



Identifikation synthetisch-letaler Interaktionen mit dem Tumorsuppressor APC
und
Beeinflussung von MYC-Proteinmengen durch Translationsinhibition im
kolorektalen Karzinom

Identification of synthetic lethal interactions with the
tumour suppressor APC
and
Manipulation of MYC protein levels in colorectal cancer by translational inhibition

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Klinische Wissenschaften.

Vorgelegt von
Friedrich Wilhelm Uthe

aus

Heidelberg
Würzburg, 2017



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Buchberger

1. Betreuer: Prof. Dr. Martin Eilers

2. Betreuer: Prof. Dr. Stefan Gaubatz

3. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Behrens

Tag des Promotionskolloquiums:

Für Jette.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung	6
2 Summary	8
3 Einleitung	9
3.1 Das kolorektale Karzinom	9
3.2 Charakteristiken und Therapie des Kolorektalen Karzinoms	9
3.3 Das Darmepithel und molekulare Grundlagen des KRK	11
3.4 Adenomatous Polyposis Coli und der Wnt-Signalweg	15
3.5 Die Wirkung APC-trunkierender Mutationen	18
3.6 Das Protein Myc	20
3.7 Proteintranslation und ER-Stress	22
3.8 Synthetische Letalität	23
3.9 Zielsetzung der Arbeit	26
4 Ergebnisse synthetisch-letale APC-Interaktionen	27
4.1 Generierung einer FL-APC-induzierbaren Zelllinie	27
4.2 shRNA-Screen auf synthetisch letale APC-Interaktionen	32
5 Diskussion	49
6 Ergebnisse II Inhibition von MYC-Translation	60
7 Diskussion II	66
7.1 BEZ235 führt zu einer Erhöhung der zellulären MYC-Proteinkonzentration .	66
7.2 Proteintranslation als therapeutisches Interventionsziel	67
7.3 Silvestrol als mögliches Reagenz für eine therapeutische Intervention	67
8 Materialien und Methoden	70
8.1 Materialien	70
8.2 Chemikalien	70
8.3 Nucleinsäuren	70
8.4 Antikörper	71
8.5 Chemikalien	71
8.6 Puffer	72

8.7	Gebrauchsmaterialien	73
8.8	Geräte und Membranen	73
8.9	Molekularbiologische Methoden	75
8.9.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation	75
8.9.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	75
8.9.3	Messung von Nukleinsäurekonzentrationen	76
8.9.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	76
8.9.5	Isolation von RNA	76
8.9.6	cDNA-Synthese	76
8.9.7	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	77
8.9.8	Herstellung eines Tet-induzierbaren FL-APC Vektors	78
8.9.9	Klonierung von shRNAs in pRSI9	78
8.9.10	Klonierung von shRNAs in pLeGO	79
8.9.11	Sequenzierungen	79
8.9.12	shRNA-Screen und Auswertung	80
8.10	Zellbiologische Methoden	82
8.10.1	Passagieren von Zellen	82
8.10.2	Auftauen von Zellen	83
8.10.3	Einfrieren von Zellen	83
8.10.4	Transfektion von Säugerzellen mit Polyethylenimin (PEI)	83
8.10.5	Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamine 2000	83
8.10.6	Herstellung von Lentiviren in HEK293T-Zellen	84
8.10.7	Transfektion, Virusproduktion und Infektion	84
8.10.8	Gewinnung von Einzelklonen	85
8.10.9	Wachstumskurven	85
8.10.10	BrdU-Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (BrdU-PI-FACS)	85
8.10.11	Kristallviolett-Färbung	86
8.10.12	Boyden-Chamber Migrations assay	86
8.11	Proteinbiochemische Methoden	87
8.11.1	Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten	87
8.11.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	87
8.11.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	87
8.11.4	Western Blot	88
8.11.5	CAP-Pulldown	88
8.11.6	Polysomenanalyse	88

10 Appendix	113
10.1 Danksagung	113
10.2 Eigene Publikationen	114
10.2 Curriculum Vitae	115
10.3 Affidavit	116
10.4 Eidesstattliche Erklärung	116

Zusammenfassung

Der Tumorsuppressor APC ist in der Mehrzahl aller Fälle kolorektaler Karzinome bereits in der initialen Phase der Karzinogenese mutiert. Diese Mutationen führen zu einer aberranten Aktivierung des Wnt-Signalweges sowie zu weiteren die Karzinogenese vorantreibenden Aktivitäten, beispielsweise einem veränderten Migrationsverhalten. Dieser Dissertation zu Grunde liegt die Idee, dass durch die Trunkierung des APC-Proteins aber auch Abhängigkeiten von Genaktivitäten entstehen, die zuvor entbehrlich waren. Solche synthetisch letalen Gene sollten in einem *high-content* shRNA-Screen gefunden werden.

Für die Durchführung des Screens wurde ein von der SW480 Kolonkarzinomzelllinie abgeleitetes, isogenes Zellsystem generiert, welches durch Induktion mit Doxyzyklin das vollständige APC-Allel (FL-APC) exprimiert. Infolge dieser Expression zeigen die Zellen einen weniger malignen Phänotyp. Dies spiegelt sich darin wider, dass die Zellen durch FL-APC Expression in ihrer Wnt-Signalwegsaktivität eingeschränkt werden. Doxyzyklin-induzierte Zellen sind schlechter in der Lage ohne Adhäsion zu proliferieren als nicht induzierte Zellen. Andererseits ist ihre Fähigkeit einem FKS-gradienten entlang zu migrieren verbessert.

Der shRNA-Screen wurde mit der *Decipher* shRNA-Bibliothek durchgeführt. Diese enthält 27.500 verschiedene shRNAs mit Interferenzaktivität gegen 5.000 mRNAs, die potentiell pharmakologisch inhibierbare Proteine kodieren. Die besten zwei Kandidaten für eine synthetisch letale Interaktion mit trunkiertem APC, *BCL2L1* und *EIF2B5* wurden im Verlauf einer Masterarbeit bzw. direkt in dieser Dissertation validiert. *EIF2B5* zeigte *in vitro* nach Depletion durch unterschiedliche shRNAs einen differentiellen Proliferationseffekt bei FL-APC induzierten im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen. Dieser differentielle Effekt konnte in einem weiteren Modellsystem, SW480 Zellen mit konstitutiver FL-APC Expression, ebenfalls validiert werden.

Durch Expression einer shRNA mit Aktivität gegen *EIF2B5* werden in beiden Zellsystem die *unfolded protein response* (UPR) Gene *DDIT3* und *splXBP1* aktiviert. Interessanterweise werden durch die Expression von FL-APC diese Gene reprimiert. Im Promotor der *EIF2B5*-mRNA befindet sich eine Bindestelle für MYC. Es ist denkbar, dass durch die Expression von FL-APC eine globale Veränderung der Genexpression vorgenommen wird, die einerseits eine Repression von *EIF2B5* nach sich zieht aber andererseits eine hierdurch ausgelöste ER-Stress Antwort verhindert. Eine Inhibition von *EIF2B5* ohne diese Adaption andererseits führt nach diesem Model zu einer UPR-aktivierten Apoptose.

In einem zweiten Projekt wurde das überraschende Verhalten von Kolonkarzinomzellen untersucht, die nach Zugabe von BEZ235, einem dualen PI3K/mTOR Inhibitor, trotz gegenteiliger Erwartungen MYC-Proteinmengen erhöhen. Eine Repression wurde erwar-

tet, weil die Inhibition von PI3K einerseits zu einer proteasomalen Destabilisierung und andererseits die mTOR Inhibition zu einer verringerten Synthese von MYC führen sollte. Während bereits gezeigt werden konnte, dass durch einen FOXO-vermittelten Mechanismus MAPK-abhängig die MYC-Expression verstärkt wird, wurde in dieser Dissertation die erwartete Translationsinhibition untersucht. BEZ235 inhibiert zwar CAP-abhängige Translation, das MYC Protein wird jedoch aufgrund einer IRES-vermittelten Translation weiterhin exprimiert. Silvestrol, ein Inhibitor der Helikase eIF4A andererseits interveniert mit CAP- und IRES-abhängiger Translation und kann die MYC-Proteinkonzentrationen verringern. Wir konnten zudem feststellen, dass die Applikation von Silvestrol auch *in vivo* möglich und wirksam ist und zudem tolleriert wird. Dies gibt Anlass zur Hoffnung, dass eine Intervention der Translation auch im Menschen eine valide Strategie zur Behandlung MYC-getriebener Tumore sein könnte.

Summary

The tumoursuppressor APC is mutated in initiating colorectal cancers. These mutations lead to an aberrant activation of the wnt-signaling pathway and to further carcinogenic activities such as altered migration behaviour. The idea that novel dependencies upon previously expendable genes are generated through APC-mutations form the basis of this dissertation. These so called synthetic lethal Genes were searched for harnessing a high content shRNA screen.

We generated an isogenic cell system which was deviated from the colorectal cancer cell line SW480. These cells naturally express truncated APC. The generated system expresses a full-length allele upon doxycycline exposure. SW480 cells which are induced partially revert their malignancy. Anchorage independent growth is compromised and migration along a gradient of fetal calf serum is improved.

The Decipher shRNA library was used for screening. It consists of 27.500 different shRNAs interfering with the activity of 5.000 genes which are potentially drugable. The two best candidates scoring as hits in the screen were *EIF2B5* and *BCL2L1*. *BCL2L1* was validated in a cooperating masterthesis and *EIF2B5* could be validated in the course of this dissertation. Following *EIF2B5* depletion using different shRNA constructs, we were able to see differential behaviour in pTRE-APC cells as well as in a second model system in which FL-APC was expressed constitutively.

Interestingly an activation of the ER-Stress genes *DDIT3* and *splXBP1* can be seen after *EIF2B5* depletion. These genes are repressed, when FL-APC is expressed. The *EIF2B5* promoter has a MYC-binding site and we speculate, that FL-APC expression induces a genetic program which represses *EIF2B5* on the one hand, however prohibits the ER-Stress reaction which follows this trigger. Inhibition of *EIF2B5* without this global adaptation in gene expression on the other side initiates UPR-mediated apoptosis.

In a second project, the surprising behaviour of colon carcinoma cell lines, which upregulate MYC upon BEZ235 exposure was examined. The dual inhibitor was thought to downregulate MYC through its PI3K and mTOR inhibitory activities which were thought to destabilise and MYC and prohibit its expression, respectively. Whereas former work could demonstrate a FOXO-mediated, MAPK-dependent positive MYC-gene expression clue the aim of this thesis was to analyse the expected protein translational inhibition. Indeed, BEZ235 inhibits CAP-dependent translation, however the MYC protein is still translated through IRES-dependent translation. The eIF4A-inhibitor Silvestrol intervenes with both CAP- and IRES-dependent translation and can therefore reduce MYC protein levels.

Einleitung

3.1 Das kolorektale Karzinom

Mit über 1,3 Millionen Neuerkrankungen jedes Jahr weltweit stellt das Kolorektalkarzinom (KRK) trotz moderner Behandlungsmethoden eine therapeutische und gesellschaftliche Herausforderung dar [1]. Die Wahrscheinlichkeit, im Alter zwischen 0 und 74 Jahren an einem solchen Karzinom zu erkranken, beträgt in Industriestaaten circa 4,4%. Etwa 45% aller Patienten sterben an den Folgen der Erkrankung [1]. Das Risiko an einem KRK zu erkranken steigt mit dem Alter an und erreicht ein Maximum um das siebzigste Lebensjahr herum [2]. Risikofaktoren des KRK sind sowohl genetische, als auch mit dem Lebensstil verbundene Faktoren. Zu dem letztgenannten gehören Rauchen, Alkoholkonsum, Diabetes Melitus und der Genuss von rotem Fleisch [3, 4].

Zu den genetisch bedingten Prädispositionen zählen unter anderem das Peutz-Jeghers Syndrom, welches zumeist durch eine Mutation der Serin-/Threoninkinase STK11 ausgelöst wird, sowie die Familiäre Adenomatöse Poliposis (FAP), welche durch Mutationen des Tumorsuppressors Adenomatous Polyposis Coli (APC, siehe 3.4) hervorgerufen wird. Des Weiteren können kolorektale Karzinome als Folgeerkrankungen des Lynch-Syndroms (Verursachung MSI-positiver KRK, siehe 3.3), sowie die beiden entzündlichen Erkrankungen Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn verursacht werden.

Das KRK ist mit circa 60.000 publizierten Artikeln im Zeitraum von 2010 bis 2015 Gegenstand immenser wissenschaftlicher Bemühungen (www.gpubmed.org), die Mortalität und Inzidenz der Erkrankung konnten jedoch im gleichen Zeitraum nicht entscheidend gesenkt werden [1, 5]. Dies verdeutlicht den nach wie vor großen Bedarf an einem genaueren Verständnis der Krankheit sowie an verbesserten Behandlungs- und Präventionsstrategien.

3.2 Charakteristiken und Therapie des KRK

Kolorektale Karzinome werden je nach Entfernung zum Anus in Karzinome des Rektums (Entfernung < 16 cm) oder des Kolons eingeteilt. Die pathologische Einteilung der Erkrankung erfolgt nach der von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) vorgeschlagenen TNM Klassifikation (Tabelle 3.1). T beschreibt hierbei die Ausdehnung bzw. Invasionstiefe des Primärtumors beginnend von T1, einer Ausdehnung nur innerhalb der Submukosa, bis hin zu T4, einer Perforation des viszeralen Peritoneums oder Invasion in andere Organe. Die Variablen N und M beschreiben das Vorhandensein und Ausmaß von Metastasen. Die Prognose für den Erkrankungsverlauf unterscheidet sich deutlich für die verschiedenen Klassifikationen. So ist die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten, die bei

Tabelle 3.1: Das TNM Klassifizierungssystem

TNM	Merkmal/Metastasen
T1	Submukosa
T2	Muscularis propria
T3	Perirektal (Subklassifikation nach Größe)
T4	Perforation des viszeralen Peritoneums oder Invasion in andere Organe
N1	1-3 regionale Lymphknoten (Subklassifikation nach Anzahl/Ort)
N2	4 oder mehr Lymphknoten
M1	Fernmetastasen (Subklassifikation nach Anzahl der Betroffenen distalen Lymphknoten/ Organe)

Modifiziert nach: Glimelius et al. [6]

der Diagnose einen T1 Tumor ohne Metastasen haben, sehr gut (90-100%). Sie beträgt bei T2-T4 Tumoren ohne Metastasen 60-90%. Bei vorhandener lokaler Metastasierung (nodal positive Karzinome) liegt die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich zwischen 30 und 60% und schließlich beim Vorhandensein von Fernmetastasen lediglich bei 15-20%.

Die Therapie kolorektaler Karzinome unterscheidet sich je nach anatomischer Lage und TMN Klassifikation des Tumors. Es erfolgt stets eine operative Entfernung des Primärtumors sowie eventueller Metastasen und eine der Operation nachfolgende (adjuvante) Chemotherapie. Falls Metastasen inoperabel sein sollten oder bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen T3-4 oder N+, erfolgt vor der Operation eine neoadjuvante Chemotherapie [7]. Chemotherapien erfolgen bei KRK in der Regel nach dem FOLFOX- oder FOLFIRI Regime und enthalten 5-Fluorurazil (5-FU), Oxaliplatin und Irinotecan als Wirkstoffe.

5-FU ist ein Urazilderivat mit einer Fluorierung am C5 Atom des Urazils. Intrazellulär wird 5-FU in mehrere aktive Metabolite konvertiert, darunter Fluorodeoxyuridinmonophosphat, Fluorodeoxyuridin-triphosphat und Fluorouridin-triphosphat. Diese Metabolite wiederum hemmen die RNA-Synthese durch die Verursachung fehlerhafter Basenpaarungen und die Nukleotidbiosynthese durch Inhibition der Thymidylat-Synthase [8]. Oxaliplatin ist ein durch Weiterentwicklung von Cisplatin hervorgegangener Wirkstoff, der im Vergleich zu seinem seit den 1960er Jahren bekannten Vorgänger geringere Nebenwirkungen zeigt. Platinderivate entfalten ihre antineoplastische Wirkung durch die Bildung von DNA-Addukten, die Replikation und Transkription hemmen und dadurch zum Zelltod führen [9]. Irinotecan ist ein halbsynthetischer Wirkstoff, welcher aus dem in Rinde, Holz und Samen des Baumes *Camptotheca acuminata* enthaltenen Naturstoffes Camptothecin hergestellt wird. Dieser Wirkstoff wird intrazellulär zu SN-38, einem Topoisomeraseinhibi-

tor, hydrolysiert, der durch seine Wirkung ebenfalls zum Zelltod führt [10, 11].

Die von der UICC empfohlenen Chemotherapeutika der FOLFOX- und FOLFIRI Regimes haben damit essentielle zelluläre Prozesse als therapeutische Angriffspunkte. Damit verbunden sind signifikante Nebenwirkungen, die sich insbesondere bei schnell proliferierenden Zellen wie beispielsweise denen des Blutes, des Darmes und des Immunsystems bemerkbar machen [12]. In der Folge sind Anämien, Infektionen und Magen-Darm assoziierte Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Appetitverlust und Durchfall häufige Symptome, die durch chemotherapeutische Intervention ausgelöst werden.

3.3 Das Darmepithel und molekulare Grundlagen des KRK

Der Aufbau des Kolonepithels

Das Darmepithel besteht aus Krypten und Villi, Einstülpungen bzw. Ausstülpungen des Darmes (Siehe Abb. 3.1). Die beiden Strukturen dienen der Oberflächenvergrößerung der Darmschleimhaut und sind in unterschiedlichen Darmabschnitten morphologisch unterschiedlich ausgeprägt: So finden sich in den Dünndarmabschnitten Zotten, fingerförmige Ausstülpungen, an denen sich wiederum Krypten und Villi befinden. Diese werden von Duodenum (Zwölffingerdarm) nach Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm) zunächst dünner und dann kleiner. Im Kolon finden sich schließlich keine Zotten mehr, sondern lediglich eng aneinander stehende Krypten und Villi ([13]).

Unabhängig von diesen morphologischen Aspekten finden sich entlang einer Krypte-Villus-Achse jeweils eine Stammzellnische am Grund der Krypte, gefolgt von einer Proliferationszone (*transient amplifying compartment*) im mittleren Bereich der Krypte. Diese geht wiederum in eine Differenzierungszone über, welche bis zur Spitze des Villus reicht [15]. Die Stammzellnische wird durch die Anwesenheit von Paneth-Zellen generiert. Neben ihrer wichtigen Funktion in der Immunabwehr des Verdauungsapparates sekretieren diese Zellen in den Darmkrypten die Faktoren EGF, Wnt3, und den Notch-Liganden Dll4 [16]. Hierdurch entsteht ein für die Erhaltung der Stammzellidentität der Zellen nötiges Mikromilieu. Die Stammzellen des Kolons sind durch ihre Position innerhalb dieser Nische definiert und teilen sich symmetrisch, das heißt beide Tochterzellen haben das Potential Stammzellen zu sein und lediglich die Präsenz der Zellen innerhalb der Nische oder der Proliferationszone bestimmt ihr weiteres Schicksal [17, 18]. Innerhalb einer Krypte befinden sich beim Menschen circa fünf bis sechs funktionelle Stammzellen. Tochterzellen einer Stammzelle haben eine statistische Chance von circa 20%, die komplette Stammzellnische zu übernehmen, ein Vorgang, der als *neutral drift* in murinen Modellen gut beschrieben ist [19]. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Übernahme der Stammzellnische zustande kommt, steigt durch Mutationen von Tumorsuppressoren und Onkogenen stark an [19, 20]. Diejenigen Zellen, welche aus der Stammzellnische in die Proliferationszone verdrängt werden, teilen sich einige Male rapide, bevor sie schließlich die Differenzierungszone erreichen. Hier

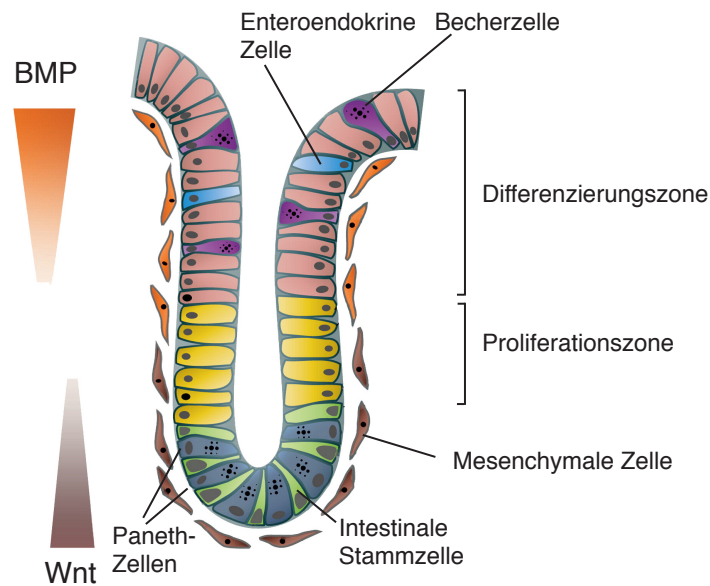


Abbildung 3.1: Das Kolonepithel

Das Kolonepithel kann in drei Zonen eingeteilt werden, die Stammzellnische am Boden der Krypte, der sich anschließenden Proliferationszone, die etwa bis zu der Hälfte der Krypte reicht, sowie der Differenzierungszone, welche bis zu der Spitze des Villus reicht. Paneth- und mesenchymale Zellen sekretieren Wnt und generieren damit einen Gradienten mit der größten Wnt-Konzentration in der Stammzellnische. Proximal des Villus sekretieren mesenchymale Zellen BMP, welches einen Gradienten spiegelbildlich des Wnt-Gradienten bildet. Die Identität der Stammzelle wandelt sich in Abhängigkeit dieser beiden Gradienten von Stammzelle zu transient amplifizierender Zelle zu terminal differenzierter Zelle. Modifiziert nach Krausova and Korinek [14].

angekommen differenzieren die Zellen zu Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrinen Zellen, die auf Nährstoffaufnahme, Mukusproduktion bzw. Hormonproduktion spezialisiert sind [14]. Entlang der Krypte-Villus-Achse entsteht durch die Wnt-Sekretion (der Paneth-Zellen, aber auch der mesenchymalen Zellen) ein Gradient, der das Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Darmepithelzellen steuert (Siehe 3.4, [14]). Die terminal differenzierten Zellen erreichen schließlich die Spitze des Villus, werden dort apoptotisch und in das Darmlumen abgestoßen [21].

Molekulare Charakterisierung des KRK

Bei der Mehrheit der KRK handelt es sich um Adenokarzinome, welche normalerweise aus Adenomen entstehen. Bereits vor annähernd 30 Jahren wurde dieser, als Adenom-Karzinom Sequenz bekannt gewordene Ablauf, von Vogelstein et al. [22] beschrieben. Durch Mutation des *APC*-Gens in einem Allel und Mutation oder den Verlust des zweiten Allels durch *loss of heterozygosity* (siehe Seite 15) kommt es zur der Bildung benignen Adenome. Es folgen weitere Mutationen, beispielsweise in den Genen *TP53*, *KRAS* oder *TGF- β* , durch die die

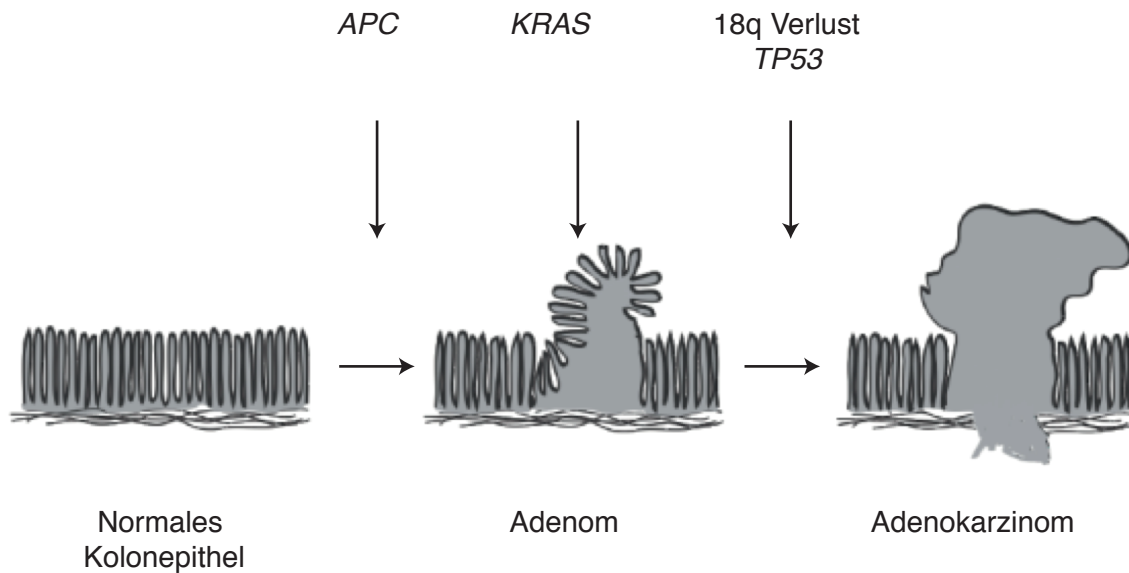


Abbildung 3.2: Die Adenom-Karzinom-Sequenz

Nach Fearon and Vogelstein [23] 1990, siehe auch [7, 24]: Nach dem von Fearon und Vogelstein vorgeschlagenen Modell bilden sich KRK in einer Adenom-Karzinom-Sequenz. Durch Mutation oder Verlust von *APC* kommt es zur Bildung von benignen Adenomen (siehe Seite 15). Es folgen weitere Mutationen, die beispielsweise *KRAS* aktivieren, *p53* inaktivieren oder den Verlust des Apoptose-induzierenden Rezeptors *Deleted in Colorectal Cancer* (*DCC*) nach sich ziehen. Es kommt schließlich zur Ausbildung eines malignen Tumors.

zuvor benignen Adenome zu malignen Adenokarzinomen werden.

Die somatische Mutationsrate in gesunden Zellen wurde auf etwa 10^{-9} pro Nukleotid und (Zell-)Generation bestimmt und es erscheint unwahrscheinlich, dass die zahlreichen Mutationen, welche in KRK auffindbar sind ohne eine zusätzliche Form von genetischer Instabilität zustande kommen [25]. In der Tat sind die allermeisten Tumore genetisch instabil, wobei eine zusätzliche Einteilung der Tumore aufgrund dem der Instabilität zu Grunde liegenden Mechanismus in drei Kategorien üblich ist:

Chromosomale Instabilität (CIN): Etwa 65–70% aller KRK sind chromosomal instabil. Infolgedessen finden sich bei diesen Tumoren Chromosomenanomalien wie Aneuploidien, Amplifikationen und Allelverluste [26]. Mutationen in Genen mit Funktionen bei der DNA-Reparatur (*ATM*, *ATR*), Telomerregulation (*TERT*) und Chromosomensegregation (*BUB1*, *AURKA*, *PLK1*, *APC*) sowie Mutationen von *TP53* können ursächlich für diese Instabilität sein. Da sich diese Mutationen im Verlauf der Karzinogenese anhäufen, nimmt die chromosomale Instabilität im Krankheitsverlauf zu. Es wurde eine weitere Subkategorisierung von CIN-positiven Tumoren in stark und schwach chromosomal instabile (*CIN-high*, *CIN-low*) Tumore vorgeschlagen [27]. Ob diese Kategorien eine klinische

Relevanz besitzen, konnte jedoch bisher nicht klar gezeigt werden.

Mikrosatelliten-Instabilität (MSI): Eine weitere Quelle genomischer Instabilität sind Mutationen in DNA-Reparaturgenen, beispielsweise *MLH1*, welche für die Reparatur von fehlerhaften Basenpaarungen benötigt werden. In der Folge werden Mutationen vor allem in stark repetitiven Sequenzen akkumuliert, da die DNA-Replikation hier fehleranfälliger ist [28]. Während MSI bei fast allen Fällen des Lynch-Syndroms vorhanden ist, findet sie sich bei KRK hingegen lediglich in circa. 15-20% aller Fälle [29]. MSI Tumore sind häufiger im proximalen Kolon vorhanden, weniger invasiv und haben eine bessere Prognose als Mikrosatelliten-stabile (MSS) Tumore [30].

CpG Methylierender Phänotyp (CIMP): Dieser Phänotyp zeichnet sich durch epigenetische Instabilität aus, bei der *Cytosin-Guanin-Dinukleotid repeat*-Sequenzen (CpG-Inseln) an der Cytosin Base zu 5'-Methylcytosin methyliert werden. In Promotorregionen von Genen führt dies zur Inaktivierung des betroffenen Gens [31]. CIMP+ Tumore haben eine hohe Wahrscheinlichkeit durch die Promotor CpG-Methylierung von *MLH1* auch einen MSI-Phänotyp zu generieren [32] und tatsächlich entsteht die Mehrzahl MSI+ Tumore durch diesen Mechanismus [33]. Patienten mit CIMP+ aber MSS Tumoren haben eine schlechte Prognose [34]. Die globale Methylierung von Genen nimmt mit dem Alter zu und dies scheint mitverantwortlich für die altersabhängige Prädisposition für KRK zu sein [33–35].

Der exakte Ursprungsort kolorektaler Karzinogenese ist Gegenstand intensiver Diskussionen: Es gibt die Beobachtung, dass Zellen mit primären genetischen Läsionen im *APC*-Gen die Stammzellnische analog der Beobachtungen im Mausmodell auch im Menschen übernehmen können [36]. Krypten mit *APC*-mutierten Zellen enthalten mehr Stammzellen als eine normale Krypte und es kommt zu häufigen Fusionen mit benachbarten Krypten. Die betroffenen Zellen werden durch die oben beschriebenen Mechanismen genetisch instabil und es entsteht ein Adenom, welches in die Proliferationszone infiltriert. Dieser Weg der Adenom-Entstehung wird als *Bottom-Up*-Hypothese in der Literatur beschrieben. Solche dysplastischen Krypten können hauptsächlich in Personen mit FAP nachgewiesen werden, bei spontanen Adenomen hingegen selten. Häufiger scheint sich bei diesen Tumorerkrankungen der Ursprung der Karzinogenese in der Proliferationszone oder der Differenzierungszone zu befinden. Dysplastische Zellen können bei histologischen Analysen von Adenomen zumeist an der luminalen Seite des Kolon nachgewiesen werden. Unter ihnen befinden sich normale Krypten ohne Mutationen im *APC*-Gen [37]. Diese Beobachtungen sind konsistent mit dem *Top-Down* Modell der Kolonkarzinogenese, nach dem sich die primären Adenome zunächst lateral und erst später zum Grund der Krypten ausbreiten. Unabhängig von dem genauen Ort der Krebsentstehung ist in allen Modellen konsistent beschrieben, dass das *APC*-Gen das am häufigsten mutierte Gen in der frühen Kolonkarzinogenese ist.

3.4 Adenomatous Polyposis Coli und der Wnt-Signalweg

Das Adenomatous Polyposis Coli (*APC*) Gen besteht aus 8535 bp, die über 21 Exons verteilt sind. Das kodierte Protein besteht aus 2843 Aminosäuren (AS) und hat ein Molekulargewicht von 311 kDa. Durch APC werden zahlreiche pleiotrope zelluläre Prozesse reguliert: Im Wnt-Signalweg beeinflusst es die Konzentration und Lokalisierung des Transkriptionsfaktors β -CATENIN. Beim aktivierten Signalweg, beispielsweise physiologisch durch die Präsenz eines Wnt-Liganden, kann dieser Faktor in den Zellkern translozieren und reguliert dort die Genexpression, u.a von *CCND1*, *AXIN2* und *MYC* (weitere Zielgene siehe: The Wnt Homepage). Dies wiederum ermöglicht eine Transition des Zellzyklus von G0/G1 in die S-Phase. Eine Interaktion von APC mit dem humanen *discs large* Protein (hDLG) kontrolliert den Zellzyklus ebenfalls an dieser Stelle [38]. Durch APC werden außerdem Zelldifferenzierung (s.o. und [14]), Migrations- und Adhäsionsverhalten [39, 40], Embryogenese [41, 42], Mitose [43, 44] und Zellpolarität [45] direkt oder indirekt reguliert. In den folgenden Abschnitten sollen zunächst die Domänenstruktur des APC-Proteins und anschließend die Regulation einiger der genannten Prozesse detaillierter beschrieben werden.

Die Domänenstruktur des APC-Proteins ist in Abbildung 3.3 dargestellt: Proximal des N-Terminus befindet sich eine Oligomerisierungsdomäne, welche aus Wiederholungen von sieben Aminosäuren (*heptad repeats*) besteht und die Bildung von APC-Oligomeren erlaubt.

Es schließt sich die Armadillo-Region des Proteins an. Diese ist stark homolog zu dem Protein Armadillo, dem *Drosophila melanogaster* Homolog von β -CATENIN [46], und erlaubt Interaktionen mit der Protein Phosphatase 2A (PP2A) und dem APC-stimulierten Guaninnukleotid-Austauschfaktor ASEF1 [47]. ASEF1 vermittelt Interaktionen zum Zytoskelett durch seine Funktion als GTP-Austauschfaktor für das kleine G-Protein CDC42 [40]. PP2A kann über seine katalytische Untereinheit zudem auch an AXIN [48] binden und eine Rolle dieser Phosphatase in der Degradation von β -CATENIN wird diskutiert (siehe Seite 17). Des Weiteren konnte eine direkte Interaktion mit Intermediärfilamenten, welche von der Armadillo-Region ausgeht, gezeigt werden [49].

Der zentrale Teil des APC-Proteins beinhaltet Interaktionsdomänen, welche an der Bindung und Regulation von β -CATENIN beteiligt sind [50]. Im kanonischen Wnt-Signalweg ermöglicht APC im Degradationskomplex den proteasomalen Abbau von β -CATENIN. Auf der N-Terminalen Seite des zentralen Bereiches befinden sich zunächst vier 15 AS Wiederholungen zwischen den AS 1020 und 1169 (15R A-D, siehe Abb. 3.3). Diese ermöglichen eine Bindung von APC an β -CATENIN [51]. Die Bindung von β -CATENIN mit jeder, außer der letzten (15R-D) der Wiederholungen ist suffizient für eine effektive Degradation [52]. Es folgen Wiederholungen von 20 Aminosäuren, 20R1 - 20R8, die sich in ihrer Fähigkeit β -CATENIN zu binden und ihrer Beteiligung an dessen Degradation un-

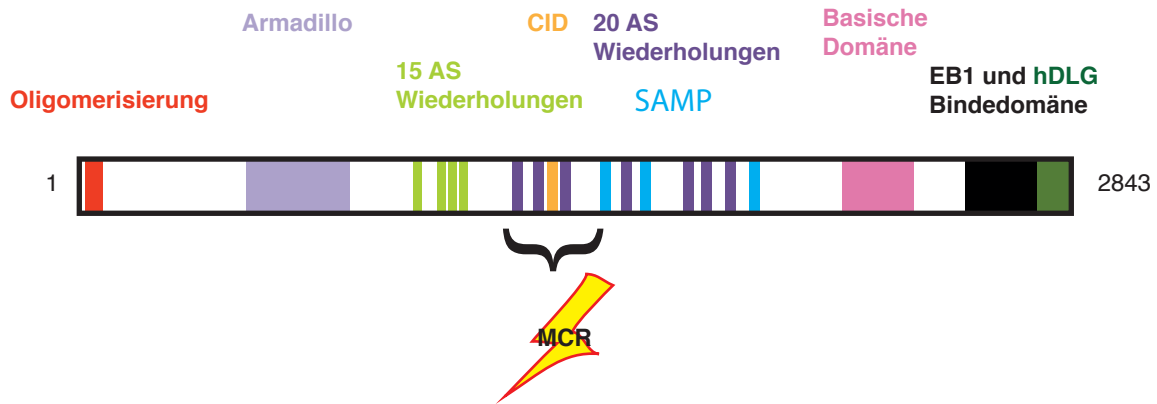


Abbildung 3.3: Domänenstruktur des APC-Proteins

Modifiziert nach [39] und Kohler et al. [50]. Proximal zum N-Terminus befindet sich die Oligomerisierungsdomäne des Proteins. Zwischen den Aminosäuren 453 und 767 befinden sich *Armadillo repeats*, gefolgt von 15 und 20 Aminosäure-Sequenz-Wiederholungen, *SAMP repeats* und der CID in der Mitte der AS-Sequenz. Im Anschluss daran befindet sich eine basische Domäne und schließlich am C-Terminus zwei Bindedomänen für die Proteine hDLG und EB1.

terscheiden. Einige dieser Wiederholungen wurden diesbezüglich in Studien mit mutierten 20R-Regionen untersucht [52, 53]. Hiernach bindet 20R1 β -CATENIN nach Phosphorylierung effizient, scheint jedoch nicht direkt an dessen Abbau beteiligt zu sein. 20R2 ist nicht in der Lage, β -CATENIN zu binden, während 20R3 suffizient für eine β -CATENIN-Bindung und dessen Degradation ist. Zwischen den 20 AS-Wiederholungen eingeschlossen sind drei Wiederholungen der AS-Sequenz Ser-Ala-Met-Pro (*SAMP repeats*) [54]. Diese vermitteln die Bindung von APC an AXIN/CONDUCTIN und führen ebenfalls zur proteasomalen Degradation von β -CATENIN [54]. Diese Degradation ist ohne eine direkte Bindung von β -CATENIN an APC möglich [52]. Eine weitere β -CATENIN-regulatorische Proteindomäne wurde zwischen den AS 1417 und 1429 (zwischen 20R2 und 20R3) kartiert und als *β -CATENIN inhibitory domain* (CID) beschrieben. APC-Fragmente, welche die CID aber keine *SAMP repeats* enthalten, sind in der Lage eine Degradation von β -CATENIN einzuleiten [53]. Nahe dem C-Terminus befinden sich eine basische Domäne und je eine Bindestelle für das Protein *End-Binding 1* (EB1) und hDLG. Die basische Domäne ist zwischen den AS 2200 und 2400 gelegen und enthält zahlreiche Arginin-, Lysin- und Prolinreste [46]. Sie ermöglichen eine direkte Interaktion mit Aktin und Mikrotubuli [55, 56]. EB1 kann die Bindung von APC zu Mikrotubuli und Aktin inhibieren [55]. Die Bindung von hDLG1 an APC wird durch dessen PDZ-Domäne vermittelt. Es wurde zudem ein ternärer Komplex mit dem Tumorsuppressor *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) gezeigt, dieser Komplex wurde jedoch bisher nicht funktionell untersucht [57].

Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg lässt sich in drei verschiedene Signalwege einteilen: Den viel beschriebenen kanonischen Wnt-Signalweg und die zwei, als nicht-kanonische Wnt-Signalwege beschriebene Signalkaskaden, *Cell Polarity Pathway* (PCP) und Wnt/Ca²⁺ Signalweg [14]. Die Beschreibung der beiden nicht-kanonischen Signalwege geht über den Fokus dieser Arbeit hinaus, es sei hierfür auf die aktuelle Literatur verwiesen [14, 58].

Der kanonische Wnt-Signalweg hat β -CATENIN als Effektormolekül. In der Abwesenheit eines Wnt-Liganden wird β -CATENIN durch den Degradationskomplex kontinuierlich ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Dieser stetige Abbau wird durch die Bindung eines Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled gestoppt, was eine Akkumulation von β -CATENIN im Zytoplasma und Nukleus zur Folge hat [59]. β -CATENIN kann im Nukleus zusammen mit Transkriptionsfaktoren wie TCF und LEF1 interagieren und damit Genexpression regulieren [60, 61]. Zum Degradationskomplex gehören neben β -CATENIN und APC auch die beiden Kinasen Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) und Casein-Kinase 1 (CK1) sowie die Gerüstproteine AXIN, AXIN/CONDUCTIN und die E3-Ubiquitin-Ligase β -TrCP. Der Abbau von β -CATENIN wird durch die Phosphorylierung an S45 durch CK1 eingeleitet. P-S45- β -CATENIN wird nun von GSK3 erkannt und zunächst an T41 und danach an S33 und S37 phosphoryliert. Hierdurch wird β -CATENIN zum Substrat für β -TrCP, durch dieses ubiquitiniert und anschließend proteasomal degradiert [59]. Diese Phosphorylierungssequenz wird durch das Protein AXIN ermöglicht, welches die Kinasen im Degradationskomplex proximal zu β -CATENIN bindet [62]. Das durch β -CATENIN induzierte Protein AXIN/CONDUCTIN führt zu einer weitaus effizienteren Degradation von β -CATENIN und stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar [54, 63].

Die Rolle von PP2A bei der β -CATENIN-Degradation ist Gegenstand von Diskussionen. PP2A kann sowohl APC als auch AXIN binden [48, 64] und die Phosphorylierung von APC beeinflussen [65]. Nach einem von Kielmann und Xu vorgeschlagenen Modell der β -CATENIN-Degradation durch den Degradationskomplex phosphorylieren CK1 und GSK-3 neben β -CATENIN auch APC in der 20AS-Wiederholungsregion, nachdem β -CATENIN bereits phosphoryliert wurde [66]. Diese Phosphorylierung führt zur Dissoziation von β -CATENIN von AXIN und Bindung an APC, wodurch AXIN wiederum zur Aufnahme eines neuen Moleküls β -CATENIN frei wäre. β -CATENIN-gebundenes APC kann hiernach durch PP2A dephosphoryliert werden. Dies verringert die Affinität des Proteins zu β -CATENIN. β -CATENIN ist nun in der Lage zu dissoziieren und ein neuer Zyklus von β -CATENIN- und APC-Phosphorylierung kann starten.

Weitere APC-Funktionen

APC und EB1 sind an der chromosomalen Segregation während der Mitose beteiligt. Beide Proteine üben ihren Einfluss hier über die dynamische Steuerung von

Mikrotubuli aus und RNA-Interferenzexperimente mit einem oder beiden der genannten Faktoren führen zu fehlerhaften Chromosomensegregationen [43, 67]. Interessanterweise sind diese Effekte bei einem gleichzeitigen *knockdown* beider Proteine nicht additiv. Auch lösen sie, im Gegensatz zu RNA-Interferenzexperimenten mit anderen an dem gleichen Prozess beteiligten Proteinen, wie CLIP170 und LIS1, keinen mitotischen Zellzyklusarrest aus. EB1 hat einen die Mikrotubulidynamik steuernden *antipausing*-Effekt. Dieser wird durch eine Interaktion mit APC reguliert und ist für die richtige Verknüpfung von Mikrotubuli mit den Chromosomen von Bedeutung, was durch den dominant-negativen Effekt von APC-Mutationen deutlich wird (Siehe 3.5)

APC beeinflusst das Migrationsverhalten von Zellen durch seine Interaktionen mit Zytoskelett-reorganisierendem GEF ASEF1 ([68]). ASEF1 übt seine Kontrolle auf diesen Prozess aus, indem es die GTPasen RHO, RAC1 und CDC43 aktiviert, deren Rolle in der Migration von Zellen gut beschrieben ist [69]. APC lokalisiert in Membranprotrusionen und kann hier, durch seine Fähigkeit die ASEF1 Aktivität zu regulieren, Einfluss auf den Migrationsprozess nehmen [68, 70]. Migration ist ein ATP-abhängiger Prozess und für die effiziente Migration von Epithelzellen bedarf es der Lokalisation von Mitochondrien in Membrannähe ([71]). APC scheint neben den beschriebenen Effekten auch die Verfügbarkeit von ATP in Membrannähe zu erhöhen, indem es in einem Komplex mit Miro, Milton und KIF5 den anterograden (zur Plasmamembran hin gerichteten) Transport von Mitochondrien verstärkt [72]. Milton agiert hier als ein Adapter zwischen dem mitochondrialen Membranprotein Miro und dem Kinesin KIF5. APC-Mutationen führen zu geringerer Assoziation von Mitochondrien mit der Plasmamembran und die Expression von vollständigem APC in Zelllinien mit trunkierten *APC*-Allelen verstärken diese Assoziation.

3.5 Die Wirkung APC-trunkierender Mutationen

Bei der absoluten Mehrzahl aller KRK liegen Mutationen in APC vor [73]. Diese Mutationen sind normalerweise kleine Insertionen oder Deletionen, die das Leseraster der proteinkodierenden mRNA-Sequenz verschieben, oder Substitutionen, die zu einer *nonsense*-Mutation führen. Besonders gehäuft treten Mutationen innerhalb der ersten drei 20 AS Wiederholungsregionen des Proteins auf - einer Region, die aufgrund dessen als *mutation cluster region* bezeichnet wird (Siehe Abbildung 3.3 und [50]). Durch die beschriebenen Mechanismen, oder durch eine bereits in der Keimbahn vorhandene Mutation, kommt es zunächst zu einem heterozygoten Allel mit einem wildtypischen und einem fehlerhaften *APC*-Gen. Das zweite Allel kann nun ebenfalls durch eine der beschriebenen Mutationen trunkieren. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es durch fehlerhafte chromosomale Segregation während der Mitose oder Genkonversion (Weinberg [74] S. 218 f.) zu einem Verlust des zweiten, intakten Allels kommt (*loss of heterozygosity*, LOH) ([75]). Welcher Mechanismus für diesen zweiten "*hit*" verantwortlich ist, wird von einem starken selektiven Druck beein-

flusst. Dieser führt einerseits in wenigstens einem der trunkierten *APC*-Allele zur Erhaltung der ersten 20 AS Wiederholung, lässt aber andererseits in keinem Allel *SAMP repeats* zu [50]. Dieses Modell ist kompatibel mit der Beobachtung, dass ein durch RNA-Interferenz-vermittelter Verlust des trunkierten APC-Proteins einen Proliferationsnachteil für die betroffenen Zellen nach sich zieht [76]. Zudem erleben Tiere des Mausmodells APC^{1638T} , mit trunkierender Mutation in der AS 1638 in beiden Allelen des *APC*-Gens, welche den ersten *SAMP repeat* enthält, ohne die Entstehung von KRK ihr gesamtes erwachsenes Leben ([77] und Abbildung 3.3). FAP-Patienten mit einer trunkierenden Mutation vor der ersten 20 AS Wiederholung neigen dazu, im zweiten Allel ebenfalls eine trunkierende Mutation zu erleiden, welche sich dann innerhalb des oben beschriebenen Bereiches befindet. Hingegen zeigen FAP-Patienten mit Mutationen innerhalb der MCR zumeist eine LOH [50]. Die β -CATENIN-regulatorische Funktion, welche von CID ausgeht, wird von N-terminalen Fragmenten, welche die CID nicht enthalten, inhibiert. Entsprechend gibt es hier ebenfalls einen Selektionsdruck, der zum Verlust dieser Domäne in wenigstens einem der beiden *APC*-Allele führt [53].

KRK heben durch die APC-Trunkierung ihre Fähigkeit, die β -CATENIN-Proteinkonzentration zu regulieren, nicht vollständig auf. Sie sind vielmehr in der Lage, den Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert zu belassen, aber dennoch kein überschießendes Wnt-Signal zu generieren, welches einen selektiven Nachteil hervorrufen würde (*just right signaling*, [78]). Mutationen im *APC*-Gen führen zu einer weniger effizienten β -CATENIN-Degradation und verlängern die Halbwertszeit von β -CATENIN von circa 50 Minuten auf etwa 3 Stunden [79]. Dies zieht deutlich höhere zelluläre Konzentrationen von β -CATENIN nach sich. Experimentell konnte gezeigt werden, dass RNA-Interferenz des trunkierten APC zu einer weiteren Erhöhung dieser Konzentration führt und einen Wachstumsnachteil *in vitro* und *in vivo* nach sich zieht [78].

APC-trunkierende Mutationen führen sowohl im APC^{\min} als auch im APC^{1638T} Mausmodell zu chromosomaler Instabilität. Fodde et al. [80] haben beschrieben, dass durch die APC-Mutation die Interaktion von APC mit EB1 unterbrochen wird (siehe auch Abb. 3.3). In embryonalen Stammzellen der angesprochenen Mausmodelle ist EB1 nicht wie in wildtypischen Zellen am Kinetochor lokalisiert, was impliziert, dass Volllängen-APC für diese Lokalisierung notwendig ist. Bereits die Expression von nur einem trunkierten *APC*-Allel in Hek293-Zellen kann einen dominant-negativen Effekt auf mitotische Zellzyklusarretierung nach Spindelfaserfehlzuordnungen haben und so einen CIN-Phänotyp auslösen [67, 81]. Dies unterstützt die Hypothese, dass APC-Trunkierungen demnach auch im Menschen CIN verursachen, deren Auswirkungen jedoch zunächst noch durch die Wirkung des Tumorsuppressors p53 großteils unterdrückt werden können.

Auch das Migrationsverhalten von Epithelzellen wird durch APC gesteuert (siehe Seite 3.4) und APC-Mutationen stören die gerichtete Migration in vielen Modellsystemen [82]. Bereits heterozygote Systeme zeigen Fehler bei der gerichteten Zellmigration ohne eine

Beeinflussung der Geschwindigkeit und Motilität [82]. Migrationsdefekte in APC-mutierten KRK-Zelllinien werden häufig durch die APC-Interaktion mit ASEF1 und die dadurch gesteuerte Zytoskelett-Reorganisation erklärt. Da ASEF1 jedoch nahe des N-Terminus von APC bindet, ist die Interaktion auch bei N-terminalen APC-Fragmenten vorhanden und folglich sollte ein Effekt hier durch eine veränderte Regulation erfolgen (siehe Abb. 3.3).

3.6 Das Protein Myc

Sowohl die Mutation von APC als auch andere, häufig in kolorektalen Karzinomen auftretende Mutationen wie beispielsweise in KRAS oder PI3K haben die Gemeinsamkeit, dass durch sie die MYC-Proteinmengen ansteigen [73]. Das Protein Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (MYC) ist ein Transkriptionsfaktor, der in den meisten humanen Tumoren überexprimiert wird. Neben den bereits beschriebenen (siehe Seite 3.6) Signalwegsmutationen können auch Amplifikationen des *MYC*-Gens (bei Magenkarzinomen) oder Translokationen zu einer Überexpression von MYC führen. Translokationen des *MYC*-Gens sind häufig in leukämischen Tumorerkrankungen zu finden. Der *open reading frame* (ORF) des *MYC*-Gens gelangt hierbei unter die Kontrolle eines stark aktiven Promotors wie beispielsweise dem T-Zell-Rezeptor bei akuten Leukämien oder des Immunglobulin-Promotors in Burkitt-Lymphomen [83, 84]. Kolorektale Tumore sind von der Überexpression von MYC abhängig: Die Deletion des *MYC*-Gens in Mausmodellen kolorektaler Karzinome, ausgelöst durch APC-Verlust, führt zur Regression entstandener Tumore [85]. Neben der Regulation des MYC-Proteins durch Beeinflussung der *MYC*-mRNA ist auch extensiv die Beeinflussung von MYC-Proteinmengen durch Regulation der MYC-Degradation gezeigt. MYC wird nach Ubiquitinierung, beispielsweise durch die Ubiquitin-E3-Ligase FBXW7, proteasomal degradiert. Die FBXW7-abhängige Degradation von MYC wird durch Phosphorylierung der AS S62 eingeleitet. P-S62 MYC wird anschließend durch GSK3 erkannt, welches MYC wiederum an T58 phosphoryliert. Nach Dephosphorylierung von S62 durch PP2A wird MYC schließlich als Substrat von FBXW7 erkannt und ubiquitiniert [86]. Ubiquitiniertes MYC kann von USP28 deubiquitiniert und so vor der proteasomalen Degradation bewahrt werden. Sowohl eine Überexpression von USP28 als auch FBXW7-Mutationen führen somit zu einer Akkumulation von MYC. Beides ist für KRK beschrieben worden [87, 88].

MYC entfaltet seine Wirkung durch die Modulation von Genexpression. Hierfür bindet es an DNA-Sequenzen mit der Konsensus-Sequenz CACGTG (Ebox). Zusammen mit Dimerisierungspartnern wie MAX (*MYC-activated-protein X*) beeinflusst MYC die Aktivität von Promotoren. Die Affinität, mit der MYC an verschiedene Promotoren bindet, unterscheidet sich hierbei für unterschiedliche Gene. Promotoren mit hoher Affinität zu MYC werden bereits bei sehr niedrigen zellulären MYC-Proteinmengen besetzt. DNA-Sequenzen mit geringer Affinität zu MYC bedürfen entsprechend höherer MYC-Konzentrationen um besetzt, und damit von MYC beeinflusst zu werden. Wenn es zu

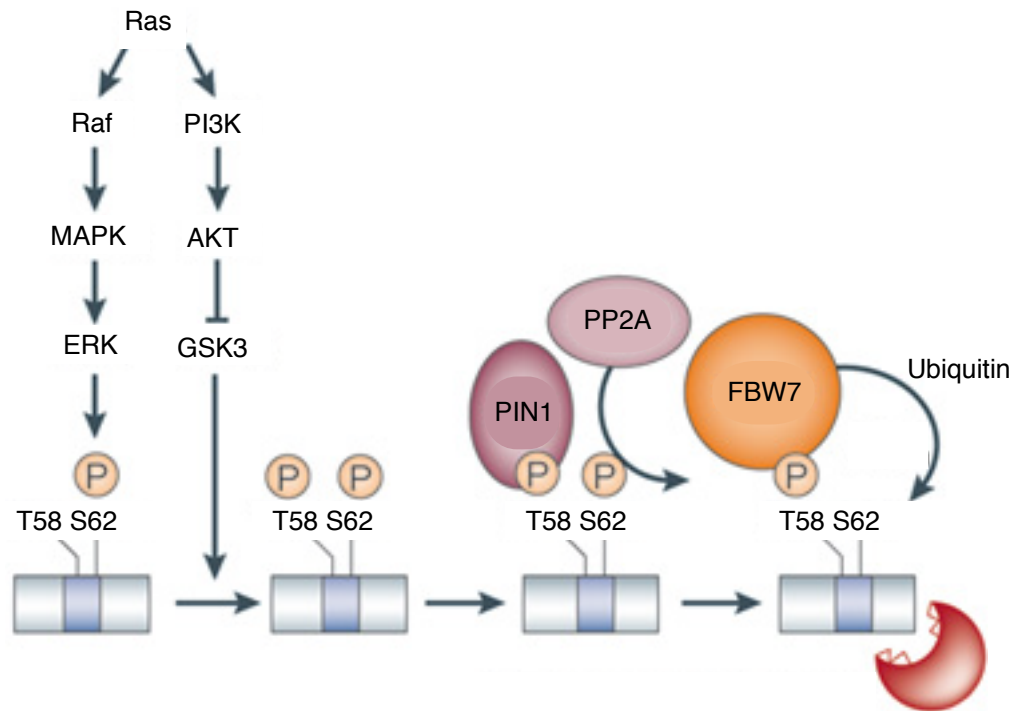


Abbildung 3.4: Proteasomale Degradation von MYC (aus [86])

Die proteasomale Degradation von MYC wird durch Phosphorylierung des AS-Restes S62 durch die Kinase ERK eingeleitet. Diese Phosphorylierung macht den Rest T58 zu einem Substrat für GSK3; Es kommt zu einer Phosphorylierung des Selben. Die Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase PIN1 isomerisiert daraufhin das MYC-Peptidrückgrat. MYC wird nun von der Phosphatase PP2A als Substrat erkannt und an S62 wieder dephosphoryliert. Das so modifizierte MYC kann in der Folge von der Ubiquitinligase FBW7 ubiquitiniert und anschließend proteasomal degradiert werden.

einer sehr starken Aktivierung des *MYC*-Gens kommt, werden schließlich auch Promotoren mit nicht-Konsensussequenzen von *MYC* besetzt. Dies ist beispielsweise bei onkogener Aktivierung, aber auch physiologischen Prozessen wie der exponentiellen Expansion aktivierter Lymphozyten der Fall [89–91]. Im Komplex mit DNA-gebundenem MIZ1 (*MYC-interacting zinc finger 1*) reprimiert *MYC* die Expression von Genen. Die Bedeutung des *MYC*-Proteins für kolorektale (und andere) Karzinome wird bei der Betrachtung der typischerweise mutierten Gene deutlich: KRK erhöhen nicht nur durch Mutationen im Wnt-Signalweg (siehe 3.4) die zellulären *MYC*-Konzentrationen sondern auch durch andere Mutationen, beispielsweise in den Genen *SMAD4*, *ARID1A* und *FBWX7* [73].

Das Potential einer *MYC*-Inhibition konnte in mehreren genetischen Modellen gezeigt werden und es wurden zahlreiche Versuche unternommen, das Protein direkt oder indirekt zu inhibieren [85, 92, 93]. Eine direkte Inhibition hat sich auch nach jahrzentelangen Versuchen als schwierig erwiesen. Da das *MYC*-Protein eine große Interaktionsfläche zu seinen Dimerisierungspartnern wie *MAX* hat und als Transkriptionsfaktor kein definiertes aktives Zentrum besitzt, wurde das Protein gemeinhin als *undruggable* (nicht-inhibierbar) eingestuft [94]. Einer der wenigen erfolgreich entwickelten direkten *MYC*-Inhibitoren ist das Molekül 10058-F4, das die Interaktion von *MYC* und *MAX* inhibiert [95]. Folgende Studien konnten jedoch nur eine geringe Effektivität *in vivo* aufzeigen [96]. Einen weiteren Weg, *MYC* zu inhibieren stellen indirekte Strategien, wie die Destabilisierung, Transkriptions- oder Translationsinhibition des Proteins dar. *BRD4* ist ein transkriptioneller Koaktivator des *MYC*-Gens und eine Inhibition führt zu einer Reduktion zellulärer *MYC*-Proteinkonzentrationen [97, 98]. Eine Möglichkeit, das *MYC*-Protein in Neuroblastomen zu destabilisieren ist die Inhibition seines Interaktionspartners *Aurora-A*. Die Interaktion verhindert eine proteasomale Degradation des Proteins. Die Inhibition von *Aurora-A* mit *MLN8054* hebt diese Interaktion auf und führt so zur Destabilisierung des Proteins [99, 100]. Ein weiterer Ansatzpunkt für eine indirekte Intervention mit *MYC*-Aktivität ist die Inhibition der Ubiquitin-Ligase *HUWE1* [101]. Diese ist in KRK für den Abbau von *MIZ-1* essentiell und folglich kommt es durch *HUWE1*-Inhibition zu einer Akkumulation von *MIZ-1*. In der Folge werden *MYC*-Zielgene inhibiert und *MYC*-abhängige Zellen werden an weiterer Proliferation gehindert [101].

3.7 Proteintranslation und ER-Stress

Proteintranslation lässt sich in drei Schritte unterteilen, Initiation, Elongation und Termination. Im Folgenden soll dieser Prozess kurz erläutert werden.

Die Translationsinitiation ist unter den meisten Umständen der limitierende Schritt der Translation [102]. Sie beginnt mit der Rekrutierung der 40S ribosomalen Untereinheit an die 5'untranslatierte Region (5'UTR) der mRNA [103]. Diese Reaktion wird durch Proteine der *eukaryotic initiation factor* Familie 4 katalysiert: Zunächst bindet eIF4E an die *CAP*-

Struktur (5'-5' Phosphodiesterbindung des terminalen Guaninnukleotids) der mRNA. Dies erlaubt die Bindung von eIF4A, welches Sekundärstrukturen innerhalb des 5'UTRs mittels seiner Helikasefunktion auflöst. Die Proteine eIF4B und eIF4H vermitteln ein Scannen der mRNA durch die kleine ribosomale Untereinheit, bis diese das Startcodon erreicht. Es folgt eine durch eIF3-vermittelte Bindung des ternären Faktors eIF2-GTP-Met-tRNA, gefolgt von durch eIF5 katalysierter Hydrolyse des GTP. An eIF5 gebundenes eIF2-GDP dissoziiert und die Elongation beginnt nach der Rekrutierung der 60S ribosomalen Untereinheit [104].

Der dissoziierte Faktor eIF5-eIF2-GDP wird durch die eIF5-Dissoziations- und *guanine nucleotide exchange* (GEF)-Funktionen von eIF2B wieder zu GTP-eIF2B recycled, was eine erneute Rekrutierung von Met-tRNA und anschließende Translationsinitiation erlaubt. Unter Bedingungen von physiologischem Stress, beispielsweise nach einer viralen Infektion oder der Akkumulation von fehl-gefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum, erfolgt eine Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF2 an S51 durch die Kinase PERK. So phosphoryliertes eIF2 ist ein kompetitiver Inhibitor von eIF2B und vermindert die globale Translationsrate unter Stressbedingungen [104]. Die Translation einiger Proteine, wie beispielsweise *activating transcription factor 4* (ATF4) erhöht sich jedoch unter diesen Bedingungen [105, 106]. Dies wird durch die Präsenz von *upstream open reading frames* (uORF) innerhalb des 5'UTR der ATF4-mRNA ermöglicht. Diese reprimieren die Translation des Proteins unter physiologischen Bedingungen und unter ER-Stress-Bedingungen wird der ORF des Proteins durch sogenanntes *leaky scanning* oder Reinitiation verstärkt translatiert [107].

Die 5'CAP-Struktur wird bei den allermeisten Proteinen zur Translationsinitiation wie oben beschrieben herangezogen. Es gibt jedoch auch *internal ribosome entry sites* (IRES), die eine Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit und sich anschließende Translationsinitiation unabhängig von der CAP-Struktur erlauben [108]. Diese Strukturen sind hauptsächlich als virale Elemente beschrieben, jedoch gibt es sie auch natürlich vorkommend in den 5'UTRs einiger humaner mRNAs, darunter der MYC-mRNA [109, 110]. Die durch das MYC-IRES-Element vermittelte Translation ist eIF4E-unabhängig und eIF4G-abhängig.

3.8 Synthetische Letalität

Synthetisch Letal beschreibt die Abhängigkeit des Überlebens einer Zelle (oder Organismus) von der Wirkung mindestens eines aus einer Gruppe von zwei oder mehr Genen. Daraus folgt, dass der Funktionsverlust eines der beiden Gene verkraftbar ist, bzw. durch die Funktion des anderen Gens kompensiert werden kann (vergl. Abb. 3.5). Die erste dokumentierte Beobachtung dieses Phänomens gelang dem amerikanischen Genetiker Calvin Bridges im frühen 20. Jahrhundert. Er stellte fest, dass zwei Populationen der Fruchtfliege *D. melanogaster* mit nicht-allelischen Genen nicht in der Lage sind, vitale Nachkommen zu

Gen 1	Gen 2		
WT	WT	→	Vital
WT	Mut	→	Vital
Mut	WT	→	Vital
Mut	Mut	→	Letal

Abbildung 3.5: Synthetische Letalität

Bei einem synthetisch letalen Zusammenhang kann ein Organismus oder eine Zelle die Mutation eines Genes (Mut Gen 1 oder Mut Gen 2) kompensieren und ist dennoch vital, sofern das andere Gen funktionell (wildtypisch WT) ist. Bei einer Mutation beider Gene hingegen kommt es zu einem letalen Phänotyp.

erzeugen, obwohl keine der beiden Einschränkungen in ihrer Vitalität aufweisen [111, 112]. Dieser Zusammenhang wurde erst 20 Jahre später mit dem Begriff synthetisch letal beschrieben [113].

Das beschriebene Konzept kann auch für die Suche nach neuen therapeutischen Zielstrukturen bei KRK herangezogen werden, bei denen die Funktionen eines oder sogar mehrerer Gene bereits durch Mutationen gestört sind (siehe 3.3). So konnte z.B. gezeigt werden, dass Zellen mit hohen MYC-Konzentrationen abhängig von der Kinase ARK5 sind. ARK5 steuert die mitochondriale Respiration und Proteinsynthese über Regulation des Energiesensors AMPK. In Zellen mit hohen MYC-Proteinmengen hat diese Regulation eine essentielle protektive Wirkung - ein *Knockdown* von ARK5 führt zu einer Energiedepletion und schließlich zu Apoptose, während Zellen mit niedrigeren MYC-Proteinkonzentrationen weniger abhängig von der Funktion dieses Proteins sind [114]. In KRK spielt die Hochregulation von MYC eine herausragende Rolle, weshalb diese Erkenntnis Hoffnungen auch auf therapeutische Nutzbarkeit weckt.

Weitere synthetisch letale Zusammenhänge wurden für die Aktivität von β -CATENIN von KRK-Zelllinien und Zellen mit mutiertem KRAS gezeigt [115, 116]: Solche Zellen, die beispielsweise durch eine Mutation im Wnt-Signalweg eine hohe Aktivität von β -CATENIN haben, sind abhängig von dem Transkriptionsregulator YAP1 und den beiden antiapoptischen Genen BCL2L1 und BIRC5 (SURVIVIN). Zellen mit KRAS-Mutationen zeigen sich sensitiv gegenüber Inhibition der Kinase STK33.

Einige Erkenntnisse über synthetisch letale Interaktionen befinden sich bereits auf dem Weg in die klinische Anwendung, wie Beijersbergen et al. [117] berichten: Während durch BRAF-Inhibition in Melanomen in klinischen Studien therapeutische Erfolge gezeigt werden konnten, blieb die gleiche Herangehensweise bei KRK mit BRAF V600E-Mutation hinter den Erwartungen zurück [118, 119]. Prahallad et al. [120] haben einen synthetisch letalen *Screen* durchgeführt, in dem die Autoren nach synthetisch letalen Interaktionen mit

BRAF-Inhibition in humanen Zellen suchten, die gegen diese Inhibition resistent waren. In diesem *Screen* konnte eine synthetisch letale Interaktion von BRAF-Inhibition in Zellen mit V600E Mutation zusammen mit der Inhibition des *epidermal growth factor receptor* (*EGFR*) festgestellt werden. Die Inhibition von BRAF in KRK mit V600E Mutation führt zu einem starken, *EGFR*-Abhängigen *Feedback*-Mechanismus, der die Resistenz der Zellen vermittelt. In der Folge wurden erfolgreiche klinische Studien durchgeführt, die eine Duale Inhibition von *EGFR* und BRAF in KRK testeten [121]. Dieses Beispiel demonstriert, dass mit shRNA-*Libraries* durchgeführte synthetisch letale *Screens* in der Lage sind Interaktionen zu identifizieren, die zu neuartigen Behandlungsstrategien bei Krebserkrankungen führen können.

3.9 Zielsetzung der Arbeit

Wie einleitend dargestellt, sind kolorektale Tumore in der Regel APC-mutiert und von der Aktivität des Proteins MYC abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit soll die potentielle therapeutische Nutzbarkeit dieser beiden Fakten beleuchtet werden:

i) Synthetisch letale Interaktionen mit APC-Mutationen

APC-Mutationen können trotz ihrer sehr zuverlässigen Präsenz in KRK bisher nicht direkt für Therapien nutzbar gemacht werden. Es sollten daher Gene identifiziert werden, von denen Zellen mit diesen Mutationen abhängig sind. Um dieses Ziel zu erreichen, sollte eine KRK-Zelllinie hergestellt und charakterisiert werden, die doozyklinabhängig ein Vollängen-APC Allel exprimiert. Diese, normalerweise APC-mutierte Zelllinie sollte anschließend in einem shRNA-*screen* genutzt werden, um shRNAs zu identifizieren, auf die die Zelllinie mit und ohne Expression des FL-APC Allels mit einer differentiellen Vitalität reagiert. Gefundene shRNAs, die einen synthetisch letalen Phänotyp hervorrufen, sollten im Anschluss validiert werden und ein Modell gefunden werden, dass diese differentiellen Effekte erklärt.

ii) Translationale Inhibition von MYC

Die meisten in KRK gefundenen Mutationen führen zu erhöhten, onkogenen MYC-Proteinkonzentrationen und KRK sind von der starken Expression dieses Faktors abhängig. Zahlreiche Versuche einer direkten Inhibition der MYC-Aktivität haben sich als vergeblich herausgestellt, und so sind es, wie eingangs dargestellt, indirekte pharmakologische Ansätze, die derzeit erhoffen lassen, dass eine effiziente Reduktion der MYC-Proteinmengen in KRK möglich ist. Ausgangspunkt dieses Teils der vorliegenden Dissertation ist die überraschende Beobachtung, dass der duale Inhibitor BEZ235 zu einer Erhöhung der MYC-Proteinkonzentration in zahlreichen KRK Zelllinien führt. Dies ist unerwartet, weil BEZ235 durch die Inhibition von PI3K und mTORC1 einerseits den Abbau von MYC durch Aktivierung der Kinase GSK3 erhöht und andererseits durch mTORC1-Inhibition die Proteinsynthese von MYC verringert werden sollte. In vorangegangenen Arbeiten konnte ein Rückkopplungsmechanismus aufgedeckt werden, der von AKT ausgehend FOXO-abhängig den MAPK-Signalweg aktiviert und so zu einer Verstärkung der MYC-Expression führt. Ziel dieses Teils ist es, diesen unerwarteten Effekt weiter zu untersuchen und auf den gefundenen Ergebnissen basierend eine andere erfolgversprechende Strategie zur Reduktion der MYC-Proteinkonzentrationen zu finden.

Ergebnisse synthetisch-letale APC-Interaktionen

4.1 Generierung einer FL-APC-induzierbaren Zelllinie

Um einen shRNA-*screen* auf synthetisch letale Interaktionen mit dem Verlust von vollständigem APC (*full length-APC*, FL-APC) durchführen zu können, wurden zunächst SW480 Kolonkarzinomzellen hergestellt, die doozyklinabhängig FL-APC exprimieren. SW480 Zellen wurden herangezogen, da diese ein trunkiertes APC-Allel tragen und einen Verlust des zweiten Allels aufweisen. Zudem konnte von diesen Zellen bereits gezeigt werden, dass sie in der Lage sind Klone hervor zu bringen, die das vollständige APC-Allel stabil exprimieren können und dabei vital bleiben [122]. Für die Generierung der gewünschten Zelllinie waren drei Schritte notwendig:

(i) Herstellen einer Tet-ON Zelllinie, die den Tet-Transaktivator konstitutiv exprimiert: SW480 Zellen wurden hierfür mittels Lipofektamin (siehe 8.10.7) mit dem Plasmid pTET-ON transfiziert und mit Geneticin selektioniert. Im Anschluss wurden mit Hilfe von Klonierungsringen Einzelklone gewonnen (Siehe Abb. 4.1 a) und 8.10.8). Mit einem Reportergen-assay wurden die generierten Tet-ON Zellen auf ihre Fähigkeit getestet, doozyklinabhängig einen pTRE-Luc Reporter zu aktivieren. Bei der Auswahl der im weiteren verwendeten Zelllinie wurde ein Klon gewählt, der neben einer unauffälligen Morphologie im Vergleich zu der Ausgangszelllinie (nicht gezeigt) auch eine gute Induzierbarkeit und eine geringe Basalinduktion gezeigt hat (Abb. 4.1 b).

(ii) Herstellen eines Plasmides mit FL-APC unter der Kontrolle des TET-Promotors (siehe 8.9.8): Das *APC*-Gen wurde aus dem Vektor pSAR-MT-APC (Addgene-Plasmid 16487) durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI gewonnen und das 8487 bp lange *APC*-Gen durch Agarosegelelektrophorese isoliert. Der Vektor pTRE2-Pur wurde ebenfalls mit *Bam*HI inkubiert und der geschnittene Vektor von 2605 bp Länge isoliert. Der gewonnene Vektor und das *APC*-Gen wurden anschließend ligiert, in XL1-Blue transformiert und die Plasmid-DNA nach erfolgter Validierung präpariert.

(iii) Transfektion der in (i) hergestellten Zelllinie SW480-pTET-ON mit dem in (ii) hergestellten Plasmid pTRE-APC: Analog dem Vorgehen in (i) wurde die Zelllinie SW480-pTet-ON aus (i) mit dem Plasmid pTRE-APC aus (ii) transfiziert und Einzelklone gewonnen (siehe Abb. 4.1 a). Ein morphologisch unauffälliger Klon zeigte in einer quantitativen Realtime-PCR eine Induktion der *APC* und Reduktion der *AXIN2* mRNA. *AXIN2* ist ein Wnt-Zielgen und dient hier als Indikator für eine erfolgreiche FL-APC-Rekonstitution. Der hergestellte Klon wurde im Folgenden eingehender untersucht. In einer Konzentrationsreihe mit variablen Mengen zugegebenen Doozyklins zeigte der Klon nach 48 h eine Induktion der *APC* mRNA und Reduktion der *AXIN2* mRNA ab einer Konzentration von etwa 50

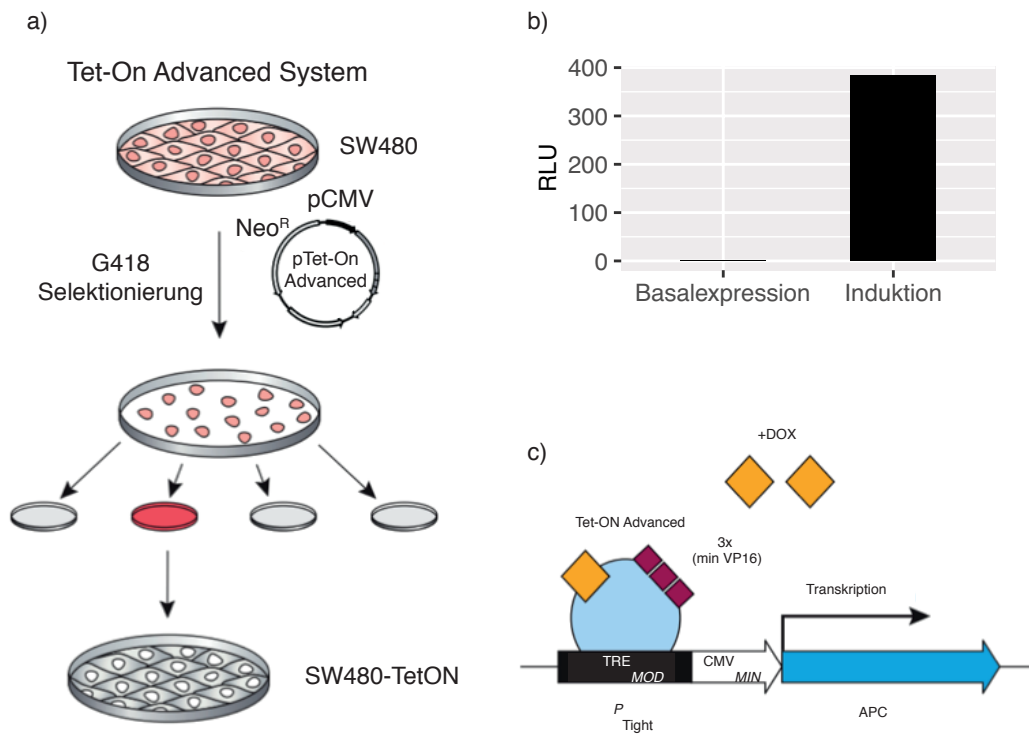


Abbildung 4.1: Herstellung einer SW480-TetOn Zelllinie

a) Schematische Darstellung der Herstellung der Zelllinie SW480-pTet-On. b) Luciferaseexpression der hergestellten Zelllinie im Tre-Luc Reportergenassay. c) Mechanismus der Tet-induzierten Genexpression.

ng/ml Doxyzyklin im Zellkulturmedium (Abb. 4.2 b). Bei einer Doxyzyklinkonzentration von 500 ng/ml wurde die *APC* mRNA auf das etwa vierfache des Ausgangswertes erhöht. Die von Faux et al. [122] generierte konstitutiv FL-APC exprimierende Zelllinie (MF-APC) wurde für dieses Experiment als Referenz genutzt. Sie hatte in etwa die zweifache Menge *APC* mRNA im Vergleich zu der nicht induzierten Zelllinie pTRE-APC. Die Menge *AXIN2* mRNA beträgt in dieser Zelllinie 17% gegenüber pTRE-APC Zellen. Eine Induktion der hergestellten Zelllinie reduzierte die *AXIN2* mRNA auf 25% des Ausgangswertes. Bei einer Inkubation der hergestellten, induzierbaren Zelllinie mit 500 ng/ml Doxyzyklin konnte festgestellt werden, dass im Immunoblot FL-APC nachweisbar ist und bereits nach vier Stunden die zelluläre β -CATENIN Konzentration stark reduziert ist (Abb. 4.2 c). Nach 24 h hat die β -CATENIN Konzentration eine deutlich geringere Konzentration erreicht, als bei nicht-induzierten Zellen vorhanden ist. Dieser Effekt hält auch nach vier Tagen kontinuierlicher APC-Induktion an. Eine Untersuchung der beiden Wnt-Zielgene *AXIN2* und *MYC* zeigte ebenfalls die erwartete Reduktion über den gesamten Versuchszeitraum. Diese Daten sind konsistent mit der Hypothese, dass durch die von Doxyzyklin induzierte FL-APC-Restauration die Aktivität des Wnt-Signalweges reduziert wird.

Um diese Vermutung weiter zu validieren wurde eine Transkriptomsequenzierung (RNA-Seq) von induzierten und nicht-induzierten Zellen durchgeführt. Differentiell exprimierte Gene wurden mit DESeq2 analysiert und so eine Liste mit der durch FL-APC-Expression induzierten differentiellen Genexpression generiert. Diese ist auf einer Log2-Skala so definiert, dass durch APC-Restauration induzierte Gene einen positiven Wert haben (Siehe Gleichung 4.1). Die vollständige Liste ist im elektronischen Anhang dieser Arbeit enthalten.

$$\log_2\text{FC} = \log_2 \left(\frac{\text{FL-APC (DOX)}}{\text{TR-APC (ETOH)}} \right) \quad (4.1)$$

Unter den mit einer *False Discovery Rate* (FDR) von $< 0,05$ differentiell regulierten Genen befinden sich unter Anderen die Wnt-Zielgene *APC*, *MYC*, *LEF1* und *AXIN2* (Siehe Tab. 4.1).

Gen	log2FC	q-Wert
<i>APC</i>	1,82	2,84E-02
<i>MYC</i>	-1,52	3,27E-08
<i>LEF1</i>	-0,88	3,52E-2
<i>AXIN2</i>	-0,70	2,71E-2

Tabelle 4.1: Regulation von *APC* und Wnt-Zielgenen im RNA-Seq (n=3)

Die generierte Liste mit log2FC wurde als nächstes verwendet, um eine *Geneset Enrichment Analysis* (GSEA) durchzuführen. Als vergleichende Sammlung Gensets diente hierbei C2 der *Molecular Signatures Database*. In dieser Sammlung befinden sich Gensets, deren Gene durch genetische oder chemische Manipulationen differentiell reguliert sind, so-

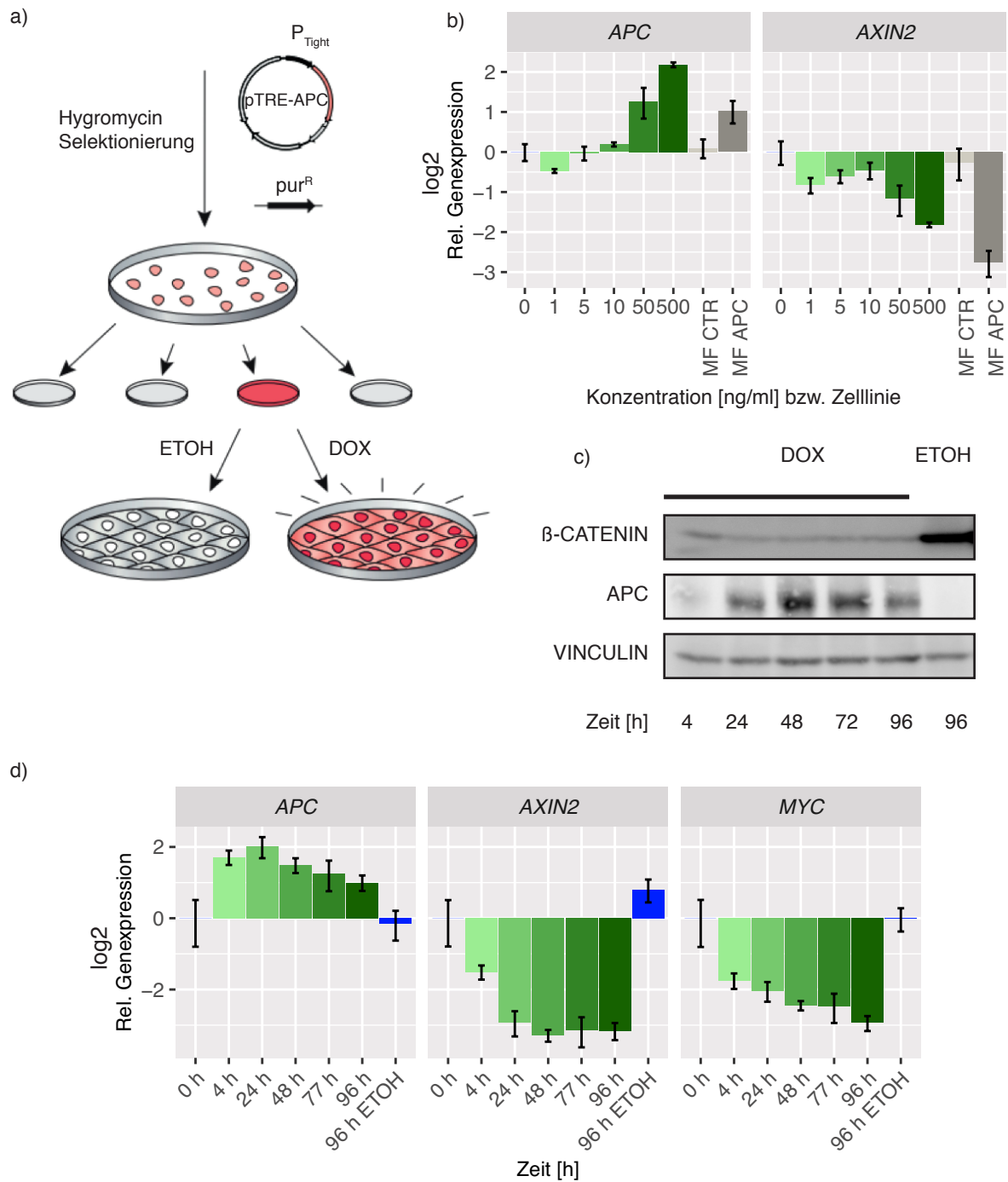


Abbildung 4.2: Die Expression von FL-APC reguliert Wnt-Zielgene

a) Schematischer Ablauf der Herstellung der Zelllinie SW480 pTRE-APC. b) qRT-PCR Messung von *APC* (Inkludiert die endogene, mutierte mRNA) sowie des Wnt-Zielgens *AXIN2* nach 48 h Inkubation mit den angegebenen Mengen Doxyzyklin (n=2). c) Immunoblot von APC, sowie β -CATENIN nach Inkubation mit den angegebenen Zeiten mit 500 ng/ml Doxyzyklin (n=1). d) qRT-PCR Messung der RNA von *APC*, sowie den Wnt-Zielgenen *AXIN2* und *MYC* nach Inkubation von 500 ng/ml Doxyzyklin mit den angegebenen Zeiten (n=3). In den qRT-PCRs sind jeweils Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) dargestellt.

Genset	NES	FDR	Referenz
SANSOM_APC_TARGETS_DN	1,79	0,016	Sansom et al. [123]
FEVR_CTNNB1_TARGETS_UP	1,69	0,003	Fevr et al. [124]
YU_MYC_TARGETS_DN	1,89	0,004	Yu et al. [125]
WILLERT_WNT_SIGNALING	-1,59	0,228	Willert et al. [126]
FEVR_CTNNB1_TARGETS_DN	-1,38	0,023	Fevr et al. [124]
SCHUMACHER_MYC_TARGETS_UP	-1,87	0,023	Schuhmacher et al. [127]

Tabelle 4.2: Regulation von *APC* und Wnt-Zielgenen im RNA-Seq GSEA der durch FL-APC regulierten Gene nach 48 h Induktion mit 500 ng/ml Doxyzyklin (n=3)

wie Gensets, die aus in Signalwegen vorhandenen Genen der Datenbanken KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), *BioCarta* und *Reactome* bestehen.

Unter den gefundenen Gensets befinden sich mit einem positiven *Normalised Enrichment Score* (NES) solche Sets, deren Gene mit durch FL-APC Expression verstärkt exprimierten Genen korreliert sind. Hierunter sind mit einer FDR von $< 0,25$ die Gensets SANSOM_APC_TARGETS_DN, FEVR_CTNNB1_TARGETS_UP und YU_MYC_TARGETS_DN (siehe Tab. 4.2 1-3 und [123–125]).

Im Genset SANSOM_APC_TARGETS_DN sind Gene, die nach akuter CRE-LOX induzierter, Kolon-spezifischer APC-Deletion im Mausmodell reprimiert werden. FEVR_CTNNB1_TARGETS_UP beinhaltet Gene, die in dem Mausmodell villin-creERT2- β -CATENIN^{-/lox} nach Zugabe von Tamoxifen Kolon-spezifisch verstärkt exprimiert werden und YU_MYC_TARGETS_DN beinhaltet Gene, welche nach Aktivierung von MYC-ER (ein MYC-Estrogenrezeptor Fusionsprotein) mit Tamoxifen reprimiert werden. Wenn MYC inaktiviert wird, kommt es folglich zu einer Aktivierung dieser Gene [124, 125]. Es konnten also Gensets gefunden werden, deren Gene durch Beeinflussung von APC, dem Wnt-Signalwegsmediator β -CATENIN und dem Wnt-Zielgen *MYC* reguliert werden und diese Gene sind mit einem positiven log2FC nach APC-Induktion korreliert (siehe Tab. 4.2 4-6). Mit einer Repression nach APC-Induktion korreliert sind Gene von Gensets mit einem negativen NES. Hierunter fallen die Gensets WILLERT_WNT_SIGNALING, FEVR_CTNNB1_TARGETS_DN und SCHUMACHER_MYC_TARGETS_UP [124, 126, 127]. Die Gene des Gensets WILLERT_WNT_SIGNALING sind solche, die nach Stimulation der pluripotenten, embryonalen Karzinomzelllinie NCCIT mit WNT3A verstärkt exprimiert werden [126].

FEVR_CTNNB1_TARGETS_DN ist das zu FEVR_CTNNB1_TARGETS_UP komplementäre Genset: Es enthält Gene, welche nach β -CATENIN Deletion reprimiert werden. Das Genset SCHUMACHER_MYC_TARGETS_UP schließlich beinhaltet Gene, welche durch MYC-Expression in einem Tet-System exprimiert werden [127]. Alle hier beschriebenen Korrelationen sind kompatibel mit der Hypothese, dass sich durch die Expression von FL-APC das Expressionsprofil der generierten Tet-APC Zelllinie global so verändert, wie es nach einer Inaktivierung des Wnt-Signalweges erwartbar ist.

Nach Manipulationen des Wnt-Signalweges wurden bereits die Ausprägung zahlreicher zellulärer Phänotypen beschrieben, darunter veränderte Proliferation, Migration, Differenzierung (siehe 3.4) und *anchorage independent growth*. Letzteres beschreibt die Unabhängigkeit von Zellen von Überlebenssignalen der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise *Fokal Adhesion Kinase*-vermittelter Repression von p53 [128]. Im Folgenden wurden für eine weitere Charakterisierung der generierten Zelllinie Versuche zur Beschreibung von verändertem Proliferations- und Migrationsverhalten, sowie *anchorage independent growth* durchgeführt. Interessanterweise konnte kein proliferativer Nachteil der FL-APC induzierten Zellen gegenüber nicht induzierten Zellen festgestellt werden (Abb. 4.3 a). Auch bei längerer Inkubation des Allels konnte in einer kumulativen Wachstumskurve kein signifikanter Unterschied zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen gezeigt werden (Abb. 4.3 b). Wenn die Zellen jedoch daran gehindert werden, an die Zellkulturschale zu adherieren ändert sich dies jedoch: Nicht induzierte Zellen sind in der Lage in Methylzellulosesuspension 50 Kolonien pro 1000 ausgesäter Zellen hervorzubringen. Bei zeitgleicher Induktion des FL-APC Allels mit dem Aussäen der Zellen jedoch entstehen nur 20 Kolonien. Bei einer Quantifizierung der Größe der entstandenen Kolonien stellte sich zudem heraus, dass FL-APC exprimierende Zellen, welche ein dreidimensionales Wachstum initiieren können, signifikant kleinere Kolonien hervorbringen. Diese Beobachtungen sind kompatibel mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [129]

Das Migrationsverhalten der generierten Zelllinie wurde im *Boyden-Chamber* Versuchsaufbau untersucht. Hierbei werden Zellen auf eine perforierte Oberfläche ausgesät. Medium wird sowohl oberhalb als auch unterhalb der Oberfläche zugegeben, wobei durch unterschiedliche Konzentrationen von Fötalem Kälberserum (FKS) ein Stimulus für die Zellen hergestellt wurde durch die Poren der Oberfläche zu migrieren (siehe 8.10.12). Nach 12 h Inkubationszeit wurden die migrierten Zellen induzierter und nicht induzierter Zellen gezählt. Hierbei stellte sich heraus, dass mehr FL-APC exprimierende Zellen migriert waren (Abb. 4.3 f). Dies korreliert mit in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, nach denen die gerichtete Migration von Zellen durch APC-trunkierte Mutation gestört ist ([82], vergl. Diskussion).

4.2 shRNA-Screen auf synthetisch letale APC-Interaktionen

Die im KRK häufig auftretenden Mutationen des APC-Proteins sind derzeit keiner direkten pharmakologischen Intervention zugänglich (siehe 3.2). In der generierten Zelllinie mit induzierbarem FL-APC sollte daher ein shRNA-Screen durchgeführt werden, um synthetisch letale Interaktionen mit dem Verlust von FL-APC zu finden. In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck die Decipher shRNA Library Modul I verwendet. Diese Virusbibliothek besteht aus 27.500 shRNAs, die mit 5.000 verschiedenen Ziel-mRNAs interferieren. Es gibt also eine Redundanz von circa 5-6 shRNAs pro Zielgen innerhalb der Bibliothek. Modul I

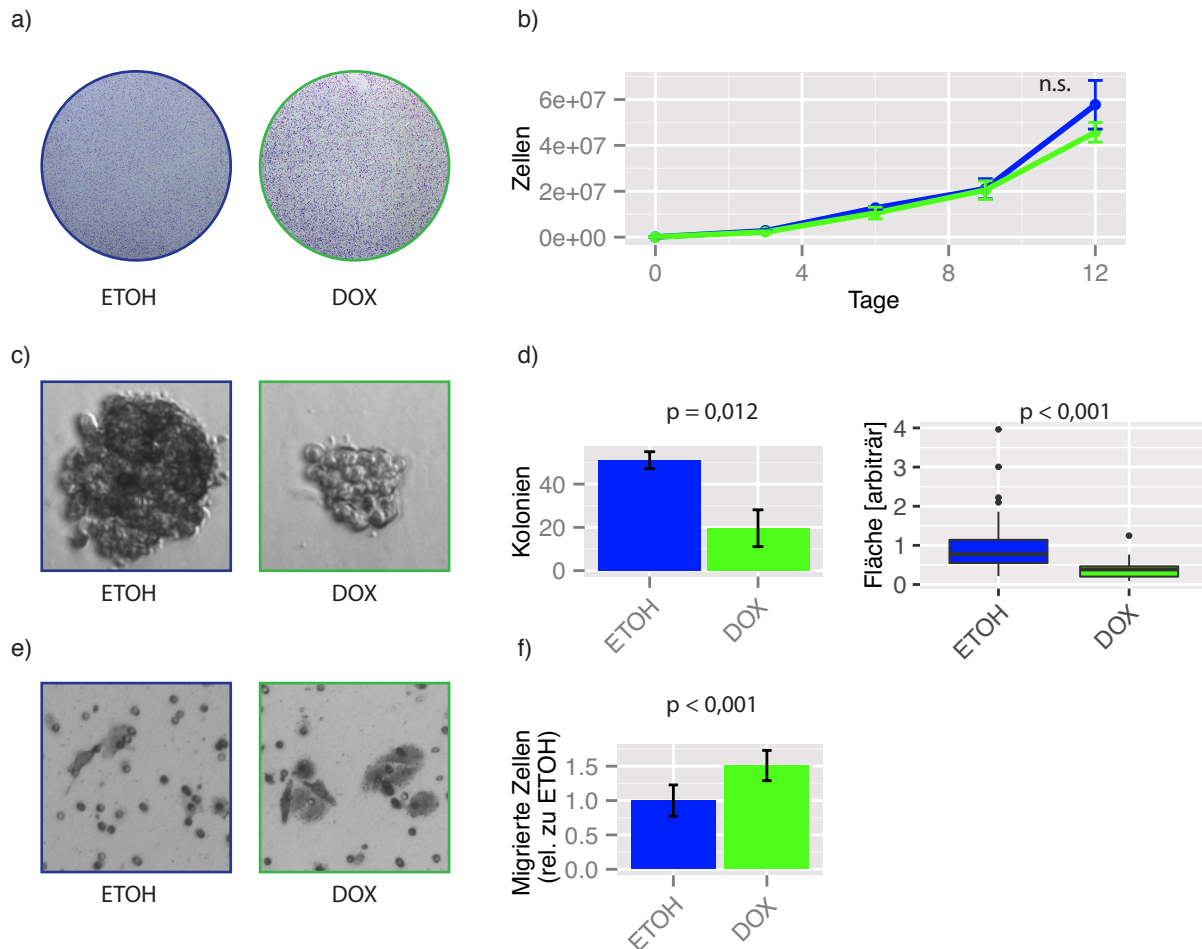


Abbildung 4.3: Expression des FL-APC Allels beeinflusst gerichtete Migration, *anchorage independent growth*, aber nicht die Proliferation von SW480-pTRE-APC Zellen

a) Kristallvioletfärbung nach vier Tagen Induktion (rep. Bsp. n=3) b) Kumulative Wachstumskurve: 500.000 Zellen wurden auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und alle drei Tage gesplittet, gezählt und erneut ausgesät. Die kumulative Zellzahl wurde für die dargestellten Zeitintervalle berechnet (n=3). c) Repräsentative Zellkolonien im *anchorage independent growth*-Versuch. d) Quantifizierung der Anzahl und Größe der entstandenen Kolonien aus c) (n=3). e) Repräsentative mikroskopische Aufnahme migrierter Zellen im *Boyden-Chamber Assay*. Die Zellen migrierten entlang eines Fetalen Kälberserum (FKS) Gradienten (1-10 % FKS). f) Quantifizierung migrierter Zellen aus e). In den Ergebnissen dargestellt sind jeweils Mittelwert +/- SD. Die Induktion des FL-APC Allels erfolgte jeweils zum Versuchsbeginn mit 500 ng/ml Doxyzyklin im Medium (n=3).

der Bibliothek wurde ausgewählt, da dieses bevorzugt pharmazeutisch inhibierbare, sowie Signalwegs-Gene enthält.

Zunächst wurden Viruspartikel mit dem Library-Plasid pRSI9 hergestellt und SW480 pTRE-APC mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,6 - 0,7 infiziert (Abb. 4.4 a). Diese MOI wurde verwendet, da sie ein Optimum zwischen dem Anteil infizierter Zellen einerseits und dem Anteil an Zellen mit nicht angestrebten, mehrfachen Integrationen andererseits, darstellt (siehe Abb. 8.1). Eine Infektion möglichst vieler Zellen war notwendig, da aufgrund der bereits vorhandenen Puromycin-Resistenz der Zelllinie eine Selektionierung nicht möglich war.

Die infizierten Zellen wurden in zwei Populationen aufgeteilt. Bei einer Population wurde das FL-APC Allel mit 500 ng/ml Doxyzyklin induziert, die andere erhielt eine identische Menge Ethanol als Solvenzkontrolle. Während des *Screens* wurden die Zellen alle drei Tage passagiert und Proben für RNA- und Protein-Präparationen sowie zytometrische Untersuchungen entnommen. Nach 3 und 15 Tagen wurden zudem Zellen entnommen um eine 800-fache Repräsentation jeder der im *Screen* vorhandenen shRNAs in einer gDNA-Präparation zu ermöglichen (siehe 4.4 a).

Mit Hilfe der entnommenen Proben wurde eine Qualitätskontrolle über den gesamten Zeitraum des Versuches durchgeführt. Es wurden hierbei die Proliferation, der Anteil infizierter Zellen sowie die erfolgreiche, kontinuierliche Induktion des FL-APC Allels untersucht (Abb. 4.5 a-c). Interessanterweise proliferieren FL-APC induzierte Zellen im Vergleich zu nicht induzierten Zellen langsamer, nachdem sie mit der shRNA-Bibliothek infiziert wurden (Abb. 4.5 a). Der für die Infektion genutzte Vektor pRSI9 enthält ein konstitutiv exprimiertes RFP-Allel. Die Fluoreszenz dieses Expressionsmarkers wurde genutzt, um den Anteil der infizierten Zellen innerhalb der Populationen zytometrisch zu bestimmen (Abb. 4.5 b). Dieser Anteil nimmt über den Versuchszeitraum kontinuierlich ab und die langsamere Proliferation der FL-APC induzierten Zellen hat hier eine schnellere Abnahme der infizierten Zellen zur Folge, als dies bei nicht-induzierten Zellen der Fall ist. Die Induktion des FL-APC Allels wurde indirekt durch Messung der β -CATENIN Konzentration gezeigt (4.5 c). Die deutliche Abnahme der β -CATENIN Konzentration nach Doxyzyklinzugabe zeigt eine kontinuierliche Expression von FL-APC über den gesamten experimentellen Zeitraum.

Die angestrebte MOI von 0,6-0,7 (circa 50 % der Zellen sind zum Zeitpunkt T1 infiziert) wurde im ersten Replikat des *Screens* nicht erreicht (4.5 b). Eine Korrektur der verwendeten Virusmenge führte in den Replikaten zwei und drei zu 50-60 % infizierten Zellen, was einer MOI von circa 0,75 entspricht. Um trotz Abnahme des prozentualen Anteils infizierter Zellen eine 800-fache Repräsentation jeder shRNA zu gewährleisten, wurden zum Zeitpunkt T2 entsprechend des verbleibenden Anteils infizierter Zellen mehr Zellen für die Isolation der genomischer DNA als zu dem Zeitpunkt T1 verwendet. Die präparierte gDNA wurde sonifiziert und aus dem erhaltenen Produkt die den shRNAs zuzuordnenden

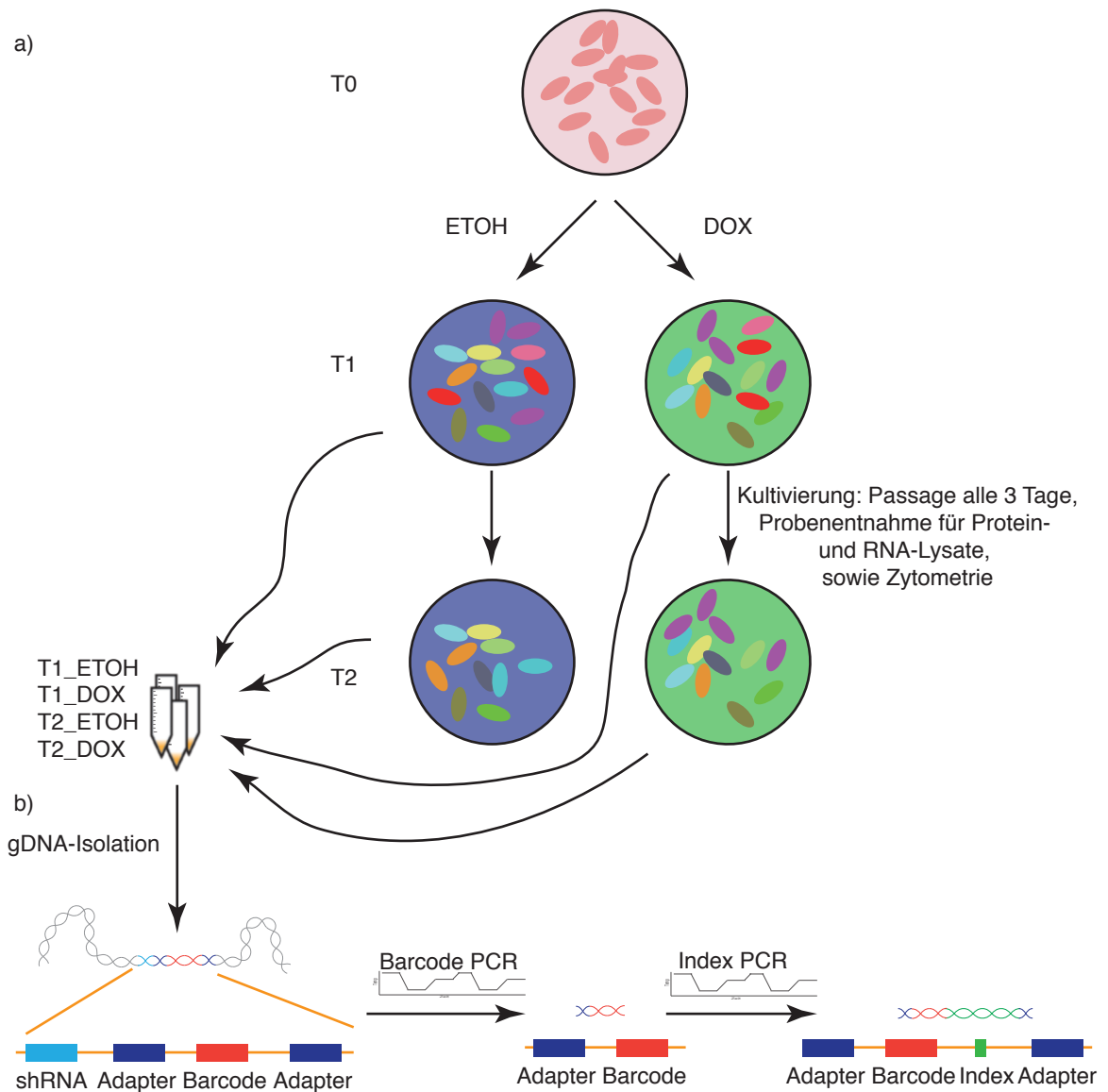


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Screens

a) Die generierte SW480-TET-APC Zelllinie wird zunächst mit einer lentiviralen shRNA-Bibliothek infiziert und in zwei Populationen aufgespalten, wobei eine mit Doxyzyklin induziert wird (T0). Nach drei und nach 15 Tagen Inkubationszeit werden Zellen geerntet (T1/2 ETOH/DOX); Zusätzlich werden als Qualitätskontrolle alle drei Tage Proben für RNA-, Protein-, und Zytometrische Untersuchungen entnommen. b) Von den geernteten Zellen wird die DNA isoliert. Anschließend wird durch PCR die Adapter- und Barcode-Sequenz gewonnen. Durch eine zweite PCR werden ein Index, sowie der zweite Adapter angefügt. Dies erlaubt ein Multiplexing der Proben in der Sequenzierung.

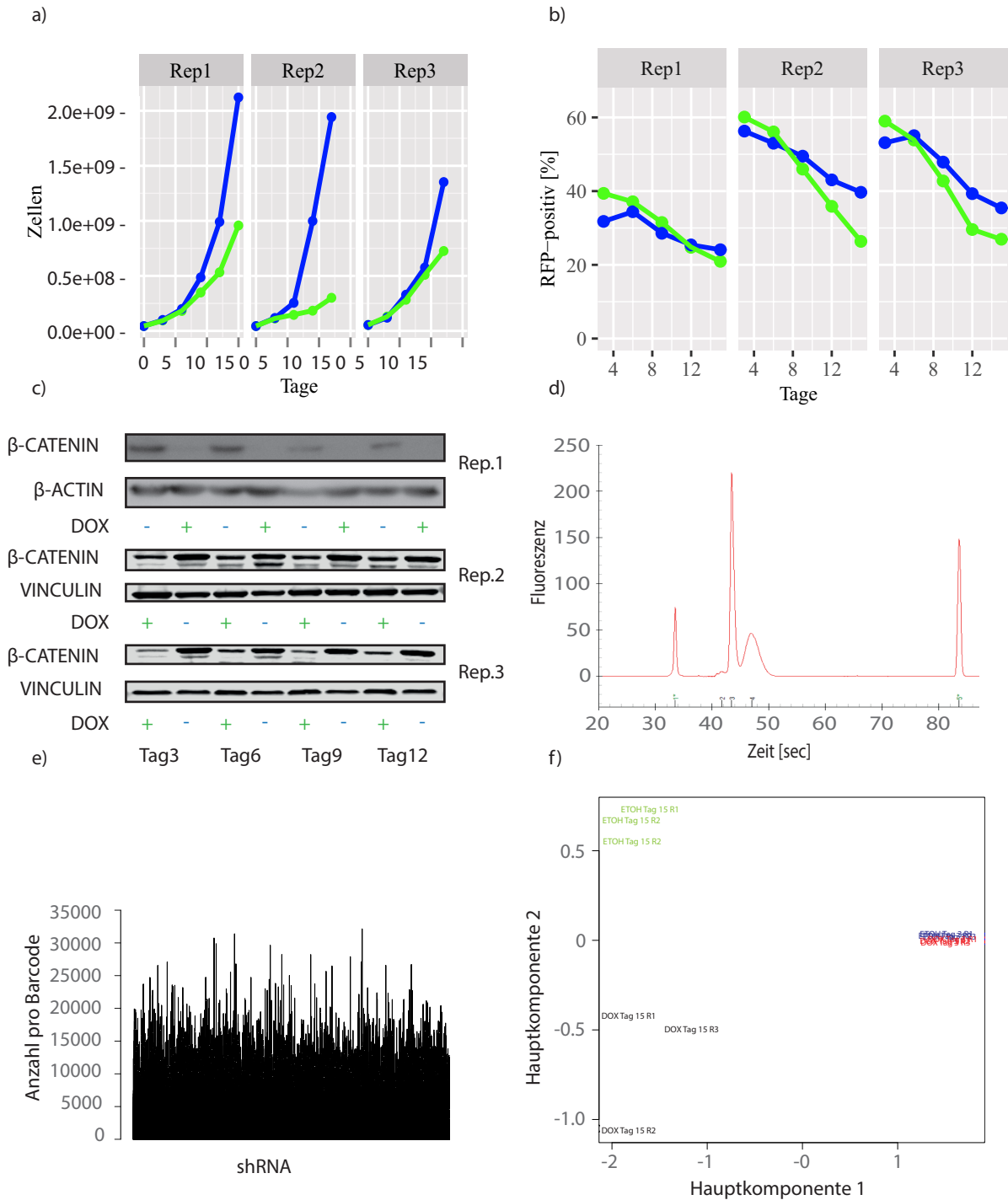


Abbildung 4.5: Qualitätskontrolle während des Screens

a) Kumulative Zellzählung der *Screen*-Replikate zu den angegebenen Zeitpunkten (Blau=DOX, Grün=ETOH). b) Anteil infizierter (RFP-positiver) Zellen. c) Funktionelle Kontrolle der APC-Induktion anhand der β-CATENIN Konzentrationen. d) Exemplarisches Elektropherogramm der Kapillargelelektrophorese einer präparierten Barcode-Sequenzierbibliothek. e) Exemplarische Häufigkeitsverteilung aller sequenzierten shRNAs einer Probe. f) PCA aller sequenzierten Proben.

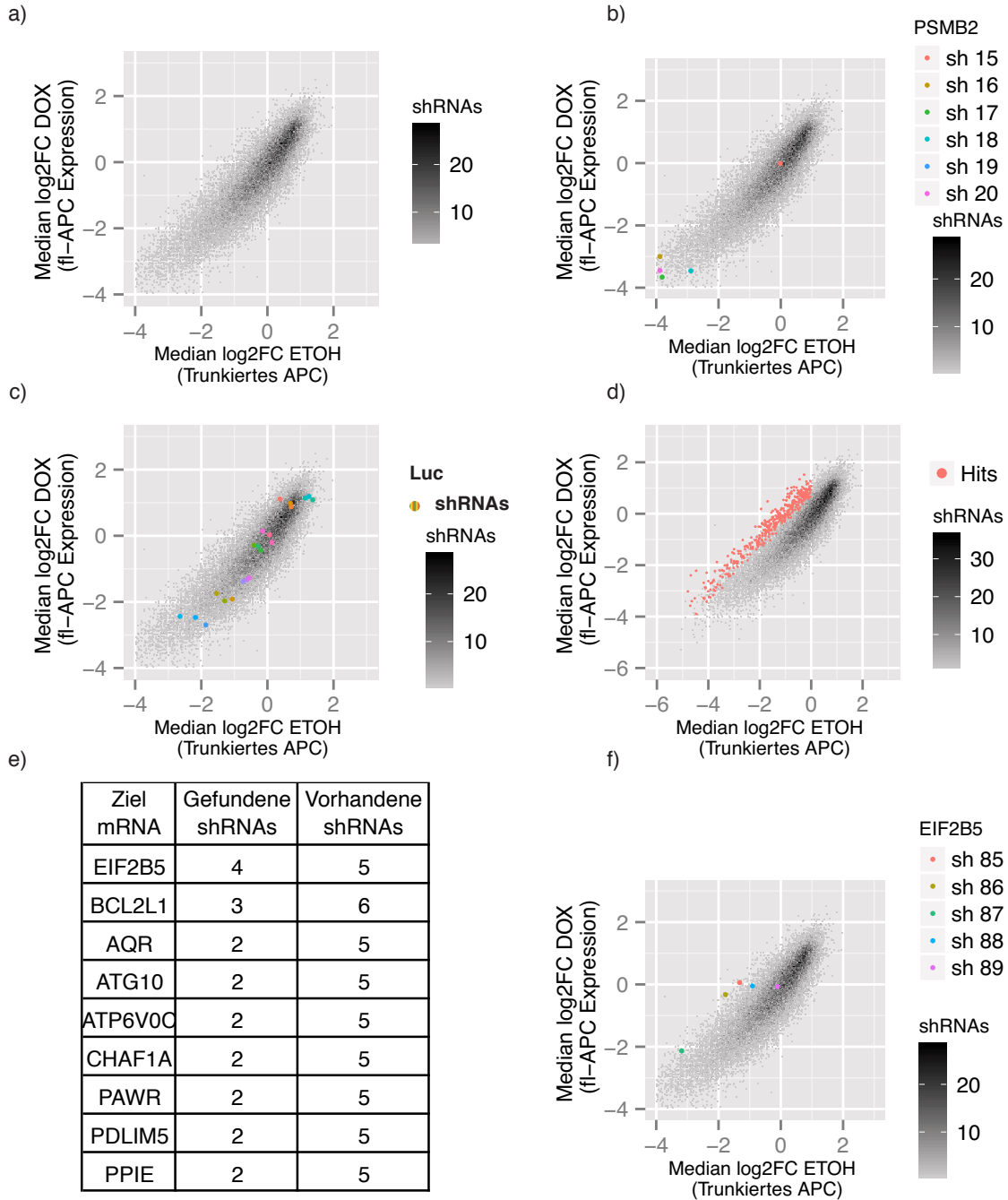
Barcodes mit einer PCR isoliert. In einer zweiten PCR wurden Proben-spezifische Indizes eingefügt, die eine gleichzeitige Sequenzierung aller Proben erlaubt (*Multiplexing*). Die erhaltenen Sequenzierbibliotheken wurden durch Kapillar-Gelelektrophorese quantifiziert. Hierbei konnte neben dem erwarteten PCR Produkt von 142 bp (Abb. 4.5 d, bei circa. 42 sec) ein unerwartetes zweites Produkt gefunden werden. Dieses wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und in pJET1.2 ligiert. Sanger-Sequenzierung der Plasmid-DNA aus erfolgreich transformierten Bakterienklonen zeigte, dass es sich bei dem Produkt ebenfalls um Barcode-Sequenzen handelt. Die Produkte enthielten keine offensichtliche Sequenz-Spezifität und wurden folglich in die Quantifizierung der Sequenzierbibliothek mit einbezogen und ebenfalls sequenziert (siehe 5.1). Alle Proben wurden ausreichend tief sequenziert, um deren biologische Varianz akkurat abzubilden (4.5 e): Die Durchschnittliche, 800-fache biologische Repräsentation jeder shRNA wurde mit einer circa 20-fachen Tiefe sequenziert (Gesamtanzahl der Reads pro shRNA ca. 16.000). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass keine durch zu geringe Sequenziertiefe bedingten statistischen Fehler zu erwarten sind.

Mit einer *Principal-Component-Analyse* wurde die Signalvarianz der biologischen Replikate untersucht (4.5). Die Replikate von Zellen mit induzierter und nicht induzierter FL-APC Expression sind nach drei Tagen kaum voneinander unterscheidbar (ETOH Tag 3 und Dox Tag 3, rot und blau). 15 Tage nach der Induktion ist eine deutliche Auftrennung in zwei separate Gruppen zu sehen (DOX und ETOH Tag 15 R1-3).

Um Kandidaten für synthetisch letale Interaktionen zu identifizieren, wurde die Änderung der Frequenz des Auftretens jeder shRNA zwischen den Zeitpunkten T1 und T2 berechnet und als Logarithmus des Quotienten angegeben (Gleichung 4.2). shRNAs, die sich über den Versuchsverlauf anreichern, haben also einen positiven $\log_2\text{FC}$ und umgekehrt. In 4.6 a) ist der Median $\log_2\text{FC}$ der shRNAs der Replikate FL-APC induzierter Zellen gegen den Median $\log_2\text{FC}$ der shRNAs der Replikate kontroll-behandelter Zellen gezeigt (Genauere Erläuterung der Auftragung siehe 8.9.12).

$$\log_2\text{FC} = \log_2 \left(\frac{T_2}{T_1} \right) \quad (4.2)$$

Die shRNAs wurden zusätzlich in Bins dargestellt, um eine Abschätzung der Dichte zu ermöglichen. Es zeigt sich, dass sich die Frequenz der meisten shRNAs im Laufe des *Screens* nicht stark verändert und im Bereich von $y = -1$; $x = -1$ bis $y = 1$; $x = 1$ streut (Abb. 4.6 a). Weiterhin zeigen sich auch bei stark an- oder abgereicherten shRNAs kaum differentielle Effekte zwischen der FL-APC-induzierten Kondition und der Kontrolle (Abweichung von der Diagonalen $y = x$). shRNAs, die mit der Expression essentieller Faktoren, wie beispielsweise der proteasomalen Untereinheit *PSMB2* interferieren haben in beiden Konditionen einen stark negativen $\log_2\text{FC}$ (Abb. 4.6 b). Als Negativkontrollen sind in der *Screen*-Bibliothek 21 shRNAs gegen das nicht in humanen Zellen exprimierte *Luziferase*-Gen (shLUC) enthalten. Diese sind in Abb. 4.6 c) dargestellt: Die $\log_2\text{FC}$ der 21 shRNA Sequenzen sind über dem



Kriterien „positiver“ shRNAs:

1. Diff. log₂FC FDR < 0,05
2. Diff. log₂FC < Median CTR + 1,5 x SD CTR
3. log₂FC ETOH < 0

Abbildung 4.6: EIF2B5 ist Top-Kandidat für eine synthetisch-letale APC-Interaktion.

a) Darstellung der log₂-fachen Änderung aller im *Screen* verwendeter shRNAs der FL-APC und TR-APC Zellen im Dottplot (Median aus n=3 Replikaten, auch für folgende). b) Wie a), mit als synthetisch letal bewerteten shRNAs in rot. c) Wie a) mit individuellen shRNAs gegen das *PSMB2*-Gen. d) Wie a), mit farbig dargestellten shRNAs gegen Luziferase. shRNAs mit unterschiedlichen *hairpin*-Sequenzen, aber gleichen *Barcodes* sind in der gleichen Farbe dargestellt. e) Tabelle mit den Genen, deren shRNAs am häufigsten als *hit* gefunden werden konnten. f) Wie a) mit farbig dargestellten shRNAs gegen *EIF2B5*

in Abb. 4.6 a) dargestellten Diagramm farbig überlagert. Die Datenpunkte, welche in einer gleicher Farbe dargestellt sind enthalten die gleiche shRNA-Sequenz, aber unterschiedliche Barcodes. Die Luc-shRNAs haben unterschiedlich starke Effekte auf die Proliferation der infizierten Zellen. Diese sind jedoch nicht zwischen der induzierten und nicht-induzierten Zelllinie differentiell (vergl. Gleichung 4.4).

Die Berechnung der *false discovery rate* (FDR) der differentiellen Regulation wurde mit dem auf EdgeR basierenden R-Paket shRNAseq durchgeführt (24860646). Um shRNAs zu finden, die synthetisch letal wirken, wurden drei Kriterien verwendet, die eine shRNA als positiv definieren:

1. Die FDR der differentiellen Regulation ist kleiner als 0,05.
2. Der differentielle Log2FC (Gleichung 4.4) ist positiv und größer als 1,5 Log2FC-Standardabweichungen aller Kontroll-shRNAs mal dem Median der Kontroll shRNAs:

$$\Delta\log_2FC > \text{Median}\Delta\log_2FC[\text{Kontrollen}] + 1,5 * SD[\text{Kontrollen}] \quad (4.3)$$

3. Die Abundanz der shRNA wurde in der Population mit trunkiertem APC-Allel verringert (Zellen mit trunkiertem APC sterben).

$$\Delta\log_2FC = \log_2FC[\text{DOX}] - \log_2FC[\text{ETOH}] \quad (4.4)$$

Die auf diese Weise gefundenen shRNAs sind in Abb. 4.6 d) dargestellt. Die endgültigen Kandidaten für eine synthetisch letale Interaktion wurden durch Anwendung eines weiteren Filters identifiziert: Die Relevanz eines in diesem *Screen* gefundenen Zielgens steigt, je mehr shRNAs gegen dieses Gen entsprechend der oben genannten Kriterien als *Hit* definiert wurden (Abb. 4.6 e). Durch diese Filter blieben zwei vielversprechende Kandidaten für eine synthetisch letale Interaktion, die Gene *EIF2B5* und *BCL2L1*. Depletion von *BCL2L1* wurde bereits in der Literatur als synthetisch letal mit aktiven β -CATENIN beschrieben und wir konnten im Zuge einer Masterarbeit zeigen, dass diese Beziehung auch in der hier hergestellten Zelllinie vorhanden ist [130, 131].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der für eine erfolgreiche Validierung aussichtsreichste Kandidat für eine synthetisch letale APC-Interaktion, *EIF2B5* weiter charakterisiert. Eine erste Validierung wurde mit dem Konstrukt *shEIF2B5* 85 in dem Decipher-Vektor pRSI9 durchgeführt (8.9.9). Diese shRNA zeigte im *Screen* einen deutlichen differentiellen Effekt beim Vergleich der beiden Konditionen +/- Doxyzyklin (siehe Abb. 4.6 f). Da die Resistenzkassette des Vektors Puromycin enthält und diese Resistenz in der Zelllinie SW480 pTRE-APC bereits vorhanden ist, wurden die Zellen infiziert und anschließend zytometrisch sortiert. Infizierte Zellen wurden mit nicht infizierten Zellen so gemischt, dass sie 85 % der Gesamtpopulation ausmachten. Anschließend wurden die Zellen in zwei Populationen aufgeteilt, von denen eine mit Doxyzyklin behandelt wurde. Basierend auf

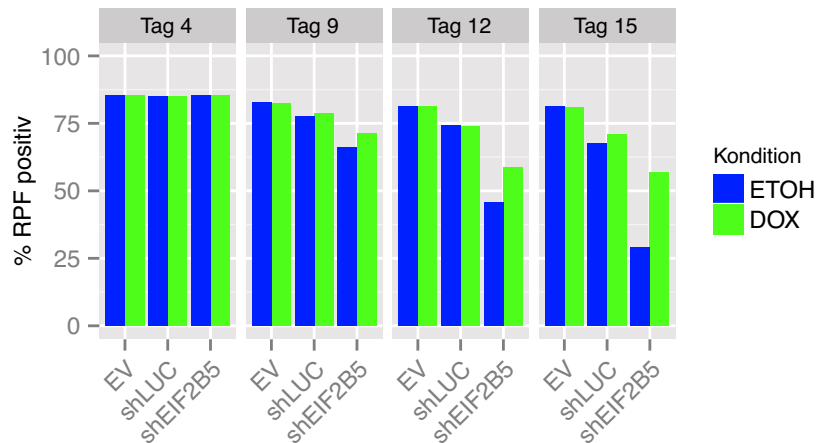


Abbildung 4.7: FL-APC exprimierende Zellen haben einen selektiven Vorteil nach *Knock-down* von EIF2B5

SW480 pTRE-APC Zellen wurden mit shEIF2B5 (85) infiziert, erfolgreich infizierte Zellen sortiert und in zwei Populationen aufgeteilt, von denen eine mit 0,5 ug/ml Doxyzyklin FL-APC induziert wurde. Beide Populationen wurden mit nicht infizierten Zellen zu einem Anteil von 15% gemischt und zytometrisch der Anteil infizierter Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (n=1).

der RFP-Expression der infizierten Zellen wurde dieser Anteil an der Gesamtpopulation in regelmäßigen Abständen über einen dem shRNA-Screen entsprechenden Zeitraum zytometrisch bestimmt (Abb. 4.7). Zellen, die mit einem leeren Kontrollkonstrukt infiziert wurden, proliferieren unabhängig von einer APC-Induktion genauso schnell wie nicht-infizierte Zellen (Abb. 4.7). Die Infektion der Zellen mit einem Kontrollkonstrukt, das RNA-Interferenz gegen das *Luziferase*-Gen auslösen soll, verursacht einen leichten Proliferationsnachteil gegenüber nicht infizierten Zellen. Die Induktion des FL-APC Allels hat bei Expression dieser shRNA ebenfalls keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten. Zellen, in denen das *EIF2B5*-Gen durch eine shRNA herunter-reguliert wird, zeigen einen starken Wachstumsnachteil gegenüber nicht infizierten Zellen. Der Anteil dieser Population sinkt nach 15 Tagen Kultivierung auf 29 % der Zellen ab. Durch Induktion des FL-APC Allels wird dieser Effekt stark verringert: Nach 15 Tagen Kultivierung sind noch 57 % der Zellen infiziert.

Nachdem ein differentieller Effekt durch FL-APC Induktion nach *EIF2B5* Interferenz bei direkter Konkurrenz gegen nicht infizierte Zellen gezeigt werden konnte, wurden in einem weiteren Schritt weitere im shRNA-Screen verwendete shRNAs in pLeGO kloniert (siehe 8.9.10). Mit den shRNA-Konstrukten *shEIF2B5* 85, 87, 88 und 89 infizierte Zellen wurden selektiert und anschließend auf 10 cm Schalen ausgesät. Nach sechs Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt (Abb. 4.8 a). Bei Expression der shRNAs gegen das *Luziferase*- und *EIF2B5*-Gen (shRNA 89) gab es weder einen absoluten, noch einen durch FL-APC Expression vermittelten differentiellen Effekt

auf die Konfluenz der Zellen. Diese Beobachtung ist identisch mit den im shRNA-*Screen* gefundenen Effekten (Es wurde eines der Luziferase-shRNA Konstrukte ohne einen Effekt auf die Zellproliferation ausgewählt). Die *EIF2B5*-shRNAs 85 und 88 reduzierten die Konfluenz der Zellen deutlich. Eine Induktion des FL-APC Allels hebt diesen Effekt partiell auf. Die shRNA *EIF2B5* 87 schließlich hat einen sehr starken Effekt zur Folge, der eine Wachstum gänzlich verhindert. Dies kann durch Expression des FL-APC Allels nicht aufgehoben werden. Diese Ergebnisse reproduzieren ebenfalls die im shRNA *Screen* gemachten Beobachtungen.

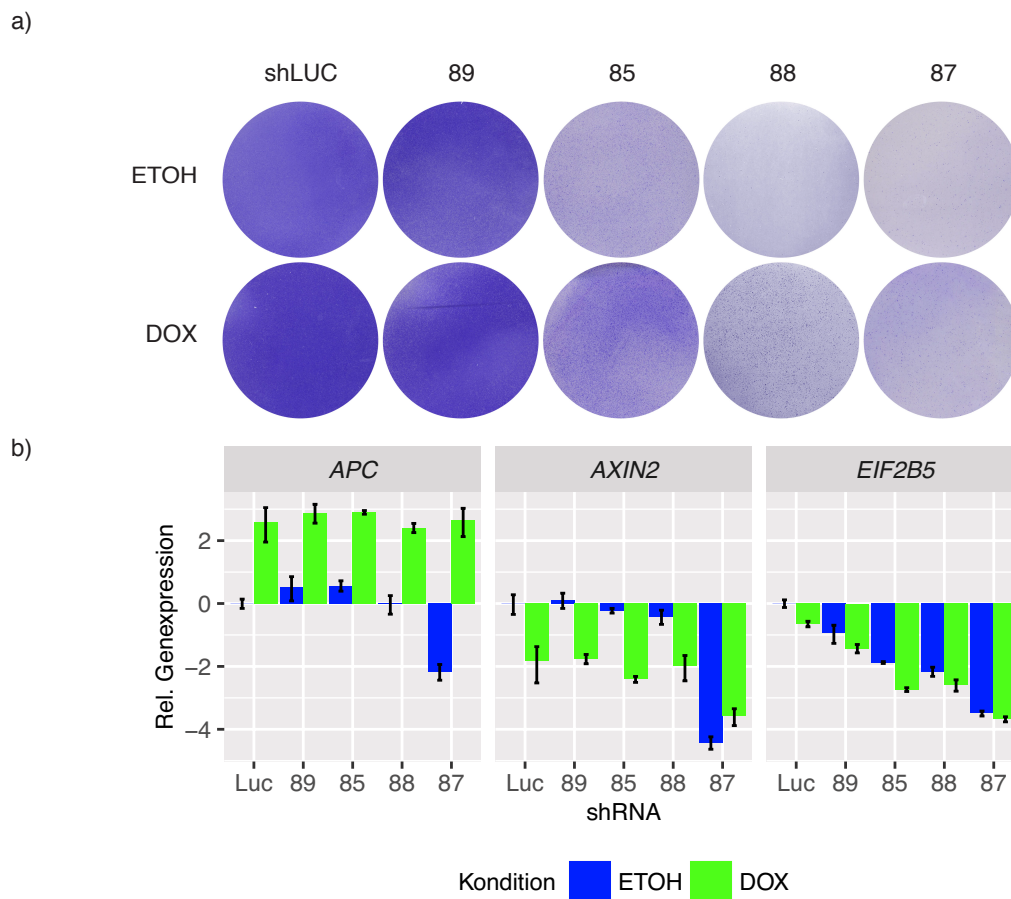


Abbildung 4.8: Die im shRNA-*Screen* gefundenen Reaktionen auf die einzelnen *EIF2B5*-Knockdown-Konstrukte lassen sich in Einzelexperimenten validieren.

a) 50.000 Zellen der Zelllinie pTRE-APC wurden mit shRNAs gegen die angegebenen Gene infiziert und selektioniert. Die Zellen wurden anschließend auf 10 cm Schalen ausgesät und wie angegeben mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin oder Solvenzkontrolle sechs Tage kultiviert. Nach dem Kultivieren wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. (Repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Experimenten) b) Bestimmung der in a) erreichten *Knockdown*-Effizienzen von *EIF2B5* sowie der erfolgten Induktion des FL-APC Allels. 10^6 Zellen wurden parallel zu a) behandelt und ausgesät. Nach drei Tagen Kultivierung wurde RNA isoliert und die angegebenen Gene in qRT-PCRs bestimmt (Mittelwert \pm SD). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus $n=3$ unabhängigen Experimenten.

Die in qRT-PCRs gemessenen *Knockdown*-Effizienzen passen zu den beobachteten Proliferationseffekten (Abb. 4.8 b). Wie erwartet wird unabhängig von der Infektion mit einer shRNA sowohl gegen das *Luziferase*-Gen als auch gegen das *EIF2B5*-Gen durch Doxyzyklin-Applikation die *APC* mRNA induziert und die *AXIN2* mRNA reprimiert. Dies trifft für die shRNAs *EIF2B5* 89, 85 und 88 zu, eine Ausnahme stellt jedoch *shEIF2B5* 87 dar. Bei Expression dieser shRNA wird die *APC* mRNA auf 25 % gegenüber Zellen, die eine *Luziferase* shRNA exprimieren, reprimiert. Zugabe von Doxyzyklin bewirkt jedoch unabhängig von dieser Repression eine Induktion der *APC* mRNA auf eine mit den anderen Infektionen vergleichbare Menge. *AXIN2* wird durch Expression der shRNA *EIF2B5* 87 bereits stark reprimiert und eine FL-APC Induktion bewirkt keine zusätzliche Veränderung. Eine Quantifizierung der verbleibenden *EIF2B5*-mRNA zeigt, dass die *Knockdown*-Effizienz bei dieser shRNA mit 8 % verbleibender mRNA gegenüber dem Ausgangswert am stärksten ist. Eine shRNA gegen das *Luziferase*-Gen verursacht erwartungsgemäß keine RNA-Interferenz mit *EIF2B5*. Die shRNA *EIF2B5* 89 hat lediglich eine schwache RNA-Interferenz zur Folge und die beiden shRNAs *EIF2B5* 85 und 88 haben eine intermediäre *Knockdown*-Effizienz (27, 22 und 51 % für die shRNAs 85, 88 und 89). Auffällig ist, dass unabhängig von der Infektion die *EIF2B5* mRNA durch Expression des FL-APC Allels reprimiert wird (100 % vs. 63 %, 15 % vs. 27 %, 16 % vs 22 % und 8 vs. 9 % für die shRNAs 89, 85, 88 und 87). Die Ergebnisse legen nahe, dass ein Fenster für therapeutische *EIF2B5*-Inhibition im KRK existieren könnte: Eine schwache Depletion von *EIF2B5* (shRNA 89) hat keinen Effekt auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen. Die shRNA *EIF2B5* 87 verursacht einen sehr starken *Knockdown*, den die Zellen nicht kompensieren können. Die beiden shRNAs *EIF2B5* 85 und 88 verursachen mit einem etwas schwächeren *Knockdown* ebenfalls einen letalen Phänotyp, dieser kann jedoch durch Expression des FL-APC Allels teilweise kompensiert werden.

Um eine quantitative Bestimmung des gefundenen differentiellen Wachstumseffektes der induzierten und nicht induzierten SW480 pTRE-APC Zellen nach *EIF2B5* *Knockdown* zu ermöglichen wurden kumulative Wachstumskurven erstellt. Hierfür wurden Zellen mit *shEIF2B5* 88 infiziert, das FL-APC Allel induziert/nicht induziert und alle drei Tage eine Zellzählung durchgeführt. Nicht induzierte, mit einer shRNA gegen das *Luziferase*-Gen infizierte Zellen expandieren nach 15 Tagen zu einer Zellzahl von $15,1 \cdot 10^8$ Zellen (Abb. 4.9 a, obere blaue Wachstumskurve). Durch Expression der *EIF2B5* shRNA reduziert sich diese Zahl auf $2,55 \cdot 10^7$ Zellen (1,69 %, Abb. 4.9 a, untere blaue Wachstumskurve). Die Expression des FL-APC Allels verringert die Anzahl der gemessenen Zellen bereits bei Expression einer *Luziferase*-shRNA leicht, so dass nach 15 Tagen eine kumulative Zellzahl von $6,27 \cdot 10^8$ Zellen erreicht wird (41,5 % der nicht induzierten Zellen, Abb. 4.9 a, obere grüne Wachstumskurve). Bei den induzierten Zellen hat die Expression der shRNA einen geringeren Effekt und es wird eine kumulative Zellzahl von $8,4 \cdot 10^7$ Zellen erreicht (13,54 % der nicht infizierten, induzierten Zellen, Abb. 4.9 a, untere grüne Wachstumskurve). Um

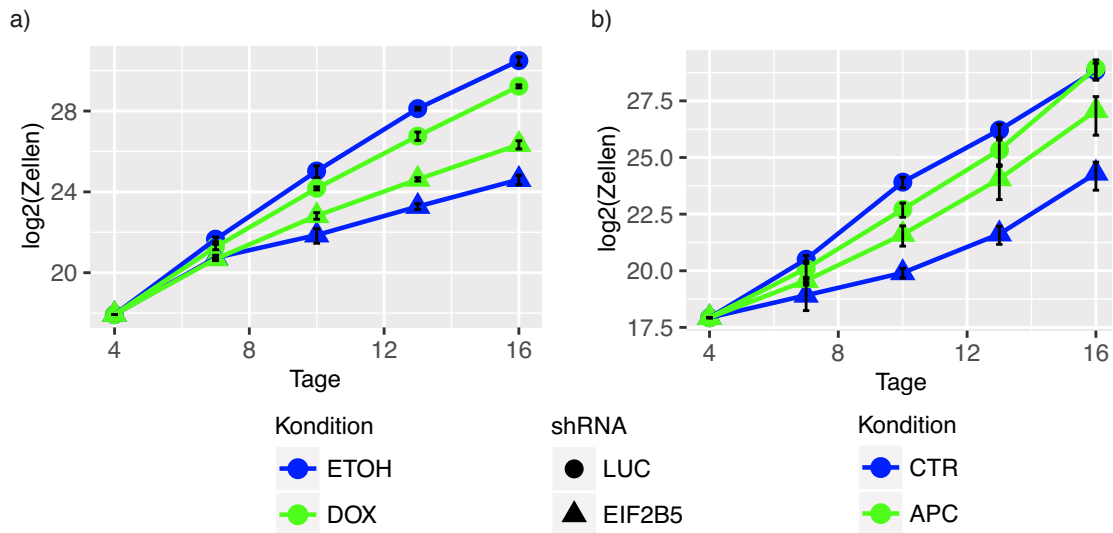


Abbildung 4.9: *EIF2B5* Interferenz verursacht einen differentiellen Proliferationsnachteil. a) pTRE-APC Zellen wurden mit *shEIF2B5* 88 infiziert und vier Tage mit Hygromycin selektiert. Anschließend wurden 250.000 Zellen auf 10 cm Schalen ausgesät und mit Doxyzyklin bzw. Ethanol kultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen passagiert, gezählt und erneut ausgesät. b) Wie a), jedoch wurden eine konstitutiv FL-APC exprimierende Zelllinie und Kontroll SW480 Zellen verwendet und keine Behandlung mit Doxyzyklin oder Ethanol durchgeführt. Die Zellzahl ist als Mittelwert aus n=3 Versuchen +/- SD dargestellt. Datengenerierung: Marika Haderer

die erhaltenen Ergebnisse in einem zweiten Zellsystem zu validieren wurde die in Faux et al. [122] generierte konstitutiv FL-APC exprimierende Zelllinie verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich ebenfalls um SW480 Zellen. Diese wurden stabil mit einem konstitutiv aktiven FL-APC Allel transfiziert. Bei Infektion der Zelllinie mit einem *Luziferase*-shRNA Konstrukt kann kein signifikanter Unterschied der kumulativen Zellzahl zu Kontrollzellen nach 15 Tagen gezeigt werden ($5,16$ und $4,78 \cdot 10^8$ Zellen). Kontrollzellen, die mit der *EIF2B5*-shRNA infiziert wurden, erreichen eine kumulative Zellzahl von $2,07 \cdot 10^7$ Zellen (4,3 % der mit *shLuziferase* infizierten Zellen, Abb. 4.9 b, untere blaue Wachstumskurve). Die FL-APC exprimierenden Zellen hingegen erreichen auch bei Expression der *EIF2B5*-shRNA noch eine Zellzahl von $1,41 \cdot 10^8$ Zellen (27,3 % der mit *shLuziferase* erreichten Zellzahl, Abb. 4.9 b, untere grüne Wachstumskurve). In beiden verwendeten Zellsystemen konnte durch FL-APC Expression ein *Rescue* der durch *EIF2B5* RNA-Interferenz verursachten Verringerung der Zellzahl beobachtet werden. Dieser differentielle Effekt, welcher in der induzierbaren Zelllinie erreicht werden konnte entspricht jedoch nicht den Erwartungen und ist auch deutlich geringer ausgeprägt als in der konstitutiv FL-APC exprimierenden Zelllinie. Aufgrund dessen, und aufgrund einer beobachteten schlechter werdenden *FL-APC* mRNA-Induktion und *AXIN2* mRNA-Repression entschlossen wir uns, eine Subklonierung der generierten Zelllinie durchzuführen.

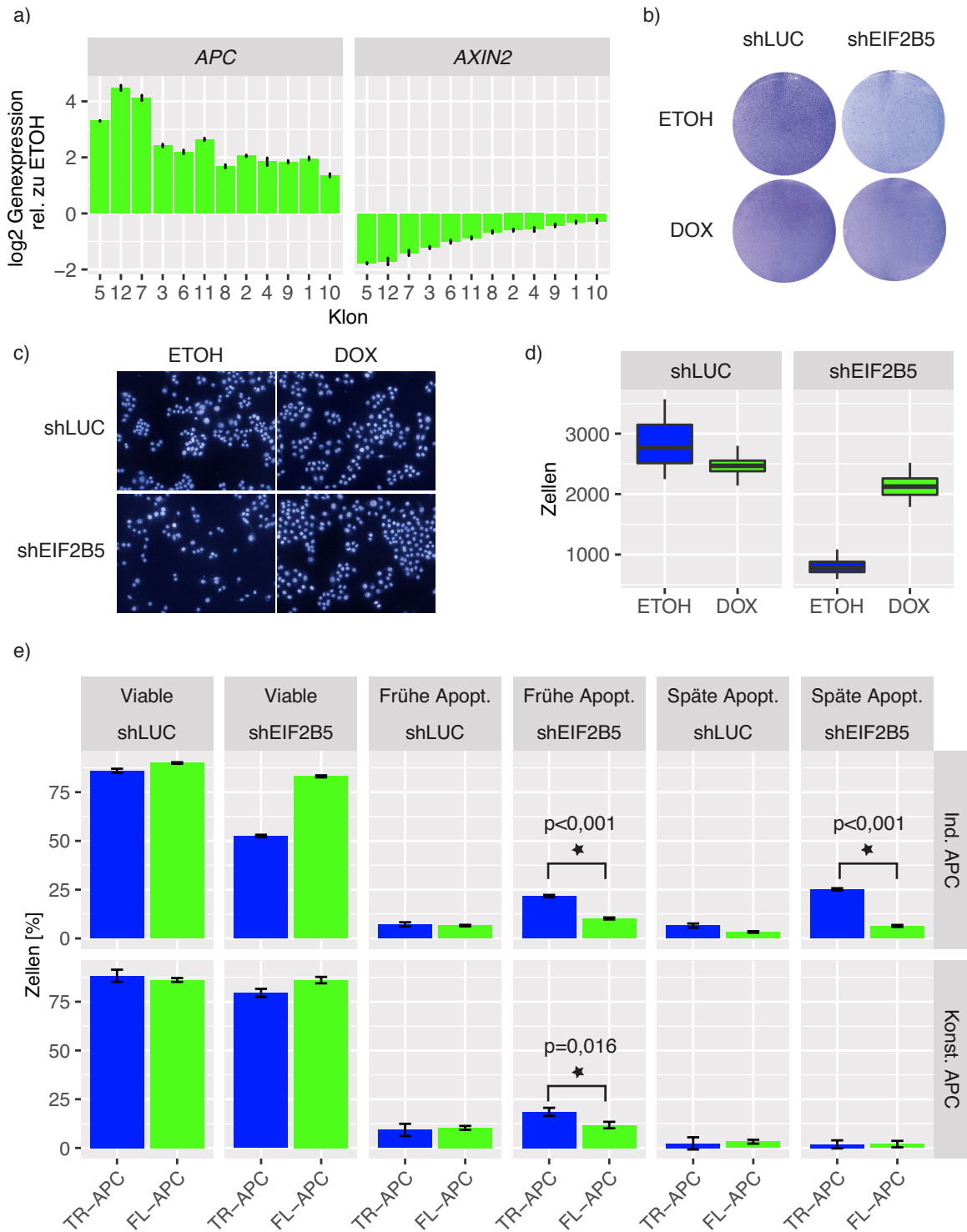


Abbildung 4.10: Knockdown von *EIF2B5* induzierte Apoptose wird durch FL-APC Expression vermindert.

a) Induktion der *APC*- und Repression der *AXIN2*-mRNA nach 24 h Inkubation der Zellen mit Doxyzyklin (n = 1). b) *shEIF2B5* oder *shLUC*-infizierte pTRE-APC Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät und mit Doxyzyklin/ETOH behandelt. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

Fortsetzung Abbildung 4.10: c) *shEIF2B5* oder *shLUC*-infizierte Zellen wurden in Vertiefungen einer 96 Well Platte ausgesät und mit 0,5 ug/ml Doxyzyklin/ETOH behandelt. Nach 4 Tagen Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit Hoechst33342 gefärbt (siehe ??). Gezeigt ist eine exemplarische Aufnahme aus einer Vertiefung. d) Quantifizierung von c) (n=12) e) *shEIF2B5* oder *shLUC* infizierte pTRE-APC (oben) bzw. konstitutiv APC-exprimierende (unten) Zellen wurden auf 10 cm Platten ausgesät und drei Tage inkubiert. Die pTRE-APC Zellen wurden hierbei wie zuvor beschrieben mit Doxyzyklin oder ETOH behandelt. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt (siehe ??) (n=3). Daten: S. Peter (a, b, e), C. Schülein-Völk (c, d), F. Uthe (e)

Der hierbei gewonnene Subklon 12 zeigte neben einer guten Reduktion der *AXIN2* mRNA auch eine sehr robuste *APC* Induktion und wurde für die folgenden Experimente verwendet. (Abb. 4.10 a). Bei Infektion der Zellen mit *shEIF2B5* 88 konnte erneut gezeigt werden, dass der durch Expression der *EIF2B5* shRNA ausgelöste Proliferationsnachteil partiell aufgehoben werden kann (Abb. 4.10 b). Um erneut eine quantitative Analyse der Proliferation zu erhalten wurden infizierte Zellen mit Ethanol oder Doxyzyklin drei Tage vorbehandelt und anschließend weitere drei Tage in 96 *Well*-Platten kultiviert. Die Zellen wurden fixiert, mit Hoechst 33342 gefärbt und die angefärbten Zellkerne anschließend mit einem Operetta Mikroskop gezählt (Abb. 4.10 c, ??). Die Expression der *EIF2B5*-shRNA reduziert die hierbei gefundenen Zellen von 2862 Zellen/*Well* auf 807 Zellen/*Well* (28 %, (Abb. 4.10 d). FL-APC induzierte Zellen zeigen erneut bereits bei Infektion mit einem *shLuziferase*-Konstrukt einen Wachstumsnachteil und erreichen eine durchschnittliche Zellzahl von 2462 Zellen/*Well*. Diese reduziert sich bei Expression der *EIF2B5*-shRNA auf 2133 Zellen/*Well* (86,6 %). Durch die Generierung eines Subklones konnte also ein deutlich stärkerer differentieller Effekt erzielt werden.

Um die Ursache der gefundenen differentiellen Zellzahlen zu ermitteln wurde überprüft, ob *EIF2B5*-depletierte Zellen ohne FL-APC Apoptose induzieren. Hierzu wurden erneut das induzierbare, sowie das konstitutive FL-APC SW480 Zellsystem herangezogen. Mit *shEIF2B5* infizierte Zellen wurden drei Tage kultiviert, pTRE-APC Zellen zusätzlich drei Tage mit Ethanol oder Doxyzyklin vorbehandelt. Die im Überstand vorhandenen Zellen und Zelltrümmer wurden mit trypsinierten Zellen vereint und die Apoptose anhand der Permeabilität für Propidium Iodid und Bindung von Annexin V zytometrisch untersucht (siehe ??). Hierbei stellte sich heraus, dass durch die Expression der *EIF2B5*-shRNA der Anteil vitaler Zellen der nicht induzierten pTRE-APC Population von initial 85,93 % (bei *shLuziferase* infizierten Zellen) auf 52,53 % sinkt (Abb. 4.10 e, obere Reihe). Entsprechend nehmen die Anteile der Zellen in frühen und späten Apoptose-Stadien (AnnexinV-positiv und PI-negative Zellen bzw. AnnexinV-positiv und PI-positiv) von initial 7,2 % und 6,5 % auf 21,7 % und 25,3 % zu. Die Expression des FL-APC Allels verringert die Apoptoseinduktion. Die Vitalität der Zellen sinkt von initialen 89,9 % auf 83,1 % und der Anteil der Zellen in früher und später Apoptose nimmt entsprechend von 6,5 % und 3,3 % auf 10,2 % und 6,4 % zu. Analoge Apoptosemessungen bei dem konstitutiv APC-exprimierenden Zellsystem ergaben ähnliche Ergebnisse: Der Anteil vitaler Zellen nimmt bei Kontrollzellen

nach 24h Inkubationszeit bei Expression der *shEIF2B5* 88 von 88,3 % auf 79,5 % ab. Der Anteil PI-positiver Zellen steigt von 9,3 % auf 18,5 % (Abb. 4.10 e, untere Reihe). Die konstitutiv FL-APC exprimierenden Zellen hingegen verblieben auch nach RNA-Interferenz mit *EIF2B5* bei einem Anteil vitaler Zellen von 86,1 %. Diese Ergebnisse sind kompatibel mit der Hypothese, dass der differentielle Wachstumsnachteil zwischen FL-APC und TR-APC exprimierenden Zellen nach *EIF2B5*-Depletion durch Apoptose verursacht ist.

Im Zuge einer Masterarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Depletion von *EIF2B5* die mit ER-Stress assoziierten Gene *DDIT3*, *ATF3*, *SARS* und *TRIB3* sowohl im induzierbaren als auch im konstitutiven FL-APC induziert und die Expression des FL-APC Allels diese Induktion stark abschwächt (Marika Haderer [131] Abb. 12, im elektronischen Anhang dieser Arbeit enthalten). Wir konnten ebenfalls validieren, dass die ATF4 Proteinmenge durch *EIF2B5*-Depletion erhöht wird und dieser Effekt nach APC-Induktion verringert ist. Der ER-Stress Signalweg wird typischerweise in drei distinkte Signalkaskaden eingeteilt [132] Die Perzeption von ER-Stress wird durch ungefaltete Proteine im endoplasmatischen Reticulum ausgelöst. Diese binden Chaperone, welche normalerweise die Aktivität der Proteine IRE1 α , PERK und ATF6 α inhibieren und lösen dadurch deren Aktivierung aus. IRE1 α -Aktivierung führt zu einem *Splicing* von XBP1. PERK-Aktivierung führt zur verstärkten Translation von ATF4 und im Anschluss zur Expression von *DDIT3* (CHOP). ATF6-Aktivierung schließlich führt zur Expression von Chaperonen, darunter GRP78 (siehe [132], Fig.2). Die Aktivierung des ER-Stress Signalweges führt zunächst zu einer Adaption der Zelle an die Stresskondition und, bei anhaltendem, nicht mehr tolerierbarem Stress, zu Induktion von Apoptose.

Ein Zusammenhang zwischen der Expression von FL-APC und der Depletion von *EIF2B5* einerseits sowie der Modulation von ER-Stress andererseits sollte nochmals validiert werden. Hierfür wurden qRT-PCR Experimente von *shEIF2B5* infizierten SW480 Zellen mit konstitutiver und induzierbarer FL-APC Expression durchgeführt (Abb. 4.11 a). In dem induzierbaren FL-APC System konnte nach Doxyzyklininduktion eine Induktion der *APC* mRNA gezeigt werden, die auch nach Expression der beiden shRNAs *EIF2B5* 85 und 88 unverändert blieb (Abb. 4.11 a), *APC*, Reihe *Ind. APC*). Die Expression von *AXIN2* wird durch FL-APC Expression wie erwartet verringert. Durch Depletion von *EIF2B5* kommt es interessanterweise auch ohne FL-APC bereits zu einer geringen Reduktion von *AXIN2* (67 % und 62 % bei den shRNAs 85 bzw. 88). Die Induktion des FL-APC Allels führt, wie bereits zuvor beobachtet, zu einer Reduktion der *EIF2B5* mRNA, sowohl nach *EIF2B5*-*Knockdown*, als auch unter Kontrollbedingungen (Abb. 4.11 a, *EIF2B5*, obere Reihe). Der *Knockdown* von *EIF2B5* führt zu einer verbleibenden mRNA Menge von weniger als 25% des Ausgangswertes. Die Ergebnisse für ein Experiment mit dem konstitutiven FL-APC Zellsystem verhalten sich analog (Abb. 4.11 a, *APC*, *AXIN2*, *EIF2B5*, untere Reihe): Die *EIF2B5* mRNA-Menge ist bei konstitutiv APC exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen verringert. Nach *Knockdown* von *EIF2B5* ist in

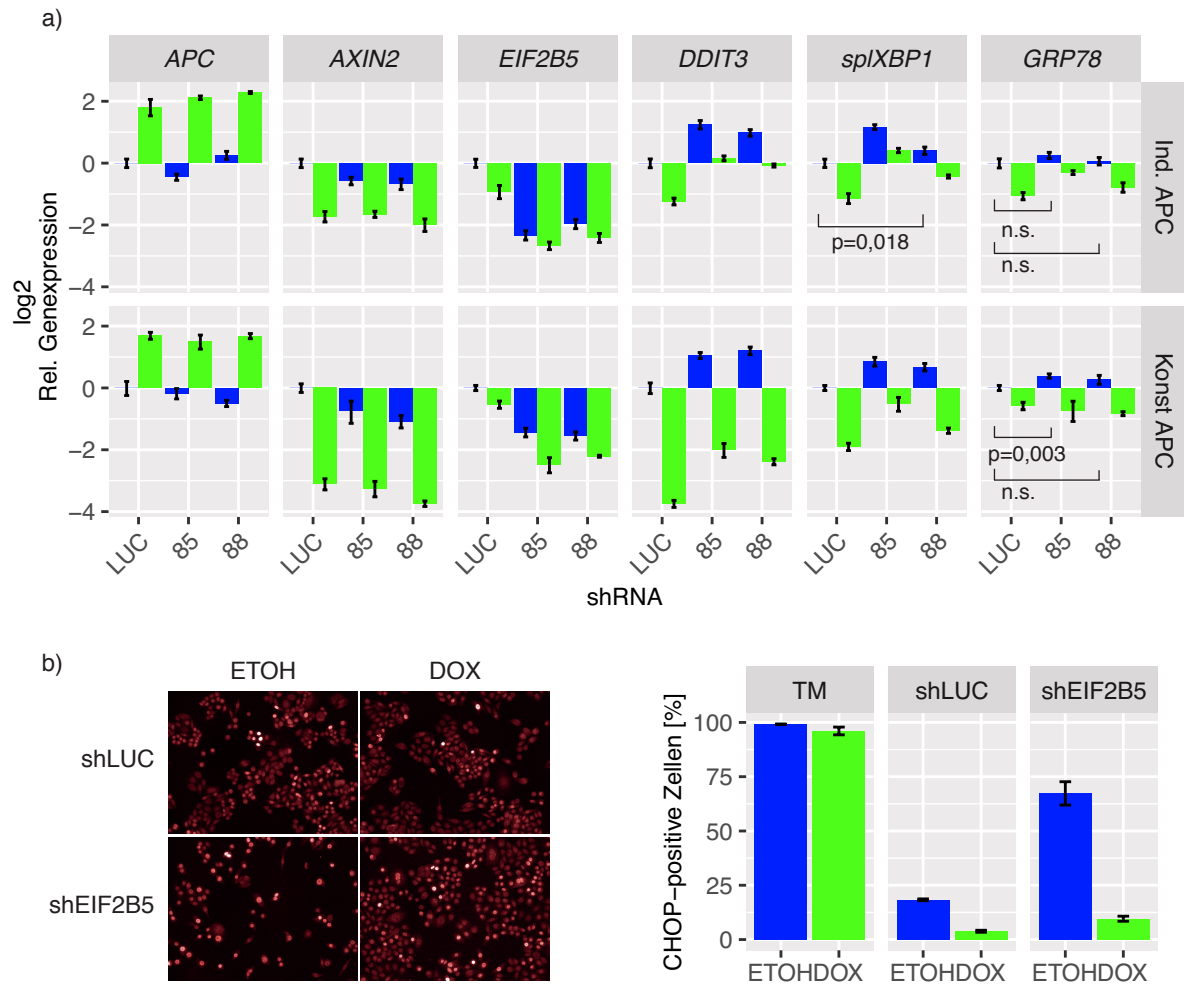


Abbildung 4.11: Knockdown von *EIF2B5* und APC-Verlust induzieren ER-Stress Gene
a) SW480-TRE-APC oder konstitutiv APC-exprimierende und Kontrollzellen wurden mit shRNAs gegen *Luziferase* oder *EIF2B5* (85 und 88) infiziert und selektioniert. SW480-TRE-APC Zellen wurden für 48 h mit Ethanol oder 0,5 ug/ml Doxzyklin behandelt. RNA wurde wie zuvor beschrieben extrahiert und die oben gezeigten Gene in qRT-PCR experimenten analysiert. b) SW480-TRE-APC Zellen wurden mit einer shRNA gegen *EIF2B5* oder *Luziferase* infiziert, selektioniert und anschließend mit 24 h 0,5 ug/ml Medium DOX oder ETOH behandelt. 10000 Zellen wurden pro Well einer 96-Well Platte in drei Replikaten pro Kondition ausgesät und weitere 72 h mit DOX/ETOH kultiviert. Die Zellen wurden daraufhin mit PFA fixiert und immunhistochemisch auf CHOP-Expression untersucht (siehe ??). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die 24 h vor dem Fixieren mit 2.5 ug/ml Tunicamycin (TM) erhielten (n=3). Links: Exemplarische Aufnahme innerhalb eines Wells. Rechts: Quantifizierung der erhaltenen Daten

den FL-APC exprimierenden Zellen noch immer eine geringere Menge der *EIF2B5* mRNA im Vergleich zu Kontrollzellen vorhanden. Entsprechend den Beobachtungen bei den induzierbaren FL-APC Zellen zeigt sich auch hier, dass die *AXIN2* mRNA-Menge nach EIF2B5 Depletion verringert ist.

Die hier betrachteten Gene *DDIT3*, *splXPB1* (*spliced XBP1*) und *GRP78*, welche als Indikator für eine Aktivierung der einzelnen ER-Stress-Signalwege verwendet wurden, werden durch die Induktion des FL-APC Allels reprimiert (Abb. 4.11 a). Dies gilt sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Expression einer *EIF2B5*-shRNA. Die Depletion von *EIF2B5* führt bei den Genen *DDIT3* und *splXPB1* zu einer signifikanten Induktion der mRNA. Dies kann erneut für die induzierbare, sowie die konstitutiv FL-APC exprimierende Zelllinie beobachtet werden (4.11 a, *DDIT3* und *splXPB1*). Für das Gen *GRP78* gilt dies jedoch nicht: *EIF2B5* shRNA-Expression führt zwar in dem konstitutiv FL-APC exprimierenden Zellsystem zu einem geringen, aber dennoch signifikanten Anstieg der *GRP78* mRNA-Menge nach Expression der shRNA 88 (1,3 x facher Anstieg gegenüber *shLuziferase*, $p=0,003$). In dem gleichen System verursacht die *EIF2B5* shRNA 85 jedoch nicht eine derartigen Veränderung. In dem induzierbaren FL-APC system kommt es weder nach Expression der EIF2B5 shRNAs 85 noch nach shRNA 88 zu einem signifikanten Anstieg der *GRP78* mRNA.

Das Protein CHOP wurde auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 4.11 b). Hierfür wurden pTRE-APC Zellen mit *EIF2B5* (88) oder *Luziferase* shRNAs infiziert und nach erfolgter Selektionierung mit Ethanol bzw. Doxyzyklin behandelt. 10.000 Zellen wurden nach 72 h Induktion auf 96 *Well*-Platten ausgesät und weitere 72 h unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde CHOP immunhistochemisch nachgewiesen und die Intensität der erhaltenen Färbung quantifiziert. Tunicamycin ist ein bekannter Auslöser von ER-Stress und wurde deshalb als Positivkontrolle verwendet. Eine Behandlung der Zellen mit Tunicamycin führt bei fast allen Zellen zu einem positiven CHOP-Signal (Abb 4.11 b). Bei Expression einer *Luziferase*-shRNA sind 18,3 % der Zellen CHOP-positiv. Dieser Wert verringert sich auf 3,8 %, wenn zugleich das FL-APC Allel induziert wird. Nach *EIF2B5* shRNA-Expression sind 68,3 % der Zellen CHOP-positiv und dies reduziert sich durch FL-APC Expression auf 9,6 % der Zellen. Diese Daten bestätigen einen Zusammenhang sowohl zwischen FL-APC/TR-APC Expression als auch zwischen der Expression von *EIF2B5* und der Induktion von ER-Stress.

Diskussion

Synthetisch letale Interaktionen bieten eine Möglichkeit, in schwer oder gar nicht inhibierbare molekulare Strukturen indirekt pharmakologisch einzugreifen. Die in KRK typischerweise zu findenden APC-Mutationen stellen eine solche Struktur dar, weil die aufgrund der Mutation erfolgte Trunkierung des Proteins einen Funktionsverlust, in diesem Fall die Fähigkeit zur effizienten β -CATENIN Degradation, zur Folge hat. Ein Ziel dieser Dissertation war es, Gene zu finden, von deren Funktion Zellen mit APC-Trunkierung abhängig sind.

Um synthetisch letale APC-Interaktionen aufzufinden wurde ein shRNA-*Screen* mit 27.500 unterschiedlichen shRNAs durchgeführt. Solche *Screens* haben aufgrund der α -Fehler-Inflation (Multihypothesentest-Problem) das Problem, zahlreiche falsch-positive und -negative Ergebnisse zu generieren [133]. Unter den Möglichkeiten dieses Problem zu verringern sind (i) die Minimierung der biologischen Varianz, (ii) eine Reduktion der Anzahl der verwendeten Hypothesen (Zielgene in der *Screen*-Bibliothek) und (iii) ein mehrmaliges, unabhängiges Testen der gleichen Hypothese. In dieser Arbeit wurden diese drei Möglichkeiten ausgenutzt:

(i) Generierung einer isogenen, FL-APC induzierbaren KRK Zelllinie Der in dieser Arbeit präsentierte shRNA-*Screen* wurde in der Kolorektalkarzinomzelllinie SW480 durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Tet-System FL-APC induzierbar gemacht [134]. SW480 Zellen wurden ausgewählt, weil von dieser Zelllinie bereits gezeigt wurde, dass sie Klone hervorbringt, die die restaurierte Expression des vollständigen APC-Proteins tolerieren [122]. Die Entscheidung, ein induzierbares FL-APC Zellsystem zu generieren war dadurch motiviert ein möglichst isogenes Zellsystem zu erhalten, welches erst zu einem definierten Zeitpunkt das vollständige APC-Allel durch Zugabe von Doxyzyklin exprimiert. Da es sich bei SW480 Zellen um chromosomal instabile Zellen handelt, nahmen wir an, dass dieser Punkt hinsichtlich des zu erwartenden α -Fehler-Inflationsproblems bei dem shRNA-*Screen* besondere Relevanz hat [135].

Es ist interessant, dass die Zelllinie überhaupt dazu in der Lage ist, eine APC-Restoration zu tolerieren. Einerseits könnte dies daran liegen, dass eine wichtige Konsequenz der APC-Trunkierung, ein verändertes Migrationsverhalten ist, das die Zellen *in vivo* vor einer Migration in Richtung Villus-Spitze bewahrt. Dort angekommene Zellen werden aufgrund ihrer Umgebung schnell apoptotisch. Dieses veränderte Verhalten würde in Zellkultur nicht zu dem gleichen Ergebnis führen (siehe Abschnitt 3.4 und [82]). Es könnte also ein größerer Selektionsdruck für eine APC-Trunkierung *in vivo* als *in vitro* bestehen und die Zellen sind in der Folge resistent gegen eine Expression des nicht mutierten FL-APC

Allels. Andererseits haben SW480 Zellen neben den hier für das *APC*-Gen beschriebenen Mutationen noch über 700 weitere Mutationen, unter anderen in den Genen *TP53*, *KRAS*, *MTOR* und 23 weiteren *cancer-driver* Genen akquiriert, die es ihnen ermöglichen könnten die Revertierung der APC-Trunkierung zu überleben (Siehe kritische SW480-Mutationen in COSMIC).

Die FL-APC Expression der hergestellten Zelllinie war Doxyzyklinkonzentrations- und zeitabhängig (Abb. 4.2). Die Konzentration der gemessenen *APC* mRNA erreichte bei einer Doxyzyklinkonzentration von 500 ng/ml nach 24 h ein Maximum von dem Vierfachen des Ausgangswertes, nahm im weiteren Zeitverlauf jedoch wieder langsam ab. Messungen von β -CATENIN im Immunoblot während des *Screens* (und auch zuvor, nicht gezeigt) zeigten jedoch, dass die Induktion des FL-APC Allels auch über zwei Wochen ausreichend ist, um Wnt-Signalweg-Effektormoleküle zu regulieren (Abb. 4.5 c). Durch einen RNA-Seq Versuch konnten umfangreiche Veränderungen in der globalen Genexpression nach Induktion des FL-APC Allels festgestellt werden. Neben weiteren Gensets konnten auch solche gefunden werden, die darauf hindeuten, dass diese Veränderung mit einer Regulation im Wnt-Signalweg zusammenhängt (Tab. 4.2). Dass auch zahlreiche Gensets gefunden werden konnten, deren Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg nicht offensichtlich ist, liegt vermutlich an der langen Induktionszeit des FL-APC Allels von 48 h. Diese Zeitspanne erlaubt es auch anderen durch FL-APC Expression modulierten Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise MYC und seinen Zielgenen die Genexpression zu beeinflussen. Eine starke Regulation von β -CATENIN und den Wnt-Zielgenen *AXIN2* und *MYC* war aber auch bereits nach 4 h APC-Induktion nachweisbar (Abb. 4.2). Ein RNA-Seq Versuch nach dieser Zeit könnte diese indirekten Effekte verringern, wodurch eine noch eindeutigere Assoziation zu Wnt-Gensets ermöglicht werden sollte. Möglicherweise könnte die Induktionszeit für einen solchen Versuch noch weiter verringert werden. Die optimale Zeitdauer der FL-APC Induktion wäre beispielsweise anhand einer Zeitreihe in der die *AXIN2*-Regulation bereits nach kleinen Intervallen gemessen wird bestimmbar. Auf diesen Versuch wurde hier verzichtet, da die Zellen auch phänotypisch in der Literatur beschriebene Effekte nach FL-APC Restauration zeigten und somit die Expression des FL-APC Allels als gegeben und funktional angesehen wurde.

Es konnte kein durch FL-APC Expression ausgelöster Proliferationsdefekt beobachtet werden (Abb. 4.3 a,b). Faux et al. [122] hingegen beschreiben einen Proliferationseffekt durch FL-APC Expression in SW480 Zellen. Der Konflikt zu den beschriebenen Daten könnte durch mehrere Faktoren erklärt werden: In Faux et al. [122] wurden die Zellen ausgesät und über den gesamten Versuchszeitraum kultiviert, während hier eine kumulative Wachstumskurve erstellt wurde, bei der die Zellen alle drei Tage passagiert wurden. Die in Faux et al. [122] generierten Zellen zeigen einen sehr starken adhäsiven Phänotyp. Parentale SW480 Zellen sind in der Lage, sich von der Zellkulturschale zu lösen und an anderer Stelle wieder zu adherieren [136–138]. Einerseits sind also TR-APC Zellen in der Lage

die Anzahl der Foci, von denen ausgehend die Zellen expandieren können, durch Ablösen und erneute Adhäsion zu erhöhen. Andererseits sind die von Faux et al. [122] konstitutiv FL-APC exprimierenden Zellen durch ihre starke Adhäsion auf die Orte beschränkt, an denen sie zu Beginn eines Versuches ausgesät wurden. Die TR-APC Zellen haben also einen Proliferationsvorteil, der nur bei langer Kultivierung mit niedrigen initialen Zellzahlen zu tragen kommt. Bei Faux et al. [122] ist dies der Fall. In der hier gezeigten kumulativen Proliferationsmessung hingegen nicht - es wurden jeweils 500.000 Zellen 72 Stunden kultiviert. Wenn diese Vermutungen zutreffen, sollte bei der Generierung einer kumulativen Wachstumskurve mit dem konstitutiven FL-APC Zellsystem ein deutlich geringerer Unterschied zu Kontrollzellen zu sehen sein, als dies in Faux et al. [122] der Fall war. In der Tat konnten wir dies hier beobachten (Abb. 4.9, b, blaue vs. grüne Kurve mit Punkten). Einschränkend ist hierbei jedoch zu benennen, dass das angesprochene Experiment mit Zellen ausgeführt wurde, die eine shRNA gegen das *Luziferase*-Gen exprimieren. Dass dies bereits einen Effekt auf die Viabilität von Zellen haben kann, konnte hier ebenfalls beobachtet werden (siehe unten). Es kann daher nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass beispielsweise ein differentieller Effekt vorliegt, der die Viabilität der normalerweise schneller proliferierenden TR-APC Zellen stärker beeinflusst als APC-restaurierte Zellen. Andererseits scheint dies aber zumindest in dem induzierbaren Zellsystem nicht der Fall zu sein (Abb. 4.7). Bei der hier generierten Zelllinie handelt es sich um Zellen klonaler Herkunft. Durch eine eventuell auch nur direkt nach der Transfektion vorhandene Basalexpression könnte der gewonnene Klon bereits eine Selektion durchlaufen haben, die eine normale Proliferation bei FL-APC Expression erlaubt. Zusammengefasst zeigt sich in pTRE-APC Zellen nach Induktion des FL-APC Allels also vor allem im Hinblick auf Literatur mit einem vergleichbaren System überraschenderweise keinen Proliferationsnachteil. Dieser scheinbare Widerspruch löst sich jedoch bei genauer Untersuchung der experimentellen Konditionen auf.

Unter Bedingungen, bei denen den Zellen die Möglichkeit zur Adhäsion genommen wird, zeigte sich ein deutlicher Überlebensnachteil für APC-trunkierte Zellen (Abb. 4.3 c,d). Die Relevanz des aktiven Wnt-Signalweges für das Überleben unter solchen Konditionen wurde bereits in zahlreichen Studien gezeigt [139–141].

Ein weiterer erwarteter Phänotyp konnte bei der Untersuchung des Migrationsphänotyps gesehen werden. FL-APC Zellen waren deutlich besser dazu in der Lage einem hergestellten FKS-Gradienten zu folgen als Zellen ohne das FL-APC Allel (Abb. 4.3 e,f). Dieses Verhalten kann erwartet werden, bereits gezeigt wurde, dass FL-APC für eine gerichtete Migrationsbewegung von Zellen benötigt wird [82]. Interessanterweise wurden bei Versuchen, FL-APC in SW480 zu restaurieren auch Daten erzeugt, die mit den hier gezeigten Daten in Konflikt zu stehen scheinen. Das Migrationsverhalten von TR-APC Zellen in *Wound-healing assays* wurde von Faux et al. [122] als stärker beschrieben als das von FL-APC Zellen. Der in diesem Versuch ermittelte Effekt beschreibt jedoch eine ungerichteten

Migration, da kein Migrations-stimulierender Gradient hergestellt wurde. Damit ist dieser Versuch nicht mit den hier dargestellten Daten nicht vergleichbar, bei denen die Zellen einen solchen Gradienten zur Verfügung hatten.

Die gesammelte Evidenz für das erwartungsgemäße Verhalten der generierten Zelllinie validierte somit die Durchführbarkeit des angestrebten shRNA-*Screens*. Als shRNA-Bibliothek wurde Modul I des Decipher-Projektes ausgewählt. Diese Bibliothek enthielt shRNAs gegen 5.000 Zielgene und reduzierte damit im Vergleich zu genomweiten shRNA-Bibliotheken die Anzahl der getesteten Hypothesen wesentlich, was eine weitere Reduktion des α -Fehlers bewirken sollte (ii). Zusätzlich enthielt die Bibliothek 5-6 shRNAs gegen jedes Zielgen, wodurch mehrere unabhängige Tests innerhalb eines *Screen*-Replikates durchgeführt wurden (iii).

ShRNA Screen auf synthetisch letale APC-Interaktionen Ein Nachteil der verwendeten Bibliothek war, dass diese zur Selektionierung infizierter Zellen eine Puromycin-resistenzkassette hatte. Eine Puromycinresistenz wurde aber bereits bei der Generierung der FL-APC induzierbaren Zelllinie verwendet. Hierdurch war eine Selektionierung infizierter Zellen bei der Verwendung dieser shRNA Bibliothek nicht möglich und folglich wurde angestrebt, möglichst viele Zellen zu infizieren. Andererseits erhöht sich durch dieses Vorgehen zwangsläufig auch der Anteil der Zellen, welcher durch mehr als ein Viruspartikel infiziert wird. Diese Gesetzmäßigkeit kann mit der Poisson-Verteilung beschrieben werden (siehe Abb. 8.1). Da ab einer MOI von 0,7 der Anteil an Zellen mit mehrfachen Integrationen schneller zunimmt als der mit einer einfachen Integration, wurde diese MOI bei der Infektion der Zellen als ein Optimum angestrebt.

Im Verlauf des *Screens* nahm der Anteil infizierter Zellen kontinuierlich ab. Die verwendete shRNA-Bibliothek enthält bevorzugt shRNAs, deren Aktivität eine Depletion von Signalwegsproteinen nach sich ziehen soll. Diese sind häufig essentiell für das Überleben einer Zelle und es kann daher ein Wachstumsnachteil infizierter- gegenüber nicht-infizierten Zellen erwartet werden. Es zeigte sich jedoch auch, dass eine Infektion mit einer Kontroll-shRNA wie beispielsweise der gegen das *Luziferase*-Gen bereits Wachstumsnachteile für infizierte Zellen entstehen (siehe Abb. 4.7, shLUC). Andererseits entstehen jedoch keine Wachstumsnachteile, wenn ein Vektor ohne shRNA-*Insert* infiziert wird (siehe Abb. 4.7, EV). Die Virusinfektion an sich ruft diesen Effekt also nicht hervor. Möglicherweise führt die exogen erzwungene Expression einer shRNA unabhängig von ihrem spezifischen Zielmolekül bereits zu einer kompetitiven Inhibition des DICER/RISC Komplexes, der shRNAs prozessiert. Solche Effekte wurden bereits beschrieben [142]. Um eine Redundanz von 800-facher Überrepräsentation jeder shRNA beim Sequenzieren zu gewährleisten, wurde die beobachtete Abnahme infizierter Zellen ausgeglichen, indem mehr Zellen für Sequenzierung verwendet wurden.

Bei der Präparation der Sequenzierbibliothek (Abb. 4.4 b) wurde ein unerwartetes Produkt durch die Index-PCR erzeugt (4.5, d). Dieses Produkt zeigte in der Chip-Gelelektro-

phorese das Laufverhalten eines zu großen, uneinheitlichen Produktes (*PCR-Peak* bei 43 Sek und ein weiteres, breites Produkt bei 48 Sek). Sangersequenzierungen von Isolaten dieser Produkte zeigten, dass es sich um korrekte Produkte aus der shRNA-Bibliothek handelte (nicht gezeigt). Es wurde folglich angenommen, dass es sich bei dem Produkt um DNA-Doppelstränge handelt, deren Barcode-Sequenz nicht identisch ist, die aber aufgrund ausreichender komplementärer Basen an den 5' und 3' Enden dennoch *annealen* (Abb. 5.1). Eine solche, partiell nicht komplementäre DNA, könnte ein verändertes Laufverhalten zeigen und derartige Produkte wurde bereits in anderen Studien beschrieben [143]. Es steht zu befürchten, dass die Quantifizierung der Sequenzierbibliotheken durch diesen Effekt ungenau werden könnte. Dieses potentielle Problem wurde jedoch ignoriert, da alle generierten Bibliotheken einen ähnlichen Anteil des beschriebenen Nebenproduktes enthielten. Die Sequenzierung der normalisierten und vereinten Bibliotheken erzeugten vergleichbare *Sequenzread*-Zahlen (nicht gezeigt).

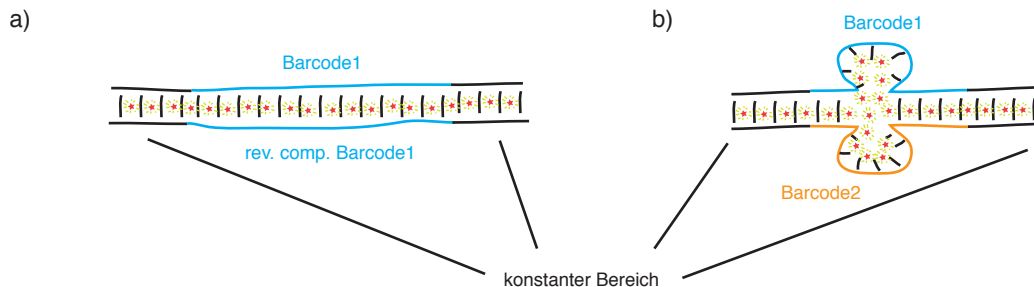


Abbildung 5.1: *reannealed partial duplex*

a) In frühen PCR-Zyklen verlaufen die Barcode- und Index-PCRs mit hoher Effektivität. Annähernd jedes Edukt wird amplifiziert und ein DNA-Doppelstrang mit der perfekt revers-komplementären Basensequenz bildet sich. Bei weiteren Zyklen nimmt die PCR-Effizienz ab und nicht-amplifizierte Edukte können wieder renaturieren. b) Da die Sequenzen aller amplifizierten Barcodes an 5' und 3' zu einem großen Teil identisch sind, ist die Wahrscheinlichkeit groß (circa 1:27.500, der Anzahl vorhandener unterschiedlicher shRNAs), dass zwei unterschiedliche shRNA Konstrukte eine partielle Doppelhelix generieren. Der Bereich, in dem keine komplementäre Basenpaarung möglich ist, könnte in der Lage sein, mehr interkalierenden Farbstoff zu inkorporieren (durch rote Sterne dargestellt).

In der dem shRNA-Screen folgenden Qualitätskontrolle konnte eine kontinuierliche Expression des FL-APC Allels indirekt durch Messung der β -CATENIN Proteinmengen bestätigt werden (4.5, c). Es zeigte sich bei der Sequenzierreaktion, dass jede shRNA der Bibliothek circa 10.000-30.000 mal sequenziert wurde. Da es innerhalb der Zellpopulation lediglich 800 unabhängige Infektionen gab ist mit dieser Sequenziertiefe eine ausreichende Abbildung der biologischen Varianz gegeben. Die durchgeführten Maßnahmen um eine geringe Varianz zu erreichen führten zum Erfolg, wie eine PCA der drei unabhängigen *Screen*-Replikate zeigte (Abb. 4.5 f und Tab. 5.1).

Überraschenderweise ergab die Auswertung des shRNA-Screens lediglich zwei Kandi-

Reduktion biologischer Varianz (i)	Nutzung eines isogenen Zellsystems
Reduktion getesteter Hypothesen (ii)	Test von lediglich 5.000 <i>inhibierbaren</i> Genen
Mehrmaliges unabhängiges Testen der gleichen Hypothese (iii)	5-6 unabhängige shRNA pro Gen
Vermeidung experimenteller Nadelöhre	800-fache Überrepräsentation aller shRNAs, 20-fache Sequenziertiefe

Tabelle 5.1: Maßnahmen zur Vermeidung falsch-positiver und -negativer *Screen*-Ergebnisse

daten für eine synthetisch letale APC-Interaktion, *BCL2L1* und *EIF2B5*. Im Zuge einer Masterarbeit konnten wir bestätigen, dass *BCL2L1* diese synthetisch letale Interaktion mit dem Verlust von FL-APC zeigt [131]). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Depletion dieses Gens synthetisch letal mit hyperaktivem β -CATENIN ist [115]. Mechanistisch liegt dies laut Rosenbluh et al. [115] an einem Komplex begründet, den β -CATENIN zusammen mit YAP1 und TBX5 bildet. Dieser führt zur Expression und damit Erhöhung von *BCL2L1*, von dem Zellen mit hoher β -CATENIN-Aktivität abhängen. Zahlreiche der in dieser Studie verwendeten Zellen haben APC-Mutationen, die zu der erhöhten β -CATENIN-Aktivität führen. Es ist daher naheliegend, dass dieser Mechanismus auch für die Abhängigkeit der generierten Zelllinie von *BCL2L1* ist.

Die weiteren Untereinheiten von EIF2B, *EIF2B1-EIF2B4* waren in dem shRNA Screen nicht positiv. Dies trifft jedoch auch für die Gene *YAP1* und *BIRC5* zu, von denen in Rosenbluh et al. [115] ebenfalls gezeigt wurde, dass diese einen synthetischen Effekt zeigen mit aktiven β -CATENIN haben [115]. Die beiden Faktoren sollten demnach auch einen synthetisch letalen Effekt mit trunkiertem APC verursachen und folglich positive Ergebnisse in dem shRNA-*Screen* ergeben. Die Durchführung und Auswertung des shRNA-*Screens* hat also zu Ergebnissen mit einem hohen Anteil falsch negativer- und korrekt positiver Ergebnisse geführt. Dies zeigt, dass negativen Ergebnisse in dem vorliegendem Versuch keine Aussagekraft beigemessen werden kann.

***EIF2B5*-Depletion führt zu einem synthetisch-letalen Phänotyp** Die *EIF2B5*-shRNAs wurden mit unterschiedlichen Vektorsystemen validiert und das im shRNA-*Screen* gesehene Verhalten konnte bestätigt werden (Abb. 4.6 f, Abb. 4.7 und 4.8). Die Untersuchung des differentiellen Effektes unterschiedlicher shRNAs lässt darüber hinaus die Existenz eines therapeutischen Fensters für die Interferenz von *EIF2B5* vermuten: Die shRNA mit einer geringen *Knockdown*-Effizienz (*shEIF2B5* 89) hatte keinen Effekt auf die Proliferation der infizierten Zellen. Die shRNA mit der stärksten Effizienz (*shEIF2B5* 87) führte unabhängig von der FL-APC Expression zu einem letalen Phänotyp und die beiden shRNAs, welche intermediäre *Knockdown*-Effizienzen besaßen (*shEIF2B5* 85 und 88) verursachten einen differentiellen Effekt zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen. Um diesen Sachverhalt quantitativ zu untersuchen wäre eine doxyzyklin-induzierbare shRNA

gegen das *EIF2B5*-Gen ein gutes Werkzeug. Solche weiterführenden Versuche könnten jedoch nicht in dem hier hergestellten Zellsystem durchgeführt werden, da dieses bereits mit Doxyzyklin induzierbar ist. Auf Versuche mit der shRNA *EIF2B5* 86 wurde aufgrund technischer Probleme verzichtet.

Die Proliferation *EIF2B5*-depletierter Zellen wurde quantitativ bestimmt, um die Stärke des differentiellen Effektes abzuschätzen. Diese Versuche wurden sowohl mit dem induzierbaren FL-APC System durchgeführt, als auch mit dem konstitutiv FL-APC exprimierenden Zellsystem. Es konnte hierbei nur ein milder synthetisch letaler Effekt gezeigt werden (Abb. 4.9). Die Zellzahl *EIF2B5*-depletierter Zellen ohne Expression eines FL-APC Allels vergrößert sich in dem Versuch - wenn auch deutlich langsamer als bei FL-APC exprimierenden Zellen (Abb. 4.9 a,b). Der differentielle Effekt war bei dem FL-APC Zellsystem markanter als bei dem induzierbaren Zellsystem. Dass neben dem hier generierten, induzierbaren Zellsystem noch ein weiteres, unabhängiges FL-APC KKR Zellmodell den gleichen Effekt zeigt validiert *EIF2B5* nochmals zusätzlich, denn es ist sehr unwahrscheinlich, dass ein positioneller Effekt der Genomintegration des Transgens in zwei unterschiedlichen Zellsystemen das gezeigte differentielle Verhalten hervorruft. Auch andere klonale Effekte sind als Erklärungsmodell sehr unwahrscheinlich, nachdem eine zweite, von SW480 Zellen abgeleitete Zelllinie die gefundenen Effekte bestätigt.

Bei der APC-Induktion der TRE-APC Zelllinie fiel mit der Zeit eine geringer werdende Repression des Wnt-Zielgens *AXIN2* und eine geringer werdende FL-APC Induktion auf. Die Vermutung lag nahe, dass es sich um einen Selektionsprozess in der Zelllinie handelt, der die Induktion des FL-APC Allels oder dessen Aktivität auf direkte oder indirekte Weise verringert. Dies könnte beispielsweise durch methylierungsinduzierte Chromatinkompaktierung verursacht sein. Ein solcher Prozess wurde bereits bei tetrazyklin-induzierbaren Systemen beschrieben [144]. Es wurde daher eine Subklonierung der Zelllinie durchgeführt. Hierbei konnten Klone gewonnen werden, deren *AXIN2*-Repression nach FL-APC Induktion deutlich stärker war als zuvor (Abb. 4.10 a). Durch die Subklonierung konnte tatsächlich ein deutlich stärkerer differentieller Effekt gezeigt werden, wie anhand von Kristallviolett-Färbungen und Zellkernzählungen mit dem Operetta-System zu sehen ist (Abb. 4.10 b, c, d). Diese Ergebnisse zeigen jedoch nicht, ob der gefundene Effekt stark genug ist, um insgesamt zu einer Abnahme der Zellzahl bei nicht-induzierten Zellen mit *EIF2B5*-*Knockdown* zu führen. Hierfür wäre zusätzlich die erneute Messung der kumulativen Proliferation nötig.

Bei der Messung von AnnexinV/PI Färbungen konnten wir eine differentielle Induktion von Apoptose durch *EIF2B5* shRNA-Expression unter TR- versus FL-APC Konditionen sehen (Abb. 4.10 d). Die gezeigten Apoptosemessungen validieren, dass es sich tatsächlich um einen synthetisch letalen Phänotyp handelt. Die Expression des nicht trunkierten Tumorsuppressors nach *EIF2B5*-Depletion verursacht einen antiapoptotischen Effekt. Typischerweise wird jedoch von antiapoptotischen Effekten berichtet, wenn das APC-Allel durch Mutationen trunkiert wird bzw. von Apoptoseinduktion nach Re-Expression des FL-APC

Allels [145, 146]. Umso erstaunlicher erscheint auf den ersten Blick eine antiapoptotische Wirkung von APC nach teilweise Depletion eines essentiellen Translationsfaktors. Die für eine endgültige Aufklärung des hier gezeigten synthetisch letalen Mechanismus notwendigen Daten konnten im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation nicht gewonnen werden. Im Folgenden sollen anhand der verfügbaren Datenlage mögliche Erklärungsmodelle entworfen und experimentelle Herangehensweisen für deren Überprüfung dargestellt werden.

Die Expression von FL-APC reprimiert *EIF2B5* auf mRNA- und Proteinebene (Abb. 4.8 b, 4.11 a und [131]). Die *EIF2B5*-mRNA hat eine Bindestelle für MYC in der Promotorregion, welche in ChIP-Seq Experimenten in unterschiedlichen Modellsystemen nachgewiesen wurde [90, 147–149]. Eine APC-induzierte Repression von *MYC* könnte also zu der beobachteten Repression von *EIF2B5* führen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Trunkierung von APC und der Induktion globaler Proteinsynthese konnte im Mausmodell bereits verifiziert werden [150]. Faller et al. [150] zeigen, dass die gesteigerte globale Proteinsynthese infolge der APC-Trunkierung von der Aktivität des negativen Translations-Elongationsfaktors eEF2-Kinase (eEF2K) abhängt. Als Mechanismus beschreiben die Autoren eine mTORC1-abhängige Inaktivierung von eEF2K. Dies hat zur Folge, dass die Aktivität von eEF2 und somit auch die Translations-Elongation gesteigert wird. Die Autoren argumentieren, dass die Translations-Elongation, der limitierende Faktor für globale Proteinsynthese nach Wnt-Aktivierung ist. Im Zuge einer Masterarbeit konnten wir im TRE-APC Modell eine Abnahme der globalen Proteinsyntheserate nach APC-Induktion bestätigen [131]. Umgekehrt bedeutet dies im Sinne einer APC-Trunkierung während der Kanzerogenese also eine gesteigerte Syntheserate. Mechanistisch könnte diese wie im Mausmodell auf der mTORC1-S6K-eEF2K Achse beruhen (vergl. Faller et al. [150]). Vermutlich stellt die gesteigerte globale Proteinsynthese auch eine erhöhte Anforderung an die Präsenz des Translations-Initiationsfaktors *EIF2B5*. Die Expression dieses Faktors ist bei TR-APC Zellen stärker als bei ihrem FL-APC Pendant (Abb. 4.11). Man könnte vermuten, dass die Proteinsyntheseleistung nach einem *EIF2B5* Knockdown lediglich wieder heruntergefahren wird, selbst wenn *EIF2B5* bei TR-APC Zellen *limitierender* sein sollte als bei FL-APC Zellen. Letzten Endes handelt es sich bei *EIF2B5* um einen Initiationsfaktor der Translation und eine Reduzierung der Translations-Initiation für die Regulation der Protein-Neusynthese wurde bereits häufig beschrieben [104]. Wieso kommt es also hier zu einem durch Apoptose getriebenen synthetisch letalen Phänotyp?

Zellen mit dem TR-APC Allel haben deutlich höhere MYC-Proteinmengen als Zellen mit rekonstituierten FL-APC [122]. Interessanterweise steigt die MYC-Proteinmenge nach einem *EIF2B5*-Knockdown bei TR-APC Zellen an, während sie bei FL-APC Zellen konstant bleibt (Daten Stefanie Peter, nicht gezeigt). Möglicherweise führt die erhöhte MYC-Expression zu einem erhöhten Bedarf an neu synthetisierten Proteinen. Dieser wird über die mTORC1-S6K-eEF2K Achse bedient (Faller et al. [150]), was aber gleichzeitig *EIF2B5* anstelle von eEF2 zum limitierenden Faktor der Proteinsynthese macht. Ein

Knockdown von *EIF2B5* führt nun zu einer abnehmenden Proteinsyntheseleistung, die den erhöhten Bedarf der TR-APC Zellen nicht mehr decken kann. Es kommt schließlich zu MYC-getriebener Apoptose (Abb. 5.2).

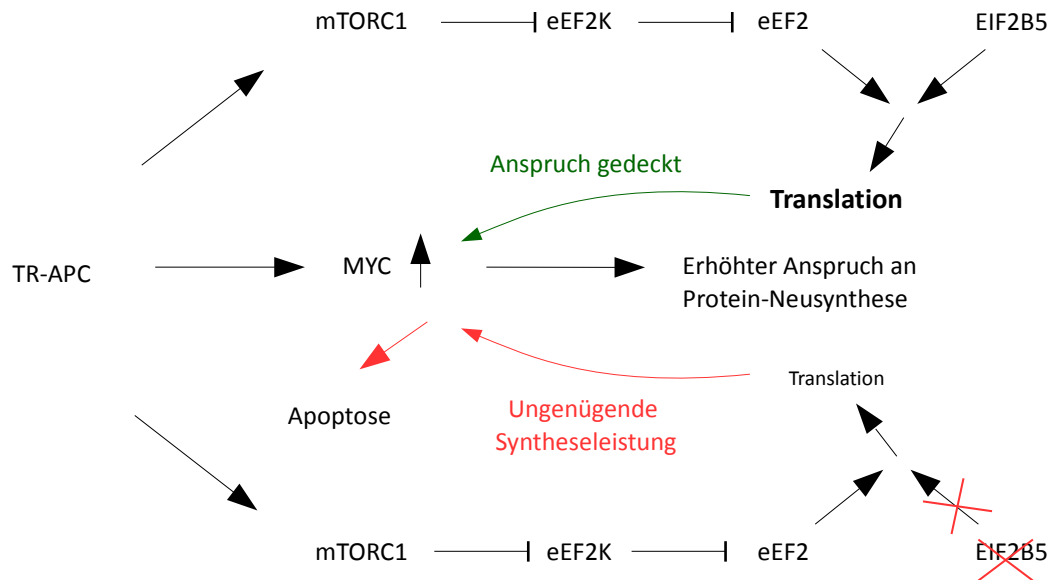


Abbildung 5.2: Modell der EIF2B5-abhängigen synthetischen Letalität I

In diesem Modell der synthetischen Letalität von TR-APC und *EIF2B5-Knockdown* kommt es zu einer MYC-induzierten Apoptose. Durch APC-Trunkierung wird das Protein MYC induziert. Dies verursacht einen erhöhten Bedarf an Proteinsynthese (Mitte). Diese wird durch eine verstärkte Translations-Elongation nach Inhibition von eEF2K erreicht. *EIF2B5* wird hierdurch für die gesteigerte Translation limitierend (Oben). Durch einen Knockdown des Gens wird die Translationsleistung wieder gesenkt und erfüllt nicht mehr den gesteigerten Bedarf. Es kommt zu einer MYC-induzierten Apoptose.

Falls diese Hypothese zutrifft sollte ein Knockdown von *MYC* den Synthetisch letalen Effekt des *EIF2B5-Knockdowns* wieder aufheben können und auch dies konnte inzwischen gezeigt werden (Daten Stefanie Peter). Zudem sollten alle Inhibitoren mit denen sich die Proteinbiosynthese verringern lässt ohne dabei die TR-APC getriebene starke MYC-Aktivität zu reduzieren ebenfalls einen synthetisch letalen Effekt bewirken. Für den mTORC1-Inhibitor Rapamycin trifft dies zu [150].

Die Expression des FL-APC Allel reprimiert die ER-Stress Markergene *DDIT3*, *splXBP1* und *GRP78* (Abb. 4.11). Umgekehrt kann dies als eine ER-Stress Induktion infolge der APC-Trunkierung gedeutet werden. TR-APC Zellen zeigen gegenüber FL-APC Zellen eine erhöhte Proteinsyntheseleistung (s.o) und möglicherweise führt dies zur Induktion von ER-Stress. Eine erhöhte Proteintranslation wurde bereits zuvor als kau-

sale Ursache für eine Induktion von ER-Stress vorgeschlagen [151]. Die Gene *DDIT3* und *spXBP1* aber nicht *GRP78* werden nach dem *Knockdown* von *EIF2B5* induziert. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von EIF2B5 und ER-Stress konnte bereits früher gezeigt werden: Sidrauski et al. [152] zeigen, dass durch eine pharmakologische Dimerisierung und Aktivierung von EIF2B ER-Stress reduziert wird. Andererseits führen Punktmutationen im *EIF2B5*-Gen, die die Aktivität von EIF2Be verringern (s.u.), zu einer Induktion von ER-Stress [153]. Es ist also zu erwarten, dass auch ein *Knockdown* von *EIF2B5* einen solchen Effekt bewirkt.

Ob die beobachtete Zunahme der ER-Stress Marker infolge der *EIF2B5*-Depletion tatsächlich zu einer physiologisch signifikanten Zunahme von ER-Stress führt, könnte durch direkte Beobachtung von Stress-Granula untersucht werden. Diese Granula entstehen infolge der UPR und bestehen aus angehaltenen Translations-Initiationskomplexen [154]. Typischerweise werden für den Nachweis dieser Granula Immunfluoreszenzen mit den Markergenen *TIA-1* und *G3BP1* durchgeführt. Falls hierbei ein differenzieller Effekt durch *EIF2B5*-Depletion zwischen FL- und TR-APC Zellen zu sehen sein sollte, würde dies die Hypothese, dass differenzieller ER-Stress zu dem beschriebenen synthetisch letalen Effekt beiträgt, stützen. In der Folge könnte durch Modulation von ER-Stress auch eine Induktion oder ein *Rescue* des synthetisch letalen Effektes möglich sein. Eine Aktivierung von UPR durch Inhibitoren wie Thapsigargin oder Tunicamycin wurden bereits vielfach beschrieben [155, 156]. Diese Inhibitoren lösen UPR durch die Induktion von ER-Stress aus: Thapsigargin durch die Inhibition der Ca^{2+} -ATPase SERCA, was wiederum verhindert, dass Ca^{2+} -abhängige Chaperone wie Grp78 und Grp94 die UPR-mediatoren IRE-1, PERK und ATF6 inhibieren [157]. Tunicamycin verursacht durch Inhibition der Proteinglycosylierung Fehlfaltungen in naszenten Proteinen [158]. In der Folge kommt es ebenfalls zur Aktivierung von UPR. IPA löst UPR direkt durch Aktivierung von PERK und IRE-1 aus [159]. *Tolfenamic acid* wurde ebenfalls als UPR-induzierend beschrieben [160]. Bis auf den relativ neuen Inhibitor IPA wurde für die beschriebenen Substanzen bereits validiert, dass sie Apoptose in kolorektalen Zelllinien auslösen [160–162]. Wenn eine durch UPR induzierte Apoptose synthetisch letal mit dem Verlust von FL-APC ursächlich für die beschriebene Toxizität ist sollte eine vorsichtige Titration der Stoffe in induzierten und nicht induzierten TR-APC Zellen unterschiedliche IC50-Konzentrationen erbringen.

***EIF2B5*-Mutationen führen beim Menschen** zu der Ausprägung einer metachromatischen Leukodystrophie (*vanishing white matter disease*, VWM). Diese Krankheit führt nach Monaten bis hin zu Jahren zum Tod der Patienten. Dies zeigt, dass eine Inhibition von EIF2B zeitweise toleriert werden kann und entsprechend ein therapeutisches Fenster für eine solche Vorgehensweise existiert [163–165]. Es gibt zahlreiche *EIF2B5*-Mutationen, die bei VWM beschrieben wurden [166]. Li et al. [166] haben die Auswirkung von zehn dieser Mutationen auf die Aktivität des EIF2B-Proteins untersucht. Diese Mutationen hatten Proteintrunkierungen von EIF2Be, eine Reduktion der GEF-Aktivität von EIF2B oder eine

Veränderung der Substrataffinität des Enzyms zur Folge. Es kam interessanterweise jedoch bei keiner der untersuchten Mutationen zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität von EIF2B. Die Nutzung eines shRNA-basierten *Knockdown*-Systems imitiert den Effekt einer EIF2B5-Mutation, da ein shRNA-Knockdown je nach Effizienz der shRNA eine Restaktivität von EIF2B5 zulassen kann. Die Mutation R195H hatte in der Studie von Li et al. [166] eine besonders starke Reduktion der EIF2B5-Aktivität zur Folge und diese Mutation führt zu einem besonders drastischen Krankheitsverlauf [167]. Dies und die Beobachtung, dass ein besonders starker *EIF2B5*-Knockdown zu einem letalen Phänotyp führt (Abb. 4.8) lässt vermuten, dass es eine Korrelation zwischen der Abnahme der EIF2B5-Aktivität und der Schwere von VWM geben könnte. Ein Zusammenhang zwischen der verbleibenden EIF2B-Aktivität und dem Zeitpunkt der Manifestation von VWM ist bereits klar gezeigt ([168]) Zudem lässt die erwähnte Beobachtung vermuten, dass ein vollständiger Funktionsverlust von EIF2B nicht zur Ausprägung von VWM sondern zu einem pränatal-letalen Phänotyp führt. Ein formaler Nachweis, dass der Knockdown von *EIF2B5* zu einer Verringerung der GEF-Aktivität von EIF2B führt könnte mittels eines GEF-Aktivitäts *Assays* erbracht werden. Eine ggf. gemessene Reduktion der GEF-Aktivität könnte neben der geringeren Verfügbarkeit der katalytisch aktiven EIF2B ϵ -Untereinheit auch durch eine veränderte stöchiometrische Zusammensetzung des EIF2B-Holoenzym bedingt sein [152, 169]. Um dies zu untersuchen wären Massenspektrometrische Untersuchungen des isolierten Proteinkomplexes eine Möglichkeit.

Da die Struktur des EIF2B-Komplexes gelöst werden konnte, ist eine gezielte Entwicklung von Inhibitoren, die in dessen Aktivität eingreifen möglich [152]. Es ist also durchaus denkbar, dass eine auf EIF2B5 basierende Therapie durchgeführt werden könnte. Für präklinische Studien stehen bereits verschiedene Mausmodelle mit Mutationen und Deletionen im EIF2B5-Gen zur Verfügung [170, 171]. Mit solchen Modellen könnte ein synthetisch letaler Effekt auch *in vivo* demonstriert werden und erste Kreuzungen mit konditionalen APC-Knockout-Mäusen wurden zu diesem Zwecke bereits durchgeführt (persönliche Mitteilung Owen Samson).

Ergebnisse II Inhibition von MYC-Translation

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse wurden bereits im Rahmen einer Publikation veröffentlicht:

Armin Wiegeling*, Friedrich Wilhelm Uthe*, Thomas Jamieson, *et al.*
Cancer Discovery 2015;5;768-781.

*Geteilte Erstautorenschaft

Wie eingangs beschrieben führt die Behandlung unterschiedlicher KRK-Zelllinien mit dem dualen PI3K- und mTORC1- Inhibitor BEZ235 entgegen den Erwartungen zu einer Erhöhung zellulärer MYC-Proteinmengen (siehe 3.9 und [109]). Eine Reduktion der MYC-Konzentration durch Applikation von BEZ235 wurde aus zwei Gründen erwartet: Erstens sollte die Inhibition von mTORC1 zur Dephosphorylierung des Translationsrepressors 4EBP1 führen, diesen damit aktivieren und folglich die Translation von MYC vermindern. Zweitens sollte die Inhibition von PI3K die Aktivität der Kinase AKT vermindern. AKT phosphoryliert GSK3, welches für die MYC-Degradation benötigt wird, und verringert dadurch dessen Aktivität. Folglich sollte eine Inhibition von PI3K eine verstärkte MYC-Degradation nach sich ziehen (vergl. Abb. 7.1).

Wir konnten von vier beschriebenen mTORC1-modifizierten 4EBP1-Phosphorylierungsstellen zeigen, dass sie nach Applikation von BEZ235 tatsächlich nicht mehr phosphoryliert werden [109]. Es kann also vermutet werden, dass BEZ235 die Translationsinitiation inhibiert. Um dies zu zeigen wurden *Cap*-Affinitätsaufreinigungen durchgeführt. Hierbei wurden *Cap*-bindende Komplexe mittels m7G-Sepharose isoliert (siehe 8.11.5). Eine Behandlung von SW480 Zellen mit BEZ235 hat keinen Einfluss auf die Bindung von eIF4E an die 5'-*Cap* Struktur (Abb. 6.1 a). Die Bindung von eIF4A und eIF4G an diese Komplexe ist nach BEZ235-Behandlung jedoch deutlich reduziert und die Bindung von 4EBP1 verstärkt. Dies ist vereinbar mit dem Modell der Translationsinitiation, nach dem 4EBP1 durch kompetitive Inhibition um eIF4E-Bindung seine Wirkung entfaltet [172]. Das vorliegende Ergebnis ist mit zwei möglichen Interpretationen kompatibel: Entweder ist die Translationsinitiation von MYC nicht von eIF4E oder eIF4A abhängig, oder die Menge an verfügbarem 4EBP1 reicht nicht aus, um eIF4E vollständig zu sequestrieren, obgleich dieses dephosphoryliert ist.

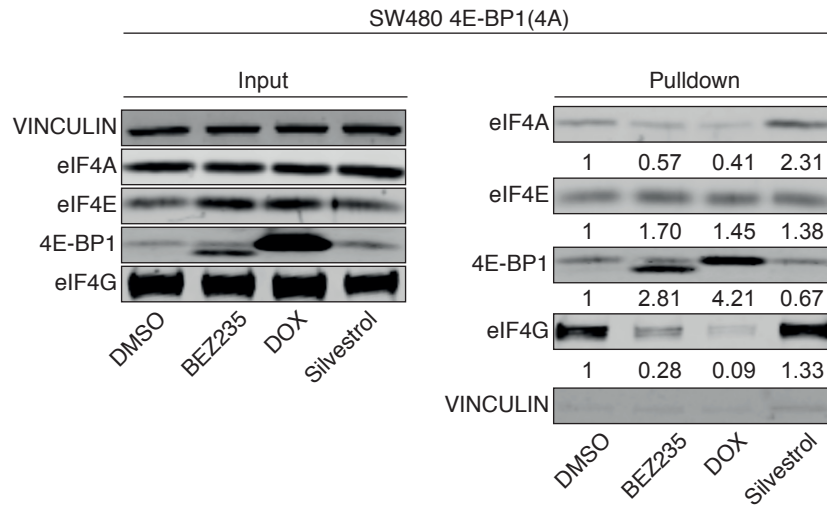
Um zu testen, ob die MYC-Expression von eIF4E abhängt, haben wir ein Doxyzyklin-induzierbares, dominant-negatives Allel von 4EBP1 in SW480 Zellen exprimiert, welches durch Mutationen an den mTORC1-Phosphorylierungsstellen mTORC1-unabhängig eIF4E inhibiert (4EBP1(4A)). Die Expression dieses Allels hat die Expression von MYC auch bei

gleichzeitiger Applikation von BEZ235 suffizient inhibiert (Abb. 6.1 b)). Die *Cap*-Bindung von eIF4A und eIF4G war unter diesen Bedingungen zudem stärker vermindert als das nach BEZ235-Behandlung beobachtbar war (Abb. 6.1 a)). Da die Menge von exogenem 4EBP1(4A) die des endogenen 4EBP1 überstieg, nahmen wir an, dass tatsächlich die verfügbare Menge an endogenem 4EBP1 limitierend ist, und eIF4E in KRK Zellen nicht vollständig sequestriert werden kann. Mit dieser Hypothese vereinbar ist, dass bei nur geringer Überexpression des eIF4E(4A)-Allels, durch die mit endogenem 4EBP1-Protein vergleichbare Mengen erzeugt wurden, keine Verminderung von MYC festgestellt werden konnte [109].

Als alternative Strategie, die MYC-Translation zu inhibieren haben wir Silvestrol, einen Inhibitor der Helikase eIF4A genutzt [109]. Bereits nanomolare Mengen Silvestrol hatten eine deutliche Reduktion der MYC-Proteinmenge zur Folge, während die *MYC*-mRNA nicht betroffen war [109]. Silvestrol hemmte signifikant die Proliferation von KRK-Zelllinien, jedoch ohne Apoptose zu induzieren [109]. Die globale Proteintranslation, gemessen durch ³⁵S-Methioninkorporation, war von Silvestrol und BEZ235 ähnlich stark reduziert, was die Frage aufwirft, weshalb MYC-Proteinkonzentrationen andererseits so stark unterschiedlich betroffen sind [109]. Um dies zu untersuchen haben wir Polysomenprofile (siehe 8.11.6) erstellt. Hierzu wurde zunächst die RNA aus Zelllysaten inhibitor- oder kontrollbehandelter Zellen auf einem Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und diese anschließend fraktioniert (Abb. 6.2 a)). Schließlich wurden die Fraktionen mittels quantitativer *realtime*-PCR untersucht: Die Expression des 4EBP1(4A) Allels bewirkte eine starke Reduktion der Assoziation der zwei als Kontrolle benutzten *ACTB* und *TUBB3* RNAs mit Polysomen (Abb. 6.2 b)). BEZ235 bewirkt bei diesen mRNAs einen moderaten Rückgang der Besetzung mit Ribosomen. Im Gegensatz dazu bewirkt die Induktion des 4EBP1(4A)-Allels bei der *MYC*-mRNA nur eine geringe Minderbesetzung mit Ribosomen, während BEZ235 bei der Beladung dieser mRNA mit Ribosomen keinerlei Effekt zeigt. Das 5'UTR der *MYC*-mRNA enthält ein *IRE*S-Element (siehe 3.7), welches eIF4A-abhängige, aber eIF4E-unabhängige Translation von MYC erlaubt [173]. Daher haben wir ebenfalls den Effekt von Silvestrol auf die Besetzung der beschriebenen mRNAs mit Ribosomen untersucht (Abb. 6.2 a)). Sowohl die *MYC*-mRNA als auch die mRNAs der Gene *ACTB* und *TUBB3* zeigten einen deutlich geringeren Anteil stark beladender mRNAs im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle (Abb. 6.2 b)). Als weitere Kontrolle haben wir die mRNA des *PFN2* Gens untersucht. Dieses wurde als wenig eIF4A abhängig beschrieben und Silvestrol hatte hier einen geringeren Einfluss als bei den anderen beschriebenen Genen (Abb. 6.2 b)).

Zusätzlich konnten wir im Rahmen einer Masterarbeit zeigen, dass in Reporterassays die Translation von Luziferase unter der Kontrolle eines *MYC*-5'-UTR durch Silvestrol im Vergleich zur *Cap*-abhängigen Translation einer Kontroll-mRNA reduziert ist (Abb. 6.3 b, Daten Yvonne Rouss). Silvestrol inhibierte außerdem die Translation von Luziferase unter der Kontrolle eines *MYC*-*IRE*S-Elementes, von dem bekannt ist, dass

a)



b)

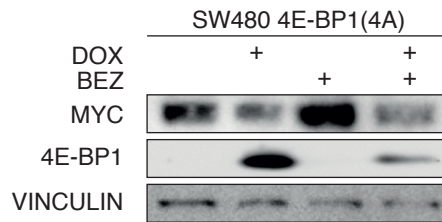


Abbildung 6.1: *Cap*-Pulldown von Translationsinitiationsfaktoren

a) *Cap*-Pulldown von SW480 Zellen nach 24 h Inkubation mit BEZ235 (200 nM), Silvestrol (25 nM), Induktion des 4EBP1(4A)-Allels mit 1 µg/ml Doxyzyklin oder Solvenzkontrolle. *Cap*-Bindende Komplexe wurden durch Affinitätsaufreinigung mit m7G-Sepharose isoliert. Anschließend wurden die dargestellten Proteine im Immunoblot (rechts) nachgewiesen und quantifiziert (Zahlen unter dem Immunoblot "Pull-down" rel. zur Solvenzkontrolle). Eine Inputkontrolle (links) wurde ebenfalls im Immunoblot auf die Präsenz der gleichen Proteine untersucht (n=3). b) SW480 Zellen wurden wie in a) behandelt und die induzierten Proteine im Immunoblot nachgewiesen (n=3).

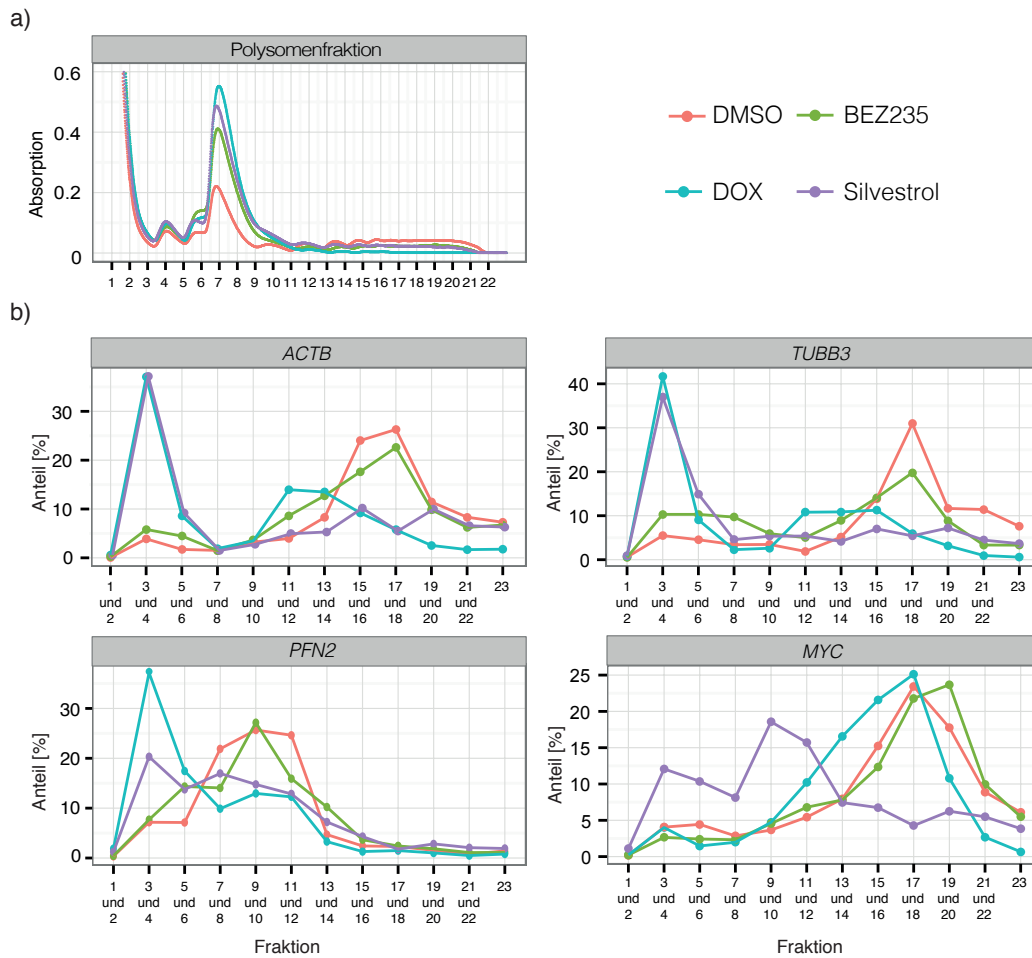


Abbildung 6.2: Silvestrol inhibiert die MYC-Translation

a) Polysomenfraktionierung (Absorption: 254 nm) von SW480 Zellen nach Behandlung mit BEZ235 (200 nM), Doxyzyklin, Silvestrol oder Solvenzkontrolle nach 24 h Inkubation. (n=3). b) RNA der gezeigten Fraktionen wurde isoliert, und der relative Anteil der *MYC*-, *ACTB*-, *TUBB3*- und *PFN2*-mRNA in den Fraktionen durch RQ-PCR bestimmt (n=2).

es von eIF4A abhängt (Abb. 6.3 c) und [173]). Andererseits wurde die Translation des eIF4A-unabhängigen Hepatitis C Virus-IRES nicht durch Silvestrol verringert (Abb. 6.3 d).

Diese Daten zeigen, dass die eIF4A-abhängige, aber eIF4E-unabhängige Translation, die vom *MYC-IRES* ausgeht, die *MYC*-mRNA Assoziation mit Polysomen erhält, wenn die *Cap*-abhängige Translation inhibiert wird.

Um diese Annahme zu bestätigen, haben wir Cymarin, einen Inhibitor *MYC IRES*-Element-abhängiger Translation benutzt [174]. Cymarin hat im Reporterassay die Translation von Luziferase unter der Kontrolle des *MYC*-5'-UTR reduziert. Des Weiteren phänotypisierte Cymarin den Silvestrol-Effekt auf die *MYC*-Expression [109].

Um die Existenz eines therapeutischen Fensters für die Inhibition der Translationsinitiation zu eruieren haben wir öffentlich zugängliche Expressionsdatenbanken untersucht. Die Expression der *PDCD4*-, aber nicht die der *eIF4A*, *eIF4E*, *4EBP1* und *4EBP2*-mRNA war in KRK im Vergleich zu normalen Gewebe stark reprimiert [109]. Dies konnten wir auch in histologischen Untersuchungen von 10 humanen KRK Proben im Vergleich zu normaler Kolon-Mucosa feststellen, was konsistent mit früheren Beobachtungen ist [109, 175]. Dies legt nahe, dass die Aktivität von eIF4A durch die Repression seines negativen Regulators *PDCD4* verstärkt ist, und die Inhibition von eIF4A daher eine valide Strategie für eine Therapie KRK sein könnte.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen haben wir geprüft, ob Silvestrol eine durch APC-Deletion induzierte Hyperproliferation von Krypten in einem *VillinCre^{ER}APC^{580s flox}* Mausmodell unterdrücken kann [109]: Durch Applikation von 2 mg Tamoxifen über zwei Tage konnte die Deletion von APC herbeigeführt werden. Nach einer zusätzlichen Behandlung der Mäuse mit 1 mg/kg Silvestrol, 45 mg/kg BEZ235 oder Solvenzkontrolle (intraperitoneal) wurden die Tiere getötet und die Kolon-Hyperproliferation untersucht. BEZ235 hatte keinen signifikanten Effekt auf die durch APC-Verlust induzierte Hyperproliferation: Sowohl durchschnittliche Größe, BrdU-Inkorporation, Ki67-Färbung als auch *MYC*-Proteinkonzentration zeigten keine signifikanten Unterschiede BEZ235- und Solvenzkontroll-behandelter Tiere. Die *in vivo*-Aktivität von BEZ235 konnte durch eine erhöhte Expression der *CDKN1A*-mRNA gezeigt werden. Im Gegensatz dazu unterdrückte die Behandlung mit Silvestrol die APC-Verlust induzierte Hyperproliferation: Untersuchte Krypten Silvestrol-behandelter Tiere waren kleiner, zeigten eine Reduktion der BrdU-Inkorporation, geringere Ki67-positive Färbung und eine Reduktion der *MYC*-Proteinkonzentration im Vergleich zu Solvenz-behandelten Tieren. Des weiteren konnten wir zeigen, dass die *MYC*-mRNA durch Silvestrol-Behandlung der Tiere unbeeinflusst ist, was zeigt, dass die *MYC*-Proteinkonzentration wie erwartet post-transkriptionell reguliert ist. Eine quantitative Untersuchung zeigte, dass *MYC* in der unteren Hälfte der Krypten reduziert ist. Dies legt nahe, dass die von Silvestrol verhinderte Hyperproliferation kein indirekter, durch Differenzierung hervorgerufener Effekt ist.

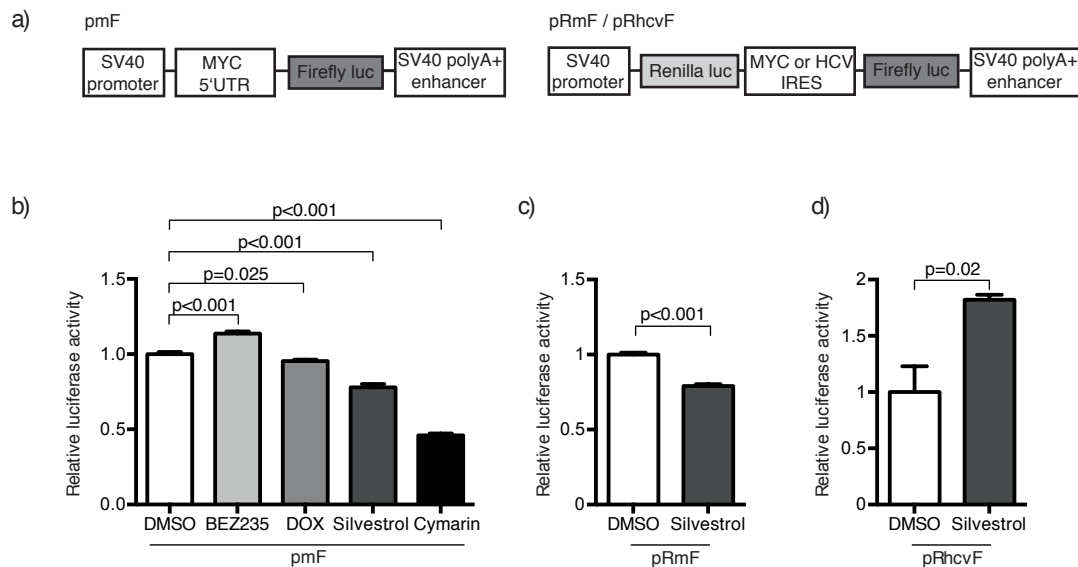


Abbildung 6.3: Silvestrol inhibiert die Translation des *MYC*-IRES

a) Schematische Illustration der in b), c) und d) genutzten Luziferase-Reportersysteme. b) SW480 Zellen wurden mit pmF transfiziert und 24 h mit BEZ235 (200 nM), Doxyzyklin, Silvestrol (25 nM), Cymarin (100 nM) oder Solvenzkontrolle inkubiert. Die Luziferaseaktivität ist relativ zu einem kotransfizierten β -Gal-Reporter gezeigt (n=3). c) SW480 Zellen wurden mit dem pRmF Luziferase-Reporter transfiziert und mit Silvestrol (25 nM) oder Solvenzkontrolle behandelt. Die relative Luziferase-Aktivität ist als Verhältnis der Photinus zur Renilla Luziferaseaktivität dargestellt (n=3). d) SW480 Zellen wurden mit dem pRhcvF Reporterkonstrukt transfiziert und analog c) behandelt und analysiert (n=3). Die Daten wurden von Yvonne Rouss erhoben.

Diskussion II

Die im folgenden dargelegte Diskussion wurde zum Großteil in Wiegering et al. [109] veröffentlicht.

Dereguliertes MYC trägt erheblich zur Entstehung kolorektaler Karzinome bei. Pharmakologische Ansätze, die diese Deregulation ausnutzen, konnten jedoch bisher nicht erfolgreich therapeutisch umgesetzt werden. Es war daher ein Ziel dieser Dissertation die Möglichkeit zu untersuchen, MYC-Degradation und -Translation als molekulare Ziele zu nutzen, um MYC-Expression zu vermindern. Hierfür wurden die beiden Inhibitoren BEZ235 und Silvestrol herangezogen, die den PI3K-mTOR Signalweg bzw. eIF4A inhibieren.

7.1 BEZ235 führt zu einer Erhöhung der zellulären MYC-Proteinkonzentration

Initial wurde erwartet, dass der PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ235 MYC-Proteinkonzentrationen durch FBXW7-abhängige Degradation, sowie die Inhibition eIF4F-abhängiger Translationsinitiation verringert. Wir konnten bestätigen, dass die MYC-Degradation in KRK von der Ubiquitin-Ligase FBXW7 abhängt [176]. Die Inhibition von PI3K oder AKT kann die MYC-Degradation verstärken, weil AKT GSK3 an S9 phosphoryliert und inhibiert [177]. AKT-Inhibition kann daher zu einer verstärkten, GSK3-abhängigen Phosphorylierung von MYC an T58 führen. Überraschenderweise ist die Phosphorylierung von GSK3 an S9 in KRK-Zellen nicht von der Aktivität der beiden Kinasen PI3K und AKT abhängig, was nahelegt, dass eine AKT-unabhängige Kinase (wie beispielsweise Aurora-A oder p90RSK), die diese AS phosphorylieren kann, die Phosphorylierung bei Inhibition von PI3K oder AKT aufrecht erhält [178, 179].

Anstatt die Degradation zu verstärken, hat die Inhibition von PI3K in mehreren KRK-Zelllinien durch FOXO-abhängige transkriptionelle Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren und damit durch deren Aktivität indirekt zu erhöhten MYC-Konzentrationen geführt [24] (Abb. 7.1). Ein ähnlicher *crossstalk*-Mechanismus wurde bereits in Brustkrebszellen identifiziert [180]. Dies könnte ein evolutionär konservierter regulatorischer Mechanismus sein, der die Expression von Oberflächenrezeptoren an die Aktivität von PI3K koppelt [181].

7.2 Proteintranslation als therapeutisches Interventionsziel

Die Inhibition der Proteintranslation ist als mögliche therapeutische Strategie für die Behandlung MYC-abhängiger Tumore in Erscheinung getreten, weil die Translationsinitiation in MYC-abhängiger Lymphome dereguliert ist, und supraphysiologische Proteinsyntheseraten für ihr Überleben eine *conditio sine qua non* darstellen [182]. In MYC-getriebenen Lymphomen hat Translationsinhibition durch Hemmung von mTORC1 und mTORC2 therapeutische Wirksamkeit, weil zwei Inhibitoren eIF4F-abhängiger Translationsinitiation, 4EBP1 und PDCD4 durch mTORC1 abhängige Phosphorylierung inaktiviert werden und im Falle von PDCD4 anschließend proteasomal degradiert werden [183–185].

Die Expression von PDCD4 ist stark reprimiert in KRK. Nach Behandlung mit BEZ235 wird 4EBP1 an mTORC1 Phosphorylierungsstellen dephosphoryliert. Dies führt jedoch nicht zu einer suffizienten Inhibition der MYC-Translation. Wir haben zwei Ursachen für diesen Effekt identifiziert: Zum einen wird die *Cap*-Bindung von eIF4A und eIF4E durch BEZ235 nur partiell gehemmt, vermutlich weil die Menge an verfügbaren 4EBPs nicht für eine vollständige Sequestrierung eIF4E ausreicht. Zum anderen bleibt die *MYC*-mRNA auch dann mit Ribosomen beladen, wenn die *Cap*-Bindung durch ein nicht phosphorylierbares 4EBP1 Allel vollständig unterdrückt wird. Dies ist vermutlich der Fall, weil durch ein *IRE5*-Element im *MYC*-5'-UTR eIF4E-unabhängige Translation ermöglicht wird [173]. Unsere Resultate sind konsistent mit kürzlichen Beobachtungen, die zeigen, dass 4EBP-Proteine nicht die kritischen Effektoren des mTORC1-Inhibitors Rapamycin sind, und sogar eine genetische Ablation von mTORC1 nicht die *MYC*-Expression im Mausmodell verringert [150]. Die Daten zeigen, dass die duale Inhibition von PI3K/mTOR keine effektive therapeutische Strategie für KRK darstellt, weil BEZ235 nur geringe Effekte auf MYC-Proteinkonzentrationen- und keinen Effekt auf Proliferation und die Zellzahl im APC-getriebenen KRK Mausmodell hat. Die Inhibition von mTORC1 durch Rapamycin zeigt hier hingegen Wirkung und inhibiert das Wachstum von KRK [150]. Wir vermuten, dass BEZ235- aber nicht Rapamycin-anhängige Inhibition von mTORC1 durch FOXO-abhängige MAPK-Aktivierung die therapeutische Effizienz in diesem System limitiert.

7.3 Silvestrol als mögliches Reagenz für eine therapeutische Intervention

Im Gegensatz zu BEZ235 hat Silvestrol die Expression von MYC in KRK-Zelllinien bereits bei nanomolaren Konzentrationen inhibiert. Des Weiteren reduzierte Silvestrol die Proliferation und Zellzahl in KRK *in vivo*, was dafür spricht, dass die Inhibition von eIF4A suffizient für eine Inhibition der MYC-Expression in KRK ist. Ähnliche Beobachtungen wurden in einem NOTCH-getriebenen T-Zell-Leukämiemodell gemacht. Wolfe et al. [186] konnten nach Inhibition von eIF4A mit Silvestrol eine Translationsinhibition zahlreicher

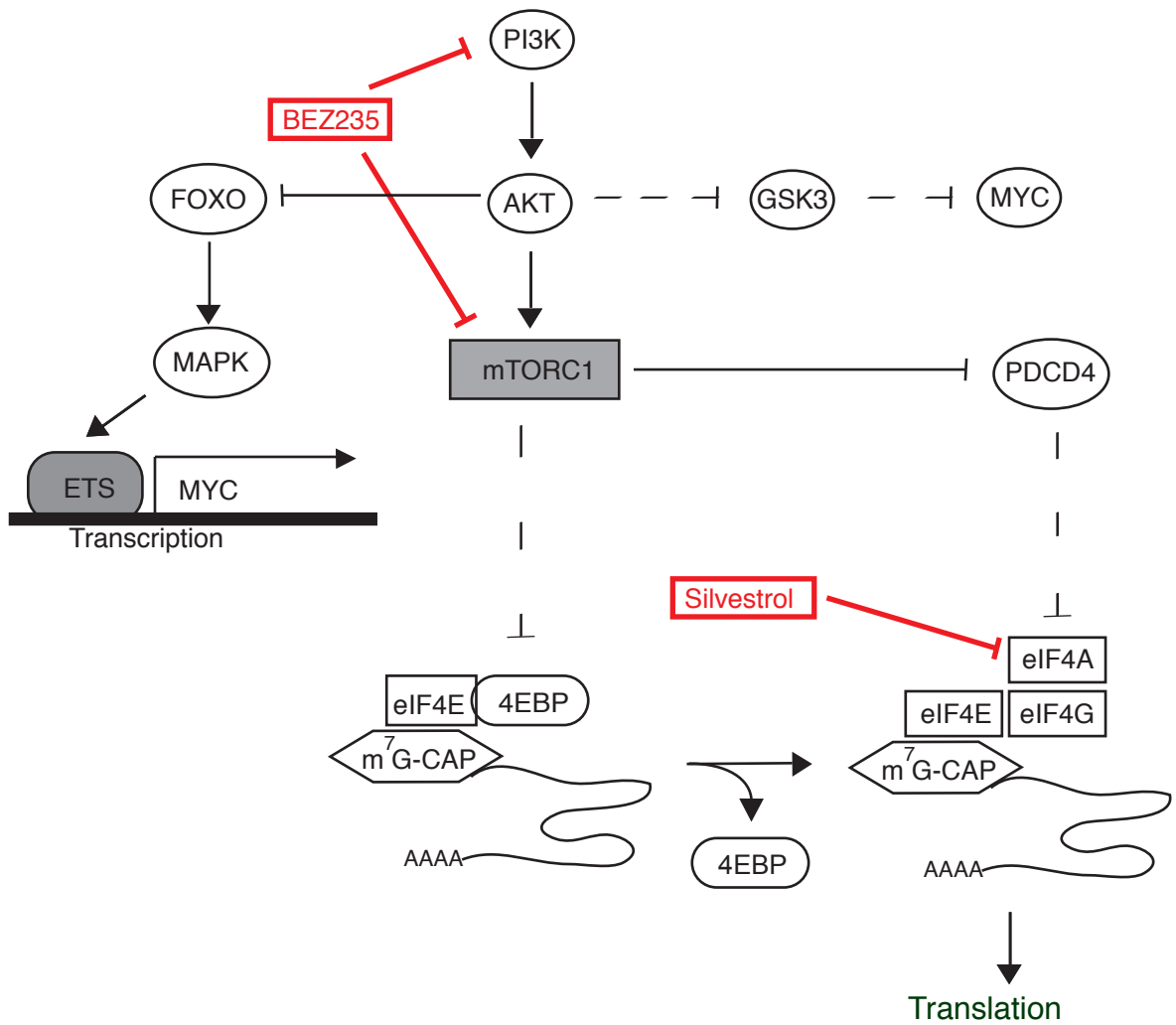


Abbildung 7.1: Model der Wirkung von BEZ235 und Silvestrol in KRK Zelllinien (Aus [109])

Onkogene beobachten, darunter auch MYC. Die Autoren führen dies auf Quadruplex-Strukturen innerhalb des 5'UTR der RNA zurück. 2003 konnte gezeigt werden, dass eine Quadruplex-Struktur für die *IRES*-abhängige Expression der *FGF2*-mRNA in humanen Fibroblasten ist [187], und eine ähnlicher Beziehung könnte auch innerhalb des *MYC*-5'-UTR die IRES-getriebene Translation determinieren.

Überraschenderweise sind die durch Silvestrol vermittelten Effekte im normalen Kolon schwach und die für eine MYC-Inhibition und Proliferationsreduktion von KRK-Zelllinien notwendige Silvestrolkonzentrationen werden *in vivo* toleriert. (Wiegering et al. [109], *in vivo*-Effekte Abb. 6).

Die MYC-Translation wird durch mTOR-Inhibition in murinen Fibroblasten nicht beeinflusst, was dafür spricht, dass die Abhängigkeit der MYC-Translation von eIF4A und eIF4G in unterschiedlichen Geweben nicht uniform ist [188].

Quadruplex-Strukturen können auch von anderen Helikasen als eIF4A, beispielsweise von RHAU erkannt werden [189]. Es ist möglich, dass es für die Behandlung von KRK mittels Translationsinhibition von MYC durch eine Inhibition von eIF4A ein therapeutisches Fenster gibt, da diese Funktion im normalen Kolon von anderen Helikasen übernommen wird.

Materialien und Methoden

8.1 Materialien

Bakterienstämme und Zelllinien

DH5 α Escherichia coli ; chromosomaler Genotyp: F-, ϕ 80dlacZ δ M15, δ (lacZYAargF)-U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, γ -, thi-1, gyrA96, relA1; verwendet zur Herstellung und Amplifikation von Plasmiden

XL1blue Escherichia coli ; chromosomaler Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacIqZ δ M15 Tn10 (Tetr)]; verwendet zur Amplifikation von Plasmiden auf der Basis von pLKO-Vektoren

HEK293T humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC)

SW480 humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)

8.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von Merck, Roth, Sigma-Aldrich, oder Thermo-Fisher Scientific bestellt.

Antibiotika und Zellkulturzusätze

Zur Selektion infizierter Zellen wurden folgende Antibiotika verwendet:

Puromycin (InvivoGen) 2 ug/ml

Geneticin (Thermo Fisher Scientific) 400 ug/ml

Zusätze für Experimente:

Polybrene (Sigma) 4 ug/ml in *aqua dest.* - für Infektion von Säugierzellen genutzt (s.u.)

Cycloheximid (CHX, Sigma) 100 ug/ml in EtOH - Zur Translationsinhibition genutzt

Doxyzyklin (Sigma) 1 ug/m in EtOH - Zur Induktion von TET-Promotoren genutzt

8.3 Nucleinsäuren

Die in dieser Arbeit verwendete shRNA-*Library* enthält 37.500 unterschiedliche shRNA-Sequenzen. Diese, sowie deren *Targets* sind im elektronischen Anhang dieser Arbeit ent-

halten. Primer für die Kontruktion von Vektoren und quantitative *Realtime*-PCRs wurden von Sigma synthetisiert. Diese waren:

Tabelle 8.1: qPCR Primer

Primer Name	Zielgen	Sequenz
APCfor	APC	tgctgagcggcagaatgaaggtc
APCrev	APC	tcagccttcgaggtgcagagtgc
AS-myc-RTfor	MYC	caccagcagcgactctga
AS-myc-RTrev	MYC	gatccagactctgaccttttgc
CS-RTmAxin2for	AXIN2	ccatgacggacagtagcgta
CS-RTmAxin2rev	AXIN2	gccattggccttcacact
FU-EIF2B5-for-RT	EIF2B5	cagggcagtagtgatggagtgc
FU-EIF2B5-rev-RT	EIF2B5	gttgtgccacctgaggagaac
SS_DDIT3for	DDIT3	cagagctggaacctgaggag
SS_DDIT3rev	DDIT3	tgtttatggctgctttgggtg
SS_sXBP1for	spXBP1	ctgagtccgaatcaggtgcag
SS_sXBP1rev	spXBP1	atccatggggagatgttctg
MH_GRP78 forward	GRP78	tgacattgaagacttcaaagct
MH_GRP78 reverse	GRP78	ctgctgtatcctcttcaccagt

8.4 Antikörper

Antigen	Hersteller	Artikelnummer	Host
APC	Cell Signaling	2504	<i>Rabbit</i>
β -CATENIN	Cell Signaling	9581	<i>Rabbit</i>
VINCULIN	Santa Cruz	sc-25336	<i>Mouse</i>
CHOP	Cell Signaling	2895	<i>Mouse</i>
4E-BP1	Cell Signaling	9452	<i>Rabbit</i>
eIF4A	Cell Signaling	2013S	<i>Rabbit</i>
eIF4E	Cell Signaling	2067	<i>Rabbit</i>
eIF4G	Cell Signaling	2498	<i>Rabbit</i>
MYC	Santa Cruz	sc-764	<i>Rabbit</i>

8.5 Chemikalien

- GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
- HiMark Pre-Stained HMW Protein Standard (Thermo Fisher Scientific)
- Protein Marker PageRuler Prestained Protein Laddeer (Thermo Fisher Scientific)
- Immobilon Western Substrat (Millipore)

Tabelle 8.2: Oligonucleotide für Klonierungen

Oligo Name	Zweck	Sequenz
APC1	Generierung eines FL-APC Fra- gementes aus pYF-APC	TEST TATATATATAG- CGCGCGCGCG
CA-decipherPCR-1-f	<i>Decipher-Library</i> Generierung	caagcaaaagacggcatacgag*a
CA-decipherPCR-1- r	<i>Decipher-Library</i> Generierung	ggttcagagttctacagtcgaaac*c
CA-decipherPCR-2-f	<i>Decipher-Library</i> Generierung	caagcagaagacggcatacgag*a
CA-decipherMP-r- CTG	<i>Decipher-Library</i> Generierung	aatgatacggcgaccaccgagaCTG- ggttcagagttctacagtcgaaac*c
CA-decipherMP-r- GAC	<i>Decipher-Library</i> Generierung	aatgatacggcgaccaccgagaGAC- ggttcagagttctacagtcgaaac*c
CA-decipherMP-r- AGT	<i>Decipher-Library</i> Generierung	aatgatacggcgaccaccgagaAGT- ggttcagagttctacagtcgaaac*c
CA-decipherMP-r- TCA	<i>Decipher-Library</i> Generierung	aatgatacggcgaccaccgagaTCA- ggttcagagttctacagtcgaaac*c
CA-decipher-r-ACC	<i>Decipher-Library</i> Generierung	aatgatacggcgaccaccgagaACC- ggttcagagttctacagtcgaaac*c
CA-decipher-r-GGA	<i>Decipher-Library</i> Generierung	aatgatacggcgaccaccgagaGGA- ggttcagagttctacagtcgaaac*c
CA-decipher-r-TTT	<i>Decipher-Library</i> Generierung	aatgatacggcgaccaccgagaTTT- ggttcagagttctacagtcgaaac*c
FU_eIF2B5_16262 FOR	Klonierung von shEIF2B5 85	tcgaggcagattgagaattatgga- agttaatatcatagctccaataa- ttctcagctgcttttta
FU_eIF2B5_16262 REV	Klonierung von shEIF2B5 85	cgcgtaaaaagcagactgagaatta- ttggaagctatgaatattaactcc- aataattctcaatctgcc
AvT_pRSI9_fwdLUC	Klonierung von shLUC	accgcttcgaaatacagttcggtt- gttaatattcatagcaaccgaacgg- acatttcgaagttttt
AvT_pRSI9_revLUC	Klonierung von shLUC	cgaaaaaaaaacttcgaaatgtcgt- tcggttgctatgaatattaacaacc- gaacggacatttcgaag

8.6 Puffer

Blockierungslösung für PVDF-Membranen: 5 % (w/v) Milchpulver oder BSA in TBS-T
Bradford-Reagenz 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7 % (w/v) Ethanol 95
%; 8,5 % ortho-Phosphorsäure

Kristallviolettlösung 0,1 % (w/v) Kristallviolett in 20 % (v/v) Ethanol

PBS (1 x) 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄
PBS-T 1 x PBS 0,5 % (v/v) Tween-20
PEI-Transfektionslösung 450 µl PEI (10 %, MW 25.000 g/mol, Sigma); 150 µl; HCl (2 N);
49,5 ml aqua bidest
RIPA-Lysepuffer 50 mM Tris; pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) NP-40; 0,5 % (w/v) DOC;
0,1 % (w/v) SDS
Sammelgel 4 % 4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30 (37,5:1); 125 mM Tris-HCl; pH 6,8;
0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer 25 mM Tris-Base; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS
SDS-Probenpuffer (3 x) 187,5 mM Tris; pH 6,8; 30 % (v/v) Glycerin; 6 % SDS; 0,03 %
Bromphenolblau; 2 M β-Mercaptoethanol Stripping-Puffer 200 mM Glycin; 0,1 % SDS; 1
% Tween-20; pH 2,3 mit HCl
Phosphatpuffer; pH 8,0 1 M Na₂HPO₄; pH 8,0 mit 1 M NaH₂PO₄ einstellen
TAE (50 x) 2 M Tris; pH 8,0; 5,7 % Essigsäure; 50 mM EDTA
10 x Tank-Blot-Puffer 1,9 M Glycin; 250 mM Tris-Base; 0,05 % SDS; pH 8,0
TBS (20 x) 500 mM Tris-Base; pH 7,4; 2,8 M NaCl
TBS-T 1 x TBS; 0,2 % Tween-20
TE 10 mM Tris; pH 8,0; 1 mM EDTA
TNN-Lysepuffer 50 mM Tris-HCl; pH 7,5; 120 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % NP-40; 10
mM Na₄P₂O₇; 100 mM NaF; 2 mM Na₃VO₄
Trenngel 7,5 - 15 % 7,5 - 15 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30 (37,5:1); 375 mM Tris-
HCl; pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,1 % (v/v) TEMED
Trypsinlösung 0,25 % Trypsin; 5 mM EDTA; 22,3 mM Tris; pH 7,4; 125 mM NaCl
In-House PCR-Puffer (Tyler Jacks Rezept) 500mM KCl; 100mM Tris pH 8,3; 15 mM
MgCl₂ in dH₂O. Autoklavieren und nach dem Autoklavieren 1 mg/ml BSA zugeben.

8.7 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Handschuhe und sonstiges Zellkultur- und Plastikmaterial wurden von den Firmen Applied Biosystems, Eppendorf, Greiner, Kimberly-Clark, Nunc, Sarstedt und VWR International bezogen.

8.8 Geräte und Membranen

- Blottingapparatur Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad)
- PerfectBlue Tank Electro Blotter Web S (Peqlab)
- Durchflusszytometer BD FACS Canto™ II (BD Biosciences)
- Entwicklermaschine LAS-4000 (Fujifilm Global)

-
- Westernblot Scanner Odyssey (Licor)
 - Heizblock Dry Bath System (Starlab)
 - Thermomixer® comfort (Eppendorf)
 - Mikroskop Axiovert 40CFL (Zeiss)
 - qRT-PCR-Gerät Step One Plus(Thermo Fisher Scientific)
 - Spektralphotometer NanoDrop 3000 (Thermo Scientific)
 - PVDF-Transfermembran Immobilon-P-Transfermembran (Millipore)
 - PCR Gerät S1000 (Biorad)
 - Schüttelinkubator Model G25 (New Brunswick Scientific)
 - SDS-PAGE-Apparatur Minigel (Bio-Rad)
 - Sonifiziergerät Digital Sonifier® W-250 D (Branson)
 - Spannungsquellen Power Pac (Bio-Rad)
 - Sterilwerkbank HeraSafe (Heraeus)
 - Universalschüttler SM-30 (Edmund Bühler GmbH)
 - UV-Tisch Maxi-UV-Leuchttisch (Peqlab)
 - Wasserbad Julabo 5M-5M Bad/Umwälzthermostat (Julabo)
 - Whatman-Filterpapier Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
 - Zellkulturinkubator BBD 6220 (Heraeus)
 - Zellzähler CASY Zellzähler (Innovatis)
 - Zentrifugen Galaxy MiniStar (VWR International)
 - Eppendorf 5417 R (Eppendorf)
 - Eppendorf 5425 (Eppendorf)
 - Eppendorf 5430 (Eppendorf)
 - Multifuge 1S-R (Heraeus)
 - Avanti J-26 XP (Beckman Coulter)

Medien für Kultivierung von Säugerzellen

Zur Kultivierung von SW480 Zellen wurde RMPI verwendet (Thermo Fisher Scientific). Für HEK293T Zellen wurde DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) verwendet (Thermo Fisher Scientific). Zu den Medien wurde Fetales Kälberserum (FBS, Biochrom AG) zugegeben, welches zuvor für 30 Min bei 56 °C hitzeinaktiviert wurde. Dem Medium wurde zusätzlich Gentamycin zugesetzt (10 µg/ml, Thermo Fisher Scientific)

8.9 Molekularbiologische Methoden

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

Zum Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterien wurden chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s. Es wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Zur Plasmidaufreinigung in größerem Maßstab wurde die Bakteriensuspension direkt in 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben. Die LB-Agarplatten oder der Flüssigansatz wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

8.9.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation) wurden 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einem Bakterien-Einzelklon angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden nacheinander 200 µl Lysepuffer und 200 µl Präzipitationspuffer zugegeben. Nach Zentrifugation (5 min, 20.000 x g, 4 °C) wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Isopropanol beigemischt. Es erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g, 4 °C zur Fällung der DNA. Das DNA-Pellet wurde mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in 30 µl aqua bidest gelöst. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präparation) wurde mit dem PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die gleichen Puffer wurden auch für die Mini-Präparation verwendet (s. oben). Die aufgereinigte DNA wurde in aqua bidest gelöst, die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert.

8.9.3 Messung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA erfolgte durch Messung der Absorption mit einem Spektralphotometer (NanoDrop, ThermoScientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierüber konnte auch die Reinheit der jeweiligen Nukleinsäure kontrolliert werden.

8.9.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten oder Chromatin wurde je nach Größe eine 0,8 - 2 % (w/v) Agaroselösung in TAE-Puffer aufgeköcht, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und zum Polymerisieren in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, mit dessen Hilfe DNA unter UV-Licht nachgewiesen werden kann. Die jeweiligen DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer gemischt und in die Gelta-schen des polymerisierten Agarosegels pipettiert. Parallel wurde zum Größenvergleich ein DNA-Größenstandard (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) aufgetragen. Nach etwa einstündiger Auftrennung bei 120 V konnte die DNA auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht werden.

8.9.5 Isolation von RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Säugerzellen erfolgte standardmäßig mit peqGOLD TriFast (Peqlab). Dafür wurde ein Zellpellet in 1 ml TriFast resuspendiert und anschließend 200 µl Chloroform zugegeben. Nach kräftigem Mischen wurde 10 min zentrifugiert (20.000 x g, 4 °C), worauf sich zwei Phasen bildeten. Die obere Phase (etwa 500 µl), welche die RNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde mehrmals invertiert und zur Fällung der RNA 15 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 20.000 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Sobald das Pellet trocken war, wurde es in 10 - 30 µl aqua bidest gelöst.

Alternativ wurde RNA, die für eine RNA-Seq Analyse eingesetzt werden sollte, mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Hierbei erfolgte auf der Säule zusätzlich ein DNase I-Verdau.

8.9.6 cDNA-Synthese

Zur Analyse der Expression einzelner Gene wurde die extrahierte RNA mittels Zufallshexanukleotid-Primern und einer reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurden 0,5 - 2 µg RNA in 10 µl aqua bidest verdünnt. Zur Auflösung der Sekundärstrukturen wurde der RNA-Ansatz für 2 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort 1 min auf 4 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 40 µl cDNASyntheseansatz

wurde 10 min bei Raumtemperatur, 50 min bei 37 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert.

cDNA-Syntheseansatz:

- 10 ul M-MLV RT 5 x Puffer (Promega)
- 5 ul dNTPs (2,5 M, Roth)
- 2 ul Zufallshexanukleotid-Primer (Roche)
- 0,2 ul RiboLockTM RNase Inhibitor (Fermentas)
- 1 ul M-MLV Reverse Transkriptase (Promega)
- ad 40 ul aqua bidest

8.9.7 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative PCR wurde zur Analyse der Genexpression verwendet. Hierbei wird die jeweilige DNA amplifiziert und dies durch Zugabe eines interkalierenden Farbstoffs (SYBRGreen) in Echtzeit quantifiziert (Deepak et al, 2007). Dafür wurden 19 ul des qRT-PCR-Reaktionsansatzes in entsprechende Reaktionsgefäße vorgelegt und 1 ul der cDNA zugegeben.

qRT-PCR-Reaktionsansatz:

- 5 ul SYBRGreen Mix (ThermoScientific)
- 0,5 ul Primer 1 (10 uM)
- 0,5 ul Primer 2 (10 uM)
- 13 ul aqua bidest (4 ul für ChIP)

PCR-Temperaturprofil:

- 1 Zyklus 95 °C 15 min
- 38 Zyklen 95 °C 60 s
- 60 °C 20 s
- 72 °C 15 s
- 1 Zyklus 95 °C 60 s
- 60 °C 30 s
- 95 °C 30 s

8.9.8 Herstellung eines Tet-induzierbaren FL-APC Vektors

Herstellen eines Plasmides mit FL-APC unter der Kontrolle des TET-Promotors: Das *APC*-Gen wurde aus dem Vektor pSAR-MT-APC (Addgene-Plasmid 16487) durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI gewonnen und das 8487 bp lange *APC*-Gen durch Agarosegelelektrophorese isoliert. Der Vektor pTRE2-Pur wurde ebenfalls mit *Bam*HI inkubiert und der geschnittene Vektor von 2605 bp Länge ebenfalls durch Agarosegelelektrophorese gewonnen. Der gewonnene Vektor und das *APC*-Gen wurden anschließend ligiert und in XL1-Blue transformiert. Die korrekte Sequenz und Orientierung des *Inserts* im hergestellten Plasmid wurde durch Sanger-Sequenzierung validiert. Die vollständige Sequenz des hergestellten Vektors ist im elektronischen Anhang dieser Arbeit enthalten.

8.9.9 Klonierung von shRNAs in pRSI9

Das Originalprotokoll wurde von Anne von Thun erstellt und ist im elektronischen Anhang dieser Arbeit enthalten.

1. *shRNA Design*: Die genutzten shRNA-Sequenzen wurden aus der *Decipher* shRNA-Bibliothek entnommen. Die Sequenzen bestehen aus jeweils Oligo1: ACCG-*Sense* (21-GT)-GTTAATATTCATAGC-*Antisense*-TTTTTT und Oligo2:CGAA-AAAAAA-*Sense*-GCTATGAATATTAAC-*Antisense*. Die Sequenzen enthalten mehrere nicht komplementäre Basen, die die Effizienz der shRNA erhöhen sollen. Die verwendeten Sequenzen sind im Text durch zwei Ziffern bezeichnet. Diese sind die letzten beiden Ziffern des *Identifiers* der jeweiligen shRNA.
2. *Annealing*: Um dsDNA zu erhalten wurden Oligo1 und Oligo2 mit 2xAnnealing-Puffer (100 mM HEPES-NaOH (pH 7,4), 200 nM KAc, 4mM MgAc) in einem *Thermocycler* inkubiert:
 - 25 ul 2xAnnealing Puffer
 - 5 ul Oligo 1 (100 uM Stock)
 - 5 ul Oligo 2 (100 uM Stock)
 - 15 ul Wasser

Thermocycler-Programm:

- (a) 95 °C 10 s
 - (b) 85 °C - x* 2 2 °C 10 min (x=Anzahl der bereits durchgeführten Durchläufe)
 - (c) Zurück zu 2 bis 25 °C erreicht sind.
3. *Klonierung*: 5 ug des pRSI9 Vektors wurden mit der Restriktionsendonuklease BbsI für 1,5 h inkubiert, mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und isoliert. 100 ng

linearisiertes Plasmid wurden mit 2 μ l *Annealed* Oligos mit T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers 1h bei Raumtemperatur ligiert. Das Ligationprodukt wurde anschließend in XL1Blue transformiert. Die Plasmid DNA eines Einzelklones wurde isoliert und durch Sanger-Sequenzierung die korrekte Sequenz validiert.

8.9.10 Klonierung von shRNAs in pLeGO

1. shRNA Design: Die herzustellende Insert-Sequenz darf am 5' Ende keinen Überhang haben und muss am 3' Ende einen XhoI kompatiblen Überhang haben (TCGA). Um den Promotor nach dem Restriktionsverdau des Zielvektors zu rekonstituieren muss zusätzlich ein T:A Basenpaar am 5' Ende der generierten dsDNA angefügt werden. Die shRNA-Sequenzen wurden aus dem Decipher-Projekt (siehe 8.9.9) entnommen und wie bereits erwähnt benannt. Für die ssDNA Oligomere ergibt sich danach folgendes Muster:

- Oligo1: 5' T-Sence-Loop-Antisence-TTTTTT-TCGA 3'
- Oligo2: 3' A-Sence-Loop-Antisence-AAAAAA-AGCT 5'

Die ssDNA Oligomere wurden an 5' phosphoryliert bestellt (Sigma)

2. *Annealing* und Klonierung: Das *Annealing* der ssDNA Oligomere sowie die Klonierung erfolgte wie in 8.9.9 beschrieben.

Kultivierungsmedien

Medien für Bakterienkultivierungen

LB-Medium 1 % (w/v) Baktotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

LB-Agar LB-Medium mit 1,2 % (w/v) Bakto-Agar; nach dem Autoklavieren wurde der LB-Agar auf 50 °C abgekühlt und 20 ml auf eine 10 cm Schale gegossen. Antibiotika Abhängig vom Resistenzgen des Plasmids wurden dem LB-Medium oder dem LB-Agar 100 μ g/ml Ampicillin oder 30 μ g/ml Kanamycin hinzugefügt.

8.9.11 Sequenzierungen

Sangersequenzierungen wurden bei dem externen Dienstleister LGC-Genomics durchgeführt. Die Sequenzierung der RNA-Seq und *Screen*-Daten erfolgte auf einem Illumina GAI-Ix.

Die Präparation der RNA-Seq Libraries erfolgte mit dem *NEBNext® UltraTM RNA Library Prep Kit for Illumina®*-Kit von New England Biolabs nach den Beschreibungen des Herstellers..

8.9.12 shRNA-Screen und Auswertung

Für die Durchführung des shRNA-Screen wurden $4,5 \times 10^6$ Zellen pro Platte in 7 ml Zellkulturmedium auf 20×15 cm Zellkulturplatten mit der shRNA Bibliothek infiziert. Das Medium enthielt ausreichend Virus (in Vorexperimenten getestet) um die angestrebte MOI von 0,7 nach drei Tagen Inkubation zu erreichen. Zeitgleich mit der Infektion wurde das FL-APC Allel durch Zugabe von Doxyzyklin induziert (10 Platten) bzw. die Zellen mit Ethanol kontrollbehandelt (10 Platten). Nach 12 h Inkubation wurde das Medium mit normalen Kulturmedium mit Doxyzyklin/Ethanol ausgetauscht und das Volumen auf 15 ml erhöht. Die MOI von 0,7 wurde als Ziel gewählt, weil diese eine Optimum zwischen zahlreichen infizierten Zellen und der Vermeidung von Mehrfachintegrationen darstellt. Auf diese Weise wurden $4,5 \times 10^6$ Zellen \times 10 Platten \times 0,5 Infektionseffizienz = $22,5 \times 10^6$ Zellen infiziert. Dies reicht aus, um die im Screen enthaltenen shRNAs mit durchschnittlich 800-facher Redundanz zu enthalten: 27.500 shRNAs \times 800 erstrebte Redundanz = 22×10^6 benötigte Infektionen

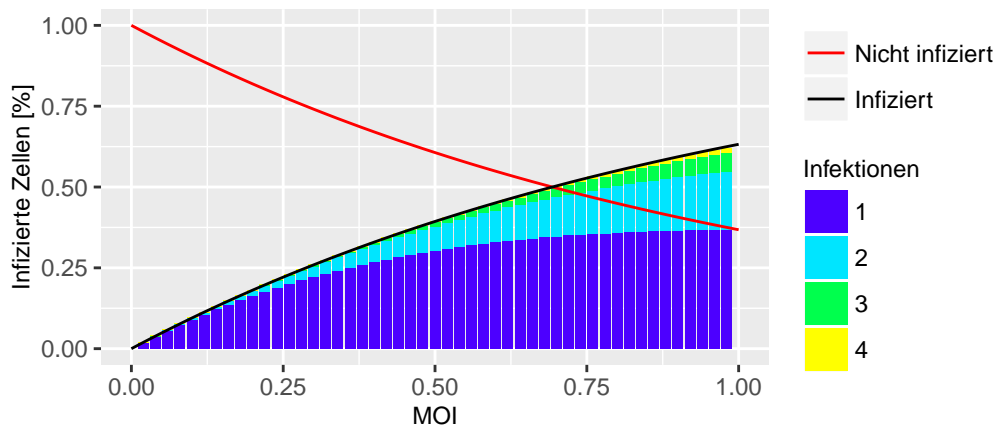


Abbildung 8.1: Theoretische Anzahl an Infektionen mit steigender MOI

Der Anteil der nicht infizierten Zellen nimmt bei steigender MOI ab und der der insgesamt infizierten Zellen entsprechend zu. Unter den insgesamt infizierten Zellen ist als Balkendiagramm angegeben der Anteil der infizierten Zellen mit 0 - 4 Infektionen. Die dargestellten Wahrscheinlichkeiten ergeben sich aus der Poisson verteilung: $P(k) = \frac{e^{-m} \cdot m^k}{k!}$ mit k = Anzahl Infektionen und m = MOI

Nach drei Tagen (T1) wurde das Medium gewechselt, 50 % der Zellen für die spätere DNA-Präparation pelletiert und bei -80°C eingefroren und weitere Proben für spätere Untersuchungen fixiert bzw. eingefroren. 54×10^6 Zellen wurden erneut bei einer Dichte von $4,5 \times 10^6$ Zellen/Platte ausgesät, nach 24h das Medium gewechselt und nach weiteren 48 h erneut passagiert. Bis zum Erreichen von T2 wurden die Zellen auf diese Weise behandelt und dabei bei jedem Passagieren mehr Zellen ausgesät, so dass bei einem linearen Anstieg der verwendeten Zellkulturplatten am Ende des Experimentes 20 Zellkulturschalen pro Kondition erreicht waren. Auf diese Weise wurde dem schrumpfenden Anteil infizierter Zellen Rechnung getragen. Zum Zeitpunkt T2 wurden alle Zellen eingefroren.

Die Zellpellets der aller Konditionen (T1/2 und +/- Dox) wurden in 5 ml Puffer P1 aufgenommen. 250 ul 10% SDS wurden hinzugegeben und die Lösung 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen in 1 ml Aliquots aufgeteilt und auf Eis bei 20% Amplitude 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Zu den Lösungen wurde 5 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24:24:1) gegeben und die resultierende Lösung gemischt. Die Phasen der Lösung wurden durch 60 minütige Zentrifugation bei 8700rpm und 20 °C getrennt und die obere Phase abgenommen in ein neues Reaktionsgefäß überführt (ca.4 ml). Zu dieser wurde 0,5 ml 3M Natriumacetat und Glycoblu (finale Konzentration von 50 ug/ul) zugegeben. Anschließend wurde mit einem Volumen Isopropanol über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Mischung wurde bei 8700rpm 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend drei Mal mit 70 % EtOH gewaschen. Schließlich wurde das Pellet luftgetrocknet und in Injektionswasser aufgenommen. Eine Konzentration von 2 mg/ml wurde hergestellt.

Aus der fragmentierten, genomischen DNA (die gesamte DNA) wurde mittels PCR mit den Primern CA-decipherPCR-1-f und CA-decipherPCR-1-r die Decipher-Barcodes amplifiziert:

Genomische DNA	2.5-5 ug
MgCl ₂	2,5 mM finale Konzentration
CA-decipherPCR-1-f	2,5 ul(10 uM Stammlösung)
CA-decipherPCR-1-r	2,5 ul(10 uM Stammlösung)
dNTPs (10 mM)	1 ul
10x <i>In-House</i> PCR-Puffer	5 ul
dH ₂ O	ad 50 ul
<i>In-House</i> Taq Pol (C.Söder Batch #16)	0,5 ul

Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Program 95°C, 3 Minuten / (95 °C 30 Sekunden, 65 °C 20 Sekunden, 72 °C 20 Sekunden) x 24 / 68 °C, 2 Minuten durchgeführt.

Die PCR-Produkte einer Kondition wurden zusammengeführt und mit zwei ul der Lösung wurde eine weitere PCR durchgeführt. Mit dieser wurden probenspezifische Barcodes, sowie Adaptoren für die Illumina NGS-Flowcell angefügt. Verwendet wurden die Primer CA-decipherMP-r-XXX (siehe S. 79) und CA-decipherPCR-2-f sowie die Phusion Polymerase (Thermo Fisher Scientific)

Produkt aus PCR1	2 ul
MgCl ₂	2,5 mM Endkonzentration
CA-decipherPCR-2-f	2,5 ul of 10 uM stock
CA-decipherMP-r-XXX	2,5 ul of 10 uM stock
dNTPs (10 mM)	1 ul
5x HF Puffer	10 ul
dH ₂ O	ad 50 ul
Phusion Pol	0,5 ul

Pro Kondition wurden zwei PCRs nach diesem Rezept durchgeführt und anschließend wieder vereint. Das PCR-Produkt wurde auf einem 2% Agarose-Gel auftrennt und das 142 bp große Produkt insoliert. Anschließend wurde auf dem Illumina GAX II nach den Anweisungen des Herstellers sequenziert (siehe 8.9.11)

Das *Alignment* der Barcode-Sequenzen und Zählen der jeweils zugeordneten *Reads* wurde mit dem Decipher Barcode Deconvoluter nach den Vorgaben des Entwicklers durchgeführt.

Die Statistik für den differenziellen Effekt einer shRNA zwischen den Konditionen wurde mit shRNA-seq berechnet [190]. Um dieses zu verwenden wurde zunächst ein Galaxy-Server eingerichtet, der die benötigten Pakete sowie Abhängigkeiten enthält. In der folgenden Galaxy-Analyse wurde als *Contrasts of Interest* $\log_2(\text{DOX}_{\frac{T2}{T1}}) - \log_2(\text{ETOH}_{\frac{T2}{T1}})$

8.10 Zellbiologische Methoden

Säugerzellen wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert.

8.10.1 Passagieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden je nach Proliferationsrate mehrmals wöchentlich vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und eine entsprechende Menge Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach wenigen Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und von der Schale gelöst. Ein Teil der Zellen wurde zur weiteren Kultivierung in eine neue Kulturschale überführt, der Rest wurde verworfen. Sollten die Zellen für einen Versuch ausgesät werden, konnte die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer oder eines Zellzählers (CASY) Methoden 43 bestimmt werden. Dabei variierte die verwendete Zellzahl je nach Art und Dauer des Experiments. Es wurde immer darauf geachtet, dass die Zellen zum Ende des Versuchs nicht konfluent wurden.

8.10.2 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen aus dem Stickstofftank wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in ein Reaktionsgefäß mit 30 ml Kulturmedium überführt und mehrfach invertiert. Um das DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer entsprechenden Menge frischen Mediums aufgenommen und die Zellsuspension auf eine neue Kulturschale zur Kultivierung gegeben.

8.10.3 Einfrieren von Zellen

Um Zellen in Flüssigstickstoff für eine längere Zeit aufzubewahren, wurden diese wie bereits beschrieben mit Trypsin-Lösung von der Kulturschale abgelöst und in Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in einem adäquaten Volumen Einfriermedium resuspendiert und jeweils 1 ml der Suspension in ein Kryoröhrchen pipettiert. Dieses wurde in einem Einfrierbehälter einen Tag bei -80 °C gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff überführt.

8.10.4 Transfektion von Säugerzellen mit Polyethylenimin (PEI)

Die Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI, Sigma). Dafür wurden Zellen 24 h vor Transfektion ausplattiert und kurz vorher ein Mediumwechsel auf Transfektionsmedium (2 % FBS, ohne Antibiotika) durchgeführt. Es wurden folgende zwei Transfektionsansätze vorbereitet: Methoden 44 x ug DNA x ul PEI 500 ul PBS 500 ul PBS Dabei wurde ein DNA:PEI-Verhältnis von 1:2 verwendet. Beide Ansätze wurden im Anschluss gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA-PEI-Mischung daraufhin direkt auf die Zellen gegeben. Nach 4 - 12 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Transfektionsmedium durch normales Kulturmedium ersetzt. 24 - 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für die weitere Analyse geerntet.

8.10.5 Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamine 2000

Alternativ zur Transfektion mit PEI wurde für bestimmte Plasmide und Zelllinien eine Lipidbasierte Transfektion durchgeführt. Hierfür wurden Zellen auf 10 cm Kulturschalen in Antibiotika-freiem Medium ausplattiert. Für die Transfektion wurden 10 - 20 ug DNA bzw. die entsprechende Menge Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) in jeweils 500 ul Opti-MEM (Life Technologies) verdünnt. Beide Ansätze wurden miteinander gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde anschließend auf die Zellen gegeben und 24 - 30 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet.

8.10.6 Herstellung von Lentiviren in HEK293T-Zellen

Alternativ zur retroviralen Infektion wurden für die Depletion von Proteinen auch Lentiviren benutzt, da diese eine wesentlich höhere Infektionseffizienz besitzen und für die Infektion humaner Zellen kein ekotropher Rezeptor nötig ist. Hierbei mussten zusätzlich die zur Virusverpackung nötigen Plasmide (psAX.2 und pMD2.G) transfiziert werden. Für die Lentivirusproduktion wurden pro 10 cm Kulturschale 4,5 Mio. HEK293T-Zellen ausplattiert und diese mittels PEI transfiziert. Dafür wurde folgender Transfektionsansatz vorbereitet: 11,1 µg Plasmid-DNA (pLKO.1-Vektor) 2,4 µl psAX.2 1,2 µl pMD2.G Methoden 46 500 µl Opti-MEM® Ein Mediumwechsel erfolgte 16 h nach Transfektion auf 6 ml normales Kulturmedium. Es wurde insgesamt dreimal der Virusüberstand abgenommen (36 h, 48 h und 60 h nach Transfektion), wonach jeweils 6 ml neues Medium zugegeben wurde. Der komplette Virusüberstand wurde anschließend filtriert und entweder sofort verwendet oder bei -80 °C zur langfristigen Lagerung eingefroren. 3.2.9 Lentivirale Infektion von Säugerzellen Für die lentivirale Infektion wurde das Medium von ausgesäten Zellen abgenommen. Pro 10 cm Kulturschale wurden 3,5 ml Medium, 500 µl Virusüberstand und 4 µg/ml Polybren auf die Zellen gegeben. Nach 16 - 24 h erfolgte eine zweite Infektion. 48 h nach der ersten Infektion konnte durch Zugabe von 2 µg/ml Puromycin mit der Selektion begonnen werden. Eine erfolgreiche Selektion wurde durch Puromycin-Behandlung von nicht-infizierten Zellen kontrolliert. Nach 1 - 2 Tagen Selektion wurden die infizierten Zellen geerntet oder für weiterführende Experimente ausplattiert.

8.10.7 Transfektion, Virusproduktion und Infektion

Transfektionen wurden, wenn nicht anders angegeben mit PEI (Polyethylenimin) durchgeführt. Für die Transfektion wurden Zellen auf 10 cm Schalen so ausgesät, dass am nächsten Tag eine Konfluenz von 70 - 80 % erreicht wurde (Beispielsweise 4×10^6 Hek293T Zellen). Am nächsten Tag wurden die Zellen 30 min starviert. 10 µg DNA wurden in 500 µl Optimem (Thermo-Fisher-Scientific) aufgenommen. 20 µl PEI wurden ebenfalls in 500 µl Optimem aufgenommen. Beide Optimem-Lösungen wurden vereint und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die starvierten Zellen erhielten wieder 5 µl Vollmedium und die Transfektionslösung wurde tröpfchenweise über die ganze Zellkulturschalenoberfläche verteilt. Transfektionen in anderen Maßstäben wurden nach der veränderten Zellkulturfläche skaliert.

Transfektionen mit Lipofektamin 2000 (Thermo-Fisher-Scientific) wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für Virusproduktionen wurden die *Packaging*-Plasmide pMD2G und psPAX2 mit dem jeweiligen Expressionsvektor kotransfiziert. Hierbei wurden 2,5 µg der beiden *Packaging*-Plasmide und 10 µg des Expressionsplasmides mit PEI wie oben beschrieben transfiziert. Nach vier Stunden Inkubationszeit erfolgte ein Medienwechsel mit anschließender Regenerationszeit über Nacht. Virale Partikel wurden über drei Tage hinweg geerntet: Hierzu wurden 6 ml Vollmedium auf die Zellen gegeben und dieses nach Inkubation für 7 Stunden

in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Um die viralen Partikel in dem Medium intakt zu halten wurde das Reaktionsgefäß bis zu der letzten Virusernte bei 4 °C gehalten. Im Anschluss an die letzte Ernte wurden die infizierten Zellen vernichtet. Der abgesammelte Virus wurde durch einen 0,4 µm Filter sterilfiltriert, in Einfriergefäßen aliquotiert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Eine Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei -80 °C

Um Zellen zu mit den viralen Partikeln zu infizieren wurden 4.500.000 Zellen in 9 ml Medium ausgesät. Es wurde ausreichend virale Partikel enthaltendes Medium in diesem Volumen anteilig verwendet, so dass nach drei Tagen Inkubationszeit zwischen 10 und 60 % der Zellen infiziert waren. Um eine verbesserte Infektionseffizienz zu erhalten wurde dem Medium zusätzlich XXXX zugefügt. Infektionen wurden stets abends durchgeführt und am nächsten Morgen erfolgte ein Medienwechsel.

8.10.8 Gewinnung von Einzelklonen

Einzelklone wurden mittels Klonierungsringen gewonnen. Die zu subklonierenden Zellen wurden sehr dünn (Beispielsweise 500 Zellen auf eine 15 cm Schale) ausgesät, so dass Kolonien klonaler Herkunft entstanden. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend das Medium vollständig abgesaugt. Klonierungsringe mit 8 mm Durchmesser (Einzelanfertigung) wurden mit einer Seite mit Vaseline abgedichtet und anschließend an der Zellkulturschale so angebracht, dass sie die zu isolierende Kolonie einschließen.

8.10.9 Wachstumskurven

Um die Proliferation unterschiedlich behandelter Zellen zu vergleichen, wurden für jeden Tag der Zellzählung jeweils 10.000 Zellen in Triplikaten in 6-well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit Trypsin-Lösung abgelöst und mittels Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt. Dies erfolgte je nach Experiment über 4 oder 5 Tage.

8.10.10 BrdU-Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (BrdU-PI-FACS)

Zur Zellzyklusanalyse wurde die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) angewendet. Hierbei kann der DNA-Gehalt (N) der Zellen mit Hilfe eines interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffs wie Propidiumiodid (PI) analysiert werden. Der DNA-Gehalt wiederum ermöglicht eine Unterscheidung der Zellzyklusphasen G1/G0 (2 N), S (> 2 N, < 4 N) und G2/M (4 N). Darüber hinaus können sowohl polyploide Zellen (> 4 N) als auch apoptotische Zellen (SubG1, < 2 N) identifiziert werden. Vor der Ernte wurden die Zellen 1 h mit 5 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU) behandelt. Als Thymidin-Analogen wird dieses in neu synthetisierte DNA eingebaut und dient damit als Maß für die Proliferationsrate der Zellen. Zur Analyse bereits abgelöster, apoptotischer Zellen wurde das Medium in 15 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und die adhärennten Zellen mit Trypsin-Lösung von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden im vorher gesammelten Mediumüberstand auf-

genommen und zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C). Nach einmaligem Waschen mit 10 ml PBS und erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend langsam unter Vortexen in 4 ml eiskaltes Ethanol abgetropft. Die so fixierten Zellen wurden mindestens 24 h bei -20 °C gelagert. Am Tag der FACS-Analyse wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C), mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml 2 M HCl/0,5 % (v/v) Triton X-100 aufgenommen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Denaturierung der DNA, woraufhin die Zellen pelletiert wurden (10 min, 400 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml 0,1 M Na₂B₄O₇ (pH 8,5) resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C). Nach Zugabe von 100 µl 1 % (w/v) BSA in PBS-T wurden 20 µl BrdU-FITC-Antikörper zugegeben und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C), mit 200 µl 1 % (w/v) BSA in PBS-T gewaschen und in 400 µl Natriumcitrat (38 mM) aufgenommen. Es wurden 15 µl Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml) und 1 µl RNase A (10 mg/ml) hinzugefügt und diese Mischung 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Überführung in FACS-Röhrchen wurden die Proben am Durchflusszytometer (FACSCanto II, BD Biosciences) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und mit einem 556 nm Langpass- und einem 585/42 nm Bandpassfilter für Propidiumiodid (Emission 617 nm) gemessen. Die Analyse der Zellzyklusverteilung wurde mit dem Programm BD FACSDiva 6.1.2 durchgeführt.

8.10.11 Kristallviolettffärbung

Zur Färbung von adhären Zellen auf einer Kulturschale wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Fixierung mit 70 % (v/v) Ethanol für 10 min, woraufhin das Ethanol entfernt wurde. Nach Trocknung der Zellen wurden diese mit Kristallviolettlösung (2 ml pro 6 cm Kulturschale) für 30 min gefärbt. Danach wurde die Färbelösung verworfen, die Zellen mit aqua bidest gewaschen und anschließend getrocknet.

8.10.12 Boyden-Chamber Migrations assay

250.000 Zellen mit Vorbehandlung wie angegeben wurden auf der oberen Seite eines *Cell Culture Insert* mit 8 µm Porengröße (Corning, REF:353097) in 250 µl Medium mit 1 % FKS ausgesät. Die Zellkultureinsätze wurden vorsichtig in eine *Companion Plate* (BD, 3504) eingesetzt und in diese 750 µl Medium mit 10 % FKS gegeben. Die Zellen wurden für 48 h inkubiert und anschließend mit 3,7 % Formaldehyd fixiert. Die Zellen wurden dann gewaschen, mit Kristallviolett gefärbt und die nicht migrierten Zellen mit Hilfe von Watte- teststäbchen entfernt. Die migrierten Zellen wurden gezählt.

8.11 Proteinbiochemische Methoden

8.11.1 Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten

Für die Isolation von Proteinen aus adhärennten Säugerzellen wurden diese mit PBS gewaschen und von der Kulturschale geschabt. Nach Zentrifugation (4 min, 800 x g, 4 °C) wurde das Zellpellet in einer entsprechenden Menge RIPA-Lysepuffer (versetzt mit Proteaseinhibitoren, 1:1.000) resuspendiert und diese Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde daraufhin zentrifugiert (10 min, 20.000 x g, 4 °C) und der Proteinüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (s. Abschnitt 3.3.3) und das Lysat entweder direkt für eine weitere Analyse eingesetzt oder in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

8.11.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde mit der Bradford-Methode durchgeführt (Bradford, 1976). Dazu wurde ein Gemisch aus 500 ul aqua bidest und 500 ul BradfordLösung in eine Küvette vorgelegt. Es wurde 1 ul des Proteinlysates hinzugegeben, kräftig gemischt und die Absorption im Photometer bei 595 nm gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 1 ul des jeweiligen Lysepuffers. Die erhaltenen Absorptionswerte konnten mit einer Eichgerade verglichen und somit die Proteinkonzentration bestimmt werden. Methoden 50

8.11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinlysaten Laemmli [191]. Dazu wurden 10 - 20 ug Proteinlysate auf ein einheitliches Volumen mit dem jeweiligen Lysepuffer aufgefüllt und ein halbes Volumen 3 x SDS-Probenpuffer hinzugefügt. Alternativ wurde eine entsprechende Menge eines Eluates einer Immunpräzipitation oder einer Ubiquitinierungsuntersuchung eingesetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei 95 °C inkubiert und direkt in die Geltaschen eines SDS-Polyacrylamid-Gels gefüllt. Das Gel bestand aus einem 4 %igen Sammelgel und je nach Größe der aufzutrennenden Proteine aus einem 7,5 - 15 %igen Trenngel. Als Größenvergleich diente ein Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas oder HiMark™ PreStained HMW Protein Standard, Invitrogen), welcher parallel aufgetragen wurde. Die Gelelektrophorese wurde in einer mit SDS-Laufpuffer befüllten SDS-PAGE-Apparatur durchgeführt. Bis zum Erreichen des Trenngels erfolgte dies bei 80 V, die Auftrennung der Proteine anschließend bei 130 V für etwa 90 min.

8.11.4 Western Blot

Im Western Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, mit der anschließend spezifische Färbungen durchgeführt werden können. Dies erfolgte mittels Tank-Blot-Verfahren. Dazu wurde die Membran 1 min in Methanol inkubiert, in aqua bidest gewaschen und darauf in Tank-Blot-Puffer äquilibriert. Die Membran wurde auf das Polyacrylamid-Gel gelegt und zwischen Filterpapieren und Schwämmen in die Tank-Blot-Apparatur gespannt. Der Transfer erfolgte je nach Proteingröße bei 250 - 350 mA für 3 h bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Membran in Blockierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt, bevor sie über Nacht bei 4 °C in einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers in Blockierungslösung rotierend inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in 1 x TBS-T wurde die Membran für 1 h in Sekundärantikörper inkubiert (1:5.000 in 1 x TBS-T), woraufhin nochmals drei Waschschritte in 1 x TBS-T folgten. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Chemilumineszenz mittels Immobilon Western Substrat (Millipore) nach Herstellerangaben. Die Signale wurden mit dem LAS-4000 (Fujifilm Global) oder Odyssey (Licor) visualisiert und konnten gegebenenfalls mit der MultiGauge Software bearbeitet und quantifiziert werden.

8.11.5 CAP-Pulldown

CAP Pulldowns wurden wie in Balgi et al. [192] beschrieben, jedoch mit einigen Modifikationen durchgeführt:

Zu 200 µg Zellysate in 500 µl CAP-Lysepuffer wurden 15 µl γ -Aminophenyl-m⁷GTP-Agarose C₁₀ (AC-155S Jena Bioscience) zugegeben und die Mischung rotierend 90 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion zentrifugiert und zwei mal mit CAP-Lysepuffer gewaschen. Die verbliebenen Proteine wurden direkt in SDS-Lysepuffer aufgenommen, 10 min bei 95 °C inkubiert und schließlich die angegebenen Proteine im Immunoblot visualisiert.

8.11.6 Polysomenanalyse

16 * 10⁶ SW480 Zellen wurden auf 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie beschrieben 24 h behandelt. Die Zellyse wurde in 400 µl Gradientenpuffer (1 mM DTT, 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,5 % NP40, 20 µl 0,1 mg/ml cycloheximid, Protease und RNase Inhibitoren (Sigma, Thermo-Fisher-Scientific)). Die Lysate wurden 10 min bei 21.000 * g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe einer Bradford-Bestimmung wurden die Konzentrationen der Proben ermittelt und diese daraufhin normalisiert. Die Proben wurden auf einen 5 - 45 % Saccharose-Gradienten geladen und bei 34.500 rpm 1 h bei 4 °C in einem SW41-Ti Rotor zentrifugiert. Die zentrifugierten Proben wurden mittels einem Gradienten Fraktionierer fraktioniert (BioComp). Jeweils zwei der erhaltenen Frak-

tionen wurden 1:1 vereint und RNA durch phenol-chloroform isolation gewonnen. Mit den so gewonnen Proben wurde mittels qRT-PCR die relative Konzentration der angegebenen Gene bestimmt. Ein ausführliches Protokoll ist im elektronischen Anhang dieser Arbeit enthalten.

Literaturverzeichnis

- [1] Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, and Freddie Bray. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5):E359–386, March 2015. ISSN 1097-0215. doi: 10.1002/ijc.29210.
- [2] Rebecca Siegel, Carol DeSantis, Katherine Virgo, Kevin Stein, Angela Mariotto, Tenbroeck Smith, Dexter Cooper, Ted Gansler, Catherine Lerro, Stacey Fedewa, Chunchieh Lin, Corinne Leach, Rachel Spillers Cannady, Hyunsoon Cho, Steve Scoppa, Mark Hachey, Rebecca Kirch, Ahmedin Jemal, and Elizabeth Ward. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(4): 220–241, August 2012. ISSN 1542-4863. doi: 10.3322/caac.21149.
- [3] Susanna C. Larsson, Nicola Orsini, and Alicja Wolk. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22): 1679–1687, November 2005. ISSN 1460-2105. doi: 10.1093/jnci/dji375.
- [4] Sooyoung Cho, Aesun Shin, Sue K. Park, Hai-Rim Shin, Soung-Hoon Chang, and Keun-Young Yoo. Alcohol Drinking, Cigarette Smoking and Risk of Colorectal Cancer in the Korean Multi-center Cancer Cohort. *Journal of Cancer Prevention*, 20(2): 147–152, June 2015. ISSN 2288-3649. doi: 10.15430/JCP.2015.20.2.147.
- [5] Ahmedin Jemal, Freddie Bray, Melissa M. Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, and David Forman. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2):69–90, April 2011. ISSN 1542-4863. doi: 10.3322/caac.20107.
- [6] B. Glimelius, E. Tiret, A. Cervantes, D. Arnold, and ESMO Guidelines Working Group. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 24 Suppl 6:vi81–88, October 2013. ISSN 1569-8041. doi: 10.1093/annonc/mdt240.
- [7] Armin Wiegering. Bedeutung und Regulation von cMYC in der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms, 2015.
- [8] Daniel B. Longley, D. Paul Harkin, and Patrick G. Johnston. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews. Cancer*, 3(5):330–338, May 2003. ISSN 1474-175X. doi: 10.1038/nrc1074.

-
- [9] Joanne Graham, Mohamed Mushin, and Peter Kirkpatrick. Oxaliplatin. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(1):11–12, January 2004. ISSN 1474-1776. doi: 10.1038/nrd1287.
- [10] Meiling Yu, Xuhui Tong, Benquan Qi, Hongdang Qu, Shuying Dong, Binbin Yu, Naiju Zhang, Nan Tang, Lingzhi Wang, and Cuiling Zhang. Berberine enhances chemosensitivity to irinotecan in colon cancer via inhibition of $\text{nf-}\kappa\text{b}$. *Molecular Medicine Reports*, 9(1):249–254, January 2014. ISSN 1791-3004. doi: 10.3892/mmr.2013.1762.
- [11] F. Ahmed, V. Vyas, A. Cornfield, S. Goodin, T. S. Ravikumar, E. H. Rubin, and E. Gupta. In vitro activation of irinotecan to SN-38 by human liver and intestine. *Anticancer Research*, 19(3A):2067–2071, June 1999. ISSN 0250-7005.
- [12] Beatrice Mohelnikova-Duchonova, Bohuslav Melichar, and Pavel Soucek. FOL-FOX/FOLFIRI pharmacogenetics: the call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 20(30):10316–10330, August 2014. ISSN 2219-2840. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10316.
- [13] Norbert Ulfig. *Kurzlehrbuch Histologie*. Thieme, Rostock, 2. korrigierte auflage edition, 2005. ISBN 3-13-135572-7.
- [14] Michaela Krausova and Vladimir Korinek. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cellular Signalling*, 26(3):570–579, March 2014. ISSN 1873-3913. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.032.
- [15] Hans Clevers and Eduard Batlle. SnapShot: the intestinal crypt. *Cell*, 152(5):1198–1198.e2, February 2013. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.030.
- [16] Hans C. Clevers and Charles L. Bevins. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annual Review of Physiology*, 75:289–311, 2013. ISSN 1545-1585. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183744.
- [17] Carlos Lopez-Garcia, Allon M. Klein, Benjamin D. Simons, and Douglas J. Winton. Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science (New York, N. Y.)*, 330(6005):822–825, November 2010. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1196236.
- [18] Hugo J. Snippert, Laurens G. van der Flier, Toshiro Sato, Johan H. van Es, Maaïke van den Born, Carla Kroon-Veenboer, Nick Barker, Allon M. Klein, Jacco van Rheenen, Benjamin D. Simons, and Hans Clevers. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 143(1):134–144, October 2010. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.016.

-
- [19] D. J. Huels and O. J. Sansom. Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 113(1):1–5, June 2015. ISSN 1532-1827. doi: 10.1038/bjc.2015.214.
- [20] Ann-Marie Baker, Biancastella Cereser, Samuel Melton, Alexander G. Fletcher, Manuel Rodriguez-Justo, Paul J. Tadrous, Adam Humphries, George Elia, Stuart A. C. McDonald, Nicholas A. Wright, Benjamin D. Simons, Marnix Jansen, and Trevor A. Graham. Quantification of crypt and stem cell evolution in the normal and neoplastic human colon. *Cell Reports*, 8(4):940–947, August 2014. ISSN 2211-1247. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.019.
- [21] Johannes Grossmann, Kathrin Walther, Monika Artinger, Petra Rümmele, Matthias Woenckhaus, and Jürgen Schölmerich. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(6):1421–1428, June 2002. ISSN 0002-9270. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05787.x.
- [22] B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, and J. L. Bos. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine*, 319(9):525–532, September 1988. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJM198809013190901.
- [23] E. R. Fearon and B. Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5):759–767, June 1990. ISSN 0092-8674.
- [24] Melanie Hüttenrauch. Untersuchung des regulatorischen einflusses des pi3-kinase/mtor-inhibitors bez235 auf die aktivität des map-kinase-signalweges. 2012.
- [25] R. J. Albertini, J. A. Nicklas, J. P. O’Neill, and S. H. Robison. In vivo somatic mutations in humans: measurement and analysis. *Annual Review of Genetics*, 24:305–326, 1990. ISSN 0066-4197. doi: 10.1146/annurev.ge.24.120190.001513.
- [26] Maria S. Pino and Daniel C. Chung. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6):2059–2072, June 2010. ISSN 1528-0012. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065.
- [27] Andrew Rowan, Sarah Halford, Michelle Gaasenbeek, Zoe Kemp, Oliver Sieber, Emmanouil Volikos, Eleanor Douglas, Heike Fiegler, Nigel Carter, Ian Talbot, Andrew Silver, and Ian Tomlinson. Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 3(11):1115–1123, November 2005. ISSN 1542-3565.
- [28] E. Viguera, D. Canceill, and S. D. Ehrlich. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *The EMBO journal*, 20(10):2587–2595, May 2001. ISSN 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/20.10.2587.

-
- [29] Katherine B. Geiersbach and Wade S. Samowitz. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(10):1269–1277, October 2011. ISSN 1543-2165. doi: 10.5858/arpa.2011-0035-RA.
- [30] C. Richard Boland and Ajay Goel. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6):2073–2087.e3, June 2010. ISSN 1528-0012. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064.
- [31] J. Newell-Price, A. J. Clark, and P. King. DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 11(4):142–148, June 2000. ISSN 1043-2760.
- [32] N. Ahuja, A. L. Mohan, Q. Li, J. M. Stolker, J. G. Herman, S. R. Hamilton, S. B. Baylin, and J. P. Issa. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research*, 57(16):3370–3374, August 1997. ISSN 0008-5472.
- [33] M. Toyota and J. P. Issa. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 9(5):349–357, October 1999. ISSN 1044-579X. doi: 10.1006/scbi.1999.0135.
- [34] Ludovic Barault, Céline Charon-Barra, Valérie Jooste, Mathilde Funes de la Vega, Laurent Martin, Patrick Roignot, Patrick Rat, Anne-Marie Bouvier, Pierre Laurent-Puig, Jean Faivre, Caroline Chapusot, and Francoise Piard. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Research*, 68(20):8541–8546, October 2008. ISSN 1538-7445. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1171.
- [35] N. Ahuja and J. P. Issa. Aging, methylation and cancer. *Histology and Histopathology*, 15(3):835–842, July 2000. ISSN 0213-3911.
- [36] Sean L. Preston, Wai-Man Wong, Annie On-On Chan, Richard Poulson, Rosemary Jeffery, Robert A. Goodlad, Nikki Mandir, George Elia, Marco Novelli, Walter F. Bodmer, Ian P. Tomlinson, and Nicholas A. Wright. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Research*, 63(13):3819–3825, July 2003. ISSN 0008-5472.
- [37] I. M. Shih, T. L. Wang, G. Traverso, K. Romans, S. R. Hamilton, S. Ben-Sasson, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5):2640–2645, February 2001. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.051629398.
- [38] T. Ishidate, A. Matsumine, K. Toyoshima, and T. Akiyama. The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene*, 19(3):365–372, January 2000. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1203309.

- [39] N. S. Fearnhead, M. P. Britton, and W. F. Bodmer. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, 10(7):721–733, April 2001. ISSN 0964-6906.
- [40] Michael J. Hamann, Casey M. Lubking, Doris N. Luchini, and Daniel D. Billadeau. Asef2 functions as a Cdc42 exchange factor and is stimulated by the release of an autoinhibitory module from a concealed C-terminal activation element. *Molecular and Cellular Biology*, 27(4):1380–1393, February 2007. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/MCB.01608-06.
- [41] R. Nusse and H. E. Varmus. Wnt genes. *Cell*, 69(7):1073–1087, June 1992. ISSN 0092-8674.
- [42] K. M. Cadigan and R. Nusse. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Development*, 11(24):3286–3305, December 1997. ISSN 0890-9369.
- [43] Dina Dikovskaya, Guennadi Khoudoli, Ian P. Newton, Gaganmeet S. Chadha, Daniel Klotz, Ashwat Visvanathan, Angus Lamond, Jason R. Swedlow, and Inke S. Näthke. The adenomatous polyposis coli protein contributes to normal compaction of mitotic chromatin. *PloS One*, 7(6):e38102, 2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0038102.
- [44] Heather Beamish, Leonore de Boer, Nichole Giles, Frankie Stevens, Vanessa Oakes, and Brian Gabrielli. Cyclin A/cdk2 regulates adenomatous polyposis coli-dependent mitotic spindle anchoring. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(42):29015–29023, October 2009. ISSN 1083-351X. doi: 10.1074/jbc.M109.042820.
- [45] Alyssa C. Lesko, Kathleen H. Goss, Frank F. Yang, Adam Schwertner, Imge Hurlur, Kenan Onel, and Jenifer R. Prosperi. The APC tumor suppressor is required for epithelial cell polarization and three-dimensional morphogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1853(3):711–723, March 2015. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.036.
- [46] K. W. Kinzler, M. C. Nilbert, L. K. Su, B. Vogelstein, T. M. Bryan, D. B. Levy, K. J. Smith, A. C. Preisinger, P. Hedge, and D. McKechnie. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5020):661–665, August 1991. ISSN 0036-8075.
- [47] Y. Kawasaki, T. Senda, T. Ishidate, R. Koyama, T. Morishita, Y. Iwayama, O. Higuruchi, and T. Akiyama. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5482):1194–1197, August 2000. ISSN 0036-8075.
- [48] J. M. Seeling, J. R. Miller, R. Gil, R. T. Moon, R. White, and D. M. Virshup. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2a. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5410):2089–2091, March 1999. ISSN 0036-8075.

-
- [49] Yasuhisa Sakamoto, Batiste Boëda, and Sandrine Etienne-Manneville. APC binds intermediate filaments and is required for their reorganization during cell migration. *The Journal of Cell Biology*, 200(3):249–258, February 2013. ISSN 1540-8140. doi: 10.1083/jcb.201206010.
- [50] Eva Maria Kohler, Adrian Derungs, Gabriele Daum, Jürgen Behrens, and Jean Schneikert. Functional definition of the mutation cluster region of adenomatous polyposis coli in colorectal tumours. *Human Molecular Genetics*, 17(13):1978–1987, July 2008. ISSN 1460-2083. doi: 10.1093/hmg/ddn095.
- [51] L. K. Su, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science (New York, N. Y.)*, 262(5140):1734–1737, December 1993. ISSN 0036-8075.
- [52] E. M. Kohler, K. Brauburger, J. Behrens, and J. Schneikert. Contribution of the 15 amino acid repeats of truncated APC to beta-catenin degradation and selection of APC mutations in colorectal tumours from FAP patients. *Oncogene*, 29(11):1663–1671, March 2010. ISSN 1476-5594. doi: 10.1038/onc.2009.447.
- [53] Eva Maria Kohler, Shree Harsha Vijaya Chandra, Jürgen Behrens, and Jean Schneikert. Beta-catenin degradation mediated by the CID domain of APC provides a model for the selection of APC mutations in colorectal, desmoid and duodenal tumours. *Human Molecular Genetics*, 18(2):213–226, January 2009. ISSN 1460-2083. doi: 10.1093/hmg/ddn338.
- [54] J. Behrens, B. A. Jerchow, M. Würtele, J. Grimm, C. Asbrand, R. Wirtz, M. Kühl, D. Wedlich, and W. Birchmeier. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science (New York, N. Y.)*, 280(5363):596–599, April 1998. ISSN 0036-8075.
- [55] James B. Moseley, Francesca Bartolini, Kyoko Okada, Ying Wen, Gregg G. Gundersen, and Bruce L. Goode. Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(17):12661–12668, April 2007. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M610615200.
- [56] J. Deka, J. Kuhlmann, and O. Müller. A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein tau. *European journal of biochemistry / FEBS*, 253(3):591–597, May 1998. ISSN 0014-2956.
- [57] Natalia S. Sotelo, Miguel Valiente, Anabel Gil, and Rafael Pulido. A functional network of the tumor suppressors APC, hDlg, and PTEN, that relies on recognition of specific PDZ-domains. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(8):2661–2670, August 2012. ISSN 1097-4644. doi: 10.1002/jcb.24141.

-
- [58] Changgong Li, Saverio Bellusci, Zea Borok, and Parviz Minoo. Non-canonical WNT signalling in the lung. *Journal of Biochemistry*, 158(5):355–365, November 2015. ISSN 1756-2651. doi: 10.1093/jb/mvv081.
- [59] Jennifer L. Stamos and William I. Weis. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1):a007898, January 2013. ISSN 1943-0264. doi: 10.1101/cshperspect.a007898.
- [60] M. Molenaar, M. van de Wetering, M. Oosterwegel, J. Peterson-Maduro, S. Godsave, V. Korinek, J. Roose, O. Destrée, and H. Clevers. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 86(3):391–399, August 1996. ISSN 0092-8674.
- [61] J. Behrens, J. P. von Kries, M. Kühl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, and W. Birchmeier. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592):638–642, August 1996. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/382638a0.
- [62] S. Ikeda, S. Kishida, H. Yamamoto, H. Murai, S. Koyama, and A. Kikuchi. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *The EMBO journal*, 17(5):1371–1384, March 1998. ISSN 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/17.5.1371.
- [63] Barbara Lustig, Boris Jerchow, Martin Sachs, Sigrid Weiler, Torsten Pietsch, Uwe Karsten, Marc van de Wetering, Hans Clevers, Peter M. Schlag, Walter Birchmeier, and Jürgen Behrens. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4):1184–1193, February 2002. ISSN 0270-7306.
- [64] W. Hsu, L. Zeng, and F. Costantini. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2a and a self-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(6):3439–3445, February 1999. ISSN 0021-9258.
- [65] S. Ikeda, M. Kishida, Y. Matsuura, H. Usui, and A. Kikuchi. GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2a complexed with Axin. *Oncogene*, 19(4):537–545, January 2000. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1203359.
- [66] Yi Xing, Wilson K. Clements, David Kimelman, and Wenqing Xu. Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes & Development*, 17(22):2753–2764, November 2003. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.1142603.

-
- [67] Rebecca A. Green, Roy Wollman, and Kenneth B. Kaplan. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10):4609–4622, October 2005. ISSN 1059-1524. doi: 10.1091/mbc.E05-03-0259.
- [68] Yoshihiro Kawasaki, Rina Sato, and Tetsu Akiyama. Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nature Cell Biology*, 5(3):211–215, March 2003. ISSN 1465-7392. doi: 10.1038/ncb937.
- [69] A. J. Ridley, W. E. Allen, M. Peppelenbosch, and G. E. Jones. Rho family proteins and cell migration. *Biochemical Society Symposium*, 65:111–123, 1999. ISSN 0067-8694.
- [70] Matthew A. Odenwald, Jenifer R. Prosperi, and Kathleen H. Goss. APC/ β -catenin-rich complexes at membrane protrusions regulate mammary tumor cell migration and mesenchymal morphology. *BMC cancer*, 13:12, 2013. ISSN 1471-2407. doi: 10.1186/1471-2407-13-12.
- [71] Salil P. Desai, Sangeeta N. Bhatia, Mehmet Toner, and Daniel Irimia. Mitochondrial localization and the persistent migration of epithelial cancer cells. *Biophysical Journal*, 104(9):2077–2088, May 2013. ISSN 1542-0086. doi: 10.1016/j.bpj.2013.03.025.
- [72] Kate M. Mills, Mariana G. Brocardo, and Beric R. Henderson. APC binds the Miro/Milton motor complex to stimulate transport of mitochondria to the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*, 27(3):466–482, February 2016. ISSN 1939-4586. doi: 10.1091/mbc.E15-09-0632.
- [73] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407):330–337, July 2012. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature11252.
- [74] Robert A. Weinberg. *Biology of Cancer*. 2007.
- [75] Michael Crabtree, Oliver M. Sieber, Lara Lipton, Shirley V. Hodgson, Hanan Lam-lum, Hunu J. W. Thomas, Kay Neale, Robin K. S. Phillips, Karl Heinimann, and Ian P. M. Tomlinson. Refining the relation between ‘first hits’ and ‘second hits’ at the APC locus: the ‘loose fit’ model and evidence for differences in somatic mutation spectra among patients. *Oncogene*, 22(27):4257–4265, July 2003. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1206471.
- [76] Jean Schneikert and Jürgen Behrens. Truncated APC is required for cell proliferation and DNA replication. *International Journal of Cancer*, 119(1):74–79, July 2006. ISSN 0020-7136. doi: 10.1002/ijc.21826.

-
- [77] R. Smits, M. F. Kielman, C. Breukel, C. Zurcher, K. Neufeld, S. Jagmohan-Changur, N. Hofland, J. van Dijk, R. White, W. Edelmann, R. Kucherlapati, P. M. Khan, and R. Fodde. Apc1638t: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes & Development*, 13(10):1309–1321, May 1999. ISSN 0890-9369.
- [78] Shree Harsha Vijaya Chandra, Ingrid Wacker, Uwe Kurt Appelt, Jürgen Behrens, and Jean Schneikert. A common role for various human truncated adenomatous polyposis coli isoforms in the control of beta-catenin activity and cell proliferation. *PLoS One*, 7(4):e34479, 2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0034479.
- [79] S. Munemitsu, I. Albert, B. Rubinfeld, and P. Polakis. Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Molecular and Cellular Biology*, 16(8):4088–4094, August 1996. ISSN 0270-7306.
- [80] R. Fodde, J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J. H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R. H. Giles, and H. Clevers. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature Cell Biology*, 3(4):433–438, April 2001. ISSN 1465-7392. doi: 10.1038/35070129.
- [81] Rebecca A. Green and Kenneth B. Kaplan. Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *The Journal of Cell Biology*, 163(5):949–961, December 2003. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.200307070.
- [82] Scott A. Nelson, Zhouyu Li, Ian P. Newton, David Fraser, Rachel E. Milne, David M. A. Martin, David Schiffmann, Xuesong Yang, Dirk Dormann, Cornelis J. Weijer, Paul L. Appleton, and Inke S. Näthke. Tumorigenic fragments of APC cause dominant defects in directional cell migration in multiple model systems. *Disease Models & Mechanisms*, 5(6):940–947, November 2012. ISSN 1754-8411. doi: 10.1242/dmm.008607.
- [83] L. M. Boxer and C. V. Dang. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene*, 20(40):5595–5610, September 2001. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1204595.
- [84] T. Boehm, R. Baer, I. Lavenir, A. Forster, J. J. Waters, E. Nacheva, and T. H. Rabbitts. The mechanism of chromosomal translocation t(11;14) involving the T-cell receptor C delta locus on human chromosome 14q11 and a transcribed region of chromosome 11p15. *The EMBO journal*, 7(2):385–394, February 1988. ISSN 0261-4189.

-
- [85] Owen J. Sansom, Valerie S. Meniel, Vanesa Muncan, Toby J. Phesse, Julie A. Wilkins, Karen R. Reed, J. Keith Vass, Dimitris Athineos, Hans Clevers, and Alan R. Clarke. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature*, 446(7136):676–679, April 2007. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature05674.
- [86] Sovana Adhikary and Martin Eilers. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(8):635–645, August 2005. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm1703.
- [87] Harith Rajagopalan, Prasad V. Jallepalli, Carlo Rago, Victor E. Velculescu, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein, and Christoph Lengauer. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature*, 428(6978):77–81, March 2004. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature02313.
- [88] Markus E. Diefenbacher, Nikita Popov, Sophia M. Blake, Christina Schüle-Völk, Emma Nye, Bradley Spencer-Dene, Laura A. Jaenicke, Martin Eilers, and Axel Behrens. The deubiquitinase USP28 controls intestinal homeostasis and promotes colorectal cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(8):3407–3418, August 2014. ISSN 1558-8238. doi: 10.1172/JCI73733.
- [89] Zuqin Nie, Gangqing Hu, Gang Wei, Kairong Cui, Arito Yamane, Wolfgang Resch, Ruoning Wang, Douglas R. Green, Lino Tessarollo, Rafael Casellas, Keji Zhao, and David Levens. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*, 151(1):68–79, September 2012. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.033.
- [90] Susanne Walz, Francesca Lorenzin, Jennifer Morton, Katrin E. Wiese, Björn von Eyss, Steffi Herold, Lukas Rycak, H el ene Dumay-Odelot, Saadia Karim, Marek Bartkuhn, Frederik Roels, Torsten W ustefeld, Matthias Fischer, Martin Teichmann, Lars Zender, Chia-Lin Wei, Owen Sansom, Elmar Wolf, and Martin Eilers. Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, 511(7510):483–487, July 2014. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature13473.
- [91] Elmar Wolf, Charles Y. Lin, Martin Eilers, and David L. Levens. Taming of the beast: shaping Myc-dependent amplification. *Trends in Cell Biology*, 25(4):241–248, April 2015. ISSN 1879-3088. doi: 10.1016/j.tcb.2014.10.006.
- [92] Laura Soucek, Jonathan R. Whitfield, Nicole M. Sodik, Daniel Mass o-Vall es, Erika Serrano, Anthony N. Karnezis, Lamorna Brown Swigart, and Gerard I. Evan. Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. *Genes & Development*, 27(5):504–513, March 2013. ISSN 1549-5477. doi: 10.1101/gad.205542.112.

-
- [93] Laura Soucek, Richard Jucker, Laura Panacchia, Ruggero Ricordy, Franco Tatò, and Sergio Nasi. Omomyc, a potential Myc dominant negative, enhances Myc-induced apoptosis. *Cancer Research*, 62(12):3507–3510, June 2002. ISSN 0008-5472.
- [94] Laura Soucek and Gerard I. Evan. The ups and downs of Myc biology. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(1):91–95, February 2010. ISSN 1879-0380. doi: 10.1016/j.gde.2009.11.001.
- [95] Thorsten Berg, Steven B. Cohen, Joel Desharnais, Corinna Sonderegger, Daniel J. Maslyar, Joel Goldberg, Dale L. Boger, and Peter K. Vogt. Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6):3830–3835, March 2002. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.062036999.
- [96] Hanna Zirath, Anna Frenzel, Ganna Oliynyk, Lova Segerström, Ulrica K. Westermarck, Karin Larsson, Matilda Munksgaard Persson, Kjell Hultenby, Janne Lehtiö, Christer Einvik, Sven Pählman, Per Kogner, Per-Johan Jakobsson, and Marie Arsenian Henriksson. MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(25):10258–10263, June 2013. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1222404110.
- [97] Panagis Filippakopoulos, Jun Qi, Sarah Picaud, Yao Shen, William B. Smith, Oleg Fedorov, Elizabeth M. Morse, Tracey Keates, Tyler T. Hickman, Ildiko Felletar, Martin Philpott, Shonagh Munro, Michael R. McKeown, Yuchuan Wang, Amanda L. Christie, Nathan West, Michael J. Cameron, Brian Schwartz, Tom D. Heightman, Nicholas La Thangue, Christopher A. French, Olaf Wiest, Andrew L. Kung, Stefan Knapp, and James E. Bradner. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468(7327):1067–1073, December 2010. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature09504.
- [98] Jake E. Delmore, Ghayas C. Issa, Madeleine E. Lemieux, Peter B. Rahl, Junwei Shi, Hannah M. Jacobs, Efsthios Kastiris, Timothy Gilpatrick, Ronald M. Paranal, Jun Qi, Marta Chesi, Anna C. Schinzel, Michael R. McKeown, Timothy P. Hefferman, Christopher R. Vakoc, P. Leif Bergsagel, Irene M. Ghobrial, Paul G. Richardson, Richard A. Young, William C. Hahn, Kenneth C. Anderson, Andrew L. Kung, James E. Bradner, and Constantine S. Mitsiades. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*, 146(6):904–917, September 2011. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.017.
- [99] Markus Brockmann, Evon Poon, Teeara Berry, Anne Carstensen, Hedwig E. Deubzer, Lukas Rycak, Yann Jamin, Khin Thway, Simon P. Robinson, Frederik Roels, Olaf

- Witt, Matthias Fischer, Louis Chesler, and Martin Eilers. Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma. *Cancer Cell*, 24(1):75–89, July 2013. ISSN 1878-3686. doi: 10.1016/j.ccr.2013.05.005.
- [100] Tobias Otto, Sebastian Horn, Markus Brockmann, Ursula Eilers, Lars Schüttrumpf, Nikita Popov, Anna Marie Kenney, Johannes H. Schulte, Roderick Beijersbergen, Holger Christiansen, Bernd Berwanger, and Martin Eilers. Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell*, 15(1):67–78, January 2009. ISSN 1878-3686. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.005.
- [101] Stefanie Peter, Jennyfer Bultinck, Kevin Myant, Laura A. Jaenicke, Susanne Walz, Judith Müller, Michael Gmachl, Matthias Treu, Guido Boehmelt, Carsten P. Ade, Werner Schmitz, Armin Wiegering, Christoph Otto, Nikita Popov, Owen Sansom, Norbert Kraut, and Martin Eilers. Tumor cell-specific inhibition of MYC function using small molecule inhibitors of the HUWE1 ubiquitin ligase. *EMBO molecular medicine*, 6(12):1525–1541, December 2014. ISSN 1757-4684. doi: 10.15252/emmm.201403927.
- [102] A. C. Gingras, B. Raught, and N. Sonenberg. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Review of Biochemistry*, 68:913–963, 1999. ISSN 0066-4154. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.913.
- [103] Greco Hernández and Paula Vazquez-Pianzola. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mechanisms of Development*, 122(7-8):865–876, July 2005. ISSN 0925-4773. doi: 10.1016/j.mod.2005.04.002.
- [104] Martin D. Jennings and Graham D. Pavitt. A new function and complexity for protein translation initiation factor eIF2b. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(17):2660–2665, 2014. ISSN 1551-4005. doi: 10.4161/15384101.2014.948797.
- [105] H. P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, and D. Ron. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6(5):1099–1108, November 2000. ISSN 1097-2765.
- [106] Carmela Sidrauski, Anna M. McGeachy, Nicholas T. Ingolia, and Peter Walter. The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2 α phosphorylation on translation and stress granule assembly. *eLife*, 4, 2015. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.05033.
- [107] Shea J. Andrews and Joseph A. Rothnagel. Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nature Reviews. Genetics*, 15(3):193–204, March 2014. ISSN 1471-0064. doi: 10.1038/nrg3520.

-
- [108] R. J. Jackson. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 6):1231–1241, December 2005. ISSN 0300-5127. doi: 10.1042/BST20051231.
- [109] Armin Wiegering, Friedrich W. Uthe, Thomas Jamieson, Yvonne Ruoss, Melanie Hüttenrauch, Maritta Küspert, Christina Pfann, Colin Nixon, Steffi Herold, Susanne Walz, Lyudmyla Taranets, Christoph-Thomas Germer, Andreas Rosenwald, Owen J. Sansom, and Martin Eilers. Targeting Translation Initiation Bypasses Signaling Crosstalk Mechanisms That Maintain High MYC Levels in Colorectal Cancer. *Cancer Discovery*, 5(7):768–781, July 2015. ISSN 2159-8290. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1040.
- [110] Constanze Kaiser, Elena Y. Dobrikova, Shelton S. Bradrick, Mayya Shveygert, James T. Herbert, and Matthias Gromeier. Activation of cap-independent translation by variant eukaryotic initiation factor 4g in vivo. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(10):2170–2182, October 2008. ISSN 1469-9001. doi: 10.1261/rna.1171808.
- [111] Sebastian M. B. Nijman. Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS letters*, 585(1):1–6, January 2011. ISSN 1873-3468. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.024.
- [112] Bridges Calvin. *The origin of variation*. 1922.
- [113] T. Dobzhansky. Genetics of Natural Populations. Xiii. Recombination and Variability in Populations of *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics*, 31(3):269–290, May 1946. ISSN 0016-6731.
- [114] Lidan Liu, Jannes Ulbrich, Judith Müller, Torsten Wüstefeld, Lukas Aeberhard, Theresia R. Kress, Nathiya Muthalagu, Lukas Rycak, Ramona Rudalska, Roland Moll, Stefan Kempa, Lars Zender, Martin Eilers, and Daniel J. Murphy. Deregulated MYC expression induces dependence upon AMPK-related kinase 5. *Nature*, 483(7391):608–612, March 2012. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature10927.
- [115] Joseph Rosenbluh, Deepak Nijhawan, Andrew G. Cox, Xingnan Li, James T. Neal, Eric J. Schafer, Travis I. Zack, Xiaoxing Wang, Aviad Tsherniak, Anna C. Schinzel, Diane D. Shao, Steven E. Schumacher, Barbara A. Weir, Francisca Vazquez, Glenn S. Cowley, David E. Root, Jill P. Mesirov, Rameen Beroukhim, Calvin J. Kuo, Wolfram Goessling, and William C. Hahn. β -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*, 151(7):1457–1473, December 2012. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.026.
- [116] Claudia Scholl, Stefan Fröhling, Ian F. Dunn, Anna C. Schinzel, David A. Barbie, So Young Kim, Serena J. Silver, Pablo Tamayo, Raymond C. Wadlow, Sridhar Ramaswamy, Konstanze Döhner, Lars Bullinger, Peter Sandy, Jesse S. Boehm,

- David E. Root, Tyler Jacks, William C. Hahn, and D. Gary Gilliland. Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell*, 137(5):821–834, May 2009. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.017.
- [117] Roderick L. Beijersbergen, Lodewyk F.A. Wessels, and René Bernards. Synthetic Lethality in Cancer Therapeutics. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1):141–161, March 2017. ISSN 2472-3428. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-042016-073434. URL <http://www.annualreviews.org/doi/citedby/10.1146/annurev-cancerbio-042016-073434>.
- [118] Axel Hauschild, Jean-Jacques Grob, Lev V. Demidov, Thomas Jouary, Ralf Gutzmer, Michael Millward, Piotr Rutkowski, Christian U. Blank, Wilson H. Miller, Eckhart Kaempgen, Salvador Martín-Algarra, Bogusława Karaszewska, Cornelia Mauch, Vanna Chiarion-Sileni, Anne-Marie Martin, Suzanne Swann, Patricia Haney, Beloo Mirakhur, Mary E. Guckert, Vicki Goodman, and Paul B. Chapman. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 380(9839):358–365, July 2012. ISSN 1474-547X. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X.
- [119] Scott Kopetz, Jayesh Desai, Emily Chan, Joel Randolph Hecht, Peter J. O’Dwyer, Dipen Maru, Van Morris, Filip Janku, Arvind Dasari, Woonbook Chung, Jean-Pierre J. Issa, Peter Gibbs, Brian James, Garth Powis, Keith B. Nolop, Suman Bhattacharya, and Leonard Saltz. Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(34):4032–4038, December 2015. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/JCO.2015.63.2497.
- [120] Anirudh Prahallad, Chong Sun, Sidong Huang, Federica Di Nicolantonio, Ramon Salazar, Davide Zecchin, Roderick L. Beijersbergen, Alberto Bardelli, and René Bernards. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600e) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*, 483(7387):100–103, January 2012. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature10868.
- [121] Robin Van Geel, Elena Elez, Johanna C. Bendell, Jason Edward Faris, Martijn P. J. K. Lolkema, Ferry Eskens, Anna Spreafico, Petr Kavan, Jean-Pierre Delord, Martin H. Schuler, Zev A. Wainberg, Yasuhide Yamada, Takayuki Yoshino, Tim Demuth, Emin Avsar, Arkendu Chatterjee, Peijuan Zhu, Rene Bernards, Josep Tabernero, and Jan HM Schellens. Phase I study of the selective BRAFV600 inhibitor encorafenib (LGX818) combined with cetuximab and with or without the α -specific PI3k inhibitor BYL719 in patients with advanced BRAF-mutant colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 32(15_suppl):3514–3514, May 2014. ISSN 0732-183X.

- doi: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.3514. URL http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.3514.
- [122] Maree C. Faux, Janine L. Ross, Clare Meeker, Terry Johns, Hong Ji, Richard J. Simpson, Meredith J. Layton, and Antony W. Burgess. Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (APC) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 3):427–439, January 2004. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.00862.
- [123] Owen J. Sansom, Karen R. Reed, Anthony J. Hayes, Heather Ireland, Hannah Brinkmann, Ian P. Newton, Eduard Batlle, Patricia Simon-Assmann, Hans Clevers, Inke S. Nathke, Alan R. Clarke, and Douglas J. Winton. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes & Development*, 18(12):1385–1390, June 2004. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.287404.
- [124] Tea Fevr, Sylvie Robine, Daniel Louvard, and Joerg Huelsken. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21):7551–7559, November 2007. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/MCB.01034-07.
- [125] Duonan Yu, Diana Cozma, Andrea Park, and Andrei Thomas-Tikhonenko. Functional validation of genes implicated in lymphomagenesis: an in vivo selection assay using a Myc-induced B-cell tumor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1059:145–159, November 2005. ISSN 0077-8923. doi: 10.1196/annals.1339.047.
- [126] Jennifer Willert, Mirjam Epping, Jonathan R. Pollack, Patrick O. Brown, and Roel Nusse. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC developmental biology*, 2:8, July 2002. ISSN 1471-213X.
- [127] M. Schuhmacher, F. Kohlhuber, M. Hölzel, C. Kaiser, H. Burtscher, M. Jarsch, G. W. Bornkamm, G. Laux, A. Polack, U. H. Weidle, and D. Eick. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Research*, 29(2):397–406, January 2001. ISSN 1362-4962.
- [128] Duško Ilić, Eduardo A.C. Almeida, David D. Schlaepfer, Paul Dazin, Shinichi Aizawa, and Caroline H. Damsky. Extracellular Matrix Survival Signals Transduced by Focal Adhesion Kinase Suppress p53-mediated Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 143(2):547–560, October 1998. ISSN 0021-9525. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2132850/>.
- [129] Daniel J. Carson, Irma M. Santoro, and Joanna Groden. Isoforms of the APC tumor suppressor and their ability to inhibit cell growth and tumorigenicity. *Oncogene*, 23(42):7144–7148, September 2004. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1207954.

-
- [130] Joseph Rosenbluh, Deepak Nijhawan, Andrew G. Cox, Xingnan Li, James T. Neal, Eric J. Schafer, Travis I. Zack, Xiaoxing Wang, Aviad Tsherniak, Anna C. Schinzel, Diane D. Shao, Steven E. Schumacher, Barbara A. Weir, Francisca Vazquez, Glenn S. Cowley, David E. Root, Jill P. Mesirov, Rameen Beroukhi, Calvin J. Kuo, Wolfram Goessling, and William C. Hahn. β -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*, 151(7):1457–1473, December 2012. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.026.
- [131] Marika Haderer. Synthetic lethal interactions with the tumorsuppressor APC in colorectal cancer. 2015.
- [132] Serge N. Manié, Justine Lebeau, and Eric Chevet. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 307(10):C901–907, November 2014. ISSN 1522-1563. doi: 10.1152/ajpcell.00292.2014.
- [133] Yoav Benjamini. Simultaneous and selective inference: Current successes and future challenges. *Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift*, 52(6):708–721, December 2010. ISSN 1521-4036. doi: 10.1002/bimj.200900299.
- [134] M. Gossen, S. Freundlieb, G. Bender, G. Müller, W. Hillen, and H. Bujard. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5218):1766–1769, June 1995. ISSN 0036-8075.
- [135] Jordi Camps, Immaculada Ponsa, Maria Ribas, Esther Prat, Josep Egozcue, Miguel A. Peinado, and Rosa Miró. Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(7):828–830, May 2005. ISSN 1530-6860. doi: 10.1096/fj.04-2276fje.
- [136] Andrius K. Planutis, Randall F. Holcombe, Marina V. Planoutene, and Klastotis S. Planoutis. SW480 colorectal cancer cells that naturally express Lgr5 are more sensitive to the most common chemotherapeutic agents than Lgr5-negative SW480 cells. *Anti-Cancer Drugs*, 26(9):942–947, October 2015. ISSN 1473-5741. doi: 10.1097/CAD.0000000000000270.
- [137] Daniela Hirsch, Nick Barker, Nicole McNeil, Yue Hu, Jordi Camps, Katherine McKinnon, Hans Clevers, Thomas Ried, and Timo Gaiser. LGR5 positivity defines stem-like cells in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 35(4):849–858, April 2014. ISSN 1460-2180. doi: 10.1093/carcin/bgt377.

-
- [138] Shinta Kobayashi, Hisafumi Yamada-Okabe, Masami Suzuki, Osamu Natori, Atsuhiko Kato, Koichi Matsubara, Yu Jau Chen, Masaki Yamazaki, Shinichi Funahashi, Kenji Yoshida, Eri Hashimoto, Yoshinori Watanabe, Hironori Mutoh, Motooki Ashihara, Chie Kato, Takeshi Watanabe, Takashi Yoshikubo, Norikazu Tamaoki, Takahiro Ochiya, Masahiko Kuroda, Arnold J. Levine, and Tatsumi Yamazaki. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(12):2631–2644, December 2012. ISSN 1549-4918. doi: 10.1002/stem.1257.
- [139] Jianghong Wang, Anthony A. Fernald, John Anastasi, Michelle M. Le Beau, and Zhijian Qian. Haploinsufficiency of Apc leads to ineffective hematopoiesis. *Blood*, 115(17):3481–3488, April 2010. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2009-11-251835.
- [140] F. T. Kolligs, B. Kolligs, K. M. Hajra, G. Hu, M. Tani, K. R. Cho, and E. R. Fearon. gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes & Development*, 14(11):1319–1331, June 2000. ISSN 0890-9369.
- [141] Ted Lau, Emily Chan, Marinella Callow, Jo Waaler, Jason Boggs, Robert A. Blake, Steven Magnuson, Amy Sambrone, Melissa Schutten, Ron Firestein, Ondrej Machon, Vladimir Korinek, Edna Choo, Dolores Diaz, Mark Merchant, Paul Polakis, Daniel D. Holsworth, Stefan Krauss, and Mike Costa. A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. *Cancer Research*, 73(10):3132–3144, May 2013. ISSN 1538-7445. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4562.
- [142] Xue-Hai Liang, Christopher E. Hart, and Stanley T. Crooke. Transfection of siRNAs can alter miRNA levels and trigger non-specific protein degradation in mammalian cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1829(5):455–468, May 2013. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.01.011.
- [143] Cheng Du, Baosheng Ge, Zhongfeng Liu, Kai Fu, Wing C. Chan, and Timothy W. McKeithan. PCR-based generation of shRNA libraries from cDNAs. *BMC biotechnology*, 6:28, June 2006. ISSN 1472-6750. doi: 10.1186/1472-6750-6-28.
- [144] Renata Pankiewicz, Yann Karlen, Markus O. Imhof, and Nicolas Mermoud. Reversal of the silencing of tetracycline-controlled genes requires the coordinate action of distinctly acting transcription factors. *The Journal of Gene Medicine*, 7(1):117–132, January 2005. ISSN 1099-498X. doi: 10.1002/jgm.644.
- [145] Tingan Chen, Ivana Yang, Rosalyn Irby, Kenneth H. Shain, Hong Gang Wang, John Quackenbush, Domenico Coppola, Jin Q. Cheng, and Timothy J. Yeatman. Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Research*, 63(15):4368–4374, August 2003. ISSN 0008-5472.

-
- [146] Hassina Benchabane and Yashi Ahmed. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 656:75–84, 2009. ISSN 0065-2598.
- [147] Jonghwan Kim, Jianlin Chu, Xiaohua Shen, Jianlong Wang, and Stuart H. Orkin. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*, 132(6):1049–1061, March 2008. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.039.
- [148] Xiaosong Liu, Jinyan Huang, Taotao Chen, Ying Wang, Shunmei Xin, Jian Li, Gang Pei, and Jiuhong Kang. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Research*, 18(12):1177–1189, December 2008. ISSN 1748-7838. doi: 10.1038/cr.2008.309.
- [149] Volkhard Seitz, Peter Butzhammer, Burkhard Hirsch, Jochen Hecht, Ines Gütgemann, Anke Ehlers, Dido Lenze, Elisabeth Oker, Anke Sommerfeld, Edda von der Wall, Christoph König, Christian Zinser, Rainer Spang, and Michael Hummel. Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PloS One*, 6(11):e26837, 2011. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0026837.
- [150] William J. Faller, Thomas J. Jackson, John R. P. Knight, Rachel A. Ridgway, Thomas Jamieson, Saadia A. Karim, Carolyn Jones, Sorina Radulescu, David J. Huels, Kevin B. Myant, Kate M. Dudek, Helen A. Casey, Alessandro Scopelliti, Julia B. Cordero, Marcos Vidal, Mario Pende, Alexey G. Ryazanov, Nahum Sonenberg, Oded Meyuhas, Michael N. Hall, Martin Bushell, Anne E. Willis, and Owen J. Sansom. mTORC1-mediated translational elongation limits intestinal tumour initiation and growth. *Nature*, 517(7535):497–500, January 2015. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature13896.
- [151] Miao Wang and Randal J. Kaufman. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529(7586):326–335, January 2016. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature17041.
- [152] Carmela Sidrauski, Jordan C. Tsai, Martin Kampmann, Brian R. Hearn, Punitha Vedantham, Priyadarshini Jaishankar, Masaaki Sokabe, Aaron S. Mendez, Billy W. Newton, Edward L. Tang, Erik Verschueren, Jeffrey R. Johnson, Nevan J. Krogan, Christopher S. Fraser, Jonathan S. Weissman, Adam R. Renslo, and Peter Walter. Pharmacological dimerization and activation of the exchange factor eIF2b antagonizes the integrated stress response. *eLife*, 4:e07314, April 2015. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.07314.
- [153] Liraz Kantor, Dalia Pinchasi, Michelle Mintz, Yetrib Hathout, Adeline Vanderver, and Orna Elroy-Stein. A point mutation in translation initiation factor 2b leads to

- a continuous hyper stress state in oligodendroglial-derived cells. *PLoS One*, 3(11): e3783, 2008. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0003783.
- [154] Scot R. Kimball, Rick L. Horetsky, David Ron, Leonard S. Jefferson, and Heather P. Harding. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284(2):C273–284, February 2003. ISSN 0363-6143. doi: 10.1152/ajpcell.00314.2002.
- [155] Han-Jung Chae, Hyung-Ryong Kim, Chunyan Xu, Beatrice Bailly-Maitre, Maryla Krajewska, Stan Krajewski, Steven Banares, Janice Cui, Murat Digicaylioglu, Ning Ke, Shinichi Kitada, Edward Monosov, Michael Thomas, Christina L. Kress, Jeremy R. Babendure, Roger Y. Tsien, Stuart A. Lipton, and John C. Reed. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Cell*, 15(3):355–366, August 2004. ISSN 1097-2765. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.038.
- [156] K. Olden, R. M. Pratt, and K. M. Yamada. Role of carbohydrates in protein secretion and turnover: effects of tunicamycin on the major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts. *Cell*, 13(3):461–473, March 1978. ISSN 0092-8674.
- [157] Chunyan Xu, Beatrice Bailly-Maitre, and John C. Reed. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10): 2656–2664, October 2005. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI26373.
- [158] A. Heifetz, R. W. Keenan, and A. D. Elbein. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry*, 18(11):2186–2192, May 1979. ISSN 0006-2960.
- [159] Aaron S. Mendez, Jennifer Alfaro, Marisol A. Morales-Soto, Arvin C. Dar, Emma McCullagh, Katja Gotthardt, Han Li, Diego Acosta-Alvear, Carmela Sidrauski, Alexei V. Korennykh, Sebastian Bernales, Kevan M. Shokat, and Peter Walter. Endoplasmic reticulum stress-independent activation of unfolded protein response kinases by a small molecule ATP-mimic. *eLife*, 4, May 2015. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.05434.
- [160] Xiaobo Zhang, Seong-Ho Lee, Kyung-Won Min, Michael F. McEntee, Jin Boo Jeong, Qingwang Li, and Seung Joon Baek. The involvement of endoplasmic reticulum stress in the suppression of colorectal tumorigenesis by tolfenamic acid. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 6(12):1337–1347, December 2013. ISSN 1940-6215. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0220.
- [161] Qin He, Dong Ik Lee, Rong Rong, Myounghee Yu, Xiuquan Luo, Michael Klein, Wafik S. El-Deiry, Ying Huang, Arif Hussain, and M. Saeed Sheikh. Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the

- death receptor 5 pathway. *Oncogene*, 21(17):2623–2633, April 2002. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1205345.
- [162] Julio Cesar Madureira de Freitas-Junior, Lilian Golçalves Bastos, Carlos Alberto Freire-Neto, Bárbara Du Rocher, Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay, and José Andrés Morgado-Díaz. N-glycan biosynthesis inhibitors induce in vitro anti-cancer activity in colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(9): 2957–2966, September 2012. ISSN 1097-4644. doi: 10.1002/jcb.24173.
- [163] Suvasini Sharma, Mohemmed Ajij, Varinder Singh, and Satinder Aneja. Vanishing white matter disease with mutations in EIF2b5 gene. *Indian Journal of Pediatrics*, 82(1):93–95, January 2015. ISSN 0973-7693. doi: 10.1007/s12098-014-1583-4.
- [164] H.-N. Lee, S.-H. Koh, K.-Y. Lee, C.-S. Ki, and Y. J. Lee. Late-onset vanishing white matter disease with compound heterozygous EIF2b5 gene mutations. *European Journal of Neurology*, 16(3):e42–43, March 2009. ISSN 1468-1331. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02395.x.
- [165] April L. Woody, David T. Hsieh, Harkirtin K. McIver, Linda P. Thomas, and Luis Rohena. Infantile onset Vanishing White Matter disease associated with a novel EIF2b5 variant, remarkably long life span, severe epilepsy, and hypopituitarism. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 167A(4):826–830, April 2015. ISSN 1552-4833. doi: 10.1002/ajmg.a.36961.
- [166] Wei Li, Xuemin Wang, Marjo S. Van Der Knaap, and Christopher G. Proud. Mutations linked to leukoencephalopathy with vanishing white matter impair the function of the eukaryotic initiation factor 2b complex in diverse ways. *Molecular and Cellular Biology*, 24(8):3295–3306, April 2004. ISSN 0270-7306.
- [167] Anne Fogli, Kondi Wong, Eleonore Eymard-Pierre, Jack Wenger, John-Paul Bouffard, Ehud Goldin, Deborah N. Black, Odile Boespflug-Tanguy, and Raphael Schiffmann. Cree leukoencephalopathy and CACH/VWM disease are allelic at the EIF2b5 locus. *Annals of Neurology*, 52(4):506–510, October 2002. ISSN 0364-5134. doi: 10.1002/ana.10339.
- [168] Laetitia Horzinski, Aurélia Huyghe, Marie-Céleste Cardoso, Céline Gonthier, Lemlih Ouchchane, Raphael Schiffmann, Pierre Blanc, Odile Boespflug-Tanguy, and Anne Fogli. Eukaryotic initiation factor 2b (eIF2b) GEF activity as a diagnostic tool for EIF2b-related disorders. *PloS One*, 4(12):e8318, December 2009. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0008318.
- [169] Yuliya Gordiyenko, Carla Schmidt, Martin D. Jennings, Dijana Matak-Vinkovic, Graham D. Pavitt, and Carol V. Robinson. eIF2b is a decameric guanine nucleotide

- exchange factor with a gamma2epsilon2 tetrameric core. *Nature Communications*, 5: 3902, May 2014. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/ncomms4902.
- [170] Yuval Cabilly, Mali Barbi, Michal Geva, Liraz Marom, David Chetrit, Marcelo Ehrlich, and Orna Elroy-Stein. Poor cerebral inflammatory response in eIF2b knock-in mice: implications for the aetiology of vanishing white matter disease. *PloS One*, 7(10):e46715, 2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0046715.
- [171] William C. Skarnes, Barry Rosen, Anthony P. West, Manousos Koutsourakis, Wendy Bushell, Vivek Iyer, Alejandro O. Mujica, Mark Thomas, Jennifer Harrow, Tony Cox, David Jackson, Jessica Severin, Patrick Biggs, Jun Fu, Michael Nefedov, Pieter J. de Jong, A. Francis Stewart, and Allan Bradley. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*, 474(7351):337–342, June 2011. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature10163.
- [172] C. G. Proud. The eukaryotic initiation factor 4e-binding proteins and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 12(6):541–546, June 2005. ISSN 1350-9047. doi: 10.1038/sj.cdd.4401588.
- [173] Keith A. Spriggs, Laura C. Cobbold, Catherine L. Jopling, Rebecca E. Cooper, Lindsay A. Wilson, Mark Stoneley, Mark J. Coldwell, Didier Poncet, Ya-Ching Shen, Simon J. Morley, Martin Bushell, and Anne E. Willis. Canonical initiation factor requirements of the Myc family of internal ribosome entry segments. *Molecular and Cellular Biology*, 29(6):1565–1574, March 2009. ISSN 1098-5549. doi: 10.1128/MCB.01283-08.
- [174] Marie-Cecile Didiot, Jeffrey Hewett, Thibault Varin, Felix Freuler, Douglas Selinger, Hanspeter Nick, Juergen Reinhardt, Alan Buckler, Vic Myer, Ansgar Schuffenhauer, Chantale T. Guy, and Christian N. Parker. Identification of cardiac glycoside molecules as inhibitors of c-Myc IRES-mediated translation. *Journal of Biomolecular Screening*, 18(4):407–419, April 2013. ISSN 1552-454X. doi: 10.1177/1087057112466698.
- [175] Giridhar Mudduluru, Fabian Medved, Rainer Grobholz, Camela Jost, Anette Gruber, Joerg H. Leupold, Stefan Post, Aaron Jansen, Nancy H. Colburn, and Heike Allgayer. Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer*, 110(8):1697–1707, October 2007. ISSN 0008-543X. doi: 10.1002/cncr.22983.
- [176] Amy S. Farrell and Rosalie C. Sears. MYC degradation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(3), March 2014. ISSN 2157-1422. doi: 10.1101/cshperspect.a014365.

-
- [177] D. A. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B. A. Hemmings. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378 (6559):785–789, December 1995. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/378785a0.
- [178] A. A. Dar, A. Belkhiri, and W. El-Rifai. The aurora kinase A regulates GSK-3beta in gastric cancer cells. *Oncogene*, 28(6):866–875, February 2009. ISSN 1476-5594. doi: 10.1038/onc.2008.434.
- [179] V. Stambolic and J. R. Woodgett. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *The Biochemical Journal*, 303 (Pt 3):701–704, November 1994. ISSN 0264-6021.
- [180] Sarat Chandarlapaty, Ayana Sawai, Maurizio Scaltriti, Vanessa Rodrik-Outmezguine, Olivera Grbovic-Huezo, Violeta Serra, Pradip K. Majumder, Jose Baselga, and Neal Rosen. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*, 19(1):58–71, January 2011. ISSN 1878-3686. doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.031.
- [181] Oscar Puig, Michael T. Marr, M. Laure Ruhf, and Robert Tjian. Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development*, 17(16):2006–2020, August 2003. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.1098703.
- [182] Maria Barna, Aya Pusic, Ornella Zollo, Maria Costa, Nadya Kondrashov, Eduardo Rego, Pulivarthi H. Rao, and Davide Ruggero. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature*, 456(7224):971–975, December 2008. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature07449.
- [183] N. Valerio Dorrello, Angelo Peschiaroli, Daniele Guardavaccaro, Nancy H. Colburn, Nicholas E. Sherman, and Michele Pagano. S6k1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science (New York, N. Y.)*, 314(5798):467–471, October 2006. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1130276.
- [184] Xiaojun Ma and John Blenis. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(5):307–318, May 2009. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/nrm2672.
- [185] Michael Pourdehnad, Morgan L. Truitt, Imran N. Siddiqi, Gregory S. Ducker, Kevan M. Shokat, and Davide Ruggero. Myc and mTOR converge on a common node in protein synthesis control that confers synthetic lethality in Myc-driven cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29):11988–11993, July 2013. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1310230110.

-
- [186] Andrew L. Wolfe, Kamini Singh, Yi Zhong, Philipp Drewe, Vinagolu K. Rajasekhar, Viraj R. Sanghvi, Konstantinos J. Mavrakis, Man Jiang, Justine E. Roderick, Joni Van der Meulen, Jonathan H. Schatz, Christina M. Rodrigo, Chunying Zhao, Pieter Rondou, Elisa de Stanchina, Julie Teruya-Feldstein, Michelle A. Kelliher, Frank Speleman, John A. Porco, Jerry Pelletier, Gunnar Rättsch, and Hans-Guido Wendel. RNA G-quadruplexes cause eIF4a-dependent oncogene translation in cancer. *Nature*, 513(7516):65–70, September 2014. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature13485.
- [187] Sophie Bonnal, Céline Schaeffer, Laurent Créancier, Simone Clamens, Hervé Moine, Anne-Catherine Prats, and Stéphan Vagner. A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41):39330–39336, October 2003. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M305580200.
- [188] Carson C. Thoreen, Lynne Chantranupong, Heather R. Keys, Tim Wang, Nathanael S. Gray, and David M. Sabatini. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, 485(7396):109–113, May 2012. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature11083.
- [189] Simon Lattmann, Banabihari Giri, James P. Vaughn, Steven A. Akman, and Yoshikuni Nagamine. Role of the amino terminal RHAU-specific motif in the recognition and resolution of guanine quadruplex-RNA by the DEAH-box RNA helicase RHAU. *Nucleic Acids Research*, 38(18):6219–6233, October 2010. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkq372.
- [190] Zhiyin Dai, Julie M. Sheridan, Linden J. Gearing, Darcy L. Moore, Shian Su, Sam Wormald, Stephen Wilcox, Liam O’Connor, Ross A. Dickins, Marnie E. Blewitt, and Matthew E. Ritchie. edgeR: a versatile tool for the analysis of shRNA-seq and CRISPR-Cas9 genetic screens. *F1000Research*, 3:95, 2014. ISSN 2046-1402. doi: 10.12688/f1000research.3928.2.
- [191] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, August 1970. ISSN 0028-0836.
- [192] Aruna D. Balgi, Bruno D. Fonseca, Elizabeth Donohue, Trevor C. F. Tsang, Patrick Lajoie, Christopher G. Proud, Ivan R. Nabi, and Michel Roberge. Screen for chemical modulators of autophagy reveals novel therapeutic inhibitors of mTORC1 signaling. *PloS One*, 4(9):e7124, September 2009. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0007124.

Appendix

10.1 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Eilers für die wissenschaftliche Unterstützung, die Förderung und stete Diskussionsbereitschaft die zu jeder Zeit weiterhalf, auch wenn ich selbst einmal das Ziel aus den Augen zu verlieren drohte.

Armin Wiegering möchte ich für die Chance danken als sein erster Promotionsstudent beim Aufbau seiner Arbeitsgruppe mitwirken zu dürfen. Deine stetige Unterstützung und dein Erfolgswille haben mich immer wieder mitgerissen!

Herrn Prof. Dr. Germer danke ich für die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Ich danke außerdem den Mitgliedern meines Thesis Committees, Herrn Prof. Gaubatz und Herrn Prof. Behrens für die gute Zusammenarbeit. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Eilers, die mir insbesondere zu Beginn half mich im Laboralltag zurecht zu finden. Insbesondere möchte ich hier Kathrin, Markus, Christina, Laura, Björn, Elmar, Steffi (H.), Steffi (P) und natürlich Carsten erwähnen. Zudem bedanke ich mich bei allen beteiligten Quatschköpfen für die schöne Zeit, die wir nach unsinnigen Wetten beim austrinken des Wetteinsatzes miteinander verbracht haben.

Für die exzellente wissenschaftliche Zusammenarbeit möchte zusätzlich Marika Haderer, Yvonne Rouss, Anne von Thun, Maritta Küspert, Cornelia Brosi, Elmar Wolf und Carsten Ade danken.

Ich danke außerdem Steffi Peter, Armin Wiegering und Jessica Schmitt für das Korrigieren dieser Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau Henriette und meinen Kindern Jonathan und Maximilian dafür, dass sie auch mein privates Leben zu einem steten Quell der Freude gemacht haben.

10.2 Eigene Publikationen

Jakobsen, T.H., van Gennip, M., Phipps, R.K., Shanmugham, M.S., Christensen, L.D., Alhede, M., Skindersoe, M.E., Rasmussen, T.B., Friedrich, K., **Uthe, F.**, et al. (2012). Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2314–2325.

(Publikation im Rahmen der Diplomarbeit)

Wiegering, A., Pfann, C., **Uthe, F.W.**, Otto, C., Rycak, L., Mäder, U., Gasser, M., Waaga-Gasser, A.-M., Eilers, M., and Germer, C.-T. (2013). CIP2A influences survival in colon cancer and is critical for maintaining Myc expression. *PLoS ONE* 8, e75292.

Wiegering, A., **Uthe, F.-W.**, Hüttenrauch, M., Mühling, B., Linnebacher, M., Krummenast, F., Germer, C.-T., Thalheimer, A., and Otto, C. (2014). The impact of pyrvinium pamoate on colon cancer cell viability. *Int J Colorectal Dis* 29, 1189–1198.

Wiegering, A., Kunz, M., Hussein, M., Klein, I., Wiegering, V., **Uthe, F.W.**, Dietz, U.A., Jurowich, C., Bley, T., Dandekar, T., et al. (2015a). Diagnostic value of preoperative CT scan to stratify colon cancer for neoadjuvant therapy. *Int J Colorectal Dis* 30, 1067–1073.

Wiegering, A.*, **Uthe, F.W.***, Jamieson, T., Ruoss, Y., Hüttenrauch, M., Küspert, M., Pfann, C., Nixon, C., Herold, S., Walz, S., et al. (2015b). Targeting Translation Initiation Bypasses Signaling Crosstalk Mechanisms That Maintain High MYC Levels in Colorectal Cancer. *Cancer Discov* 5, 768–781.

* Contributed equally



Friedrich Wilhelm Uthe

Curriculum Vitae

Education

- 2012-2016 **PhD**, *University of Würzburg*.
2005-2011 **Diploma Biochemistry/Molecular Biology**, *University of Jena*.
1994-2004 **Abitur**, *Heidelberg College*.

Diploma Thesis

- Title *Generierung und funktionelle Analyse stabiler Hepatomazelllinien mit regulierbarer Expression Ras-inhibitorischer Proteindomänen*
- Supervisor Prof. Dr. Karlheinz Friedrich
- Description This thesis explored the idea that the malignancy of hepatocellular carcinoma cell lines could be reversed by using RAS-binding domains of Raf

Experience

- since 08/2016 **Sales**, THERMO FISHER SCIENTIFIC, Darmstadt.
04/2011- **Development**, IMMUNOTOOLS GMBH, Rostock.
09/2011 Development of Cell-Sorting based Hybridoma generation techniques

Computer skills

- Basic \LaTeX , Illustrator, Photoshop, Blender, Hardware, Mechatronics (3d-Printing)
Intermediate OpenOffice, Microsoft Windows
Advanced R, Linux

Communication Skills

- 2015 Oral Presentation at 19. Chirurgische Forschungstage in Würzburg
2015 Poster at the 18th International AEK Cancer Congress in Heidelberg
2015 Poster at the 7th Mildred Scheel Cancer Conference in Königswinter

Languages

- German **Mothertongue**
English **Advanced**

10.3 Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Identification of synthetic lethal interactions with the tumour suppressor Adenomatous Polyposis Coli and Manipulation of MYC protein levels in colorectal cancer by translational inhibition” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials 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.

Place, Date

Signature

10.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation 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.

Ort, Datum

Unterschrift