alles vollständig gelöst war und anschließend in die Gelelektrophoresekammern mit Kamm gefüllt.

Die DNA-Probe wurde mit 5µl DNA-Ladepuffer (6x) in die Kammern gefüllt und bei 150mA aufgetrennt.

Danach konnten die DNA-Banden durch UV-Licht und Kamera sichtbar gemacht werden.

3.1.7 Messen von Nukleinsäurekonzentration

Für die Messung von Nukleinsäurekonzentrationen wurde das Spektrophotometer NanoDrop 1000 verwendet. Dafür wurde 1µl der Probe auf das Ende des Lichtwellenleiters (Empfang) gegeben und der zweite Lichtwellenleiter (Quelle) heruntergeklappt. So verbindet die Probe beide Leiter und die Konzentration kann mittels Absorption bei 260nm gemessen werden. Hierbei kann neben der Konzentration auch die Reinheit der Probe überprüft werden.

3.1.8 PCR-Amplifizierung und Verdau durch EcoRI und XhoI von shCIP2A-Oligos und pInducer11

shCIP2A-Oligos wurden mit Wasser auf 30ng/µl verdünnt und anschließend PCR-amplifiziert, wobei durch die spezifischen Primer einerseits dsDNA hergestellt und andererseits die Restriktionsschnittstellen für EcoRI und XhoI eingefügt wurden.

shCIP2A (100ng)	3,3ul
dNTPs	1ul
Primer mirE AMP (10uM)	2,5 ul
5x GC reaction buffer	10ul
DMSO	1,5ul
Polymerase (Phusion)	0,5ul
H2O	31,2ul

PCR-Programm

98°C	3'		
98°C	25s	/	
54°C	30s	/	25 Zyklen
72°C	60s	/	

Zur Überprüfung des PCR-Erfolges wurden 5µl des PCR-Produkts auf einem 2%-Agarose-Gel aufgetragen und anschließend durch das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit aufgereinigt.

Nun wurde das PCR-Produkt und der pInducer11 mit EcoRI und XhoI verdaut, der Verdau auf einem 1%-Agarose-Gel überprüft und nochmals durch das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit aufgereinigt.

Als Nächstes wurde das EcoRI/XhoI-verdaute PCR-Produkt mittels einer T4-Ligase in den EcoRI/XhoI-verdauten pInducer11 ligiert.

Die korrekte Sequenz der DNA wurde durch Sangersequenzierung validiert. Anschließend wurde die Maxipräparation, mit erneuter Transformation in XL1 blue und nachfolgender Extraktion der DNA durchgeführt.

3.1.9 Sequenzierungen

Sangersequenzierungen wurden durch den externen Dienstleister LGC-Genomics durchgeführt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

HCT116 p53+/+ - Zellen wurden in Zellkulturschalen mit DMEM-Medium (1% Penicillin-Streptomycin, 10% FBS) kultiviert. Gelagert wurden die Zellen in Zellkulturinkubatoren bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO².

3.2.2 Zellen passagieren

Um ein exponentielles Wachstum der Zellen zu garantieren, wurden sie regelmäßig im Verhältnis 1:5 – 1:10 gesplittet. Das Medium wurde entfernt, Zellen mit zimmerwarmen 1xPBS gespült und mittels 37°C-warmer Trypsinlösung von den Schalen entfernt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit im Zellkulturinkubator wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen und in 15ml-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1500rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, Zellen in frischem

Medium resuspendiert, mittels Neubauer-Zählkammer oder CASY Cell Counter gezählt und im gewünschten Verhältnis neu ausgesät.

3.2.3 Zellen einfrieren

Die Zellen wurden wie oben beschrieben trypsiniert, anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewünschte Zellzahl wurde dann in 1,5ml Einfriermedium resuspendiert, sofort in die Einfrierröhrchen pipettiert und mithilfe eines mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälters bei -80°C um 1°C pro Stunde herunter gekühlt. Nach mind. 24 Stunden wurden die Einfrierröhrchen für die endgültige Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

3.2.4 Zellen auftauen

Die Einfrierröhrchen wurden im 37°C -warmen Wasserbad rasch aufgetaut, sofort in 10ml frisches Medium pipettiert und zentrifugiert (1100rpm, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und anschließend wie gewohnt ausgesät.

3.2.5 Zellen ernten

Die Zellen wurden entweder mit eiskaltem 1xPBS zweimal gespült und direkt auf der Zellkulturschale bei -80°C eingefroren oder mit eiskaltem 1xPBS zweimal gespült, abgekratzt und in ein auf Eis gestelltes Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Bei 4°C wurde das 1xPBS abzentrifugiert, die Zellen entweder gleich weiterverwendet oder in flüßigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.6 siRNA Transfektion

(nach Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol 2013)

Die Zellen wurden ein Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu ca. 80% konfluent waren. Auf eine 10cm-Zellkultivierungsschale wurden 1×10^6 Zellen ausgesät, dementsprechend mehr oder weniger auf größere bzw. kleinere Schalen (siehe Umrechnungstabelle). Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und es wurde Antibiotika-freies DMEM-Medium (10%FBS) auf die Zellen gegeben. Zweimal 600µl Opti-MEM® Medium wurden 36µl Lipofectamine® RNAiMAX

Reagent bzw. 10µM siRNA hinzugegeben. Die verdünnte siRNA wurde dann zu dem verdünnten Lipofectamine® RNAiMAX Reagent gegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1200µl des siRNA-Lipid-Komplexes auf die Zellen gegeben.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen 1:2 gesplittet, nach 48 Stunden ggf. mit Inhibitoren behandelt und anschließend geerntet.

3.2.7 Virusherstellung, Infektion von HEK293-Zellen und Transfektion der shCIP2A in HCT116 p53+/+-Zellen

Dieser Schritt wurde freundlicherweise durch Friedrich Wilhelm Uthe (Doktorand der Biochemie) in der S2-Zellkultur nach gängigem Protokoll der AG Eilers durchgeführt. Induziert wurde die shCIP2A in den HCT116-Zellen für mind. 48 Stunden mit 0,5µg/ml Doxycyclin. Für die HCT116-Zellen mit den Konstrukten „kodierende Sequenz“, „5'UTR mit kodierender Sequenz“ und „5'UTR mit kodierender Sequenz und 3'UTR“, wurden für die Induktion 1µg/ml Doxycyclin verwendet, für das Konstrukt „kodierende Sequenz mit 3'UTR“, reichten 0,1µg/ml Doxycyclin aus. Die HCT116 mit den genannten MYC-Konstrukten wurden für 2 Stunden mit Doxycyclin induziert und anschließend geerntet.

3.2.8 Wachstumskurve

Für die Wachstumskurve wurden 1×10^4 Zellen auf eine 6-Well-Zellkulturschale in Triplikaten ausgesät und eine Woche lang täglich mit der Neubauer Zählkammer gezählt. Von den ermittelten Werten wurden die Durchschnittswerte der jeweiligen Triplikate errechnet und in die Wachstumskurve eingetragen. Mithilfe von Excel wurden Standardabweichungen der Werte und eine exponentielle Trendlinie errechnet.

Für die Standardabweichungen verwendet Excel folgende Formel:

$$\text{STABW.N} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

Wobei \bar{x} der Mittelwert aus allen drei Werten ist und n der Stichprobenumfang.

3.2.9 BrdU/PI-Durchflusszytometrie

Bromodesoxyuridin ist ein künstlich hergestelltes Nukleotid, das anstelle von Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus‘ eingebaut wird. Durch einen BrdU-Antikörper kann so nachgewiesen werden, in welcher Phase sich die Zelle befindet und eignet sich damit gut als Nachweis für proliferierende Zellen

[79]. Gleichzeitig wurde Propidium Iodid verwendet, welches in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert und so Rückschlüsse zulässt, in welcher Zellzyklusphase sich die Zellen befinden [80], Abb.3.1). Um dies zu ermöglichen wurden die Zellen mit 80%-igem Ethanol fixiert, da Propidium Iodid die intakte Zellmembran nicht überwinden kann, und, um ein Interkalieren in die RNA zu verhindern, ebenso eine RNase hinzugefügt.

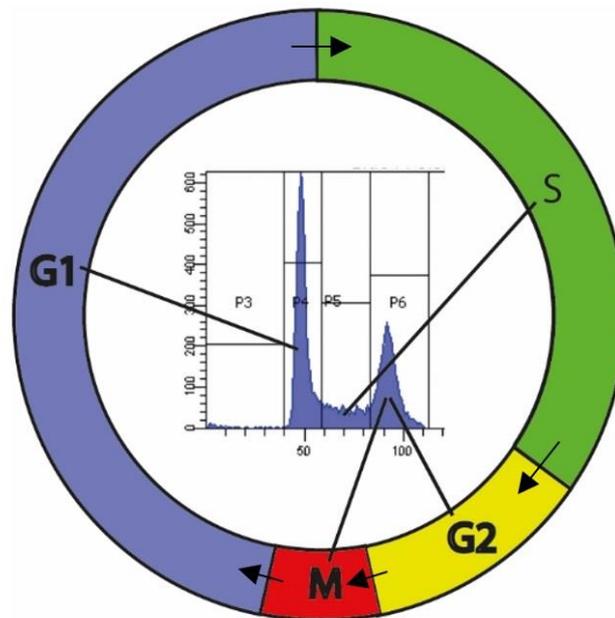


Abb. 3.1: Zellzyklus-FACS: Darstellung eines Diagramms einer Durchflusszytometriemessung mit Propidium Iodid-Färbung und den dazugehörigen Zellzyklusphasen (angelehnt an [81])

$1,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf 10cm-Zellkulturschalen ausgesät, behandelt und fünf Tage inkubiert. Für 60 Minuten wurden die Zellen mit $10 \mu\text{M}$ BrdU markiert und anschließend abtrypsiniert, wobei das Medium nicht verworfen, sondern in 15ml-Röhrchen aufbewahrt wurde um apoptotische Zellen später in die Messung einschließen zu können. Mit diesem Medium wurden die abtrypsinierten Zellen in ein 15ml-Röhrchen aufgenommen und mit 1500rpm bei 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Gewaschen wurde das Zellpellet dann erst mit 10ml eiskaltem 1xPBS, nochmals zentrifugiert (1500rpm, 4°C , 5 Minuten) und in 1ml

eiskaltem 1xPBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die Fixation anschließend in 4ml eiskalten Alkohol tröpfchenweise, unter ständigem Vortexen, gemischt und bei -20°C über Nacht inkubiert.

Einige Stunden vor der FACS-Messung wurde die Zellsuspension mit 1500rpm bei 4°C 10 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet anschließend mit 5ml eiskaltem 1xPBS gewaschen und nochmals 5 Minuten mit 1500rpm bei 4°C zentrifugiert. In 1ml 2M HCl/0,5% Triton X-100 wurde das Zellpellet wieder aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1500rpm, 4°C, 10 Minuten) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1ml 0,1M Na₂B₄O₇ (pH 8,5) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit 2000rpm bei 4°C 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand weggekippt und die Zellen in 100µl 1% BSA in PBS-T wieder aufgenommen. Dazu wurden außerdem 20µl BrdUFITC-Antikörper pipettiert und 30 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 2000rpm bei 4°C 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 200µl 1% BSA in PBS-T gewaschen und nochmals zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Pellet mit 400µl Natriumzitat (38mM), 15µl Propidium Iodid (54µM) und 1µl RNase (24µg/ml) vermischt und im Dunkeln bei 37°C eine halbe Stunde inkubiert. Für die Messung wurden die Proben in die FACS-Röhrchen pipettiert und die Durchflusszytometriemessung anschließend gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.10 Zellzyklusberechnung

Die Berechnung der Dauer der verschiedenen Zellzyklusphasen wurde anhand der Wachstumskurve und des PI-FACS durchgeführt.

Aus der Wachstumskurve wurden zwei Werte (Tag 1 und Tag 7) entnommen und mithilfe dieser konnte die Zeit berechnet werden, die die Zellen für eine Zellteilung benötigen. Dafür wurden folgende Formeln verwendet:

$$D = \frac{\ln(n_7/n_1)}{\ln(2)}$$

$$D_t = \frac{(7-1)}{D}$$

Dabei ist D die Anzahl der Verdopplungen, D_t die Verdopplungszeit in Tagen und n₁ bzw. n₇ die Zellzahl an Tag 1 bzw. Tag 7.

Für die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen wurde die Verdopplungszeit mit dem Anteil der Zellen multipliziert, die im PI-FACS in der G1-, S- oder G2-Phase waren. Dabei wird angenommen, dass sich alle Zellen gleich verhalten und in derselben Geschwindigkeit teilen.

3.2.11 Kristallviolett Färbung

Um Zellen auf Zellkulturschalen zu färben wurde Kristallviolett verwendet, welches die Zellen violett färbt. 1×10^5 Zellen wurden ausgesät und 18 Tage lang wachsen gelassen. Das Medium wurde verworfen, Zellen mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 3ml 70%-igem Ethanol 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde der Alkohol entfernt und 3ml der Kristallviolett-Färbelösung auf die Zellen gegeben. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung verworfen und die Reste der Färbelösung mit frischem Wasser von den Zellkulturschalen gewaschen und anschließend getrocknet.

3.2.12 Züchten von Einzelzellklonen

Um eine bessere Knockdown-Effizienz durch die shRNA zu erreichen wurden Einzelzellklone gezüchtet. Dafür wurde von der Zellkulturschale mit polyklonalen Zellen 10ml des Mediums abgenommen, filtriert und in ein 50ml-Röhrchen gegeben. Dieselbe Menge an frischem Medium wurde dazugegeben und nun, von diesem konditioniertem Medium, je 100 μ l auf eine 96-Well-Zellkulturschale vorgelegt. Polyklonale Zellen wurden abtrypsiniert und in 10ml Medium wiederaufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 100 μ l in das erste Well (A1) gegeben, mit dem vorhandenen Medium gemischt und davon wieder 100 μ l in das zweite Well (B1) pipettiert, gemischt und 100 μ l weiter in das dritte Well (C3) gegeben. Nach diesem Schema wurde bis H1 fortgeföhren und anschließend die acht Wells (A1-H1) wieder auf 200 μ l mit frischem Medium aufgefüllt. Aus diesen Wells wurden nun jeweils 100 μ l in die zweite Well-Spalte (A2-H2) pipettiert, gemischt und wieder jeweils 100 μ l in die dritte Well-Spalte (A3-H3) gegeben. So wurde bis zur letzten Spalte forgeföhren. Durch dieses Pipettierschema wurde ein Konzentrationsgradient von dem ersten Well A1 bis zum letzten Well H12 hergestellt und damit auch eine hohe Wahrscheinlichkeit erreicht, dass sich in den Wells mit einer geringeren Zellsuspensionskonzentration nur eine Zelle teilt und eine Kolonie von monoklonalen Zellen wächst. Die Zellkulturschalen wurden nun einige Tage im CO₂-Inkubator inkubiert, bis

deutlich sichtbare Kolonien gewachsen sind. Die Wells, in denen sich nur ein einziger Zellklon befand, wurden markiert und die monoklonalen Zellen erst in 24-Well-, dann in 6-Well-, später in 6-cm und letztendlich in 10cm-Zellkulturschalen übergeführt um eine große Zellzahl zu erreichen. Die so erhaltenen Einzelklone wurden auf ihre Knockdown-Effizienz von CIP2A getestet und ein Einzelklon, mit einem sehr guten Knockdown von CIP2A, für weitere Experimente verwendet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten

Proteine wurden aus den Zellen mithilfe des RIPA-Lysepuffers isoliert. Frisch dazugegeben wurde Phosphatase- und Proteaseinhibitoren je im Verhältnis 1:1000. Für eine geringe Zellzahl ($\leq 1 \times 10^6$) wurden maximal 40 μ l RIPA-Lysepuffer verwendet, für eine größere Zellzahl ($2-4 \times 10^6$) 100 μ l. Die Zellen wurden mit dem Lysepuffer in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt und mit 20.000rpm bei 4°C 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand mit den Zellproteinen wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß pipettiert und Proteinkonzentrationen mit Bradford- oder BCA-Assay bestimmt.

Mit 1x- und 3x-Laemmliprobenpuffer wurde die Konzentration auf 1-2 μ g/ μ l eingestellt. Bei 95°C wurden die Proben anschließend 5 Minuten erhitzt und so denaturiert.

Gelagert wurden die Proteinlysate bei -20°C.

3.3.2 Messung der Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentration wurden entweder mithilfe des Bradford-Assays oder BCA-Assays bestimmt.

Für Ersteres wurde 1ml Bradfordlösung in Mikroküvetten pipettiert und anschließend je 2 μ l Proteinlysate dazugegeben. Jedes Proteinlysate wurde in Triplikaten gemessen, außerdem gab es eine Leerprobe mit 2 μ l RIPA-Lysepuffer inkl. Inhibitoren für den Nullabgleich. Die Mikroküvetten wurden gründlichst durchgemischt und die Absorption im Photometer bei 595nm gemessen. Anschließend konnte die Proteinkonzentration mithilfe einer standardisierten Absorptions-Konzentrations-Kurve durch lineare Regressionsanalyse errechnet werden.

Für den BCA-Assay wurde auf Eis je 1µl Proteinlysate in eine 96-Well-Zellkulturschale pipettiert. Auch hier wurde in Triplikaten gemessen. Zusätzlich wurde ebenfalls in Triplikaten eine Proteinkonzentrationsreihe (0-7µg/µl BSA in RIPA-Lysepuffer) mit je 1µl auf die Schale pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 97µl Bicinchoninic Acid solution und 1µl Kupfersulfatlösung gestartet und unter Lichtschutz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Absorption wurde bei 550nm gemessen. Mithilfe der Absorptionswerte der Proteinkonzentrationsreihe konnte eine Absorptions-Konzentrations-Kurve erstellt werden und die Konzentrationen der Proteinlysate durch lineare Regressionsanalyse errechnet werden.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden Acrylamid-Gele (15mm Dicke) zwischen zwei eingespannte Glasplatten gegossen und der Taschenkamm zur Ladung der Proben eingesetzt. Die Gele bestanden aus einem 4%-igem Sammelgel, um alle Proteine in einer Startlinie zu sammeln und so eine gute Auftrennung zu garantieren, und einem anschließenden 7,5-12%-igem Laufgel zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Durch das SDS im Gel und im Laufpuffer erhalten alle Proteine eine negative Ladung, wodurch eine Auftrennung nach Ladung verhindert wird.

Von jeder Probe wurden 10-20µg Protein geladen, wobei in mindestens einer Tasche pro Gel 15µl des Proteinstandards geladen wurde. Die Gele wurden mit den Glasplatten in die Apparatur eingespannt und Laufpuffer bis zu den Markierungen eingefüllt.

Bei 80V für 15 Minuten und 120V für 1 Stunde und 30 Minuten wurden die Proteine aufgetrennt.

3.3.4 Western Blot

Zur leichteren Handhabung wurden die Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mittels eines Wet Blots vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen.

Dafür wurden Gel und Membran nach dem Sandwich-Prinzip zwischen je vier Blottingpapiere und je ein Polster oben und unten in die Blotting-Kassetten und damit in den mit kaltem Transferpuffer gefüllten Blottank eingespannt. Um Luftbläschen zu vermeiden wurden Blottingpapiere und Polster in kaltem Transferpuffer gelegt und die Luftbläschen vor

jeder neuen Schicht ausgestrichen.

Gebloftet wurde über Nacht bei 30V und max. 120mA.

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran mit einer Blockierungslösung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Für die anschließende Inkubation im primären Antikörper wurde dieser im oben genannten Verhältnis mit TBS-T verdünnt, mit 5% (w/v) Milchpulver und 1% (v/v) Natriumcitrat vermischt und die in Teile geschnittene Membran darin über Nacht bei 4°C auf Rollen inkubiert. Der verdünnte primäre Antikörper wurde mehrmals verwendet und nach Gebrauch bei 4°C oder -20°C gelagert. Nun wurde die Membran bei Raumtemperatur sehr gut mit TBS-T unter ständigem Schwenken eine Stunde gewaschen und danach, ebenso bei Raumtemperatur und unter ständigem Schwenken, für mindestens zwei Stunden in den mit TBS-T verdünnten sekundären Antikörper gelegt. Im nächsten Schritt wurde die Membran nochmals wie oben beschrieben gewaschen, bevor dann die Proteinbanden detektiert werden konnten.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung einer Zelllinie HCT116 mit Doxycyclin-induzierbarer shCIP2A

Für den Knockdown von CIP2A werden in dieser Arbeit RNAi (RNA-Interferenz) verwendet: siRNA und shRNA. Im Gegensatz zu siRNA erhält man jedoch mittels shRNA eine Zelllinie mit stabilem Knockdown und hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [82]. Abbildung 4.1 (A) zeigt die relative mRNA-Expression nach Induktion der jeweiligen shCIP2A mittels Doxycyclin. Mittels shCIP2A1 kann die mRNA-Expression von CIP2A auf 47% gesenkt werden, ebenfalls zeigt sich eine Reduktion der MYC mRNA auf 63%. In der Zelllinie mit shCIP2A2 kann die CIP2A-mRNA auf 79% gesenkt werden, die MYC-mRNA auf 74%. Aus den Zellen mit shCIP2A1 wurden zur Verbesserung der Knockdown-Effizienz anschließend Einzelklone gezüchtet und die monoklonalen Zellen mit sehr guter Knockdown-Effizienz für weitere Versuche verwendet. Abb. 4.1 (B) zeigt links die relative mRNA-Expression nach Induktion der shCIP2A in den ausgewählten monoklonalen Zellen. Die Expression von CIP2A-mRNA kann auf 46% gesenkt werden, die Expression von MYC-mRNA sinkt auf 92%. Der Western Blot rechts zeigt ein Verlust von MYC-Protein, nach Induktion der shCIP2A, auf 55%.

Ergebnisse

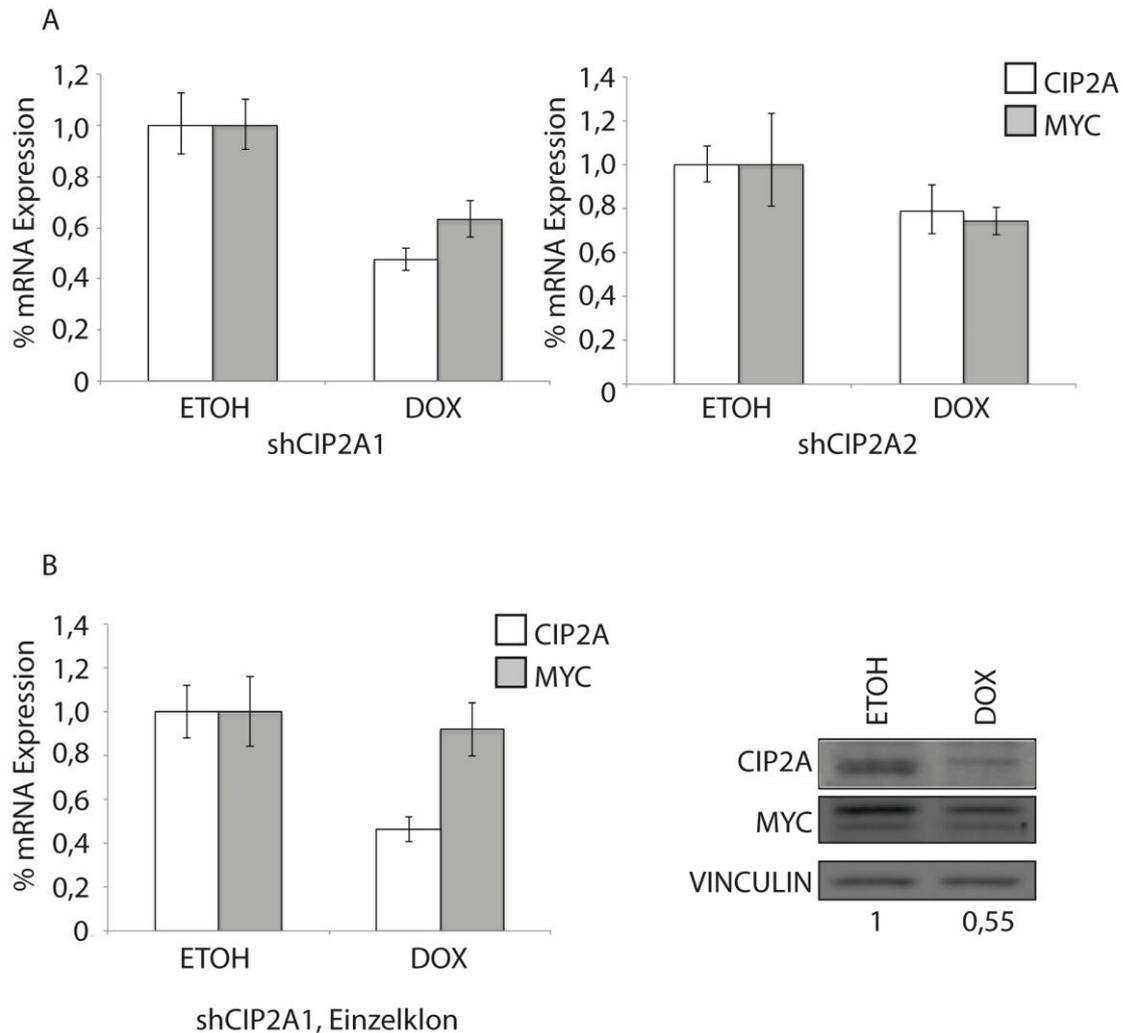


Abb. 4.1: Polyklonale und Monoklonale Zellen. (A) Relative mRNA Expression der polyklonalen Zellen nach Induktion der shCIP2A mittels Doxycyclin. Links: shCIP2A1: Reduktion der mRNA-Expression von CIP2A auf 47% und Reduktion der MYC mRNA auf 63%. Rechts: shCIP2A2: Reduktion der CIP2A-mRNA auf 79%, Reduktion der MYC-mRNA auf 74%. (B) Einzelklon HCT116 shCIP2A1: links dargestellt die relative mRNA-Expression: nach Induktion der shCIP2A fällt die CIP2A-mRNA-Expression auf 46%, die MYC-mRNA Expression fällt auf 92%. Western Blot (rechts): durch Induktion der shCIP2A mittels Doxycyclin fällt das MYC-Protein-Level auf 55%.

4.2 Einfluss von CIP2A auf das Wachstum von Zellen

Um den Einfluss von CIP2A auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurde nach CIP2A-Knockdown eine Kristallviolett-Färbung durchgeführt und eine Wachstumskurve erstellt. Mithilfe der Wachstumskurve wurde anschließend die Zeit der einzelnen Zellzyklusphasen berechnet.

4.2.1 Zelldichte in HCT116 Zellen nach CIP2A-Knockdown

Für die Kristallviolett-Färbung wurden HCT116-Zellen mit induzierbarer shCIP2A verwendet. Nach Induktion der Zellen mit 0,5µg/ml Doxycyclin wurden die Zellen insgesamt 18 Tage inkubiert und anschließend mit Kristallviolett gefärbt. Auffallend ist die sichtbar geringere Zelldichte nach CIP2A-Knockdown (Abb 4.2 (A)).

4.2.2 Zellwachstum nach CIP2A-Knockdown

Für die Wachstumskurve wurden je 10 000 Zellen HCT116 shCIP2A in 6-Well-Schalen ausgesät und die shRNA in den Zellen mit 0,5µg/ml Doxycyclin induziert. Die Zellzahl pro Platte wurde täglich mit der Neubauer Zählkammer ermittelt; Die so entstandene Wachstumskurve ist in Abbildung 4.2 (B) dargestellt. Nach drei Tagen sind die Zellen ohne CIP2A-Knockdown auf eine Zellzahl von 29.500 (\pm 3.482) angewachsen, die Zellen mit CIP2A-Knockdown weisen eine Zellzahl von 27.500 (\pm 1.788) auf. Nach sieben Tagen betragen die Zellzahlen ohne CIP2A-Knockdown 396.750 (\pm 1.500), bzw. nach CIP2A-Knockdown 165.375 (\pm 13.875). Der prozentuale Unterschied nach sieben Tagen liegt damit bei 170%.

Um den Anteil der abgestorbenen Zellen sowie die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen zu berechnen, wurde ergänzend ein BrdU/PI-FACS durchgeführt.

Zur Quantifizierung der jeweiligen Zeitdauern der einzelnen Zellzyklusphasen wurden die im Methodenteil genannten Formeln verwendet. Die Formeln berücksichtigen einerseits die Werte aus der Wachstumskurve, andererseits die Ergebnisse aus der BrdU/PI-FACS, sodass die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen berechnet werden kann. Ohne CIP2A-Knockdown verweilen die Zellen 13,54 (\pm 0,09) Stunden in der G1-Phase, 4,25 (\pm 0,12) Stunden in der S-Phase und 10,4 (\pm 0,12) Stunden in der G2-Phase. Nach CIP2A-Knockdown liegen die Zeiten bei 19,27 (\pm 0,23) Stunden in der G1-Phase, 4,55 (\pm 0,02) Stunden in der S-Phase und 12,15 (\pm 0,23) Stunden in der G2-Phase (Abb. 4.2 (D)). Die Zahlen in den Klammern geben jeweils die Standardabweichung an. Nach Knockdown von CIP2A verweilen die Zellen jeweils länger in der G1- und G2-Phase (p-Wert <0,05).

Abbildung 4.2 (B) zeigt den Anteil der abgestorbenen Zellen: nach CIP2A-Knockdown konnte ein Anteil abgestorbener Zellen von 1,1% ermittelt werden, ohne CIP2A-Knockdown lag der Anteil bei 0,9%. Damit ist der Unterschied nicht signifikant.

Ergebnisse

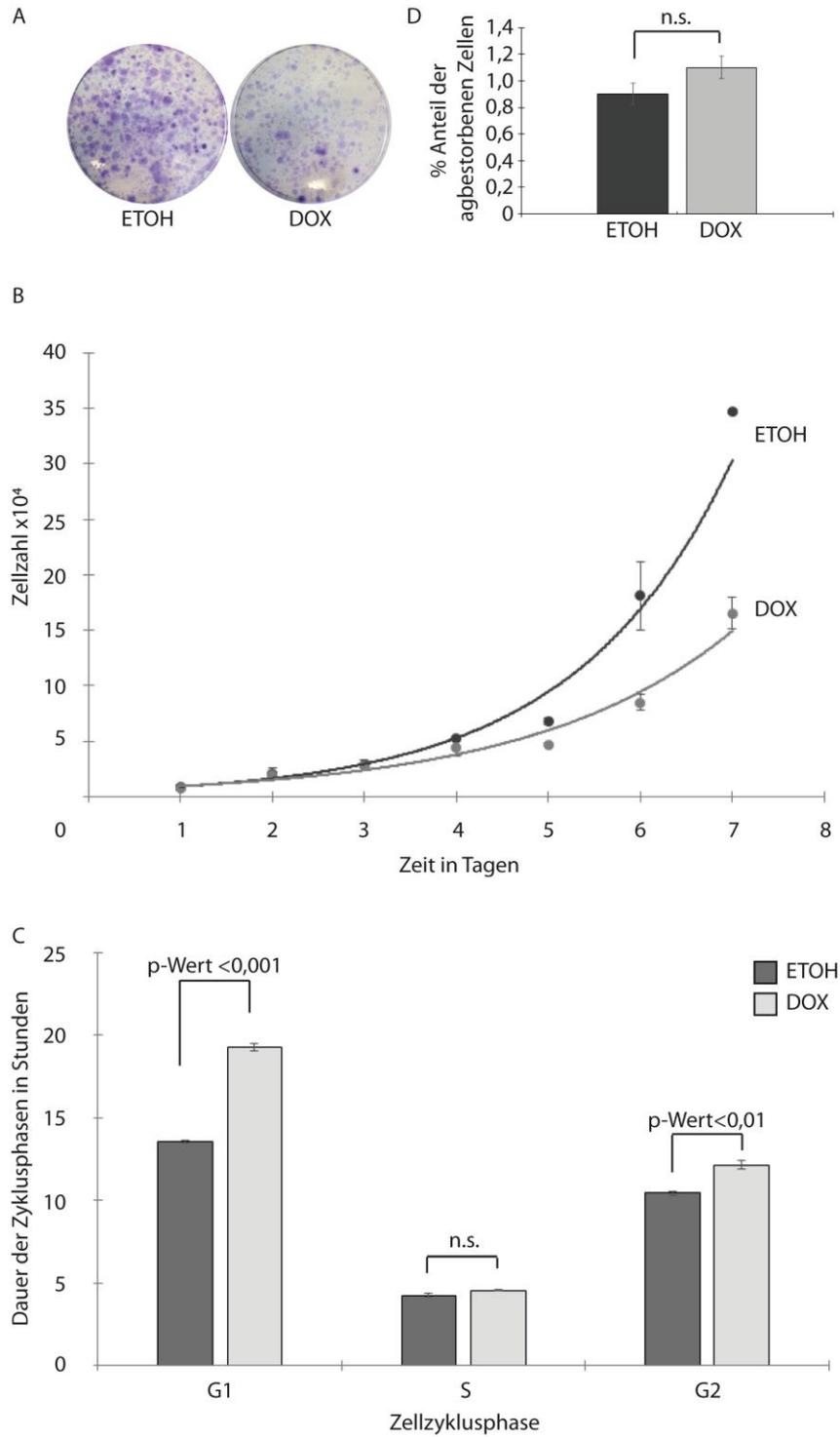


Abb. 4.2: Einfluss von CIP2A auf das Wachstum der Zellen : (A) Kristallviolett-Färbung der Zellen nach bzw. ohne Induktion der shCIP2A mittels Doxycyclin (B) Wachstumskurve mit/ohne CIP2A-Knockdown. (C) Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen mit/ohne CIP2A-Knockdown nach 7 Tagen. (D) Anteil der apoptotischen Zellen mit bzw. ohne CIP2A-Knockdown mittels shCIP2A nach insges. 7 Tagen (p-Wert 0,1). Die Fehlerbalken bzw. die Zahlen in Klammern geben jeweils die Standardabweichung an.

4.3 CIP2A hat keinen Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein

4.3.1 Hemmung der Translation durch Cycloheximid

CIP2A wurde erstmalig als ein Inhibitor der Proteinphosphatase 2 A (PP2A) beschrieben. Die PP2A spielt eine Rolle im Abbau des MYC-Proteins. Sobald MYC an Threonin58 und Serin62 phosphoryliert, erkennt dies die PP2A. Diese dephosphoryliert MYC an Serin62, infolgedessen MYC für den Abbau markiert wird. Durch die Inhibition der PP2A verhindert CIP2A die Dephosphorylierung an Serin62 des MYC-Proteins und schützt MYC-Protein so vor dem Abbau [34,69]. Im Umkehrschluss sollte in Zellen, die kein CIP2A enthalten, MYC-Protein schneller abgebaut werden und damit eine verkürzte Halbwertszeit aufweisen.

Um diesen Wirkmechanismus im kolorektalen Karzinom zu überprüfen, wurden HCT116-Zellen mit siCIP2A transfiziert und für je 0, 15, 30, 60 und 150 Minuten mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid hemmt die Peptidyltransferase an der 60S-Untereinheit des Ribosoms, verhindert so das Verketteten der Aminosäuren und inhibiert dadurch die Translation der Proteinbiosynthese [83,84]. Dieser Wirkmechanismus verhindert die Herstellung neuer Proteine. Durch Immunoblot kann so das noch vorhandene Protein zu den genannten Zeitpunkten nachgewiesen werden und Rückschlüsse auf die Halbwertszeit des gesuchten Proteins gezogen werden. In Abb.4.5 (A) ist ein Western Blot auf CIP2A, MYC und Vinculin, als Ladekontrolle, gezeigt. Das dazugehörige Diagramm mit der Quantifizierung der MYC-Proteinmenge ist in Abb.4.5 (B) gezeigt. Die Werte wurden zu Vinculin normalisiert und der Wert nach 0 Minuten als Referenzwert = 1 gesetzt. Die Halbwertszeit von MYC Protein liegt nach Transfektion von siCTR und siCIP2A in beiden Fällen bei ca. 35 Minuten.

Ergebnisse

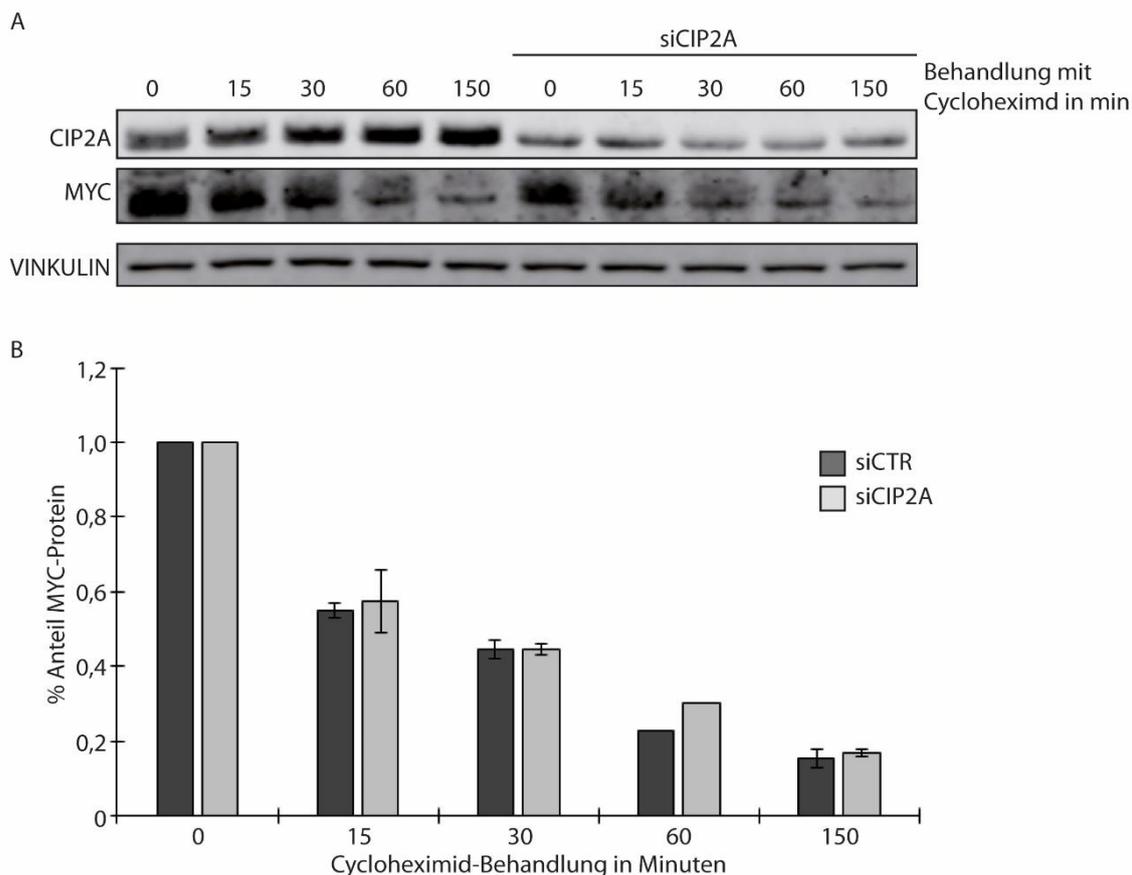


Abb. 4.3: Hemmung der Proteintranslation durch CHX (A) Western Blot: Cycloheximid wurde für die angegebene Zeit auf die Zellen gegeben. Rechts sind die Zellen mit siCIP2A transfiziert. (B) Quantifizierung der MYC-Proteinmenge, normalisiert zu Vinkulin, Referenzwert 1 bei 0 min für je siCTR/siCIP2A, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=2).

4.3.2 Hemmung des Abbaus von MYC-Protein durch Okadasäure, MG132 und in gentechnisch veränderten Zellen mit fehlender Ubiquitinligase FBWX7

Im vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von MYC auch nach Knockdown von CIP2A unverändert bei ca. 35 Minuten liegt, was die Vermutung nahelegt, dass CIP2A keinen merklichen Einfluss auf den Abbau von MYC im kolorektalen Karzinom hat. Um diese Hypothese und damit den Wirkmechanismus von CIP2A genauer zu untersuchen, wurden die verschiedenen Stationen des Abbaus von MYC gehemmt und so versucht, den Verlust von MYC-Protein nach CIP2A-Knockdown zu kompensieren. Hierfür wurden die zwei Hemmstoffe Okadasäure und MG132, sowie eine veränderte Zelllinie HCT116 FBW7^{-/-} verwendet: Okadasäure (OA) ist ein Inhibitor der Proteinphosphatase 1 und 2A, MG132 ist ein potenter, reversibler Inhibitor des Proteasoms und reduziert dadurch den Abbau ubiquitinerter Proteine [85,86]. In FBW7^{-/-} Zellen wird der Abbau von MYC-

Protein durch das Fehlen der Ubiquitinligase FBWX7^{-/-} gehemmt [87]. Würde CIP2A im kolorektalen Karzinom ebenfalls den Abbau von MYC-Protein hemmen, hätte der Knockdown von CIP2A bei gleichzeitiger Inhibition des Abbaus von MYC-Protein keinen Verlust von MYC-Protein zur Folge. Die Angriffspunkte der einzelnen Substanzen werden in Abb. 4.6 dargestellt.

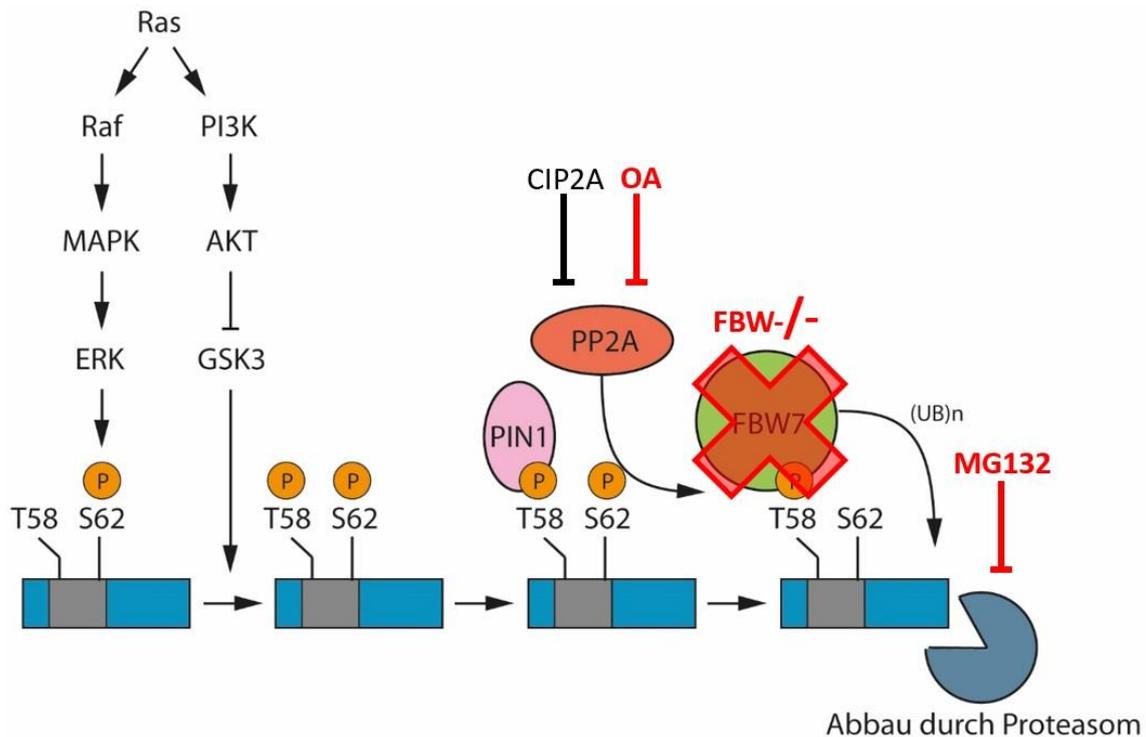


Abb. 4.4: Angriffspunkte der verwendeten Inhibitoren beim Abbau von MYC-Protein . Okadasäure (OA) inhibiert die Proteinphosphatase PP2A. In der HCT 116 FBW^{-/-} -Zellreihe wird durch Fehlen der Ubiquitinligase FBW7 die Ubiquitierung von MYC und damit dessen Abbau reduziert. MG132 hemmt das Proteasomen und damit die proteasomale Degradation von MYC (Schema des Abbaus von MYC angelehnt an Adhikary und Eilers, 2005).

Die Ergebnisse sind in Abb. 4.7 dargestellt, (A) zeigt die dazugehörigen Western Blots. Der Blot links zeigt die Proteinbanden von CIP2A und MYC nach Knockdown von CIP2A einmal ohne und einmal nach Zugabe von Okadasäure. In dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 20nM für 12h verwendet, was eine, gemäß Literatur, suffiziente Inhibition von PP2A bewirkt [85]. Nimmt man an, dass CIP2A tatsächlich über Hemmung der PP2A auch im kolorektalen Karzinom den Abbau von MYC reduziert, so müsste der Verlust von MYC-Protein nach Knockdown von CIP2A durch die Zugabe von Okadasäure kompensiert werden können. Entgegen dieser Annahme konnten wir zeigen, dass durch die Zugabe von OA die Menge an MYC-Protein zusätzlich um 37% gesteigert werden konnte. Der Verlust von CIP2A scheint durch die Zugabe von OA jedoch kaum beeinflusst.

Um herauszufinden, ob CIP2A einen Einfluss auf die weiteren Schritte des MYC-Abbaus hat, wurden die Zellen im nächsten Teil des Versuches statt mit OA, bei ansonsten gleichem Vorgehen, mit dem Proteasomeninhibitor MG132 behandelt. Auch hier, unter der Annahme, dass CIP2A einen hemmenden Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein hat, müsste der Verlust von MYC-Protein nach CIP2A-Knockdown durch die Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132 verhindert werden können. Jedoch machen auch hier die Ergebnisse deutlich, dass dieser Verlust nicht durch MG132 kompensiert werden kann: ob mit oder ohne Zugabe von MG132 fällt das MYC-Protein-Level nach CIP2A-Knockdown vergleichbar ab.

Um diesen Versuch zu vervollständigen und den kompletten Abbau von MYC-Protein beleuchtet zu haben, wurde eine in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene HCT116 FBWX7-defiziente Zelllinie verwendet. Zielproteine der Ubiquitinligase FBWX7, darunter MYC, können bei Fehlen derselben nicht ubiquitiniert und dementsprechend nicht für den Abbau markiert werden. Folglich können diese Proteine nicht abgebaut werden. Auch hier würde man, bei Annahme der bisher bekannten Wirkung von CIP2A, einen fehlenden Rückgang von MYC-Protein nach Knockdown von CIP2A erwarten. Konkordant zu den bisherigen Ergebnissen zeigt sich dieser Effekt nicht. In den unveränderten HCT 116 (FBWX7+/+) - Zellen zeigt sich nach CIP2A-Knockdown ein Rückgang von MYC-Protein auf 70 %, in den HCT 116 FBWX7-/- -Zellen ein Rückgang von MYC-Protein auf 71 %.

Die dazugehörige Realtime PCR in Abb. 4.7 (B) zeigt, dass der Knockdown von CIP2A funktioniert und die mRNA-Menge durch die Zugabe von siCIP2A auf 17,8 % gesenkt werden kann. Jedoch zeigte sich, entgegen bisher veröffentlichter Daten, ebenfalls eine Reduktion der MYC-mRNA nach CIP2A-Knockdown auf 63 %.

Abb. 4.6 (C) zeigt das gleiche Experiment wie in (A) und (B) gezeigt und beschrieben, jedoch nun mit der selbst hergestellten Zelllinie HCT 116 mit induzierbarer shCIP2A. Durch die Realtime-PCR wird deutlich, dass der Effekt mittels shCIP2A auf die Reduktion von CIP2A deutlich geringer ist als mittels siCIP2A. Die CIP2A mRNA kann hier lediglich auf 58,4 % gesenkt werden, die Expression der MYC-mRNA bleibt unverändert bei 100 %. Das MYC-Proteinlevel sinkt nach Induktion der shCIP2A auf 80 %, dies ändert sich auch durch Zugabe von MG132 nicht.

Ergebnisse

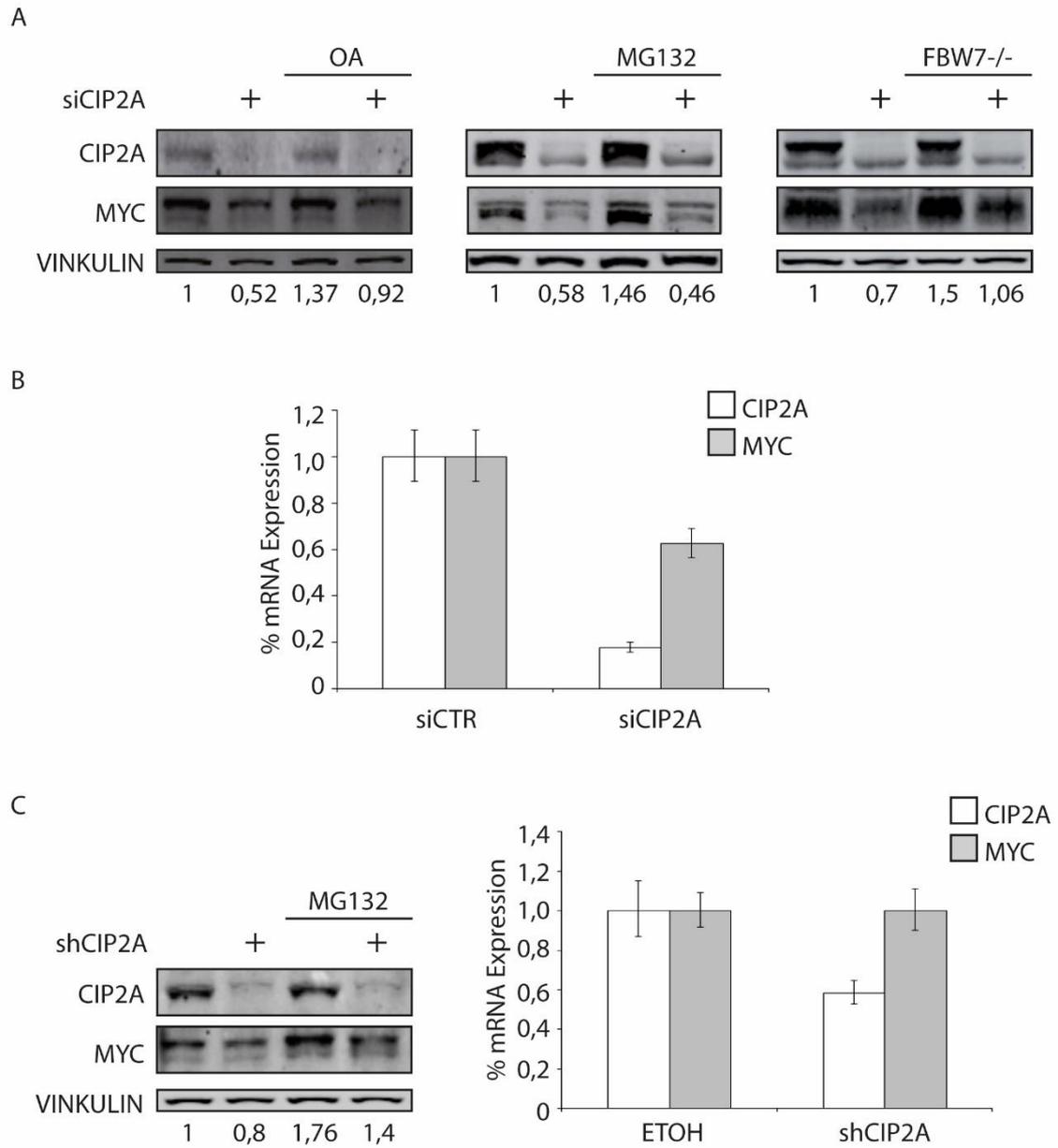


Abb. 4.5: CIP2A hat keinen Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein . (A) HCT116 wurden für 12h mit OA (20nM), 3h mit MG132 (10mM) behandelt. Untenstehende Zahlen geben das relative MYC-Proteinlevel an, normalisiert zu Vinkulin (B) Relative mRNA Expression von CIP2A und MYC nach CIP2A-Knockdown (C) Western Blot und relative mRNA Expression in HCT116 shCIP2A, Doxycyclin-induziert; Hemmung des Proteasomen durch MG132. Fehlerbalken im Balkendiagramm markieren die Werte RQmin und RQmax.

4.4 CIP2A reguliert die Translation von MYC Protein

Die bisherigen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass CIP2A im kolorektalen Karzinom keinen merklichen Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein hat, sondern vermutlich eher auf die Transkription und vor allem auf die Translation von MYC wirkt. Um diese Hypothese, die Wirkung auf die Translation von MYC, näher zu untersuchen, wurden im folgenden Experiment mehrere HCT116 Zelllinien verwendet, die verschiedene Doxycyclin-induzierbare MYC-Konstrukte enthalten. Insgesamt wurden vier Zelllinien verwendet: eine Zelllinie, die die induzierbare kodierende Sequenz der MYC-mRNA enthält, eine, die die kodierende Sequenz mit der 3'-Untranslatierten Region enthält, eine, die die 5'-Untranslatierte Region mit der kodierenden Sequenz enthält und eine Zelllinie, die die komplette induzierbare MYC-mRNA enthält. Angehängt an die genannten Sequenzen ist jeweils ein HA-Tag, um mittels Western Blot das Proteinlevel und mittels qRT-PCR die mRNA-Expression des exogenen MYC nachweisen zu können (Abb.4.6).

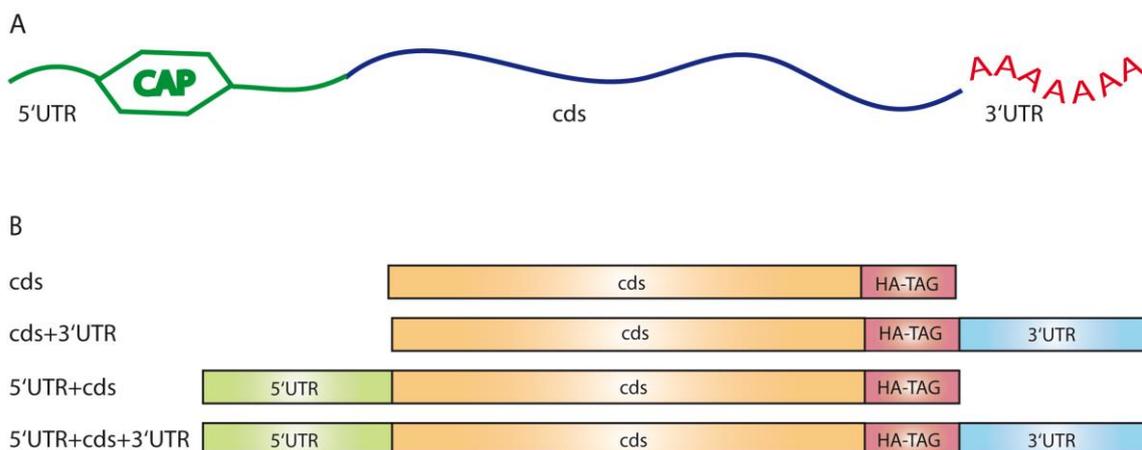


Abb. 4.6: Schematische Darstellung der MYC-mRNA-Konstrukte. (A) schematische Darstellung der endogenen MYC mRNA (B) Schematische Darstellung der Doxycyclin-induzierbaren MYC-mRNA-Konstrukte: insgesamt sind vier Zelllinien vorhanden, die allesamt die kodierende Sequenz enthalten. Die weiteren Zelllinien unterscheiden sich in Vorhandensein bzw. Fehlen der untranslatierten Regionen (3'UTR und 5'UTR). Angehängt ist jeweils ein HA-Tag zur Identifikation des exogenen MYC-Proteins.

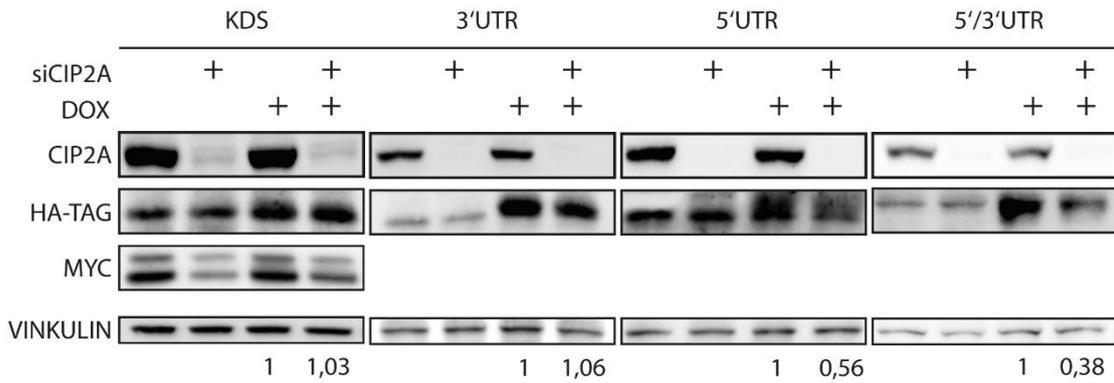
Zunächst wurden die Zellen mit siCIP2A transfiziert und 48h später die Expression der MYC-Konstrukte durch Zugabe von Doxycyclin induziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde Gesamtzellproteinlysate hergestellt und RNA extrahiert. In Abb. 4.7 sind die Western Blots und die relative MYC-mRNA-Expression dargestellt. Die relative mRNA-Expression des exogenen MYC ändert sich durch Knockdown von CIP2A nicht. Auf Proteinebene gibt es keine Änderung des Proteinlevels sowohl in den Zelllinien mit der

Ergebnisse

kodierenden Sequenz, als auch in den Zellen mit der kodierenden Sequenz und der 3'Untranslatierten Region. Zu einer Abnahme des exogenen MYC-Proteinlevels nach CIP2A-Knockdown kommt es in den Zellen mit der 5'UTR und kodierender Sequenz und in den Zellen mit 5'UTR, kodierender Sequenz und 3'UTR. Hier fällt das Proteinlevel auf 56 % bzw. 38 % ab, während es in den Zellen mit der CDS und 3'UTR annähernd unverändert bleibt.

Ergebnisse

A



B

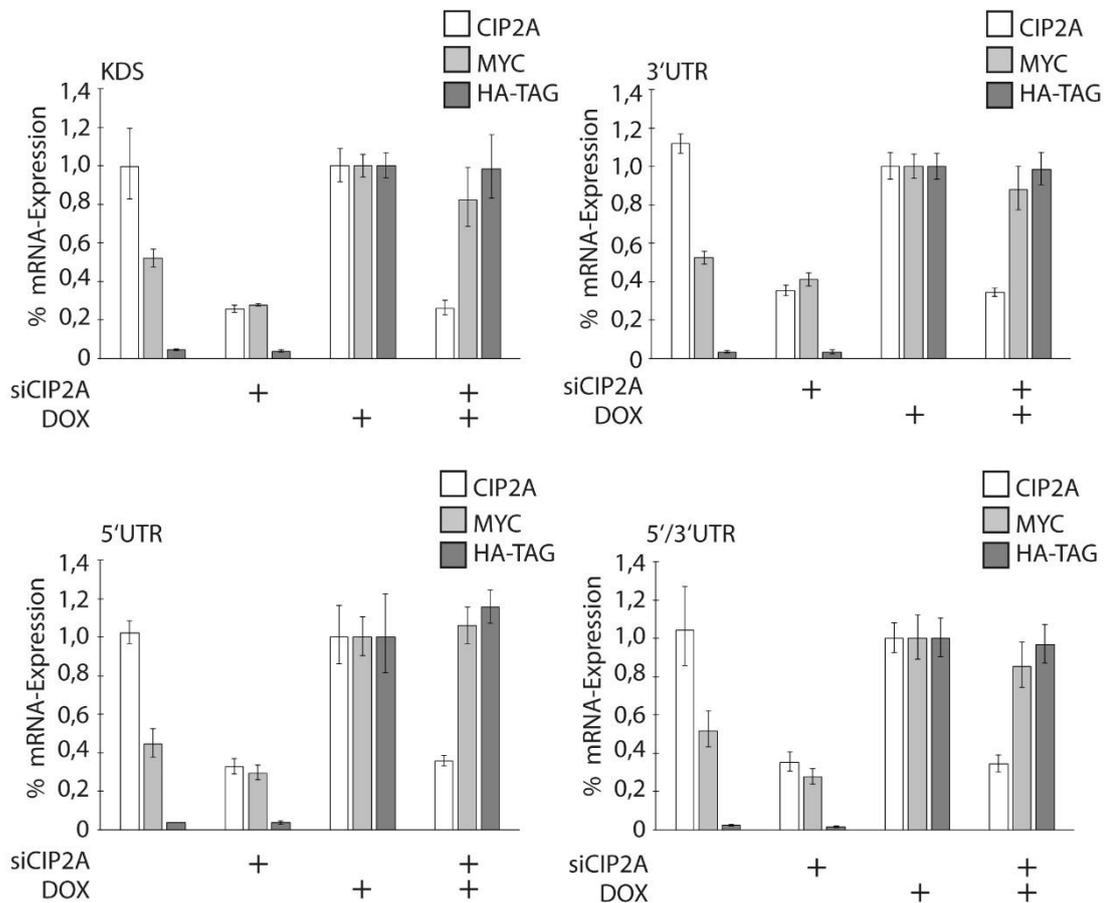


Abb. 4.7: CIP2A reguliert die Translation von MYC-Protein. (A) Vier HCT116-Zelllinien mit verschiedenen unterschiedlichen MYC-Konstrukten: KDS, KDS mit 3'UTR, 5'UTR mit KDS, 5'UTR mit KDS und 3'UTR, wurden mit siCIP2A transfiziert und die MYC-Konstrukte durch Doxycyclin induziert. In der Abbildung sind die zugehörigen Western Blots dargestellt. Untenstehende Zahlen sind die relativen Proteinlevel des HA-Tag (\equiv exogenes MYC), normalisiert zu Vinkulin. (B) Relative mRNA-Expression aus Daten der qRT-PCR, dargestellt in Balkendiagrammen. Fehlerbalken markieren die Werte RQmin und RQmax. (KDS +3'UTR wurde abgekürzt zu 3'UTR, 5'UTR + KDS zu 5'UTR, usw.)

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, eine neue Zelllinie HCT116 mit einer DOX-induzierbaren shCIP2A herzustellen. Mittels shRNA und siRNA sollte der Wirkmechanismus von CIP2A auf MYC im kolorektalen Karzinom untersucht werden.

5.1 CIP2A-depletierte Zellen zeigen einen Wachstumsnachteil

In MYC-induzierten Tumoren bewirkt die Deaktivierung von MYC einen Proliferationsarrest, Re-Differenzierung der Tumorzellen, ein Zusammenbrechen des Mikromilieus und der Vaskularisierung und führt zu einer raschen Regression des Tumors [88]. Auch für CIP2A existieren dementsprechende Daten. Wird in Tumorgewebe des Mammakarzinoms CIP2A herunterreguliert, wächst das Gewebe deutlich langsamer als in der Kontrollsituation [73]. Auch in vitro zeigen CIP2A-depletierte Zellen sowohl eine deutlich geringere Zellgröße, als auch eine verlangsamte Proliferation. Wird den Zellen zusätzlich Rapamycin, welches mTOR hemmt, zugegeben, ist dieser Effekt aufgehoben [55].

Auch wir konnten zeigen, dass in den Zellen des kolorektalen Karzinoms eine Depletion von CIP2A ein Wachstumsnachteil der Zellen bewirkt, wobei dieser auf eine verringerte Proliferation und nicht auf eine gesteigerte Apoptose zurückzuführen ist, siehe Abbildung 4.2.

5.2 CIP2A hat keinen Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein

2007 wurde CIP2A erstmals durch Junttila et al. als Cancerogener Inhibitor der Protein Phosphatase 2A beschrieben. Experimentiert wurde mit Zellen des Zervixkarzinoms, den sog. HeLa-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass CIP2A in diesen Zellen einen Einfluss auf den Abbau von MYC hat: durch die Inhibition der PP2A durch CIP2A wird verhindert, dass die PP2A MYC-Protein an Serin 62 dephosphoryliert und damit für den Abbau markiert. Folglich schützt CIP2A im Zervixkarzinom MYC-Protein vor dem Abbau und stabilisiert es dadurch [69]. Um diesen Wirkmechanismus im kolorektalen Karzinom zu überprüfen, wurden die Zellen, nach Knockdown von CIP2A mittels siRNA, mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid hemmt die Translationselongation und damit die Proteinsynthese. Durch anschließende Quantifizierung der Proteinlevel kann so einen Rückschluss auf die

Halbwertszeit gezogen werden. In der Annahme, dass CIP2A MYC-Protein stabilisiert, würde man in den mit siCIP2A behandelten Zellen eine verkürzte Halbwertszeit von MYC-Protein erwarten. Überraschenderweise zeigte sich, dass sich die relativen Proteinlevel nach 0, 15, 30, 60 und 150 Minuten mit und ohne CIP2A-Knockdown nicht unterschieden. Unter beiden Konditionen konnte eine Halbwertszeit von MYC-Protein von ungefähr 35 Minuten ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass CIP2A im Kolorektalen Karzinom keinen Effekt auf den Abbau von MYC Protein hat.

Neben der Protein Phosphatase 2A spielen beim Abbau von MYC-Protein weitere Proteine eine Rolle. Nachdem MYC-Protein durch die PP2A an Serin 62 dephosphoryliert wurde, wird es durch die Ubiquitinligase FBW7 ubiquitiniert und anschließend proteasomal degradiert [34].

Okadasäure ist ein bekannter Inhibitor der Protein Phosphatasen [85]. Mit der Annahme, dass der Effekt von CIP2A durch Hinzugabe von Okadasäure ausgeglichen werden kann, sollten die Zellen nach Knockdown von CIP2A und Zugabe von Okadasäure keinen Verlust von MYC-Protein zeigen. Jedoch sehen wir, dass die Zellen nach Knockdown von CIP2A, trotz Vorhandensein von Okadasäure, einen Verlust von MYC-Protein zeigen, siehe Abbildung 4.5.

Da dieses Ergebnis darauf hindeutet, dass CIP2A keinen Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein hat, wurden weitere Experimente durchgeführt, bei denen jeweils ein anderer Schritt des Abbaus von MYC-Protein gehemmt wird. Hierfür wurde zum einen der Proteasomeninhibitor MG132, zum anderen eine genetisch veränderte Zelllinie FBW7^{-/-} verwendet [86]. Die Zellen FBW7^{-/-} besitzen keine Ubiquitinligase FBW7, wodurch MYC-Protein in reduziertem Maße ubiquitiniert und abgebaut wird [87]. Konkordant zeigte sich auch hier nach Knockdown von CIP2A und zeitgleicher Hemmung des Proteasomes, bzw. in den FBW7-defizienten Zellen, nicht die erwartete Änderung im MYC-Proteinlevel, s. Abbildung 4.5..

Mit diesen Ergebnissen können wir zeigen, dass CIP2A in den verwendeten Zellen des kolorektalen Karzinom keinen Einfluss auf den Abbau von MYC Protein hat.

5.3 CIP2A hat einen Einfluss auf die Translation von MYC Protein

Unbeantwortet bleibt bisher die Frage nach dem genauen Regulationsmechanismus von MYC durch CIP2A. Als Möglichkeiten kommen einerseits eine transkriptionelle oder andererseits die translationelle Regulation in Betracht.

Um eine mögliche Regulation auf transkriptioneller Ebene auszuschließen, wurden quantitative Realtime PCR durchgeführt. Diese bestätigten eine verminderte Expression von CIP2A mRNA nach Knockdown mittels si/shRNA. Zeitgleich zeigen sie aber auch, dass der Knockdown von CIP2A teilweise einen Verlust von MYC mRNA zur Folge hat. Dies ist sehr überraschend, da eine Änderung der MYC-mRNA weder für das Zervixkarzinom, noch für das kolorektale Karzinom beschrieben wurde [69,70]. Zudem würde man eher eine Hochregulation der MYC mRNA Expression, infolge eines Feedback-Loops als Antwort auf das gesunkene Proteinlevel, erwarten [89,90]. Tatsächlich konnte in den shCIP2A-Zellen nach Induktion der shRNA keine Änderung der MYC-mRNA Expression, aber trotzdem ein Rückgang von MYC Protein, gesehen werden. Dies deutet daraufhin, dass CIP2A möglicherweise einen geringen Effekt auf das MYC Transkript, deutlich mehr jedoch auf die Translation hat, weshalb im Folgenden hierauf näher eingegangen wird.

Die Proteinsynthese stellt einen sehr energieaufwendigen Vorgang in der Zelle dar und ist entsprechend gut kontrolliert. Unterteilt wird diese in Translationsinitiation, -elongation, -termination und Ribosomenrecycling. Für Tumorgewebe ist bekannt, dass die Proteinsynthese im Allgemeinen gesteigert ist [91].

Um zu überprüfen, inwieweit CIP2A im kolorektalen Karzinom einen Einfluss auf die Translation von MYC hat, wurden verschiedene Zellen mit unterschiedlichen Konstrukten der MYC Transkripte verwendet. Diese enthalten verschiedene MYC-mRNA-Konstrukte mit angehängtem HA-Tag zur Identifizierung des exogenen MYC. Hier zeigte sich in den Zellen mit den mRNA-Konstrukten der kodierenden Sequenz, sowie in den Zellen mit der kodierenden Sequenz und der 3'UTR keine Änderung des exogenen MYC-Proteinlevels nach CIP2A-Knockdown. Hingegen zeigten die Zellen mit den mRNA-Konstrukten, die ebenfalls eine 5'UTR enthielten, einen deutlichen Rückgang an MYC-Protein. Vor allem die Zellen die die komplette MYC-mRNA enthielten, zeigten den deutlichsten Effekt.

Dies deutet darauf hin, dass CIP2A im kolorektalen Karzinom keinen Einfluss auf die Translationselongation hat, jedoch die Translationsinitiation von MYC reguliert. Der genaue Wirkmechanismus bleibt im Moment noch spekulativ.

Die Translationsinitiation von MYC ist meist CAP-abhängig, kann aber auch unabhängig über ein IRES (Internal Ribosome Entry Side) gestartet werden [92].

Bei der CAP-abhängigen Initiation spielen viele Proteine eine Rolle, vor allem seien hier eIF4E und 4EBP1 genannt. Der Translations-Initiations-Faktor eIF4E bindet schon während der Transkription am eIF4E-sensitiven Element an der 3'UTR und beteiligt sich am Export der mRNA aus dem Nukleus [49,93]. Für die Translationsinitiation bindet es dann an die CAP-Struktur der 5'UTR und bleibt über PABP in Kontakt mit dem Poly-A-Schwanz der mRNA [93]. Im Zytoplasma ist 4EBP1 an eIF4E gebunden. Solange diese Bindung besteht, kann die Translation nicht starten. Sobald 4EBP1 phosphoryliert ist, kommt es zur Dissoziation und eIF4E kann mit eIF4F und weiteren Faktoren die Translation starten [57]. Damit spielt eIF4E eine Rolle sowohl im Export der mRNA, als auch während der Translationsinitiation, sprich dem Translationsstart [49]. Da in der normalen Zelle die Menge an freiem eIF4E limitierend ist und es in Karzinomen häufig überexprimiert ist, gilt es als Onkogen [59]. Hierbei ist bemerkenswert, dass bereits eine 2,5-fache Erhöhung von eIF4E für eine malignen Transformation ausreicht [94]. Die Menge und Aktivität von eIF4E kann kontrolliert werden durch Genamplifikation und Aktivierung der Transkription (v.a. durch MYC) sowie durch das Vorhandensein von phosphoryliertem 4EBP1 und durch den Phosphorylierungsstatus von eIF4E selber [94]. Hierbei ist bekannt, dass die Phosphorylierung an Ser209 eine wichtige Rolle im Rahmen der Tumorentstehung/-progression spielt, wobei der genaue Mechanismus dahinter noch unklar ist [68,91]. Bekannt ist, dass MNK1/2 eIF4E phosphorylieren und dass PP2A durch direkte und indirekte Dephosphorylierung von MNK1/2 die Phosphorylierung von eIF4E hemmt. Durch Hemmung der PP2A konnte zudem gezeigt werden, dass hierdurch die Assoziation von eIF4E und eIF4G gesteigert werden konnte; sind eIF4E und eIF4G gebunden, kommt es zusätzlich zu einer indirekten Stimulation von eIF4A ([68,94].

Auch ist im kolorektalen Karzinom häufig mTORC1 aktiviert und treibt unter anderem über die Phosphorylierung von 4EBP1 (und dadurch Dissoziation von 4EBP1 und eIF4E) die Proteinsynthese voran [56].

Für CIP2A konnte einerseits gezeigt werden, dass es mTORC1 aktiviert und so positiv auf die Proteinsynthese wirkt [55]; andererseits ist anzunehmen, dass es durch die inhibierende Wirkung auf PP2A wiederum dessen inhibierende Wirkung auf eIF4E aufheben kann.

Gegen eine Regulation über mTORC1 im kolorektalen Karzinom spricht, dass in einer früheren Studie bereits gezeigt wurde, dass CIP2A im kolorektalen Karzinom keinen Effekt auf die PI3K-/ AKT-/ mTOR-Signalwege hat [70].

Eine Regulation über eIF4E ist denkbar. Da sich eIF4E einerseits am Export der mRNA, aber auch am Translationsstart beteiligt könnte erklärt werden, warum der größte Effekt von CIP2A auf die MYC-Proteinmenge in den Zellen mit der kompletten MYC-mRNA gesehen werden kann. Dass keine Änderung des Proteinlevels in den Zellen, die nur die 3'UTR enthalten, zu sehen ist, könnte dadurch erklärt werden, dass dieser Effekt allein nicht ausschlaggebend ist. Die mögliche Wirkweise von CIP2A im kolorektalen Karzinom ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Regulation von MYC durch CIP2A größtenteils über die Translationsinitiation zu erfolgen scheint, da der größte Effekt von CIP2A in Zellen gesehen wird, die eine 5'UTR-enthaltene MYC-mRNA haben. Dieses Erkenntnis reiht sich in die bisherigen Studien ein, die zeigen, dass die Initiationsfaktoren in Malignomen häufig hoch reguliert sind und insbesondere die komplexeren und längeren 5'UTRs auf eine höhere Konzentration dieser Faktoren angewiesen sind [95]. Ob es über CAP-abhängige Mechanismen, über ein IRES oder einem anderen Mechanismus zu einer gesteigerten Translation von MYC-Protein durch CIP2A kommt bleibt aktuell noch offen. Dies sollte durch weitere Versuche, die sich auf die Translationsinitiation konzentrieren, weiter untersucht werden. Mit bereits publizierten Zellen, welche ein Doxycyclin-induzierbares Konstrukt mit verändertem 4EBP-1 enthalten, welches durch mTORC1 nicht dephosphoryliert werden kann und deshalb an eIF4E gebunden bleibt, könnte untersucht werden, ob diese nach Induktion mit Doxycyclin und Zugabe von siCTR/CIP2A eine veränderte MYC-Expression zeigen [96]. Weiterhin sollte der Effekt von CIP2A auf den Phosphorylierungsstatus von eIF4E Ser206 untersucht werden, da hierfür bekannt ist, dass dies durch die PP2A reguliert wird.

Diskussion

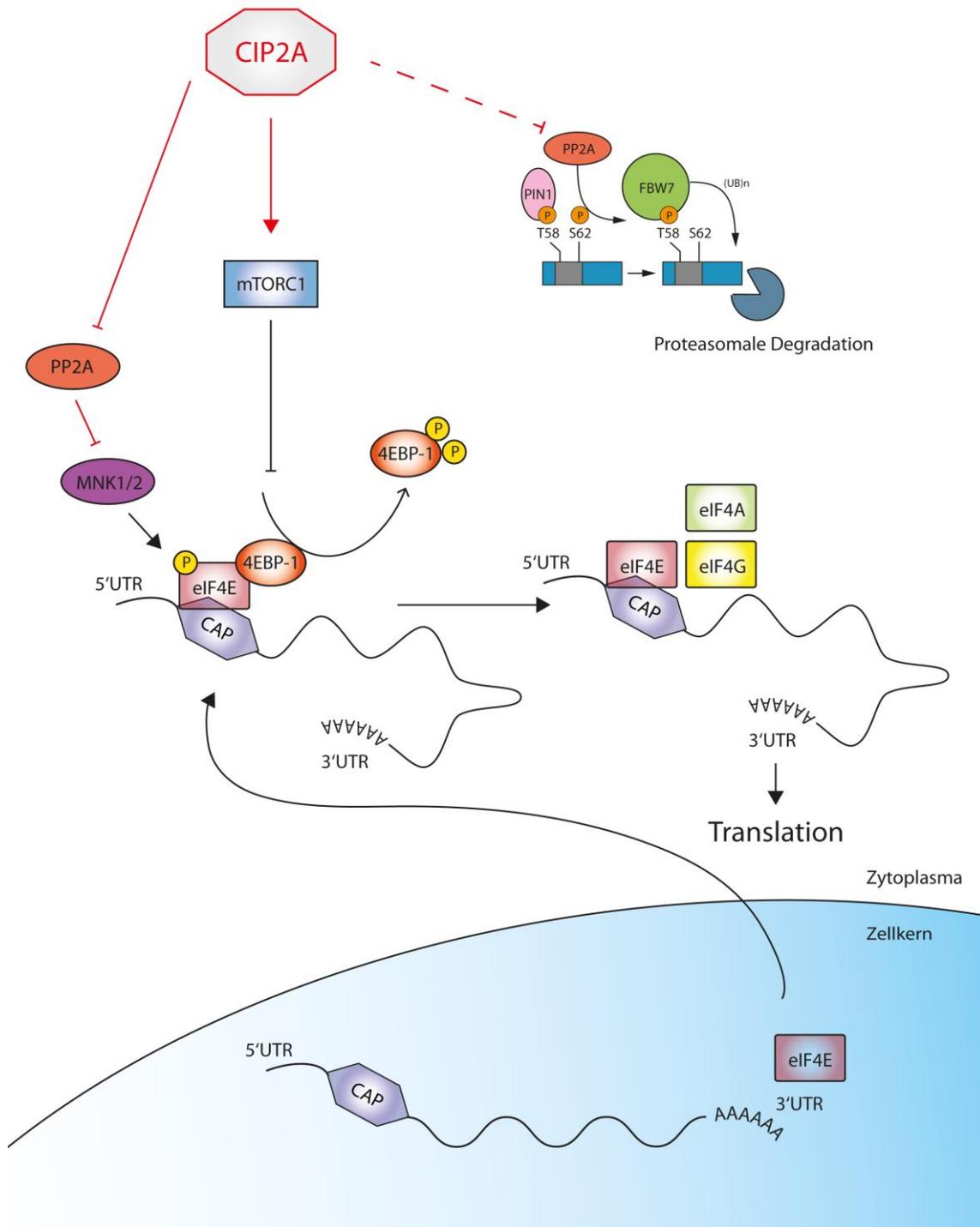


Abb. 5.1.: Modell einer möglichen Wirkweise von CIP2A. Dargestellt ist eine mögliche Wirkweise von CIP2A im kolorektalen Karzinom auf die Translationsinitiation. Einerseits ist eine Steigerung der Translation über die Induktion von mTORC1 denkbar; zudem ist möglich, dass über die Hemmung der PP2A eIF4E gehemmt wird, was ebenfalls als Treiber der Translation und Onkogen bekannt ist.

6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten beim Menschen vorkommenden Karzinome [2]. Diesem liegen unterschiedliche Mutationen zugrunde, die in knapp 100% der kolorektalen Karzinome zu einer Überexpression von MYC führen, welches als Transkriptionsfaktor maßgeblich den Zellzyklus, Proliferation und Vaskularisierung beeinflusst [10,16]. Damit stellt MYC ein potenzielles Therapieziel in der Behandlung des Kolorektalen Karzinoms dar. Zusätzlich konnte in den letzten Jahren ein Onkoprotein namens CIP2A identifiziert werden, welches nach Depletion mit einem Verlust von MYC Protein einhergeht [69]. Zusätzlich ist CIP2A ein unabhängiger prognostischer Faktor im Kolorektalen Karzinom [70].

Diese Arbeit konnte zeigen, dass CIP2A-depletierte Zellen einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber unbehandelten Zellen zeigen. Dieser Unterschied kann nicht durch eine gesteigerte Apoptose, sondern vielmehr durch einen verlängerten Zellzyklus erklärt werden. Weiterhin konnte eine neue Zelllinie mit DOX-induzierbarer shCIP2A hergestellt werden, die für weitere Experimente genutzt werden kann. Entgegen der Wirkweise im Zervixkarzinom [69], konnte im kolorektalen Karzinom kein Einfluss auf die Stabilität von MYC Protein durch CIP2A nachgewiesen werden. Auch konnte der Verlust von MYC nach CIP2A Knockdown nicht durch gleichzeitige Inhibierung des Abbaus, durch Okadasäure, MG132 oder in den FBWX7-defizienten Zellen, verhindert werden. Stattdessen resultiert die Herunterregulation von CIP2A in einem leichten Rückgang der MYC-mRNA Menge und einem deutlichen Verlust an MYC-Protein. In Zellen mit verschiedenen Konstrukten der MYC Transkripte kann dieser Verlust an MYC Protein auf eine translationelle Regulation in der 5'UTR zurückgeführt werden, was eine bisher nicht beschriebene Wirkweise von CIP2A darstellt. Da CIP2A in normalen Zellen praktisch nicht exprimiert ist [78], könnte dies ein mögliches Ziel in der Tumorthherapie darstellen. Dieses gilt es in weiteren Experimenten noch genauer zu untersuchen.

Summary

Colorectal Cancer is one of the most common type of cancer in human beings [2]. These are based on different mutations, which, in nearly 100%, lead to overexpression of MYC. As an transcription factor, MYC influences cell cyclus, proliferation and vascularization [10,16]. So MYC appears to be a good target in the therapy of colorectal cancer. Additionally a oncoprotein called CIP2A could be identified in the last years, which depletion leads also to a loss of MYC protein [69]. CIP2A was also found to be a independent prognostic factor in colorectal cancer [70].

In this work it could be demonstrated, that CIP2A-depleted cells show disadvantage in cell growth compared to the untreated cells. This difference could not be explained through an increased cell death, but an extended cell cycle. Additionally, a new cell line with DOX-inducible shRNA against CIP2A was established, which can be used for further experiments. Contrary to the mode of action which was found in cells of cervix carcinoma [69] we could not see an influence of CIP2A on the stability of MYC. Furthermore, the loss of MYC protein after knockdown of CIP2A could not be prevented by simultaneous inhibition of MYC degradation by okadaic acid, MG132 or in FBWX7-deficient cells. Instead knockdown of CIP2A lead to little decrease of MYC-mRNA and a clear loss of MYC protein. In cells with different constructs of MYC mRNA the loss of MYC protein can be attributed to a regulation in the 5'UTR. Because CIP2A is rarely expressed in normal tissue [78] it seems to be a possible target in the treatment of colorectal cancer. This should be further evaluated in future experiments.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Kaatsch P., Spix C., Katalinic A., Hentschel S., Luttmann S., Stegmaier C. et al., 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012. Robert Koch-Institut.
- [2] 2016. Krebs - Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. [December 12, 2020]; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_node.html;jsessionid=73C5962E783902D19F84DA27F110CC2A.1_cid298.
- [3] Cardoso R., Zhu A., Guo F., Heisser T., Hoffmeister M., Brenner H., 2021. Incidence and Mortality of Proximal and Distal Colorectal Cancer in Germany—Trends in the Era of Screening Colonoscopy. *Dtsch Arztebl Int* 118(Forthcoming). <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0111>.
- [4] 2019. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. [December 12, 2020]; Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>.
- [5] Huxley R.R., Ansary-Moghaddam A., Clifton P., Czernichow S., Parr C.L., Woodward M., 2009. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer* 125(1):171–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.24343>.
- [6] Fearon E.R., 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 6:479–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>.
- [7] Deutscher Ärzteverlag GmbH, *Ärzteblatt R.D.*, 2010. Chirurgische Therapie von Lebermetastasen beim kolorektalen Karzinom. [December 12, 2020]; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/74879/Chirurgische-Therapie-von-Lebermetastasen-beim-kolorektalen-Karzinom>.
- [8] Luedde T., Roderburg C., Binnebösel M., Neumann U.P., Trautwein C., 2016. Interdisziplinäre Therapie kolorektaler Lebermetastasen. *Gastroenterologe* 11(6):479–88. <https://doi.org/10.1007/s11377-016-0114-4>.
- [9] Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Kinzler K.W., 2013. Cancer genome landscapes. *Science* 339(6127):1546–58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.

- [10] 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487(7407):330–7. <https://doi.org/10.1038/nature11252>.
- [11] Sansom O.J., Meniel V.S., Muncan V., Phesse T.J., Wilkins J.A., Reed K.R. et al., 2007. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 446(7136):676–9. <https://doi.org/10.1038/nature05674>.
- [12] Peter M., Rosty C., Couturier J., Radvanyi F., Teshima H., Sastre-Garau X., 2006. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 25(44):5985–93. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209625>.
- [13] Conacci-Sorrell M., McFerrin L., Eisenman R.N., 2014. An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4(1):a014357. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014357>.
- [14] McKeown M.R., Bradner J.E., 2014. Therapeutic strategies to inhibit MYC. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014266>.
- [15] Elbadawy M., Usui T., Yamawaki H., Sasaki K., 2019. Emerging Roles of C-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092340>.
- [16] Vita M., Henriksson M., 2006. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 16(4):318–30. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.015>.
- [17] Brooks T.A., Hurley L.H., 2009. The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics. *Nat Rev Cancer* 9(12):849–61. <https://doi.org/10.1038/nrc2733>.
- [18] Baluapuri A., Wolf E., Eilers M., 2020. Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(5):255–67. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0215-2>.
- [19] Freytag S.O., Geddes T.J., 1992. Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* 256(5055):379–82. <https://doi.org/10.1126/science.256.5055.379>.
- [20] Sonenberg N., Hinnebusch A.G., 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136(4):731–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>.

- [21] Pelengaris S., Khan M., Evan G.I., 2002. Suppression of Myc-Induced Apoptosis in β Cells Exposes Multiple Oncogenic Properties of Myc and Triggers Carcinogenic Progression. *Cell* 109(3):321–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00738-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00738-9).
- [22] Baudino T.A., McKay C., Pendeville-Samain H., Nilsson J.A., Maclean K.H., White E.L. et al., 2002. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 16(19):2530–43. <https://doi.org/10.1101/gad.1024602>.
- [23] Galaktionov K., Chen X., Beach D., 1996. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382(6591):511–7. <https://doi.org/10.1038/382511a0>.
- [24] Sipos F., Firneisz G., Múzes G., 2016. Therapeutic aspects of c-MYC signaling in inflammatory and cancerous colonic diseases. *World J Gastroenterol* 22(35):7938–50. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i35.7938>.
- [25] Larsson L.-G., Henriksson M.A., 2010. The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Exp Cell Res* 316(8):1429–37. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.03.025>.
- [26] Frye M., Gardner C., Li E.R., Arnold I., Watt F.M., 2003. Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130(12):2793–808. <https://doi.org/10.1242/dev.00462>.
- [27] Carroll P.A., Diolaiti D., McFerrin L., Gu H., Djukovic D., Du J. et al., 2015. Deregulated Myc requires MondoA/Mlx for metabolic reprogramming and tumorigenesis. *Cancer Cell* 27(2):271–85. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.024>.
- [28] Doherty J.R., Yang C., Scott K.E.N., Cameron M.D., Fallahi M., Li W. et al., 2014. Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Res* 74(3):908–20. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2034>.
- [29] Schmidt E.V., 1999. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* 18(19):2988–96. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202751>.
- [30] Boxer L.M., Dang C.V., 2001. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20(40):5595–610. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204595>.
- [31] Dang C.V., 2012. MYC on the path to cancer. *Cell* 149(1):22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>.
-

- [32] Sakamuro D., Prendergast G.C., 1999. New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene* 18(19):2942–54. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202725>.
- [33] Herbst A., Hemann M.T., Tworkowski K.A., Salghetti S.E., Lowe S.W., Tansey W.P., 2005. A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* 6(2):177–83. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400333>.
- [34] Adhikary S., Eilers M., 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8):635–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1703>.
- [35] McMahon S.B., van Buskirk H.A., Dugan K.A., Copeland T.D., Cole M.D., 1998. The Novel ATM-Related Protein TRRAP Is an Essential Cofactor for the c-Myc and E2F Oncoproteins. *Cell* 94(3):363–74. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81479-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81479-8).
- [36] Knoepfler P.S., 2007. Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer Res* 67(11):5061–3. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0426>.
- [37] Herold S., Wanzel M., Beuger V., Frohme C., Beul D., Hillukkala T. et al., 2002. Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* 10(3):509–21. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00633-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00633-0).
- [38] Staller P., Peukert K., Kiermaier A., Seoane J., Lukas J., Karsunky H. et al., 2001. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3(4):392–9. <https://doi.org/10.1038/35070076>.
- [39] Zhu P., Martin E., Mengwasser J., Schlag P., Janssen K.-P., Göttlicher M., 2004. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 5(5):455–63. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00114-X).
- [40] Hermeking H., Rago C., Schuhmacher M., Li Q., Barrett J.F., Obaya A.J. et al., 2000. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(5):2229–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.050586197>.
- [41] Bouchard C., Thieke K., Maier A., Saffrich R., Hanley-Hyde J., Ansorge W. et al., 1999. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 18(19):5321–33. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5321>.
- [42] Eilers M., Eisenman R.N., 2008. Myc's broad reach. *Genes Dev* 22(20):2755–66. <https://doi.org/10.1101/gad.1712408>.

- [43] Levens D., 2010. You Don't Muck with MYC. *Genes Cancer* 1(6):547–54. <https://doi.org/10.1177/1947601910377492>.
- [44] D'haeseleer P., 2006. What are DNA sequence motifs? *Nat Biotechnol* 24(4):423–5. <https://doi.org/10.1038/nbt0406-423>.
- [45] Brooks T.A., Hurley L.H., 2010. Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer* 1(6):641–9. <https://doi.org/10.1177/1947601910377493>.
- [46] González V., Hurley L.H., 2010. The c-MYC NHE III(1): function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:111–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094649>.
- [47] Yao L., Tak Y.G., Berman B.P., Farnham P.J., 2014. Functional annotation of colon cancer risk SNPs. *Nat Commun* 5:5114. <https://doi.org/10.1038/ncomms6114>.
- [48] Culjkovic B., Topisirovic I., Borden K.L.B., 2007. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* 6(1):65–9. <https://doi.org/10.4161/cc.6.1.3688>.
- [49] Goodfellow I.G., Roberts L.O., 2008. Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* 40(12):2675–80. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.023>.
- [50] Bueno M.J., Gómez de Cedrón M., Gómez-López G., Pérez de Castro I., Di Lisio L., Montes-Moreno S. et al., 2011. Combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway. *Blood* 117(23):6255–66. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-315432>.
- [51] Mihailovich M., Bremang M., Spadotto V., Musiani D., Vitale E., Varano G. et al., 2015. miR-17-92 fine-tunes MYC expression and function to ensure optimal B cell lymphoma growth. *Nat Commun* 6:8725. <https://doi.org/10.1038/ncomms9725>.
- [52] Bjornsti M.-A., Houghton P.J., 2004. Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell* 5(6):519–23. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.05.027>.
- [53] Faller W.J., Jackson T.J., Knight J.R., Ridgway R.A., Jamieson T., Karim S.A. et al., 2015. mTORC1-mediated translational elongation limits intestinal tumour initiation and growth. *Nature* 517(7535):497–500. <https://doi.org/10.1038/nature13896>.
- [54] Stoneley M., Paulin F.E., Le Quesne J.P., Chappell S.A., Willis A.E., 1998. C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 16(3):423–8. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201763>.
-

- [55] Puustinen P., Rytter A., Mortensen M., Kohonen P., Moreira J.M., Jäättelä M., 2014. CIP2A oncoprotein controls cell growth and autophagy through mTORC1 activation. *J Cell Biol* 204(5):713–27. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304012>.
- [56] Gulhati P., Cai Q., Li J., Liu J., Rychahou P.G., Qiu S. et al., 2009. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15(23):7207–16. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1249>.
- [57] Benedetti A. de, Graff J.R., 2004. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23(18):3189–99. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207545>.
- [58] Marintchev A., Edmonds K.A., Marintcheva B., Hendrickson E., Oberer M., Suzuki C. et al., 2009. Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* 136(3):447–60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.014>.
- [59] Culjkovic B., Topisirovic I., Skrabanek L., Ruiz-Gutierrez M., Borden K.L.B., 2006. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol* 175(3):415–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.200607020>.
- [60] Topisirovic I., Ruiz-Gutierrez M., Borden K.L.B., 2004. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res* 64(23):8639–42. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2677>.
- [61] Lindqvist L.M., Vikström I., Chambers J.M., McArthur K., Ann Anderson M., Henley K.J. et al., 2012. Translation inhibitors induce cell death by multiple mechanisms and Mcl-1 reduction is only a minor contributor. *Cell Death Dis* 3(10):e409. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.149>.
- [62] Hann S.R., Eisenman R.N., 1984. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* 4(11):2486–97. <https://doi.org/10.1128/mcb.4.11.2486>.
- [63] Sears R., Nuckolls F., Haura E., Taya Y., Tamai K., Nevins J.R., 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14(19):2501–14. <https://doi.org/10.1101/gad.836800>.

- [64] Gregory M.A., Qi Y., Hann S.R., 2003. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem* 278(51):51606–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310722200>.
- [65] Farrell A.S., Sears R.C., 2014. MYC degradation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014365>.
- [66] Yada M., Hatakeyama S., Kamura T., Nishiyama M., Tsunematsu R., Imaki H. et al., 2004. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* 23(10):2116–25. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600217>.
- [67] Perrotti D., Neviani P., 2013. Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *The Lancet Oncology* 14(6):e229-e238. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70558-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70558-2).
- [68] Li Y., Yue P., Deng X., Ueda T., Fukunaga R., Khuri F.R. et al., 2010. Protein phosphatase 2A negatively regulates eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and eIF4F assembly through direct dephosphorylation of Mnk and eIF4E. *Neoplasia* 12(10):848–55. <https://doi.org/10.1593/neo.10704>.
- [69] Junttila M.R., Puustinen P., Niemelä M., Ahola R., Arnold H., Böttzauw T. et al., 2007. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* 130(1):51–62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.044>.
- [70] Wiegering A., Pfann C., Uthe F.W., Otto C., Rycak L., Mäder U. et al., 2013. CIP2A influences survival in colon cancer and is critical for maintaining Myc expression. *PLoS One* 8(10):e75292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075292>.
- [71] Böckelman C., Koskensalo S., Hagström J., Lundin M., Ristimäki A., Haglund C., 2012. CIP2A overexpression is associated with c-Myc expression in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 13(5):289–95. <https://doi.org/10.4161/cbt.18922>.
- [72] Lucas C.M., Harris R.J., Giannoudis A., Copland M., Slupsky J.R., Clark R.E., 2011. Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A) at diagnosis of chronic myeloid leukemia is a critical determinant of disease progression. *Blood* 117(24):6660–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-304477>.
- [73] Côme C., Laine A., Chanrion M., Edgren H., Mattila E., Liu X. et al., 2009. CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity. *Clin Cancer Res* 15(16):5092–100. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3283>.

- [74] Li W., Ge Z., Liu C., Liu Z., Björkholm M., Jia J. et al., 2008. CIP2A is overexpressed in gastric cancer and its depletion leads to impaired clonogenicity, senescence, or differentiation of tumor cells. *Clin Cancer Res* 14(12):3722–8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4137>.
- [75] Böckelman C., Lassus H., Hemmes A., Leminen A., Westermarck J., Haglund C. et al., 2011. Prognostic role of CIP2A expression in serous ovarian cancer. *Br J Cancer* 105(7):989–95. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.346>.
- [76] Yu G., Liu G., Dong J., Jin Y., 2013. Clinical implications of CIP2A protein expression in breast cancer. *Med Oncol* 30(2):524. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0524-9>.
- [77] Liu J., Wang X., Zhou G., Wang H., Xiang L., Cheng Y. et al., 2011. Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A is overexpressed in cervical cancer and upregulated by human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Gynecol Oncol* 122(2):430–6. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.04.031>.
- [78] De P., Carlson J.H., Leyland-Jones B., Dey N., 2015. Role of "oncogenic nexus" of CIP2A in breast oncogenesis: how does it work? *Am J Cancer Res* 5(9):2872–91.
- [79] 04.09.2018. Bromdesoxyuridin. [September 30, 2021]; Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/bromdesoxyuridin/10718>.
- [80] 30.09.2021. Propidiumiodid. [September 30, 2021]; Available from: <https://www.chemie.de/lexikon/Propidiumiodid.html>.
- [81] 12.10.2021. Chapter 6: DNA Analysis | Flow Cytometry - A Basic Introduction. [October 12, 2021]; Available from: <http://flowbook.denovosoftware.com/chapter-6-dna-analysis>.
- [82] Moore C.B., Guthrie E.H., Huang M.T.-H., Taxman D.J., 2010. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* 629:141–58. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3_10.
- [83] 24.10.2021. Cycloheximid, 1 g online bestellen⮞ carlroth.com. [October 24, 2021]; Available from: <https://www.carlroth.com/de/de/antibiotika-mykotika/cycloheximid/p/8682.1>.
- [84] 25.10.2021. Actidion from microbial, ≥94% (TLC) | Sigma-Aldrich. [October 25, 2021]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/c7698>.

- [85] Cohen P., Klumpp S., Schelling D.L., 1989. An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Letters* 250(2):596–600. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80803-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80803-8).
- [86] 24.10.2021. MG-132 - CAS 133407-82-6 - Calbiochem | 474790. [October 24, 2021]; Available from: https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/MG-132-CAS-133407-82-6-Calbiochem,EMD_BIO-474790.
- [87] Amati B., 2004. Myc degradation: dancing with ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(24):8843–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403046101>.
- [88] Soucek L., Whitfield J., Martins C.P., Finch A.J., Murphy D.J., Sodir N.M. et al., 2008. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* 455(7213):679–83. <https://doi.org/10.1038/nature07260>.
- [89] Penn L.J., Brooks M.W., Laufer E.M., Land H., 1990. Negative autoregulation of c-myc transcription. *EMBO J* 9(4):1113–21. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08217.x>.
- [90] Facchini L.M., Chen S., Marhin W.W., Lear J.N., Penn L.Z., 1997. The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Mol Cell Biol* 17(1):100–14. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.1.100>.
- [91] Schmidt S., Denk S., Wiegeling A., 2020. Targeting Protein Synthesis in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 12(5). <https://doi.org/10.3390/cancers12051298>.
- [92] Nanbru C., Lafon I., Audigier S., Gensac M.C., Vagner S., Huez G. et al., 1997. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem* 272(51):32061–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32061>.
- [93] López-Lastra M., Rivas A., Barría M.I., 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* 38(2-3):121–46. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602005000200003>.
- [94] Siddiqui N., Sonenberg N., 2015. Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem Soc Trans* 43(5):763–72. <https://doi.org/10.1042/BST20150126>.
- [95] Cencic R., Carrier M., Galicia-Vázquez G., Bordeleau M.-E., Sukarieh R., Bourdeau A. et al., 2009. Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopentabenzofuran, silvestrol. *PLoS One* 4(4):e5223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005223>.

- [96] Wiegering A., Uthe F.W., Jamieson T., Ruoss Y., Hüttenrauch M., Küspert M. et al., 2015. Targeting Translation Initiation Bypasses Signaling Crosstalk Mechanisms That Maintain High MYC Levels in Colorectal Cancer. *Cancer Discov* 5(7):768–81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1040>.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

'	Minute(n)
°C	Grad Celsius
μ	Mykro
3'UTR	Untranslatierte Region am 3'-Ende der MYC-mRNA
4EBP1	eIF4E-Bindeprotein 1
5'UTR	Untranslatierte Region am 5'-Ende der MYC-mRNA
abs.	Absolut
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
c	Zenti
CAP	7-Methylguanosin Rest am 5'UTR
CIP2A	Cancerogener Inhibitor der PP2A
C _T	<i>threshold cycle</i> (Schwellenwert der Zyklusanzahl)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Deoxynukleotide
eIF4A/E/G	Eukaryotischer Initiations Faktor 4A/E/G
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FBP	FUSE-Bindeprotein
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>

Abkürzungsverzeichnis

FIR	FBP-interagierender Repressor
For	<i>forward</i> (5' → 3')
FUSE	<i>Far Upstream element</i>
g	Gramm
G	<i>gap</i> (Pause)
GSK	Glykogen-Synthase-Kinase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
kDA	Kilo Dalton
KDS	Kodierende Sequenz
M	Monoklonal
m	Meter
mA	Milliampère
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
max	maximal
MG132	Carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal
min	Minute(n)
min	minimal
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MNK	<i>MAPK-interacting kinase</i>
Ms	<i>mouse</i> (Maus)
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC1	mTOR Complex 1
NHE III ₁	Nuklease hypersensitives Element
OA	<i>Ocadaic Acid</i> (Okadasäure)
P	Polyklonal
PABP	Poly(A) - Bindeprotein
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat- gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)

Abkürzungsverzeichnis

PI	Propidium Iodid
pInd.	pInducer
PNAS	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	Quantitative
Rb	<i>rabbit</i> (Kaninchen)
Rev	<i>reverse</i> (3' → 5')
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds per Minute
RQ	Relative Quantifizierung
RT	<i>Realtime</i>
s	Sekunde(n)
S	Synthese
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sh	<i>short hairpin</i>
si	<i>small interfering</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TZF	T-Zell-Faktor
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume/volume:</i> Volumen pro Volumeneinheit
w/v	<i>weight/volume:</i> Gewicht pro Volumeneinheit

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:Entstehung eines Karzinoms.	2
Abb. 1.2.: Darstellung der möglichen genetischen Veränderungen des kolorektalen Karzinoms.....	4
Abb. 1.3: Wirkungen von MYC auf die Zelle.....	6
Abb. 1.4: Transkription von MYC.	8
Abb. 1.5: CAP-abhängige Translation von MYC	10
Abb. 3.1: Zellzyklus-FACS:.....	37
Abb. 4.1: Polyklonale und Monoklonale Zellen.	44
Abb. 4.2: Einfluss von CIP2A auf das Wachstum der Zellen	46
Abb. 4.3: Hemmung der Proteintranslation durch CHX	48
Abb. 4.4: Angriffspunkte der verwendeten Inhibitoren beim Abbau von MYC-Protein	49
Abb. 4.5: CIP2A hat keinen Einfluss auf den Abbau von MYC-Protein.....	51
Abb. 4.6: Schematische Darstellung der MYC-mRNA.Konstrukte.....	52
Abb. 4.7: CIP2A reguliert die Translation von MYC-Protein	54
Abb. 5.1.: Modell einer möglichen Wirkweise von CIP2A.	60

III Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: siRNA und shRNA.....	17
Tab. 2.2: Primer für die quantitative Realtime PCR.....	18
Tab. 2.3: Primer für PCR-Amplifikation von shRNA-Klonierung	18
Tab. 2.4: Sequenzierprimer pInducer11	19
Tab. 2.5: Primäre Antikörper.....	19
Tab. 2.6: Sekundäre Antikörper	20
Tab. 2.7: Sonstige Antikörper	20

Eidesstaatliche Erklärung

Eidesstaatliche Erklärung

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Regulation of c-myc through CIP2A in colorectal cancer" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Spaichingen,
Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation "Regulation von c-myc durch CIP2A im kolorektalen Karzinom" eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Spaichingen,
Ort, Datum

Unterschrift

Anhang

Abdruckgenehmigung Abb. 1.1:



American Association for the Advancement of Science - License Terms and Conditions

This is a License Agreement between Gisela Schwarz ("You") and American Association for the Advancement of Science ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Association for the Advancement of Science, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date	01-Apr-2021	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order license ID	1108882-1	Publisher	AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE
ISSN	1095-9203	Portion	Chart/graph/table/figure

LICENSED CONTENT

Publication Title	Science	Country	United States of America
Author/Editor	American Association for the Advancement of Science.	Rightholder	American Association for the Advancement of Science
Date	01/01/1880	Publication Type	e-Journal
Language	English	URL	http://www.sciencemag.org/archive

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chart/graph/table/figure	Distribution	Worldwide
Number of charts / graphs / tables / figures requested	1	Translation	Other translation needs
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Enter languages	german
Who will republish the content?	Not-for-profit entity	Copies for the disabled?	No
Duration of Use	Life of current edition	Minor editing privileges?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Incidental promotional use?	No
Rights Requested	Main product	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	Regulation von c-myc durch CIP2A im kolorektalen Karzinom	Institution name	Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Instructor name	Eilers/ Wiegering	Expected presentation date	2021-07-01

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Gisela Schwarz
------------------------	-----	---	----------------

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	Cancer Genome Landscapes	Title of the article/chapter the portion is from	Fig. 2. Genetic alterations and the progression of colorectal cancer
Editor of portion(s)	Vogelstein	Author of portion(s)	American Association for the Advancement of Science.
Volume of serial or monograph	339	Issue, if republishing an article from a serial	6127
Page or page range of portion	1548	Publication date of portion	2013-03-29

Anhang

Abdruckgenehmigung Abb. 1.2:



Marketplace™

Springer Nature BV - License Terms and Conditions

This is a License Agreement between Gisela Schwarz ("You") and Springer Nature BV ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer Nature BV, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date	18-Mar-2021	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order license ID	1105283-1	Publisher	Nature Research
ISSN	1476-4687	Portion	Chart/graph/table/figure

LICENSED CONTENT

Publication Title	Nature	Publication Type	e-Journal
Article Title	Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.	Start Page	330
Date	01/01/1995	End Page	337
Language	English	Issue	7407
Country	United States of America	Volume	487
Rightholder	Springer Nature BV	URL	http://www.nature.com/nature/

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chart/graph/table/figure	Distribution	Worldwide
Number of charts / graphs / tables / figures requested	1	Translation	Other translation needs
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Enter languages	german
Who will republish the content?	Not-for-profit entity	Copies for the disabled?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Minor editing privileges?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Incidental promotional use?	No
Rights Requested	Main product, any product related to main product, and other compilations/derivative products	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	Regulation von c-myc durch CIP2A im kolorektalen Karzinom	Institution name	Institut für Biochemie und Molekularbiologie Würzburg
Instructor name	Eilers/ Wiegner	Expected presentation date	2021-07-01

ADDITIONAL DETAILS

The requesting person / organization to appear on the license: Gisela Schwarz

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer	Title of the article/chapter the portion is from	Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.
Editor of portion(s)	The Cancer Genome Atlas Network	Author of portion(s)	The Cancer Genome Atlas Network
Volume of serial or monograph	487	Publication date of portion	2012-07-18
Page or page range of portion	330-337		

Abdruckgenehmigung Abb. 1.4



Marketplace™

Springer Nature BV - License Terms and Conditions

This is a License Agreement between Gisela Schwarz ("You") and Springer Nature BV ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer Nature BV, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date	18-Mar-2021	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order license ID	1105284-1	Publisher	Nature Research
ISSN	1474-1768	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Nature Reviews Cancer	Publication Type	e-Journal
Article Title	The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics.	Start Page	849
Date	01/01/2001	End Page	861
Language	English	Issue	12
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland	Volume	9
Rightsholder	Springer Nature BV		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of images / photos / illustrations	1	Translation	Other translation needs
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Enter languages	german
Who will republish the content?	Not-for-profit entity	Copies for the disabled?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Minor editing privileges?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Incidental promotional use?	No
Rights Requested	Main product, any product related to main product, and other compilations/derivative products	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	Regulation von c-myc durch CIP2A im kolorektalen Karzinom	Institution name	Biochemie und Molekularbiologie Würzburg
Instructor name	Eilers/ Wiegering	Expected presentation date	2021-07-01

ADDITIONAL DETAILS

The requesting person / organization to appear on the license	Gisela Schwarz
---	----------------

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics.	Title of the article/chapter the portion is from	The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics.
Editor of portion(s)	Brooks, Tracy A.; Hurley, Laurence H.	Author of portion(s)	Brooks, Tracy A.; Hurley, Laurence H.
Volume of serial or monograph	9	Publication date of portion	2009-12-01
Page or page range of portion	849-861		