

Aus dem Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften

Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Martin Eilers

**Untersuchungen zu neuen therapeutischen Ansätzen zur
Beeinflussung der MYC-Expression im kolorektalen Karzinom**



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christina Pfann

aus Dietersheim

Würzburg, Dezember 2017

Referent: Prof. Dr. Martin Eilers

Korreferent: Prof Dr. med. Nicolas Schlegel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Kolorektale Karzinom und seine genetischen Veränderungen.....	1
1.2	Das Protoonkogen <i>c-MYC</i>	5
1.3	Die zentrale Rolle von <i>MYC</i> im kolorektalen Karzinom.....	7
1.4	Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg	8
1.5	Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges durch BEZ235	11
1.6	Der MAPK-Signalweg: RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskade	13
1.7	FOXO-Transkriptionsfaktoren und deren Rolle in Tumoren	14
1.8	Initiation der Translation im Fokus der Tumorthherapie.....	16
1.8.1	Initiation der 5'-Cap-abhängigen Translation.....	16
1.8.2	Direkte Hemmung der Translationsinitiation in Tumorzellen als therapeutische Strategie	18
1.8.3	IRES-abhängige Translation	19
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
2	MATERIAL.....	22
2.1	Humane Zelllinien.....	22
2.2	Zellkulturmedien	22
2.3	Zusätze zur Behandlung von Zellen.....	23
2.4	Nukleinsäuren	23
2.4.1	Primer	23
2.4.2	siRNA.....	24
2.5	Antikörper	25
2.5.1	Primärantikörper für Immunoblot.....	25
2.5.2	Sekundärantikörper für Immunoblot	26
2.6	Molekulargewichtsstandard.....	26
2.7	Lösungen	26
2.8	Puffer	27
2.9	Chemikalien	29
2.10	Enzyme und Kits	29
2.11	Verbrauchs- und Zellkulturmaterialien	29

2.12 Technische Instrumente und Zubehör	30
3 METHODEN.....	31
3.1 Zellbiologische Methoden	31
3.1.1 Kultivierung von Zelllinien	31
3.1.2 Passagieren von Zellen	31
3.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen	31
3.1.4 Ernten von Zellen.....	32
3.1.5 Kristallviolett-färbung und Bestimmung der GI ₅₀	32
3.1.6 Wachstumskurve	33
3.1.7 Transfektion von doppelsträngigen Oligonukleotiden (siRNA)	33
3.1.8 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)	34
3.1.9 Annexin V-/Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (Annexin V-/PI-FACS) ..	34
3.2 Proteinbiochemische Methoden.....	35
3.2.1 Zelllyse	35
3.2.2 Proteinquantifizierung.....	36
3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.2.4 Western Blot	37
3.3 Molekularbiologische Methoden	37
3.3.1 RNA-Isolation	37
3.3.2 Konzentrationsbestimmung	38
3.3.3 cDNA-Synthese	38
3.3.4 Quantitative Echtzeit-PCR (<i>real-time quantitative PCR</i> , RQ-PCR)	39
4 ERGEBNISSE	41
4.1 Duale PI3K/mTOR-Hemmung in Kolonkarzinomzellen führt zu einer verstärkten MYC-Expression.....	41
4.2 BEZ235 führt zu einer Proliferationshemmung via G1-Arrest und Apoptose-Induktion in SW480-Zellen	42
4.3 Zellzyklus-Inhibition und Apoptoseinduktion durch Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges erfolgt MYC-unabhängig.....	45
4.4 Duale PI3K/mTOR-Hemmung führt zu einer verstärkten Expression von Rezeptortyrosinkinasen und Aktivierung des MAPK-Signalweges	48
4.5 MYC-Induktion und RTK/MAPK-Aktivierung nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges ist abhängig von FOXO3A	49

4.6	MYC-Induktion nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges ist bedingt durch einen aktivierten MAPK-Signalweg	51
4.7	PI3K/mTOR-Hemmung induziert die Expression des MYC-bindenden FOXO-Zielgens <i>HBP1</i>	52
4.8	DNA-Demethylierung via 5-Aza-2'-deoxycytidin verringert die MYC-Expression in Kolonkarzinomzellen	53
4.9	Hemmung der Translationsinitiation via eIF4A-Inhibition verringert die MYC-Proteinexpression in Kolonkarzinomzellen	56
4.10	MYC-Induktion nach Hemmung der Cap-abhängigen Translation erfolgt IRES-abhängig und wird durch verminderte eIF4A-Aktivität gehemmt.....	59
4.11	Silvestrol wirkt proliferationshemmend auf Kolonkarzinomzellen.....	60
4.12	Silvestrol bewirkt eine uneinheitliche Arretierung des Zellzyklus in Kolonkarzinomzellen	61
4.13	Silvestrol induziert Apoptose in Kolonkarzinomzellen.....	63
5	DISKUSSION	68
5.1	Hemmung der MYC-Expression als zentrales therapeutisches Ziel im kolorektalen Karzinom	68
5.2	Hemmung des PI3K-/mTOR-Signalweges	68
5.2.1	Rationale für eine Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges im KRK	68
5.2.2	Erhöhte Expression von MYC nach Behandlung mit BEZ235 bei MYC-unabhängiger proliferationshemmender Wirkung in Kolonkarzinomzellen	70
5.2.3	Ausbleibende stabilitätsmindernde Wirkung auf MYC und unvollständige Hemmung der Cap-abhängigen Translationsinitiation durch PI3K/mTOR-Hemmung im KRK.....	72
5.2.4	MYC-Induktion durch Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges als Folge einer FOXO3A-abhängigen Induktion von RTK und Aktivierung des RAF/MEK/ERK-Signalweges.....	73
5.2.5	Unterschiedliches Ausmaß der MYC-Induktion nach PI3K/mTOR-Hemmung in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien.....	75
5.2.6	Konsequenzen der Aktivierung von FOXOs und MAPK-Signalweg hinsichtlich MYC-Aktivität und Aktivität des PI3K/mTOR-Signalweges.....	77
5.2.7	IRES-abhängige Translation von MYC nach Hemmung der Cap-abhängigen Translation durch PI3K/mTOR-Inhibition.....	79
5.3	Hemmung der Translationsinitiation	80

5.3.1	Rationale für eine Hemmung der Translationsinitiation durch eIF4A-Inhibition im kolorektalen Karzinom.....	80
5.3.2	Erfolgreiche Reduktion von MYC-Proteinexpression durch eIF4A-Inhibition in Kolonkarzinomzellen	81
5.3.3	Hemmung der Cap- und IRES-abhängigen Translation von MYC durch eIF4A-Inhibition.....	82
5.3.4	Proliferationshemmende Wirkung von Silvestrol auf Kolonkarzinomzellen durch Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose <i>in vitro</i>	83
5.4	Zusammenfassendes Modell.....	86
5.5	Limitationen und Ausblick.....	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	89
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	91
8	ANHANG.....	106
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	106
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	113

1 Einleitung

1.1 Das Kolorektale Karzinom und seine genetischen Veränderungen

Krebserkrankungen stellen mit einer Inzidenz von nahezu 500/100.000 ein bedeutsames gesundheitliches Risiko in der westlichen Gesellschaft dar und gehören nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Das kolorektale Karzinom (KRK) ist sowohl bei Männern als auch Frauen inzwischen die zweithäufigste Krebsursache, ebenso steht es an zweiter Stelle der Krebstodesursachen. Das kumulative Risiko einer Person, im Laufe des Lebens am KRK zu erkranken, beläuft sich derzeit auf etwa 5%, wobei die Letalität 30% beträgt (1-3). In der Ätiologie von KRK spielen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten, Vererbung, sowie erworbene genetische Veränderungen eine Rolle (4, 5). Laut Schätzungen dürften bis zu 30% aller KRK eine erbliche Komponente haben, gemessen an dem Anteil der familiären Hochrisiko-Patienten mit zwei oder mehr Verwandte ersten/zweiten Grades mit KRK. Dabei handelt es sich jedoch lediglich bei ca. 5 % um wirkliche hereditäre familiäre Syndrome, die einer autosomal-dominanten Vererbung folgen (6, 7). Dazu gehören in erster Linie das HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*)- und das FAP (*familial adenopolyposis*)-Syndrom, sowie weitere hamartomatöse Polyposis-Syndrome. Beim weitaus größeren Teil der KRK, ca. 95%, handelt es sich jedoch um sogenannte sporadische KRK.

Charakteristisch für das KRK ist die Adenom-Karzinom-Sequenz, welche beschreibt, dass der Großteil aller Kolonkarzinome aus einem benignen Adenom heraus entsteht. Dies geschieht über eine schrittweise Akkumulation von genetischen Veränderungen der kolorektalen Epithelzellen, die prinzipiell zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (u. a. *APC*, *MLH1*, *p53*) oder zur Aktivierung von Protoonkogenen (u. a. *KRAS*, *PIK3CA*) führen. Hier spielen sowohl Genmutationen und strukturelle Chromosomenaberrationen (z. B. Punktmutation, Deletion, Translokation, Amplifikation) als auch epigenetische Veränderungen eine Rolle (z. B. Hypermethylierung von Promotoren) (8).

Kolorektale Polypen finden sich bei einem beträchtlichen Prozentsatz der westlichen Bevölkerung – mit einem deutlichen Anstieg in der zweiten Lebenshälfte. So tragen 25% der Menschen im Alter von 50 Jahren und bis zu 50% der 70-Jährigen kolorektale Adenome, die sich durch beginnende Dysplasie und veränderte Differenzierung der Epithelzellen auszeichnen – im Unterschied zu den kleinen, noch häufigeren hyperplastischen Polypen (5). Jedes dieser Adenome stellt ein statistisches Risiko für ein meist Jahre bis Jahrzehnte später auftretendes Karzinom dar. Ein 1 cm-großes Adenom beispielsweise trägt ein Risiko von 10-15%, sich in den nächsten 10 Jahren in ein Karzinom zu entwickeln (9). Doch gerade diese Tatsache begründet die herausragende Rolle der Vorsorgeuntersuchung beim KRK, da durch eine koloskopische Auffindung und evtl. Abtragung von kolorektalen Polypen, diese Adenom-Karzinom-Sequenz unterbrochen werden kann und somit die Inzidenz des KRK effektiv gesenkt werden konnte und weiterhin kann (10).

Bei der molekularbiogenetischen Betrachtung von kolorektalen Karzinomen finden sich, unter zahlreichen Mutationen, eine überschaubarere Zahl an Genen, die in großen Teilen der KRK mutiert vorliegen und Komponenten von entscheidenden zellulären Signalwegen darstellen, sogenannte „*key driver genes*“ (Übersichtsarbeit: (5)).

Aus den hereditären KRK sind zentrale genetische Veränderungen bekannt, die auch bei sporadischen KRK einen entscheidenden Beitrag liefern.

So zeichnet sich das HNPCC-Syndrom durch Defekte in DNA-Reparaturgenen (*mismatch repair genes, MMR-genes*) wie *MSH2* und *MLH1* aus, welche zur sog. Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) führen. Auch 15% der sporadischen KRK zeigen MSI aufgrund verminderter Expression von MMR-Genen. Dies geschieht jedoch nur zum kleinen Teil durch Keimbahnmutationen der MMR-Gene, viel häufiger findet sich hier eine Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors.

Die Gruppe der Mikrosatelliten-instabilen, prognostisch günstigeren KRK entstammen in erster Linie dem rechtsseitigen Kolon (*Colon ascendens*) und sind stark assoziiert mit Hypermethylierung (erhöhte Mutationsrate zu Vergleichs-KRK) und dem *CpG-island methylator phenotype* (CIMP) (11).

Dem gegenüber steht die größere Gruppe der KRK (85%) mit chromosomaler Instabilität (CIN), meist ohne Hypermuation. Ist für FAP-Patienten ein Verlust oder eine Stilllegung des *APC*-Tumorsuppressorgens bekannt, findet sich auch in 70-80% aller sporadischen KRK ein inaktiviertes *APC*-Gen. Dies wird als initialer Schritt in der Entstehung eines Adenoms gesehen. Die Folge der *APC*-Inaktivierung ist eine konstitutive Aktivierung des WNT-Signalweges, welche zur gesteigerten Expression von *c-MYC* und weiteren Onkogenen führt. Durch weitere aktivierende bzw. inaktivierende Mutationen, die Komponenten des WNT-Signalwegs wie *CTNNB1* (*Catenin β 1*) betreffen, ist dieser in 93% aller KRK dereguliert.

Weitere bedeutende, deregulierte Signalwege im KRK sind der RAS-MAPK-Signalweg sowie der PI3K-Signalweg. Somatische Mutationen in *KRAS* finden sich in 40% aller KRK, seltener in *NRAS*. In 5-10% kommt es zu einer *BRAF*-Aktivierung, mit auffälliger Assoziation zum Hypermethylierungs-Phänotyp (CIMP) (12). Der PI3K-Signalweg wird in erster Linie durch Aktivierung des *PIK3CA*-Gens (15-25%) oder Inaktivierung von *PTEN* (ca. 10%) und *PIK3R1* aktiviert. Zu einer Überexpression des Wachstumsfaktors *IGF2* kommt es in über 20% der Fälle. Interessanterweise zeigen ein Drittel aller kolorektalen Karzinome gleichzeitige Veränderungen in RAS- und PI3K-abhängigen Signalwegen (11). In 60% liegen Mutationen im p53-Signalweg vor, häufig durch einen Verlust der Heterozygotität (LOH) im kurzen Arm des Chromosoms 17 und somatischer Mutation im verbleibenden *TP53*-Allel. Diesem Schritt, der nicht in frühen Adenomen zu finden ist, wird eine Rolle in der Adenom-Karzinom-Transition zugesprochen.

Weitere Mutationen im KRK betreffen Komponenten des TGF- β -Signalwegs (ca. 25%), Amplifikation von *CDK8* (10-15%) und von *Zyklin E* (5%) und schließlich die Amplifikation des Transkriptionsfaktors *c-MYC* („high copy“ in 5-10%).

(siehe Übersichtsartikel: (5); (11); Abbildung 1.1)

Neben veränderter Expression von Protein-kodierenden Genen, ist auch die veränderte Expression von zahlreichen *micro-RNAs* (*miRs*) im KRK bedeutend (13, 14). Dies sind nicht-kodierende, 18-24 Nukleotid-lange Einzelstrang-RNA-Moleküle, welche posttranskriptionell die Expression von Genen regulieren, indem sie komplementär an

die 3'UTR von mRNAs binden und durch verschiedene Mechanismen, eine verminderte Translation der mRNA bzw. deren Degradation bewirken (15).

Ein Beispiel ist die als Tumorsuppressor geltende *miR-34*-Familie, welche sich im KRK, aufgrund von Hypermethylierung ihres Promotors, häufig vermindert exprimiert findet (16-18).

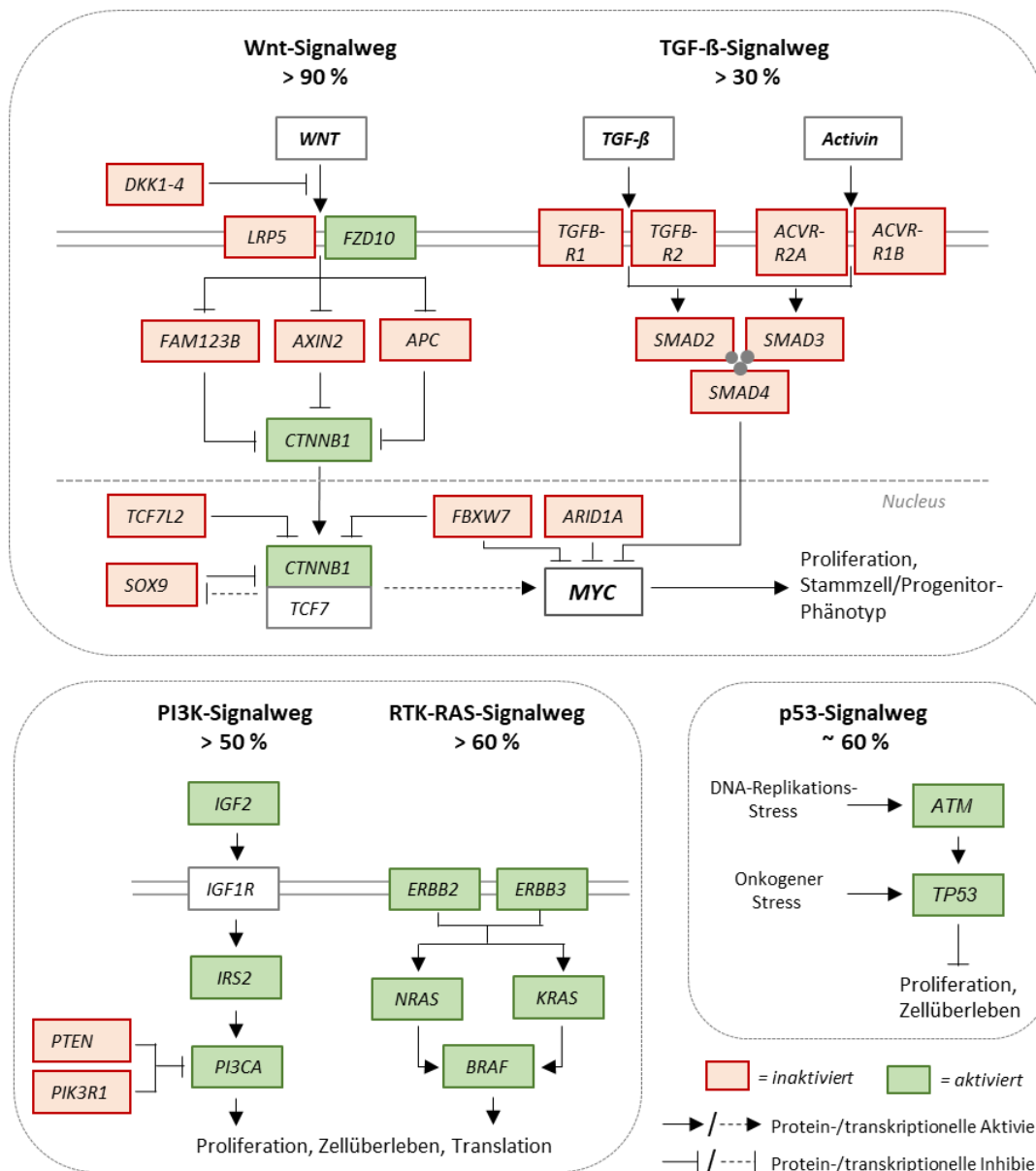


Abbildung 1.1: Veränderte Signalwege im KRK

Aktivierende (*grün*) oder inaktivierende (*rot*) Mutationen bzw. veränderte Expression beteiligter Gene, führen zu einer häufigen Aktivierung der WNT-, PI3K- und RAS/RAF-Signalwege bzw. zur Inaktivierung der TGF-β- und p53-Signalwege im KRK (angelehnt an Cancer Genome Atlas (2012) (11))

1.2 Das Protoonkogen *c-MYC*

Das Protoonkogen *c-MYC* ist das zelluläre Homolog zum retroviralen Gen *v-MYC* des aviären Myelocytomatose-Virus MC29 und wurde vor nun über drei Jahrzehnten durch seine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese des Burkitt-Lymphoms entdeckt (19). Es gehört neben *N-MYC* und *L-MYC* zur Familie der MYC-Transkriptionsfaktoren und wird nachfolgend als *MYC* bezeichnet. Eine deregulierte Expression von *MYC* und dessen Beitrag bei der Tumorentstehung konnte in zahlreichen menschlichen Tumorentitäten gezeigt werden (20, 22). Die physiologische Rolle der MYC-Proteine ist vielfältig und Zelltyp-abhängig, sie regulieren zahlreiche, teilweise gegensätzliche zellbiologische Funktionen wie Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Energie-Metabolismus und Apoptose. Aus der Beteiligung an diesen essentiellen zellulären Vorgängen erschließt sich das Potential eines überexprimierten *MYC* hinsichtlich maligner Transformation von Zellen und Tumorentstehung. In Tumoren liefert MYC einen entscheidenden Beitrag zur ungebremsten Proliferation, fehlenden Differenzierung sowie verminderten Adhäsion von Zellen und treibt Angiogenese und Metastasierung voran (Übersichtsartikel: (21, 23)). Dennoch ist bis jetzt nicht vollständig aufgeklärt, inwiefern Kontrollmechanismen insuffizient greifen, welche physiologischerweise MYC-Funktionen regulieren, insbesondere welche Schritte letztlich über Zellzyklus-Progression oder MYC-induzierte Apoptose einer Zelle entscheiden. Schließlich bleibt auch die transformierende Wirkung MYCs abhängig von weiteren Mutationen.

Strukturbiologisch gehört MYC zu der basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper Proteinfamilie (bHLHZ). In C-terminaler Komplexbindung mit seinem bHLHZ-Partnerprotein MAX, kann MYC *in vivo* an DNA binden (24, 25). Die Bindung der MYC-MAX-Heterodimere an konservierte DNA-Sequenzen, sog. *E-box* (*enhancer box*)-Elemente (*CACGTG*) und dabei Rekrutierung weiterer Koaktivatoren (wie P-TEFb, CREB, p300 u. a.) führt zu einer Aktivierung der Transkription. Dies antagonisierend bildet MAX auch Komplexe mit Proteinen der MAD-Familie oder MNT, welche über DNA-Bindung die Transkription reprimieren können (26-28). Über die Bindung an das Protein MIZ1, welches aktivierend an Promotoren gebunden ist, kann MYC die Expression von Genen reprimieren (29).

Der N-Terminus von MYC enthält drei hochkonservierte Elemente, MYC-Box 1-3, welche für die Proteinstabilität und biologische Aktivität entscheidend sind (30). Die postranslationale Regulation von MYC erfolgt u. a. über Ubiquitinierung, was zu dessen proteasomalen Abbau oder veränderter Aktivität führt. Wichtige Rolle hierbei spielen die E3-Ubiquitin-Ligasen FBW7 (31), SKP2 (32) und HUWE1 (33, 34) sowie die Ubiquitin-spezifische, mit FBW7 interagierende Protease USP28 (35).

Die generell relativ schwache zelluläre Expression von MYC und dessen kurze Halbwertszeit von ca. 20 Minuten durch kontinuierliche proteasomale Degradation, bedingen eine nur transiente Bindung von MYC an einem bestimmten Genlocus (36). Dabei kann MYC sowohl aktivierend als auch reprimierend auf verschiedene Zielgene wirken, welche intensiven Forschungsgegenstand der letzten Jahrzehnte darstellen.

Veröffentlichte genomweite bzw. promotorweite Analysen erbrachten mehrere Tausend MYC-abhängige Gene und man ging zunächst davon aus, dass MYC 10-15% aller, weit über die Konsens-Sequenz hinausgehende, Genloci binden und somit in ihrer Expression regulieren kann (37, 38). Als anerkannte MYC-Zielgene galten Proteine mit zellbiologischen Funktionen bei Zellwachstum, Proliferation und Metabolismus. Neben Protein-kodierenden Genen reguliert MYC jedoch auch die Expression von Polymerase 1- und -3-Transkripten (z. B. t-RNA, r-RNA) sowie nicht-kodierender RNA-Moleküle wie microRNAs (siehe Abbildung 1.2; Übersichtsarbeit (23, 36)).

Dieser Theorie der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung mit spezifischen MYC-Zielgenen steht in den letzten Jahren zunehmend die streitbare These gegenüber, die MYC als „allgemeinen Verstärker“ sieht. MYC soll dabei nicht als „An-Aus“-Regulator spezifischer Zielgene fungieren, sondern die Transkription aller aktiven Promotoren in verschiedenen physiologischen Situationen, durch Freigabe der pausierenden RNA-Polymerase, verstärken (39-41). MYC wird somit eine entscheidende Rolle in der Transkriptions-Elongation zugesprochen.

Trotz vorherrschender Kontroversität des komplexen Themenfelds, muss man mittlerweile von einer Zelltyp- und Kontext-spezifischen Wirkung durch MYC, anstatt eines fixen Transaktivierungsmusters, ausgehen. Die Funktion von MYC ist letztlich

abhängig von dessen Expressionslevel (physiologisch vs. onkogen) und der unterschiedlichen Bindungsaffinität von Promotoren und Enhancern (42, 43).

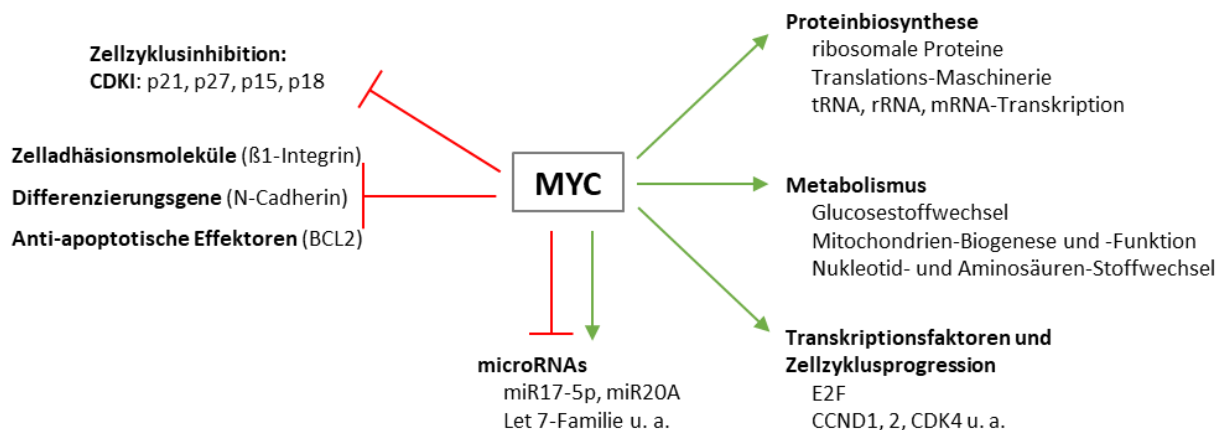


Abbildung 1.2: Funktionen des Transkriptionsfaktors MYC

Zusammenfassung funktioneller Gengruppen mit MYC-aktivierter (*grün*) bzw. MYC-reprimierter (*rot*) Expression (angelehnt an (36)).

Das Modell spezifischer MYC-Zielgene wurde mittlerweile zum Teil verworfen.

1.3 Die zentrale Rolle von *MYC* im kolorektalen Karzinom

Während direkte „*high copy*“ Amplifikationen des *MYC*-Gens in 5-10% der KRK nachgewiesen werden können und moderate, „*low copy*“ Gen-Amplifikationen bzw. Überexpression zudem in einem weit größeren Anteil der Tumoren auftreten (5), zeigt eine Veröffentlichung des Cancer Genome Atlas Network bei nahezu 100% der Tumoren veränderte Expression von MYC-Zielgenen – sowohl MYC-aktivierter als auch MYC-reprimierter Gene (11).

Zum einen ist dies die Konsequenz zugrundeliegender Mutationen in Signalwegen, die die Expression bzw. Aktivität von *MYC* beeinflussen. So resultiert eine Aktivierung des *WNT*-Signalwegs in über 90% aller KRK (siehe Abbildung 1.1), z. B. durch Verlust des Tumorsuppressors *APC*, in einer Aktivierung von *MYC* – eines der Haupt-Zielgene von β -Catenin (44). Inaktivierung von *FBXW7*, die Substrat-bindende Komponente der E3-Ubiquitin-Ligase SCF, wie in bis zu 20% aller KRK, führt zu einer verminderten Degradation von *MYC* (31).

Ein aktivierter MAPK-Signalweg kann, über ERK1/2-vermittelte nukleäre Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie (z.B. ELK-1), die Transkription von *MYC* steuern (45).

Zum anderen kann eine posttranslationale Regulation und Stabilisierung des MYC-Proteins zu der veränderten Expression von MYC-Zielgenen führen.

So induziert aktiviertes *RAS* die Stabilisierung von MYC und führt zu einer Akkumulation von aktivierten MYC. Über den MAPK-Signalweg mit den ERK-Kinasen als Effektoren wird die Halbwertszeit des MYC-Proteins über die Phosphorylierung von MYC an Serin-62, einer Phosphorylierungsstelle der N-terminalen MYC-box 1, erhöht, indem es seine Ubiquitin-abhängige Degradation vermindert (46). Eine nachfolgende Phosphorylierung an Threonin58 durch GSK3, dessen Aktivität durch den PI3K/AKT-Effektorarm von *RAS* reguliert wird, würde den proteasomalen Abbau von MYC fördern (47, 48). Somit kann auch ein aktivierter PI3K/AKT-Signalweg über die Inaktivierung von GSK3 die Stabilität des MYC-Proteins erhöhen.

Neben den genannten typischen Mutationen im KKR, können jedoch auch viele weitere Interaktionen zwischen den Signalwegen oder eine veränderte Expression von regulatorischen Elementen, wie *micro-RNAs*, in eine gesteigerte Aktivität von MYC im KKR münden. Ein Beispiel ist die weitgehende, durch Promotor-Hypermethylierung bedingte, Inaktivierung der *MYC*-reprimierend wirkenden *miR-34b/c* im KKR (17, 49).

Durch diese Betrachtung muss MYC als zentraler Effektor von zahlreichen genetischen Veränderungen im KKR gesehen werden und sollte daher auch verstärkt in den Fokus bei der zielgerichteten medikamentösen Behandlung des KKR rücken.

1.4 Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Zu den heterodimeren PI3-Lipidkinasen (PI3K) gehören 3 Klassen mit weiteren Isoformen, wobei für die Klasse 1A-PI3K, durch ihre Rolle im nachfolgend beschriebenen PI3K-Signalweg, deren Beitrag zur Tumorentstehung für viele Tumorentitäten gezeigt werden konnte (50). Die PI3K1A, nachfolgend als PI3K bezeichnet, besteht aus einer regulatorischen p85-Domäne, sowie der katalytischen p110-Domäne (*PIK3CA*). Die

Aktivierung der PI3K erfolgt zum einen durch aktivierte Rezeptortyrosinkinasen (RTK), z. B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren – entweder über direkte Bindung der regulatorischen p85-Domäne an Phosphotyrosinreste von aktivierten RTK oder teilweise auch indirekt über zwischengeschaltete Phosphoproteine, wie das Insulinrezeptor-Substrat 1 (IRS-1). Zum anderen gehört die PI3K zu den Effektoren von aktiviertem RAS-Protein, welches direkt an die p110-Untereinheit der PI3K binden und diese aktivieren kann. Schließlich katalysiert die p110-Domäne der PI3K die Umwandlung des membranären Phosphatidylinositol-(4, 5)-Diphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-Triphosphat (PIP₃), welches weiter als *second messenger* fungiert (50). Antagonisiert wird dieser Schritt u. a. durch die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue*), einem in verschiedenen Tumoren mutiert vorliegenden Tumorsuppressorgen (51).

PIP₃ rekrutiert nun weitere Signalproteine an die Zellmembran, so auch die Serin/Threonin-Kinasen AKT (auch *Proteinkinase B*) und PKD1 (*phosphatidyl dependent kinase 1*). Die Phosphorylierung von AKT an Threonin-308 durch PKD1 und zusätzliche Phosphorylierung an Serin-473 durch mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) führt zu deren vollständigen Aktivierung und ermöglicht die weitere, meist inhibierende Phosphorylierung zahlreicher Effektoren von AKT. Über die so regulierten Signalkaskaden steuert AKT die Schlüsselfunktionen Proliferation, Zellwachstum/Metabolismus und Zellüberleben/Apoptose. So gehören zu den AKT-Zielproteinen u. a. das pro-apoptotische Protein BAD (*BCL-2 antagonist of cell death*), die Zellzyklus-Regulatoren p21 und p27 oder *Forkhead-Box* Transkriptionsfaktoren (FOXOs). Ein weiteres wichtiges, durch AKT phosphoryliertes und inhibiertes Protein ist GSK3 (*Glykogen-Synthetase-Kinase 3*), welches im aktivierten Zustand u. a. MYC und Zyklin D inaktiviert (Übersichtsarbeiten: (50, 52, 53)).

Über die Inaktivierung des TSC2 (*Tuberous sclerosis 2*)-Proteins mündet die Aktivierung von AKT schließlich in eine Aktivierung von mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (54). Zudem besitzt die Serin/Threonin-Kinase mTOR eine direkte Phosphorylierungsstelle für AKT (55).

Als Teil des Rapamycin-sensitiven Proteinkomplexes TORC1 reguliert mTOR die Translations-Maschinerie, indem es die p70-S6K (*p70-ribosomale S6-Kinase*) und den eIF4E-Inhibitor 4E-BP1 (*eucaryotic initiation factor 4E binding protein 1*) phosphoryliert. Die Aktivierung der p70-S6-Kinase resultiert in einer Phosphorylierung des RPS6 (*ribosomales Protein S6*), welches daraufhin die Proteinbiosynthese aktiviert – in erster Linie von Komponenten des Translationsapparats, wie ribosomale Proteine. 4E-BP1 bindet im dephosphorylierten Zustand eIF4E und verhindert so die Anlagerung weiterer Initiationsfaktoren (siehe auch Abschnitt 1.8.1). mTOR-abhängige Phosphorylierung von 4E-BP1 ermöglicht somit die Formation des Translations-Initiationskomplexes eIF4F und die Aktivierung der 5'-Cap-abhängigen Translation (56, 57). Gebunden im Rapamycin-insensitiven Proteinkomplex TORC2 kann mTOR wiederum AKT phosphorylieren, was als positive Rückkopplung des Signalweges gesehen werden kann (58).

Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass AKT nur eine von zahlreichen PI3K-abhängig aktivierten Signalproteinen darstellt, neben z. B. RAC und ARF6 mit deren Rolle bei der Zytoskelett-Polymerisation (52). Ebenso hat die mTOR-Aktivität neben Translationsaktivierung viele weitere für das Zellwachstum relevante Effektoren und Funktionen, wie tRNA- und Ribosomen-Biogenese, Aktin-Organisation, Steuerung des PKC-Signalwegs oder Autophagie und ist neben der AKT-vermittelten Aktivierung ebenso abhängig vom vorherrschenden Nährstoffangebot (57).

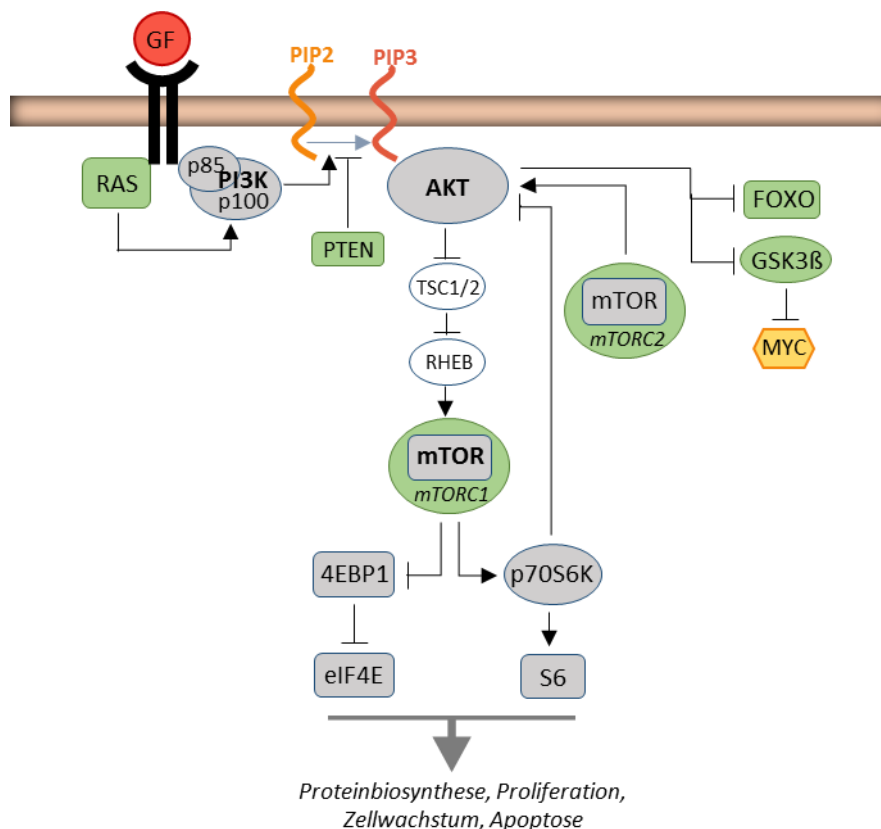


Abbildung 1.3: Der PI3K/mTOR-Signalweg

Vereinfachte, schematische Darstellung der PI3K/mTOR-Signalkaskade.

RTK- oder RAS-abhängig aktivierte PI3K katalysiert die Umwandlung von PIP2 in PIP3, antagonistisiert durch PTEN, mit nachfolgender Phosphorylierung von AKT. Zu den Substraten AKTs gehören u. a. GSK3 β und FOXO. Über die Inaktivierung von TSC1/2 mit folglich aktivierter GTPase RHEB bewirkt AKT schließlich die Aktivierung von mTOR. Durch mTORC1 wird p70S6K und 4EBP1 mTOR-abhängig phosphoryliert und somit die Proteinbiosynthese aktiviert. Gebunden an mTORC2 trägt mTOR rückkoppelnd zur Aktivierung von AKT bei.

1.5 Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges durch BEZ235

Zahlreiche Tumore zeigen eine onkogene Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, durch multiple genetische Veränderungen auf unterschiedlichen Stufen des dargestellten Signalwegs (59). So ist die Unterbrechung dieses deregulierten Signalwegs durch die Inhibierung einzelner Komponenten ein vielversprechender Ansatz in der zielgerichteten Tumorthherapie. Die Wirkung einzelner PI3K-, AKT- oder mTOR-Inhibitoren zeigt sich jedoch durch zelluläre Feedback-Mechanismen limitiert. So führt eine selektive mTORC1-Hemmung über den Verlust einer negativen Rückkopplung durch die S6K auf IRS-1 letztlich zu einer AKT-Aktivierung (60, 61). Trotz einer PI3K-

Hemmung kann es zu einer verstärkten Phosphorylierung von AKT durch den mTOR-enthaltenden TORC2-Komplex kommen (58). Zudem muss beachtet werden, dass mTOR nicht allein unter dem regulatorischen Einfluss eines aktivierten PI3K/AKT-Signalwegs steht (57). Eine Weiterentwicklung stellen somit duale Inhibitoren wie NVP-BEZ235 (BEZ235) dar, das als *small molecule*-Wirkstoff sowohl Klasse1-PI3K als auch mTORC1/2 inhibiert. BEZ235 gehört zur Klasse der Imidazoquinoline und hemmt reversibel die katalytische Aktivität der Enzyme, indem es kompetitiv deren ATP-Bindestelle blockiert (62). Dies führt zu einem Rückgang der RTK-abhängigen Phosphorylierung von AKT und Inhibierung dessen nachgeschalteter Effektoren, wie auch zu einem Rückgang der mTORC1/2-Aktivität. Die dosisabhängige, antiproliferative Wirkung des oral-verfügbaren BEZ235 konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, der Mechanismus hierbei war eine Induktion eines G1-Arrests und je nach Modell auch die Induktion pro-apoptotischer Signale (62-65). Zudem bewirkt BEZ235 im KRK eine Hemmung der Angiogenese im Tumor (64). Obwohl nur ein gewisser Teil aller KRK einer direkten Überaktivierung des PI3K-Signalwegs, durch *PIK3CA*-, *PTEN*- oder weitere Mutationen, unterliegen (siehe Abschnitt 1.1), ist der wachstumshemmende Effekt von BEZ235 auch für *PIK3CA*-Wildtyp-Zelllinien gezeigt mit ebenso effektiver Hemmung des PI3K/mTOR-Signalwegs. So müsste sich die Anwendung von BEZ235 nicht nur auf Patienten mit *PIK3CA*-mutiertem KRK beschränken (64). Durch zahlreiche präklinische Studien wurden vielfach Effekte einer Mono- oder Kombinationstherapie mit BEZ235 auf verschiedene Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* gezeigt, darunter die Strahlensensibilisierung von Glioblastomen (66), die antiproliferative Wirkung auf Adenokarzinome des Ovars (67) und Osteosarkome (68), Apoptose-Induktion in Prostatakarzinomen (69), der hemmende Einfluss auf die epitheliale-mesenchymale Transition als Ausgangspunkt für Metastasierung (70), sowie die erfolgreiche Kombination des Tyrosinkinase-Inhibitors Nilotinib und BEZ235 in BCR-ABL-positiven Leukämie-Zellen (71, 72) – um nur einige zu nennen. Es finden sich mittlerweile erste Berichte hinsichtlich tumorhemmender Wirkung und Verträglichkeit von BEZ235 aus klinischen Phase I/II-Studien mit Anwendung des Inhibitors bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren (73, 74).

1.6 Der MAPK-Signalweg: RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskade

Neben dem Jun-Kinase- und dem p38-Kinase-Signalweg, ist die Proteinkinase-Kaskade von RAF, MEK über ERK der klassische MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg. Er steuert Proliferation, Differenzierung, sowie Apoptose einer Zelle. Eine Möglichkeit der ERK-Aktivierung geht von der Aktivierung von RTK, wie Zytokin- oder Wachstumsfaktoren-Rezeptoren, aus. An den dimerisierten, phosphorylierten Tyrosinkinase-Rezeptor kann das Adapterprotein GRB2 (*growth factor receptor-bound protein*), zusammen mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (*son of sevenless*) binden. Hierüber farnesyliertes, GTP-gebundenes und somit aktiviertes RAS-Protein rekrutiert nun die Serin/Threonin-Kinase c-RAF an die Zellmembran und ermöglicht so dessen Aktivierung durch verschiedene Phosphorylierungen (u. a. durch Kinasen der SRC-Familie, PKC und PAK) und Dimerisierung. Aktiviertes RAF phosphoryliert und aktiviert die MAP-Kinase-Kinase MEK1/2, welche wiederum die MAP-Kinase ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) aktiviert. Schließlich kann aktiviertes ERK1/2 zytoplasmatische Substrate phosphorylieren und aktivieren oder in den Zellkern translozieren und dort die Aktivität von zahlreichen Transkriptionsfaktoren und somit die Expression deren Zielgene modulieren. Zu den zytoplasmatischen Substraten von ERK gehört z. B. p90-RSK (*p90 ribosomal S6 kinase*), die verschiedene Transkriptionsfaktoren wie CREB reguliert. Im Zellkern aktiviert ERK Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, ETS, c-FOS, AP-1 und MYC. Neben der direkten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors MYC kann dessen Expression und Aktivität auf unterschiedlichen Wegen durch einen aktivierten MAPK-Signalweg beeinflusst werden. (siehe Übersichtsarbeiten: (75, 76))

Ebenso wie der PI3K-Signalweg findet sich der MAPK-Signalweg in zahlreichen Tumoren aktiviert, im KHK ist dies in bis zu über 60% der Fälle ((11); Abb. 1).

So gibt es bereits zahlreiche Ansätze zur zielgerichteten Hemmung verschiedener Komponenten dieses Signalweges, darunter RAS-Inhibitoren (77), RAF-Destabilisatoren (78), MEK-Inhibitoren (79) und neuere ERK1/2-Inhibitoren (80).

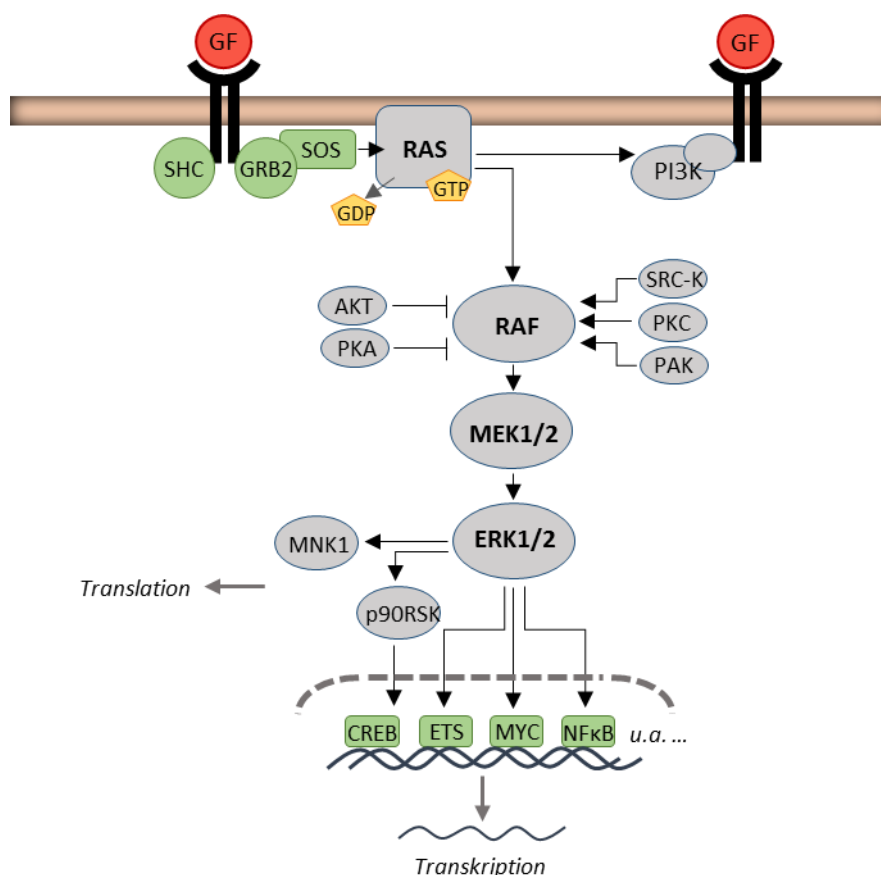


Abbildung 1.4: Der MAPK-Signalweg (RAF-MEK-ERK-Kaskade)

Vereinfachte, schematische Darstellung der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade, eines der MAPK-Signalwege.

Aktivierung von RTK durch Ligandenbindung führt über weitere rekrutierte Faktoren zu aktivierten, farnesyliertem und GTP-gebundenem RAS. Aktiviertes RAS induziert die Phosphorylierungskaskade der Kinasen RAF-MEK1/2-ERK1/2. Durch verschiedene zytoplasmatische Substrate von ERK1/2 und nukleäre Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, ist ERK1/2 schließlich an der Regulation essentieller zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt.

1.7 FOXO-Transkriptionsfaktoren und deren Rolle in Tumoren

FOXO-Transkriptionsfaktoren gehören zur großen Familie der *Forkhead-Box* (FOX)-Transkriptionsfaktoren, bestehend aus FOXO1 (FKHR), FOXO3A (FKHRL1), FOXO4 (AFX) und FOXO6 (81). Für die Funktion entscheidend ist eine hochkonservierte *Forkhead*-DNA-Bindungsdomäne, über die FOXO-Transkriptionsfaktoren an die Konsensus-DNA-Sequenz 5'TTGTTTAC'3 (*Forkhead-responsive element*) binden und so die Transkription ihrer Zielgene regulieren (82). Zur Wirkung von FOXOs gehören, aufgrund weitreichender transkriptioneller Aktivierung bzw. Repression, die Arretierung des

Zellzyklus, Apoptoseinduktion sowie die Regulation von Zellalterung und Zelldifferenzierung. Zudem vermitteln FOXOs eine Resistenz gegenüber oxidativem und zytotoxischem Stress und wirken inhibierend auf Invasivität, Metastasierung und Angiogenese in Tumoren (Übersichtsarbeit: (83)). Unter anderem sind sie über Induktion von *HBP1* (84) und *MXI1* (85) an der Repression MYC-abhängiger Transkription beteiligt und hemmen, neben allgemeiner Translationshemmung (siehe Abschnitt 1.8.1), durch Induktion von *miR-34b/c* (*microRNA-34b/c*) die Translation von MYC (49).

FOXOs gelten somit als wichtige Tumorsuppressoren. Ihr Verlust führt zu Tumorentstehung und -progression (86). Damit einhergehend finden sich FOXOs in vielen Tumoren verschiedener Entitäten dereguliert (Übersichtsarbeiten: (87, 88)).

Die posttranslationale Regulation von FOXOs erfolgt über verschiedene Mechanismen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung als Effekt übergeordneter Signalkaskaden, vermittelt durch Wachstumsfaktoren, oxidativen Stress und DNA-Schädigung (89). Einer dieser übergeordneten Signalwege ist die PI3K/AKT-Signalkaskade, lange bekannt ist dabei die Phosphorylierung und damit Inhibierung von FOXOs durch die Proteinkinase AKT (90). Dies führt über Komplexbildung mit 14-3-3-Proteinen zu einem Export von phosphorylierten FOXOs aus dem Zellkern mit nachfolgender Ubiquitinierung und Degradation im Zytoplasma (91).

Im Umkehrschluss führt eine Hemmung der PI3-Kinase, z. B. durch BEZ235, zu einer Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren mit entsprechender Aktivierung bzw. Repression von FOXO-Zielgenen.

Eine Aktivierung besonders von FOXO3A wird als – zumindest indirekte – Wirkung einiger Chemotherapeutika gesehen, gezeigt z. B. für den zytotoxischen Effekt von Cisplatin im Kolonkarzinom (92).

Zum anderen sind jedoch überlebensfördernde Feedback-Mechanismen durch die Induktion von FOXO3A nachgewiesen, welche zu einer Wirkstoff-Resistenz führen können. Hierzu gehören die rückkoppelnde PI3K/AKT-Aktivierung durch FOXO3A-abhängig erhöhte Expression von *PIK3CA* (*p110α*-Untereinheit der *PI3K*) (93) sowie die FOXO3A-abhängige Induktion von Rezeptortyrosinkinasen (94, 95).

1.8 Initiation der Translation im Fokus der Tumorthherapie

1.8.1 Initiation der 5'-Cap-abhängigen Translation

Voraussetzung und gleichzeitig limitierender Schritt für die Initiation der Translation ist die Bindung der kleinen 40S-Untereinheit von Ribosomen an die zu translatierende mRNA. Bei der 5'-Cap (*m7GpppN*-Struktur in der 5'-UTR von mRNAs)-abhängigen Translation ist hierfür der Proteinkomplex eIF4F (*eukaryotic translation initiation factor 4F*) notwendig, bestehend aus dem 5'-Cap-bindenden Initiationsfaktor eIF4E, der ATP-abhängigen RNA-Helikase eIF4A und dem für weitere Interaktionen dienenden Gerüstprotein eIF4G (96). Unter anderem durch Zirkularisierung der mRNA über PABP (*Poly(A)- binding protein*) und durch Beteiligung weiterer eIFs wird folglich die Anlagerung eines 43S-Präinitiationskomplexes aus 40S-Ribosom, Methionin-beladener Initiator-tRNA (Met-tRNA) und GTP-eIF2 ermöglicht, woraufhin ein Absuchen der mRNA nach dem komplementären AUG-Startcodon erfolgt ((97); Übersichtsartikel:(98)).

Reguliert wird die Zusammenlagerung der eIF4F-Komponenten und somit die Translationsinitiation über verschiedene Mechanismen:

Von großer Bedeutung ist die Bindung von eIF4E durch 4EBP1 (*eIF4E-binding protein 1*), was die Anlagerung von eIF4G und eIF4A an mRNA-gebundenes eIF4E und somit die Formation des notwendigen Initiationskomplexes verhindert. Die mTOR-abhängige Phosphorylierung von 4EBP1 und mögliche nachfolgende Phosphorylierungen durch weitere Kinasen (z.B. ERK) an verschiedenen Phosphorylierungsstellen von 4EBP1 führt zu dessen Dissoziation von eIF4E (99).

Die Phosphorylierung von eIF4E selbst durch verschiedene Kinasen, z. B. durch MNK1 (*MAP- kinase-interacting kinase 1*) als Substrat von ERK1/2 und p38-MAPK (100, 101), fördert wiederum die Translations-Aktivität (96, 102).

Ein anderer Weg der Regulation betrifft den Initiationsfaktor eIF4A. Das als Tumorsuppressor fungierende Protein PDCD4 (*programmed cell death protein 4*) inhibiert Komplexbindung und Helikasefunktion von eIF4A. PDCD4 wird durch die aktivierte *S6-Kinase 1* (S6K1), ein Effektor des mTOR-Signalweges, phosphoryliert und nachfolgend durch Ubiquitinierung degradiert (103).

Sowohl 4EBP1 (104) als auch PDCD4 (105) sind Zielgene von FOXO-Transkriptionsfaktoren, wobei deren Expression unter zellulären Stressbedingungen aktiviert wird.

Die beschriebenen Mechanismen, Dephosphorylierung von 4EBP1 und PDCD4 sowie FOXO-Aktivierung, erklären die Translations-inhibierende Wirkung eines unstimulierten bzw. gezielt gehemmten PI3K/mTOR-Signalweges.

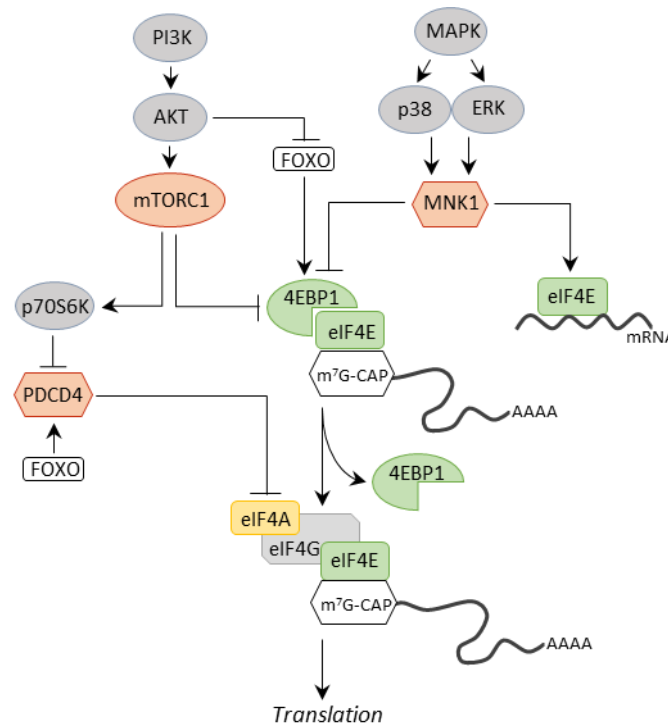


Abbildung 1.5: Regulationsmechanismen für Initiation der 5'Cap-abhängigen Translation

Vereinfachte Darstellung von regulatorischen Einflüssen auf die Formation des eIF4F-Komplexes, bestehend aus den Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4G und eIF4A. Der Komplex ist Voraussetzung für die Bindung der ribosomalen 40S-Untereinheit an die mRNA über weitere Faktoren und somit die Initiation der Translation. mTOR- bzw. MNK-abhängige Phosphorylierung von 4EBP1 führt zu dessen Dissoziation von Cap-gebundenem eIF4E, wodurch die Anlagerung von eIF4G und eIF4A ermöglicht wird. Antagonistisch FOXO-abhängige Dephosphorylierung und somit Aktivierung von eEBP1. Phosphorylierung von eIF4E u. a. via MNK reguliert dessen mRNA-Bindung. Inhibition der eIF4A-Helikase durch PDCD4, welches wiederum mTOR/S6K-abhängig inaktiviert wird.

1.8.2 Direkte Hemmung der Translationsinitiation in Tumorzellen als therapeutische Strategie

Eine blockierte Translation kann Folge der Inhibierung von Signalwegen sein, die in eine aktivierte Proteinbiosynthese münden, so z. B. die Wirkung einer mTOR-Hemmung wie durch BEZ235.

Zunehmender Forschungsgegenstand ist derzeit jedoch ein direktes Eingreifen auf Stufe der Translationsinitiation als Alternative zur Kombination verschiedener Inhibitoren, um Feedback-Regulationen durch Effektoren vorangeschalteter Signalwege zu umgehen (106, 107).

Zudem findet sich in Tumoren oft eine erhöhte Expression von eIF4E selbst (108) bzw. reduzierte Expression von 4EBP1 (109) mit relevanter Transformations-fördernder Wirkung. Solch ein vermindertes 4EBP1:eIF4E-Verhältnisses kann die Wirkung einer mTOR-Inhibierung limitieren. Eine resultierende Aktivierung des eIF4F-Komplexes dürfte entscheidend das Transformationspotential und mögliche Wirkstoff-Resistenzen vermitteln, woraus sich die Hemmung der eIF4F-Formation als therapeutischer Ansatzpunkt ergibt (110-112).

Bekanntere Translationsinhibitoren sind Rocaglamid und dessen zahlreiche Derivate (Rocaglate) aus der Mahagonien-Spezies *Aglaia* (Übersichtsarbeit: (114).

Der führende Vertreter dieser Gruppe ist das Cyclopenta[b]benzofuran Silvestrol mit zytotoxischem und Tumor-hemmendem Potential (115). Der Wirkmechanismus Silvestrols besteht in einer Hemmung der eIF4AII-Aktivität, indem es eine aberrante RNA-Bindung der eIF4A-Helikase erzwingt und somit weniger funktionales eIF4A für die Komplexbindung in eIF4F zur Verfügung steht (106, 116), mit erstaunlicher Selektivität für diese Zielproteine (117). Mittlerweile gelang auch die Entwicklung synthetischer Analoga mit vergleichbarer Wirkung (118, 119).

Die tumorhemmende Aktivität von Silvestrol im nanomolaren Wirkungsbereich, übereinstimmend durch Wachstumshemmung und Induktion von Apoptose, konnte bereits für verschiedene Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, mit insgesamt guter Toleranz des Inhibitors im Mausmodell. Hierzu gehörten hämatologische Neoplasien (Lymphom (106); Leukämie-Modelle (120);

Mantellzelllymphom (121); EBV-assoziierte B-Zell-Malignitäten (122)) sowie solide Tumoren (Prostatakarzinom, Mammakarzinom (115, 123); Hepatozelluläres Karzinom (124); Melanom (nur *in vitro*-Daten: (125)).

Auch für Kolonkarzinomzellen konnte bereits der Zellzyklus-inhibierende und Apoptose-induzierende Effekt durch verwandte Cyclopenta[b]benzofurane nachgewiesen werden, welcher sich weitgehend selektiv für maligne Zellen zeigte (126).

Neben der mTOR-Hemmung, stellt die gezielte Hemmung der Translationsinitiation via Inhibierung des eIF4F-Komplexes somit eine weitere, möglicherweise effektivere, Strategie dar, Proteinbiosynthese und insbesondere MYC-Translation im KRK zu blockieren.

1.8.3 IRES-abhängige Translation

In Situationen von zellulärem Stress (Hypoxie, Nährstoffmangel, Temperaturschock, osmotischer Stress, Apoptose u. a.), aber auch während der Mitose, kommt es zu einer allgemeinen Suppression der Proteinbiosynthese, u. a. durch Verhinderung des o. g. eIF4F-Komplexes oder Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2A (127, 128). Eine 5'-Cap-unabhängig initiierte Translation sichert jedoch die Translation von Proteinen, die der Antwort auf Stressfaktoren dienen und das Überleben sichern. Ermöglicht wird dies durch eine Struktur in der 5'-Untranslatierten Region (UTR) bestimmter mRNAs, der *Internal Ribosome Entry Site* (IRES), welche eine Cap-unabhängige Anlagerung des Translationsapparates ermöglicht (129). Zunächst war die IRES-Struktur als virale Strategie der Proteinsynthese bei Picornaviridae bekannt, doch zeigte sich, dass 3-5% aller zellulären mRNAs trotz eIF4F-Defizienz Polysom-gebunden bleiben (130). Welche weiteren Kofaktoren, sog. ITAFs (*IRES trans-acting factors*), für die Initiation der IRES-medierten Translation benötigt werden, ist noch weitgehend unklar und IRES-spezifisch variabel, bekannt ist z. B. das Polypyrimidin-reiche Sequenzen bindende Protein PTB1 (131).

Diese IRES-enthaltenden mRNAs kodieren Proteine mit Funktion für Zellwachstum, Proliferation, Apoptose sowie Angiogenese und entsprechen somit auch Genen mit entscheidender Rolle in Tumorentstehung und -progression. Dazu gehören die

Apoptose vermittelnden Proteine p53 (132) und APAF1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) (133), das Zellzyklus regulierende Onkoprotein c-JUN (134), der Angiogenese fördernde Wachstumsfaktor VEGF (135) und der Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR (136) – um nur einige zu nennen.

Schließlich sind auch für *MYC* IRES-Strukturen in dessen 5'-UTR bekannt (137, 138). Die *MYC*-IRES-Aktivität wird durch MNK-Kinasen reguliert und somit MAPK-abhängig (durch p38-MAPK- oder ERK) aktiviert (139). Dieser Effekt ist z. B. Folge einer mTOR-Hemmung und findet sich bei inaktivem AKT-Status noch verstärkt (140) – ein Aspekt, der womöglich bzgl. der dualen PI3K/mTOR-Hemmung bedacht werden sollte.

Erhöhte Aktivität IRES-abhängiger Translation von *MYC* oder anderen Onkogenen gelten mittlerweile als bedeutender Mechanismus des Tumorprogresses, so konnte z. B. eine Punktmutation in der *MYC*-IRES bei Patienten mit Multiplem Myelom nachgewiesen werden (141).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Durch die zentrale Rolle einer deregulierten *MYC*-Expression im KRK (siehe Abschnitt 1.3), welche als bedeutender Faktor für Tumorinitiation nach *APC*-Verlust gezeigt wurde (142), sollte der Einfluss einer zielgerichteten Inhibitor-Behandlung auf dessen Expression in den Fokus rücken.

Eine duale Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges durch BEZ235 (62) in Kolonkarzinomzellen erschien initial als Ansatz, die Translation von *MYC* zu hemmen und dessen Umsatz zu erhöhen (siehe Abschnitt 1.4). Da ca. 50% aller KRK aktivierende Mutationen im PI3K-Signalweg aufweisen (11) und eine wachstumshemmende Wirkung von BEZ235 zudem in *PI3CA*-Wildtyp-Zelllinien beobachtet wurde (64), erschien dies als geeignete Strategie. Zu Beginn dieser Arbeit war ein wachstumshemmender Effekt durch Behandlung mit BEZ235 via Induktion eines G1-Zellzyklusarrestes in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien bekannt. Beobachtet wurde jedoch eine ausbleibende Suppression der *MYC*-Proteinexpression mit sogar erhöhtem mRNA- und Protein-Expressionslevel von *MYC* nach PI3K/mTOR-Inhibition (143). Dieser Effekt auf die Expression von *MYC*, sowie deren Einfluss auf die proliferationshemmende Wirkung

und mögliche Apoptoseinduktion durch eine Behandlung mit BEZ235, sollte in dieser Arbeit auch in der bisher nicht untersuchten Zelllinie SW480 überprüft werden. Ebenso wurde im Vorfeld bereits eine Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren nach PI3K/mTOR-Hemmung in Kolonkarzinomzellen gezeigt und es gab Hinweise auf eine verstärkte Expression von RTK und eine Aktivierung des MAPK-Signalweges (143). RTK-Expression und Aktivität des MAPK-Signalweges sowie dessen möglicher Einfluss auf verstärkte MYC-Expression nach PI3K/mTOR-Hemmung sollten ergänzend in SW480-Zellen untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es, über die Abhängigkeit der MYC-Induktion von FOXO-Transkriptionsfaktoren mit bekannter Feedback-Regulation von RTK (94, 95), Aufschluss zu gewinnen. Schließlich sollte der Mechanismus dieses möglicherweise konservierten Feedback-Mechanismus zwischen den Signalwegen und letztlich erhöhter MYC-Proteinlevel näher beleuchtet werden.

Bei bekannter Abhängigkeit der MYC-Translation vom eIF4F-Initiationskomplex in MYC-abhängigen Tumoren (144, 145), ergab sich als alternative Strategie, die MYC-Proteinexpression in Kolonkarzinomzellen zu senken, der Versuch einer direkten Hemmung der Translationsinitiation. Hierbei sollte der Einfluss einer Behandlung mit Rocaglamid-Derivaten als Inhibitoren der eIF4A-Helikase, insbesondere Silvestrol (106, 114), auf die Proteinexpression von MYC in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien untersucht werden. Schließlich sollte die proliferationshemmende Wirkung Silvestrols sowie deren Mechanismus, mit fraglicher Induktion von Apoptose, in verschiedenen Kolonkarzinomzellen überprüft werden und somit eine potentielle Eignung des eIF4A-Inhibitors als tumorhemmender Wirkstoff im KRK festgestellt oder abgelehnt werden.

2 Material

2.1 Humane Zelllinien

SW480 humane Kolonkarzinomzelllinie [*Cell Line Services, CLS*]

SW620 humane Kolonkarzinomzelllinie [*American Type Culture Collection, ATCC*]
(Lymphknoten-Metastase des SW480-Primärtumors)

HCT116 humane Kolonkarzinomzelllinie

[*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ*]

LS174T humane Kolonkarzinomzelllinie [*ATCC*]

2.2 Zellkulturmedien

Vollmedium für SW480 und HCT116:

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 0,584 g/l (4 mM) L-Glutamin [Sigma]

10% Fetales Kälberserum (FBS, *fetal bovine serum*, hitzeinaktiviert für 30 min bei 60°C)
[Sigma]

1% Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml) [*PAA Laboratories*]

Vollmedium für LS174T:

RPMI-1640-Medium mit 2 g/l Glukose und 0,3 g/l (2 mM) L-Glutamin [Sigma]

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin

Vollmedium für SW620:

Leibovitz-Medium mit 0,9 g/l Galactose und 0,3 g/l (2 mM) L-Glutamin [Gibco]

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium:

95% FBS

5% DMSO

Medium zur siRNA-Transfektion

Opiti-MEM1 [Invitrogen]

2.3 Zusätze zur Behandlung von Zellen

NVP-BEZ235	[LC Laboratories]	1-500 nM in DMSO
UO126	[Promega]	10 µM in DMSO
5-Aza-2'-deoxycytidin	[Sigma]	8 µM in DMSO
Silvestrol	[MedChem Express]	10-100 nM in DMSO
Rocaglamid	[Sigma]	5-200 nM in DMSO
Cymarin	[Sigma]	100 nM in DMSO

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 Primer

Primer für cDNA-Synthese

Hierfür wurde ein Gemisch aus randomisierten Primern [Roche] verwendet.

Primer für quantitative Echtzeit-PCR (RQ-PCR)

Alle aufgelisteten Primer wurden von den Firmen Invitrogen oder Operon synthetisiert und entstammten der Oligodatenbank des Labors.

fwd = forward; rev = reverse

Gen	Sequenz (5'→ 3' Richtung)
<i>B2M</i> (β2-Mikroglobulin)	<i>fwd:</i> GTGCTCGCGCTACTCTCTC <i>rev:</i> GTCAACTTCAATGTCGGAT
<i>BAX</i>	<i>fwd:</i> ATGTTTTCTGACGGCAACTTC <i>rev:</i> ATCAGTTCCGGCACCTTG
<i>CCND1</i>	<i>fwd:</i> GCTGTGCATCTACACCGACA <i>rev:</i> TTGAGCTTGTTACCAGGAG
<i>CDC25A</i>	<i>fwd:</i> CCCAAACTCCACTACCCTGA <i>rev:</i> TCGGAACTTCTTCAGGTCT
<i>CDKNA1 (p21)</i>	<i>fwd:</i> CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG <i>rev:</i> CATGGGTTCTGACGGACAT

<i>EGFR</i>	<i>fwd:</i> GAACATCACCTGCACAGGAC <i>rev:</i> GGGCCGTCAATGTAGTGG
<i>EPHB1</i>	<i>fwd:</i> GGAGGCAGACAACACTGTCA <i>rev:</i> GAACAATGCCACCTTGGAGT
<i>ERBB3 (HER3)</i>	<i>fwd:</i> CACAATGCCGACCTCTCC <i>rev:</i> CACGAGGACATAGCCTGTCA
<i>HBP1</i>	<i>fwd:</i> AACCAGCCTTCCCTCATCA <i>rev:</i> GACATGCAGAAAATGCCAGA
<i>IGFR1</i>	<i>fwd:</i> AAAAAACCTTCGCCTCATCCT <i>rev:</i> TGGTTGTCGAGGACGTAG
<i>INSR</i>	<i>fwd:</i> ACACGATGAATTCCAGCAACT <i>rev:</i> CGATGGTCTTCTCGCCTT
<i>MUC2</i>	<i>fwd:</i> CAAGATCTTCATGGGGAGGA <i>rev:</i> GAACACGGTGGTCCTCTTGT
<i>MYC</i>	<i>fwd:</i> CACCAGCAGCGACTCTGA <i>rev:</i> GATCCAGACTCTGACCTTTTG
<i>ODC1</i>	<i>fwd:</i> AAAGTTGGTTTTGCGGATTG <i>rev:</i> CGAAGGTCTCAGGATCGGTA
<i>PCNA</i>	<i>fwd:</i> TGGAGAACTTGGAAATGGAAA <i>rev:</i> GAACTGGTTCATTCATCTCTATGG

2.4.2 siRNA

Die RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon entworfen und synthetisiert. Verwendet wurde jeweils ein Gemisch aus 4 siRNAs (*ON-TARGETplus SMARTpool*):

siFOXO3A *siGENOME set of 4*
siMYC *siGENOME set of 4*

Als Kontrolle diente:

siCONTROL *siGENOME control*
(*ON-TARGET plus Non-Targeting Pool*)

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper für Immunoblot

Antikörper	Firma, K.-Nr.	Spezies	Verdünnung
anti-BCL2	Santa Cruz, sc-783	Kaninchen, monoklonal	1:1.000
anti-Caspase 3 (8G10)	Cell Signaling, cs-9665	Kaninchen, monoklonal	1:1.000
anti-cleaved-PARP (Asp214)	BD, 51-9000017	Maus, monoklonal	1:1.000
anti-c-MYC (N262)	Santa Cruz, sc-764	Kaninchen, polyklonal	1:1.000
anti-c-MYC (9E10)	eigene Herstellung	Maus, monoklonal	1:500- 1:1.000
anti-c-MYC (c33)	Santa Cruz, sc-42	Maus, monoklonal	1:2.000
Anti-c-RAF	Cell Signaling, cs-9422	Kaninchen, polyklonal	1:1.000
anti-FOXO3A (H-144)	Santa Cruz, sc-11351	Kaninchen, polyklonal	1:1.000
anti-MCL1 (S-19)	Santa Cruz, sc-819	Kaninchen, polyklonal	1:1.000
anti-phospho-c-RAF (Ser338)	Cell Signaling, cs-9427	Kaninchen, polyklonal	1:1.000
anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling, cs-9101	Kaninchen, polyklonal	1:1.000
anti-phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	Cell Signaling, cs-9121	Kaninchen, polyklonal	1:1.000
anti-phospho-S6 (S240/244)	Cell Signaling, cs-2215	Kaninchen, polyklonal	1:1.000
anti-Vinculin	Sigma Aldrich, V9131	Maus, monoklonal	1:10.000

2.5.2 Sekundärantikörper für Immunoblot

Antikörper	Firma, K.-Nr.	Spezies	Verdünnung
anti-Maus-IgG-HRP	Amersham, NA931	Schaf, gekoppelt an die Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase, HRP</i>)	1:10.000
anti-Kaninchen-IgG- HRP	Amersham, NA934	Esel, gekoppelt an die Meerrettich-Peroxidase	1:10.000

2.6 Molekulargewichtsstandard

Protein Marker:

PageRuler™ Prestained Protein Ladder [Fermentas]

2.7 Lösungen

Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid [Roth]
Ammoniumpersulfat (APS)	10% (w/v) gelöst in dH ₂ O [Sigma]
Annexin V-FITC	[BD Bioscience]
Bovines Serumalbumin (BSA)	2mg/ml gelöst in dH ₂ O [PAA]
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	dATP, dCTP, dGTP, dTTP [Sigma] Stammlösung mit je 100mM
Dimethylsulfoxid (DMSO)	[Merck]
Dithiothreitol (DTT)	0,1M [Sigma]
Mercaptoethanol (99%)	[Roth]
M-MLV RT Puffer (5×)	[Promega]
Penicillin/Streptomycin	100 × Konzentrat [PAA]
Phosphataseinhibitor	[Sigma], eingesetzt 1:100
Propidiumiodid	[Sigma]
Proteaseinhibitoren-Mix	20 mg/ml gelöst in DMSO [Sigma],

	eingesetzt 1:1.000
RiboLock RNase Inhibitor	[Thermo Scientific]
Steriles Wasser	aqua ad injectabilia [B. Braun]
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	[Applichem]
TRIzol Reagenz	[Invitrogen]
Trypsin-EDTA	0,25% (w/v) Trypsin 5 mM EDTA 22,3 mM Tris (pH 7,4) 125 mM NaCl

2.8 Puffer

Annexin V Binding Puffer	10 mM HEPES (pH 7,4) 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂
Antikörperpuffer	5% (w/v) BSA 0,02% (w/v) Natriumazid (NaN ₃) gelöst in TBS-T
Blockierungslösung	5% (w/v) Magermilchpulver [Merck] gelöst in TBS-T
Kristallviolettlösung	0,1% Kristallviolett in dH ₂ O
3 × Laemmli Probenpuffer	0,125 M Tris-HCl (pH 6,8) 20% (v/v) Glycerin 10% (v/v) Mercaptoethanol 4% (w/v) SDS 0,004% (w/v) Bromphenolblau
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄

	1,76 mM KH_2PO_4
PI-FACS-Puffer	38 mM Natriumcitrat 54 μM Propidiumiodid 24 $\mu\text{g/ml}$ RNase A
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris (pH7,4) 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat 0,1% (w/v) SDS
Sammelgel 4%	0,6 ml Acrylamidstammlösung 1,13 ml Tris-HCl (0,5M, pH 6,8) 47 μl ml SDS 10% 47 μl APS 10% 4,7 μl TEMED in 2,8 ml dH_2O gelöst
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Strippingpuffer	62,5 mM Tris (pH 6,7) 2% SDS 0,7% (v/v) β -Mercaptoethanol
Tankblot-Puffer (10 \times)	1,7 M Glycin 0,25 M Tris-Base 0,25% (v/v) SDS (10%) gelöst in dH_2O pH 8,0 mit HCl
Verwendung	1 \times Tankblot-Puffer mit 15% (v/v) Methanol (MeOH)
TBS-T	25 mM Tris (pH 7,4)

	140 mM NaCl
	0,2% (v/v) Tween-20
Trenngel 10%	4,8 ml Acrylamidstammlösung
	3,5 ml Tris-HCl (1,5 mM, pH 8,8)
	0,140 ml SDS 10%
	0,140 ml APS 10%
	0,014 ml TEMED (0,1%)
	in 5,6 ml dH ₂ O gelöst

2.9 Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden Produkte in Analysequalität oder in Qualität für die Molekularbiologie der Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Invitrogen, AppliChem, Gibco, Roche und PAA verwendet.

2.10 Enzyme und Kits

M-MLV Reverse Transkriptase	[Promega]
SYBR Green qPCR Master Mix	[Thermo Scientific]
Quick Start Bradford Protein Assay	Bradford Reagenz [Biorad]
Immobilon Western Cemiluminescent HRP Substrate	Entwicklerlösung [Millipore]
Lipfectamine TM RNA _i MAXX	Transfektionsreagenz [Invitrogen]
RNAse-freies DNase Set	[Quiagen]
RNeasy Kit	RNA Aufreinigung [Quiagen]

2.11 Verbrauchs- und Zellkulturmaterialien

Verbrauchsmaterialien, wie z. B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen oder Zellkulturmaterial wurden von den Firmen Applied Biosystems, StarLab, Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt und BD Bioscience bezogen.

2.12 Technische Instrumente und Zubehör

Sterilarbeitsbank	HeraSafe [Heraeus]
Zellkulturinkubator	BBD 6220 [Heraeus]
Zellzähler	CASY Zellzähler [Innovatis]
Mikroskop	Axiovert 40CFL [Zeiss]
Zentrifugen	Sorvall RC-5B Zentrifuge [DuPont Instruments] Zentrifuge 5417R [Eppendorf] Megafuge 1.0 R mit Cytospineinsätzen [Heraeus]
Schüttelinkubator	Model G25 [New Brunswick Scientific]
Wasserbad	Julabo 5M-5M Bad/Umwälzthermostat [Julabo]
Heizblock	Dry Bath System [StarLab]
Blottingapparatur	Mini Trans-Blot [Bio-Rad] Mini Wet Blot [Biotech Service Blu]
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel [Bio-Rad] Mini-PROTEAN Tetra Cell [Bio-Rad]
Blotting-Filterpapier	[Schleicher und Schuell]
PVDF-Membran	Immobilon-P-Transfer Membran [Millipore]
Entwicklermaschine	LAS-4000 mini [Fujifilm Global]
Photospektrometer	NanoDrop 1000 [Thermo Scientific] Ultrospec 3100 pro UV/Visible [Amersham]
RQ-PCR-Gerät	MXp3000P qPCR System [Stratagene]
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II [BD Biosciences]

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Arbeiten an Zellen zur fortgesetzten Kultur wurden unter einer Sterilarbeitsbank durchgeführt. Die Kultivierung der adhärennten Zelllinien erfolgte jeweils in 6 cm, 10 cm oder 15 cm Zellkulturschalen mit entsprechend 5 ml, 10 ml oder 15 ml Vollmedium, wobei für die Zelllinie SW620 Leibovitz-Medium, für LS174T RPMI-Medium und für SW480 und HCT116 DMEM-Medium mit jeweils 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet wurde.

Die Inkubation erfolgte stets bei 37°C, 5% CO₂ und relativer Luftfeuchte von 95% im Begasungsinubator.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80% wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin abgelöst. Nach ca. 5 min Inkubation bei 37°C erfolgte die Resuspension der Zellen in 8 ml Vollmedium und somit Inaktivierung des Trypsins. Je nach gewünschter Verdünnung wurde ein bestimmtes Aliquot der Zellsuspension auf eine neue Kulturschale überführt und dieses mit entsprechender Menge Vollmedium aufgefüllt.

Zur Aussaat einer bestimmten Zellzahl erfolgte die Bestimmung der Zell-Konzentration mittels CASY-Zellzähler [Innovatis] und anschließender Berechnung des zu überführenden Suspensionsvolumens.

3.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert, die Resuspension in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert (4 min, 2000 rpm, RT). Das Pellet wurde anschließend in 2 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und

schließlich bei -80°C gelagert. Die längerfristige Aufbewahrung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Um die Zellen aufzutauen und erneut zu kultivieren, wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die Zellen wurden in frisches, vorgelegtes Vollmedium überführt und zur Entfernung des DMSO-enthaltenden Einfriermediums zentrifugiert (4 min, 2000 rpm, RT). Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in Vollmedium resuspendiert und auf Zellkulturschalen ausgesät, wobei nach 12-24 h ein Mediumwechsel erfolgte.

3.1.4 Ernten von Zellen

Folgende Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und erneut 1 ml PBS in die Zellkulturschale gegeben. Der Zelllayer wurde nun mithilfe eines Zellschabers abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Bei Bedarf erfolgte die Aufteilung der Suspension zu je ca. 0,5 ml in zwei getrennte Röhrchen für nachfolgende Protein- bzw. RNA-Extraktion. Es folgte die Zentrifugation bei 3500 rpm und 4°C für 5 min. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet weiterer Verarbeitung zugeführt oder bei -80°C gelagert.

3.1.5 Kristallviolett-Färbung und Bestimmung der GI_{50}

Zur Bestimmung der Zelldichte auf Kulturschalen als Korrelat zur Proliferationsfähigkeit erfolgte die Färbung mit dem Triphenylmethan-Farbstoff Kristallviolett. Hierzu wurden die Zellen in identischer Zellzahl ausplattiert und nach 24 h je nach Versuchsregime behandelt. Bei Erreichen der Konfluenz einer der Schalen erfolgte die Kristallviolett-Färbung aller Schalen für eine vergleichende Beurteilung. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend für 15 min in 70% Ethanol fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden für 30 min in Kristallviolett-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde überschüssiger Farbstoff in einem Wasserbad abgewaschen und die gefärbten Kulturschalen über Nacht getrocknet. Schließlich wurde das Ergebnis fotodokumentiert.

Als Maß für die antiproliferative Aktivität eines Inhibitors dient die GI_{50} (*growth inhibition of 50%*), definiert als diejenige Wirkstoffkonzentration, die zu einer Hemmung des Zellwachstums um 50% führt. Zur Bestimmung dieser wurden Zellen in identischer Zahl ausplattiert und mit aufsteigenden Konzentrationen eines Inhibitors behandelt. Bei Beinahe-Konfluenz der Kontrollzellen wurden die Schalen wie oben beschrieben mit Kristallviolett gefärbt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Farbdichte der Platten in Form von Graustufen mittels *ImageJ*. Die jeweiligen Werte als korrelierendes Maß zur Zelldichte unter den verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen wurden jeweils in Relation zum Dichtewert der Kontrollzellen gesetzt und somit die Konzentration bei 50%-iger Zelldichte als GI_{50} ermittelt.

3.1.6 Wachstumskurve

Zur Darstellung einer Wachstumskurve wurden Zellen in identischer Zellzahl mehrfach ausplattiert und nach 24 h je nach Versuchsregime behandelt. Anschließend wurde die Zahl der im Zellverband haftenden, somit lebenden Zellen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen mit Hilfe des CASY-Zellzählers bestimmt. Dazu wurden Mittelwert und Standardabweichung der Zellzahlen von jeweils drei Schalen pro Bedingung und pro „Zähltag“ gebildet und graphisch dargestellt.

3.1.7 Transfektion von doppelsträngigen Oligonukleotiden (siRNA)

Die Transfektion von synthetischen *short interfering-RNAs* (siRNA) erfolgte unter Verwendung der Lipidtransfektinsreagenz LipofectamineTM RNAiMAX [Invitrogen]. Zunächst wurden die Zellen 24 h vor Transfektion auf 6 cm-Schalen ausplattiert und das Vollmedium spätestens 1 h vor Transfektion durch Antibiotika-freies Medium (mit 10% FBS) ersetzt. Ziel bei Transfektion war eine Endkonzentration von 25 nM siRNA und 0,25% Lipofectamine. Hierzu wurden 5 μ l einer 20 μ M-siRNA-Stocklösung und 10 μ l der Transfektionsreagenz in jeweils 400 μ l Opti-MEM I-Medium [Invitrogen] verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Beide Lösungen wurden anschließend vermischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Dieser Transfektionsmix wurde schließlich in 3,2 ml Medium (ohne Antibiotika) auf die Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel zu

Vollmedium und weitere 24 h später die Behandlung der Zellen je nach Versuchsregime. Die Zellen wurden 48-72 h nach Transfektion geerntet.

3.1.8 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)

Der fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) besitzt die Eigenschaft, in DNA zu interkalieren und ermöglicht auf diese Weise die Bestimmung des DNA-Gehalts einer Zelle. Mit der PI-Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) kann somit in einer bestimmten Zellpopulation die Verteilung der Zellzyklusphasen, welche jeweils einen unterschiedlichen DNA-Gehalt aufweisen (G1/G0: 2N, S: >2N, <4N, G2/M: 4N), gezeigt werden. Die „sub-G1“-Population repräsentiert apoptotische Zellen mit einem DNA-Gehalt von <2N.

Das Zellkulturmedium mit enthaltenen apoptischen Zellen wurde in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und die adhären Zellen mit Trypsin abgelöst und anschließend wieder im Zellkulturüberstand resuspendiert. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (400 x g, 5 min, 4°C) und Entfernung des Überstands, wurden die Zellen mit 10ml kaltem PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 1 ml kaltem PBS resuspendiert. Zur Fixation der Zellen wurden diese unter Vortexen tropfenweise zu kaltem Ethanol (100%) gegeben. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bei -20°C gelagert und 1-2 h vor Messung auf die Färbung vorbereitet. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert (400 x g, 10 min, 4°C), in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (400 x g, 5 min, 4°C). Das Pellet konnte schließlich in PI-Färbelösung aufgenommen werden und die Proben wurden vor der Messung bei 37°C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und mit einem 585 ± 21 nm-Bandpassfilter (Detektor FL2) für Propidiumiodid (Emission 617 nm). Zur Messung und Analyse der Zellzyklusverteilung wurde das Programm *BD FACSDiva 6.1.2* verwendet.

3.1.9 Annexin V-/Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (Annexin V-/PI-FACS)

Die Färbung der Zellen mit Annexin V dient der Detektion apoptotischer Zellen (146). Annexin V ist ein Ca²⁺-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen

Affinität für Phosphatidylserin (147). In frühen Apoptose-Stadien findet die Translokation von Phosphatidylserin, welches normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, auf die Außenseite der Zellmembran statt. Bei jedoch nekrotischen Zellen mit durchlässiger Membran, kann Annexin V in die Zellen eindringen und an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung mit Annexin V, apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Propidiumiodid (PI) gelangt nur in Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran und färbt somit nekrotische bzw. spät-apoptotische Zellen. Man kombiniert daher die Annexin V-Markierung mit einer PI-Färbung.

Lebende Zellen sind dabei Annexin V-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin V-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin V-positiv und PI-positiv.

Die mit Trypsin geernteten Zellen inklusive Zellkulturüberstand wurden nach Zentrifugation (250 x g, 5 min, 4°C) mit PBS gewaschen und in 100 µl Annexin V-Bindepuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl FITC (*Fluoresceinisothiocyanat*)-markiertem Annexin V erfolgte die Inkubation für 15 min bei RT. Anschließend wurden die Proben mit weiteren 300 µl Annexin V-Puffer aufgefüllt und der Messung am Durchflusszytometer zugeführt. Die Gegenfärbung mit 5 µl PI erfolgte unmittelbar vor der FACS-Messung.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Zellyse

Für die Lysierung der Zellmembranen wurde RIPA-Puffer, versetzt mit 1:1000 Protease-Inhibitor und 1:100 Phosphatase-Inhibitor, verwendet.

Das Zellpellet wurde je nach Größe mit 40-80 µl RIPA-Puffer resuspendiert und für mindestens 30 min unter regelmäßigem Vortexen auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des Lysats (14000 rpm, 10 min, 4°C) und die Überführung des Überstands mit enthaltendem Protein in ein neues Probenröhrchen. Die Proteinlysate wurden entweder direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit der photometrischen Methode nach Bradford (1976) (148). Grundlage ist der Farbumschlag des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 bei Vorliegen der unprotonierten, blauen Form durch Komplexbildung mit Proteinen.

Hierzu wurden 1 µl Proteinlysate zu 1 ml Bradford-Lösung in Küvetten gegeben, gut gemischt und die Absorption am Photometer bei 595 nm bestimmt. Dies erfolgte pro Proteinlysate zweimalig in getrennten Küvetten, um einen Mittelwert beider gemessenen optischen Dichte-Werte zu generieren. Die Berechnung der Proteinkonzentration aus der optischen Dichte erfolgte mittels linearer Regression einer Standardkurve, welche anhand von Proben mit bekannten Protein (BSA)-Konzentrationen erstellt wurde.

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde durch Zugabe von RIPA-Puffer einander angepasst.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) (149) durchgeführt.

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten dadurch eine, zu ihrem Molekulargewicht proportionale, negative Ladung. Unter Anlage einer elektrischen Spannung werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix somit nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

Für die Proben wurden je nach Versuch 10-40 µg Protein mit 3x-Laemmli-Probenpuffer versetzt und mit 1x-Laemmli für eine ausreichende Gesamtmenge aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C aufgekocht und das Protein somit denaturiert.

Die Probentaschen im Sammelgel wurden mit je 20 µl der Proteinproben befüllt, als Proteinmarker wurden 3 µl *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* [Fermentas] verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelkammer. Unter Anlage einer Spannung von 80 V wurden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 4%

Polyacrylamid konzentriert und anschließend bei 120 V in einem 10%-igen Trenngel aufgetrennt.

3.2.4 Western Blot

Gemäß Towbin et al. (1979) (150) wurde das Proteinmuster des Gels mithilfe des Tankblot-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierzu wurden Schwämme, Whatman-Papier, PVDF-Membran in Blotting-Puffer getränkt und mit dem Polyacrylamid-Gel in einer Blotting-Kassette geschichtet. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlage eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel in einem mit Tankblotpuffer gefülltem Tankblot bei 250 mA und 4°C für ca. 3 h.

Die entnommene PVDF-Membran wurde in Methanol und dH₂O geschwenkt und dreimalig in TBS-T gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die Inkubation in Blockierungslösung (5% Milch-Lösung in TBS-T) für 30-60 min bei RT mit anschließend weiteren drei Waschschritten in TBS-T.

Nach gewünschtem Zuschnitt der Membran entsprechend der zu detektierenden Proteine, wurde diese mit dem Primär-Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Schwenktisch inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Peroxidasegekoppeltem Sekundär-Antikörper in Milchlösung für 2 h bei RT, vorher und nachher wurden die Membranzuschnitte erneut dreimal mit TBS-T gewaschen.

Zur Darstellung der Proteinbanden wurden die Membranzuschnitte mit Entwicklerlösung bedeckt und die entstandene Chemilumineszenz mittels der Entwicklermaschine LAS-400 detektiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA aus Zellen erfolgte unter Verwendung von *TRIzol*-Reagenz [Invitrogen] nach empfohlenem Protokoll. Das Zellpellet wurde in 1 ml *TRIzol* resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform mit gründlicher Durchmischung, erneuter Inkubation für 3 min bei RT wurde die Probe zentrifugiert (12000 rpm, 10 min, 4°C). Die obere, wässrige Phase wurde mit

Filterpipettierspitzen in ein neues Probenröhrchen überführt, in welches 500 μ l Isopropanol vorgelegt wurde. Zur Präzipitation der RNA wurde die Probe 20 min bei 20°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, 4°C), wobei der Überstand verworfen wurde. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75%-Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 30 μ l RNase-freiem Wasser gelöst.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde mittels Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm am *NanoDrop* Spektralphotometer durchgeführt. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit (1 $A_{260\text{nm}}$) einer Einzelstrang-RNA-Konzentration von 40 ng/ μ l. Der Absorptionsquotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ sollte im Hinblick auf die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure betrachtet werden, wobei kontaminationsfreie RNA ein Verhältnis von 1,9-2,1 aufweist.

3.3.3 cDNA-Synthese

Die in der isolierten Gesamt-RNA enthaltene *messenger*-RNA (mRNA) wurde mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurden 2 μ g RNA eingesetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 10 μ l bzw. 20 μ l verdünnt. Diese wurde für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend für 10 min auf 4°C gekühlt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Während dieses Schrittes wurde der vorbereitete cDNA-Syntheseansatz dazu pipettiert:

10 μ l	5xM-MLV Puffer
5 μ l	DTT (0,1 M), 5 μ l dNTPs (2,5 mM),
2 μ l	Zufallshexanukleotid-Primer p(dN)6 (2 mg/ml)
0,2 μ l	<i>RiboLock</i> RNase Inhibitor
1 μ l	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)
ad 16,8 μ l	Nuklease-freies Wasser

Es erfolgte die cDNA-Synthese nach folgendem Protokoll:

10 Minuten bei 22°C

50 Minuten bei 37°C

15 Minuten bei 70°C

Abkühlen auf 4°C

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Quantitative Echtzeit-PCR (*real-time quantitative PCR*, RQ-PCR)

Zur Quantifizierung von mRNA diente die Amplifikation der cDNA mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RQ-PCR).

Es wurde 1 µl cDNA je Probe in eine 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt und folgender PCR-Reaktionsansatz zugegeben:

5 µl	SYBR Green Mix
1 µl	Primer Mix (5' und 3' Primer, 10 µM)
13 µl	Nuklease-freies Wasser

Jede Probe wurde als Triplikat gemessen, um Mess- und Pipettierfehler durch Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung zu korrigieren.

Die fertig befüllte PCR-Platte wurde mit einer Klebefolie verschweißt und die Proben durch kurze Zentrifugation am Boden der Vertiefungen gesammelt.

Die Amplifikation der cDNA durch die RQ-PCR-Maschine erfolgte nach folgendem Temperatur-/Zeitprofil:

1 Zyklus:	95°C	15 Minuten
38 Zyklen:	95°C	30 Sekunden
	60°C	20 Sekunden
	72°C	15 Sekunden
1 Zyklus:	95°C	1 Minute
	60°C	30 Sekunden
	95°C	30 Sekunden

Ein erster Durchlauf erfolgte unter Verwendung des Primers für β 2-Mikroglobulin (β 2M) als sog. *housekeeping*-Gen (nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen). Erbrachte dies abweichende Ct-Werte (*cycle threshold*, amplifikations-bedingter Schwellenwert

des exponentiellen Fluoreszenzanstiegs über den Hintergrundwert) der Proben, wurde ein Konzentrationsausgleich der cDNA vorgenommen. Danach erfolgte ein entsprechender Durchlauf für das untersuchte Zielgen parallel zum Referenzgen $\beta 2M$. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte anhand des gemessenen Ct-Werts unter Voraussetzung gleicher Amplifikationseffizienz von 1 und jeweils unter Normalisierung auf $\beta 2M$.

Nach der relativen Ct-Methode wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\text{Relative Expression (n-fach)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{wobei } \Delta Ct = Ct_{(\text{Zielgen})} - Ct_{(\beta 2M)}$$

$$\text{und } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{Exp.-Probe})} - \Delta Ct_{(\text{Ktr.-Probe})}$$

4 Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse wurden im Wesentlichen veröffentlicht in *Cancer Discovery* - 2015 - 5(7), 768-781.

4.1 Duale PI3K/mTOR-Hemmung in Kolonkarzinomzellen führt zu einer verstärkten MYC-Expression

Durch die in der Literatur beschriebene, bedeutende Rolle von *MYC* im kolorektalen Karzinom erscheint eine Herunterregulation dessen Expression als vorrangiges Ziel bei therapeutischen Ansätzen (siehe Abschnitt 1.3).

Eine Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges ließe ein vermindertes MYC-Proteinlevel erwarten, zum einen durch Hemmung der Proteinbiosynthese, zum anderen durch Stabilitäts-mindernde, posttranslationale Regulation (siehe Abschnitt 1.4).

Es erfolgte die Behandlung der Kolonkarzinomzelllinie SW480 mit 10 nM bzw 100 nM des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors BEZ235 für 24 h, wobei als Kontrollgruppe DMSO-behandelte Zellen dienten.

Eine erfolgreiche Hemmung des Signalweges durch BEZ235 konnte bereits bei 10 nM durch Rückgang der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 an Serin 240/244 gezeigt werden (Abbildung 4.1 A). Es fanden sich jedoch erhöhte MYC-Proteinlevel nach Inkubation mit BEZ235 bei beiden Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Neben Hochregulation von MYC auf Proteinebene, ließ sich eine MYC-Induktion auch auf Transkriptionsebene durch 4- bis 5-fach erhöhte MYC-mRNA-Expression in BEZ235-behandelten SW480-Zellen nachweisen (Abbildung 4.1 B).

Ein entsprechender Effekt verstärkter MYC-Expression konnte vielfach für SW620-Zellen (Abbildung 4.8) und im Vorfeld dieser Arbeit für CACO2-Zellen gezeigt werden (151), sowie schwächer ausgeprägt in den Zelllinien HCT116 und LS174T (nicht dargestellt).

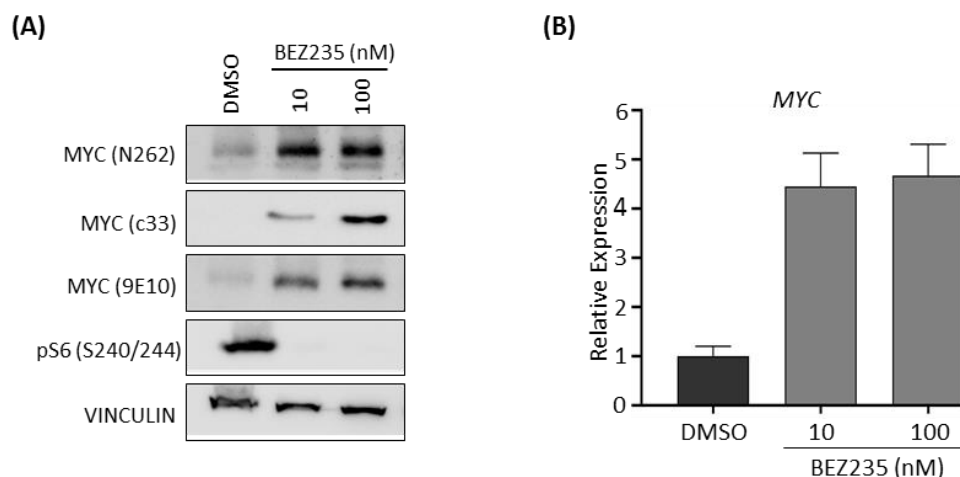


Abbildung 4.1: Gesteigerte Protein- und mRNA-Expression von MYC nach Behandlung mit BEZ235

(A) Behandlung mit BEZ235 induziert erhöhte MYC-Proteinlevel in SW480-Kolonkarzinomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 10 nM oder 100 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert und anschließend geerntet. Die Proteinmengen von pS6 (S240/244) und MYC wurden mittels Immunoblot bestimmt, wobei VINCULIN als Ladekontrolle verwendet wurde. Drei verschiedene Antikörper zur Detektion von MYC zeigten übereinstimmend erhöhte MYC-Proteinlevel nach BEZ235-Behandlung.

(B) Behandlung mit BEZ235 führt zu einer gesteigerten MYC-mRNA-Expression in SW480-Zellen. Die Zellen wurden mit 10 nM oder 100 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, deren RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Expression der MYC-mRNA wurde mittels RQ-PCR-Analyse bestimmt, wobei $\beta 2M$ als Referenzgen diente. Dargestellt sind jeweils Mittelwert + SD der relativen Expression.

4.2 BEZ235 führt zu einer Proliferationshemmung via G1-Arrest und Apoptose-Induktion in SW480-Zellen

Trotz verstärkter Expression des im Allgemeinen proliferationsfördernd wirkenden MYC, zeigen SW480-Zellen unter Behandlung mit BEZ235 eine deutliche Wachstumshemmung, wie sie bereits für verschiedene Zelllinien unter Behandlung mit BEZ235 beschrieben wurde (63). Durch Färbung mit Kristallviolett konnte der proliferationshemmende Effekt von BEZ235 dargestellt werden. Hierzu wurden SW480- und LS174T-Zellen in identischer Zellzahl ausplattiert, mit 150 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert und bei ca. 80 %-iger Konfluenz der Kontrollzellen fixiert. Die mit BEZ235 behandelte Gruppe zeigte eine deutlich reduzierte Zelldichte im Vergleich zur Kontrolle, wobei sich bei LS174T-Zellen nach 4 Tagen kontinuierlicher Behandlung in dieser Konzentration praktisch keine Zellen auf der Platte befanden (Abbildung 4.2 A).

Durch Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von BEZ235 wurde die GI_{50} (*growth inhibition of 50%*; Wirkstoffkonzentration, die zu einer Hemmung des Zellwachstums um 50% führt) von BEZ235 in SW480-Zellen bestimmt. Hierzu wurden ebenso identische Zellzahlen ausplattiert, mit aufsteigenden Konzentrationen BEZ235 bzw. DMSO behandelt und anschließend mit Kristallviolett gefärbt. Mittels *ImageJ* erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Farbdichte der Platten anhand von Graustufen, als Korrelat zur Zelldichte. Diese wurde für jede Konzentration in Relation zum Dichtewert der Kontrollzellen gesetzt, woraus sich eine GI_{50} um 18 nM BEZ235 in SW480-Zellen ergab (Abbildung 4.2 B).

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits die Induktion eines G1/G0-Arrest durch BEZ235 in Kolonkarzinomzellen durch M. Hüttenrauch/A. Wiegering nachgewiesen. Um das Ergebnis zu reproduzieren und diesen Effekt auch in der Zelllinie SW480 darzustellen, erfolgte eine Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung mittels Durchflusszytometrie Ethanol-fixierter, Propidiumiodid-gefärbter Zellen (PI-FACS), welche für 24 h mit BEZ235 bzw. DMSO inkubiert wurden. Diese zeigte eine deutliche Zunahme der sich in der G0/1-Phase des Zellzyklus befindenden Zellpopulation bei BEZ235-behandelten Zellen mit entsprechender Abnahme der S- und G2/M-Population im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei niedrigmolarer BEZ235-Behandlung mit 25 nM zeigte sich dieser Effekt moderater (Zunahme der G0/G1-Population von 57,5% auf 67,5%) im Vergleich zu einer ausgeprägten G0/1-Arretierung bei Behandlung mit 100 nM BEZ235 (Zunahme der G0/G1-Population von 57,5% auf 78%) (Abbildung 4.2 C).

Der Apoptose repräsentierende Anteil der Zellen in subG1-Phase im PI-FACS ändert sich nicht wesentlich nach BEZ235-Behandlung für 24 h. Mittels Annexin V-/PI-FACS konnte jedoch nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation mit 150 nM BEZ235 ein zeitabhängiger Anstieg des Anteils nicht viabler Zellen nachgewiesen werden. Es fanden sich erhöhte Fraktionen sowohl (früh-)apoptischer (Annexin +, PI -) als auch nekrotischer (Annexin +, PI +) Zellen (Abbildung 4.2 D). Zudem konnte mittels Immunoblot eine verminderte Menge des Proteins MCL-1, ein anti-apoptotisches Protein der BCL-2-Familie (152), nach Behandlung mit BEZ235 im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich in BEZ235-behandelten Zellen ein Anstieg des Apoptose-Markers *cleaved-*

PARP, der im Rahmen von Apoptose durch Caspasen inaktivierte Form des Proteins PARP (153) (Abbildung 4.2 E).

So konnte gezeigt werden, dass eine PI3K/mTOR-Inhibition durch BEZ235 in SW480-Zellen neben G1-Zellzyklusarrest eine gesteigerte Apoptoserate induziert.

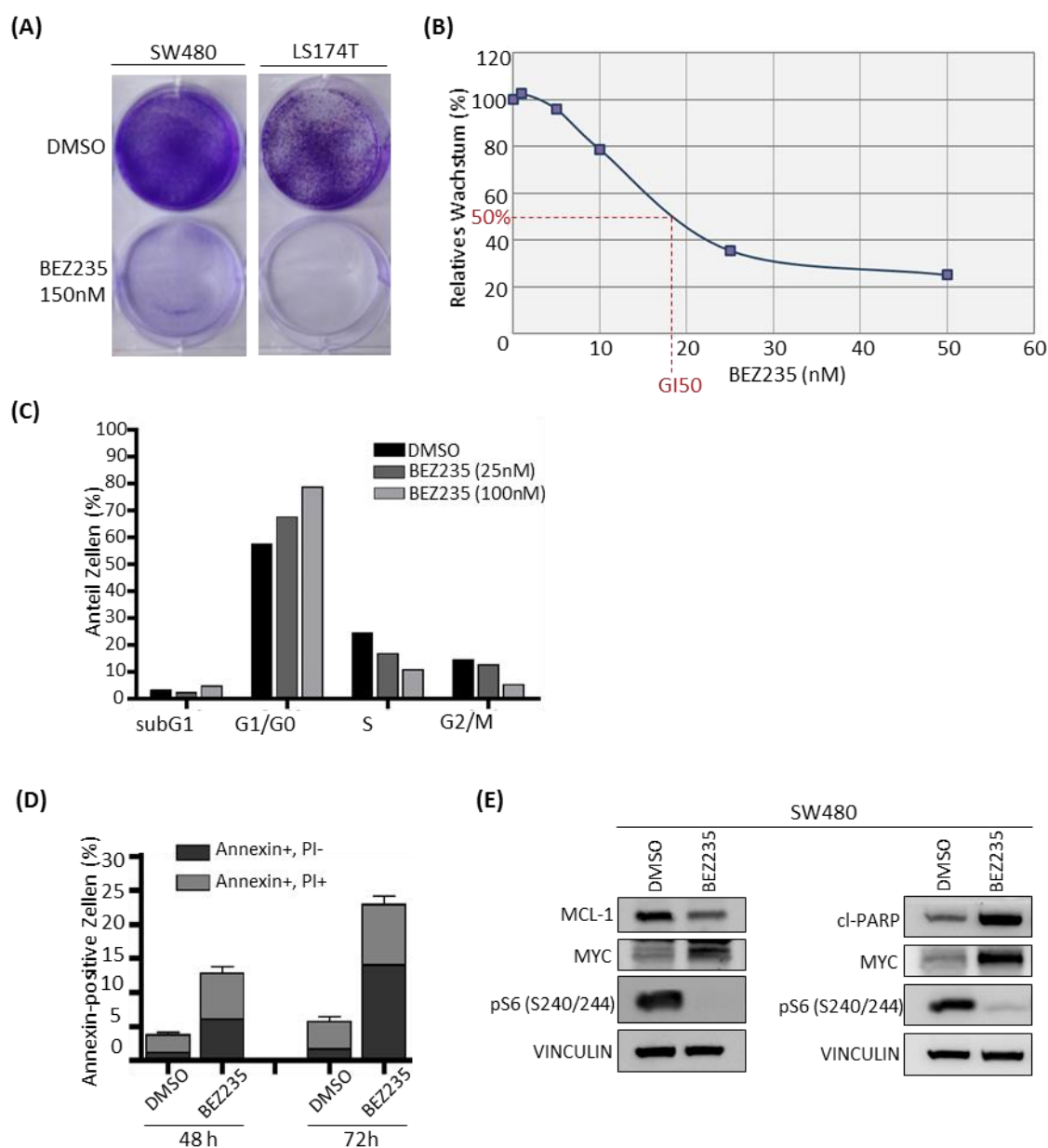


Abbildung 4.2: Proliferationshemmung in SW480 durch Behandlung mit BEZ235 via G1-Arrest und gesteigerter Apoptoserate

(A) Darstellung der Wachstumshemmung BEZ235-behandelter Zellen. Jeweils 50.000 SW480- und LS174T-Zellen wurden in 6 cm Schalen ausplattiert und nach 24 h mit 150 nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt. Bei Beinahe-Konfluenz der Kontrolle nach 4 Tagen kontinuierlicher Behandlung erfolgte die Fixierung und Kristallviolett-Färbung der Zellen zur Visualisierung der Zelldichte.

(B) Ermittlung der GI_{50} von BEZ235 in SW480-Zellen. Jeweils 50.000 Zellen wurden in 6 cm Schalen ausplattiert, nach 24 h mit 1, 5, 10, 25 oder 50 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 4 Tagen mit Kristallviolett gefärbt. Anschließend wurde die Farbdichte in Form von Graustufen mittels der Software *Image J* als Maß für die Zelldichte bestimmt. Dargestellt sind die Zelldichten unter der jeweiligen Inhibitor-Konzentration in Relation zur Dichte der Kontrollzellen als Prozentwerte. Es ergibt sich eine Wirkstoffkonzentration bei 50%-iger Wachstumshemmung (GI_{50}) von 18 nM.

(C) G1/G0-Arrest der Zellen durch BEZ235-Behandlung. SW480-Zellen wurden für 24 h mit 25 nM oder 100 nM BEZ235 bzw. DMSO inkubiert, anschließend in Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Mittels PI-FACS wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen analysiert und als prozentualer Anteil der Gesamtpopulation dargestellt.

(D) Apoptoseinduktion durch BEZ235-Behandlung. SW480-Zellen wurden für 48 h bzw. 72 h mit 150 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Die geernteten Zellen wurden mit Annexin V-FITC gefärbt und nach Gegenfärbung mit Propidiumiodid einer FACS-Analyse unterzogen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil apoptotischer (Annexin V +, PI -) bzw. nekrotischer (Annexin V +, PI +) Zellen als Mittelwert + SD biologischer Triplikate.

(E) Verminderte Expression des anti-apoptotischen Proteins MCL1 und Induktion des Apoptose-Markers *cleaved*-PARP durch BEZ235. SW480-Zellen wurden mit 150 nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt und nach 24 h geerntet. Nachweis der Proteinmengen von pS6 (S240/244), MYC, MCL1, *cleaved*-PARP (cl-PARP) bzw. VINCULIN als Ladekontrolle erfolgte mittels Immunoblot.

4.3 Zellzyklus-Inhibition und Apoptoseinduktion durch Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges erfolgt MYC-unabhängig

Es stellt sich die Frage, ob die Induktion erhöhter MYC-Proteinlevel den Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber der proliferationshemmenden Wirkung von BEZ235 verleiht. Um dies zu untersuchen, wurde in SW480-Zellen mittels siRNA-Transfektion ein MYC-Knockdown erzeugt und in dieser Situation erneut der Einfluss einer Inkubation mit BEZ235 auf die Zellzyklusphasenverteilung analysiert. Es wurde dabei zur Behandlung eine niedrigmolare BEZ235-Konzentration (25 nM) gewählt, unter der sich in den Vorversuchen bereits deutlich erhöhte MYC-Proteinlevel, jedoch nur ein moderater G1/G0-Arrest zeigte (siehe Abschnitt 4.1 und 4.2). Die Transfektion einer gegen MYC-mRNA gerichteten siRNA (*siMYC*) führte zwar nicht zu einer vollständigen Depletion von MYC-Protein, jedoch zu einem aufgehobenen BEZ235-induzierten Anstieg im Vergleich zu den mit einer Kontroll-siRNA (*siCTR*) transfizierten Zellen (Abbildung 4.3 A rechts). Eine Depletion von MYC allein ließe einen G1-Arrest erwarten, der Knockdown hier führte lediglich zu einer geringen, wenn auch signifikanten Zunahme der G1/G0-

Zellpopulation. Die 24-stündige Inkubation mit 25 nM BEZ235 in diesen Zellen führte allerdings nicht zu einer signifikant stärkeren Zunahme der Zellen in G1/G0-Phase als in den *siCTR*-transfizierten, hoch MYC exprimierenden Zellen (Abbildung 4.3 A, links). Somit ist der Einfluss MYCs auf die Zellzyklus-hemmende Wirkung von BEZ235 als nicht vordergründig zu sehen.

Um die Rolle MYC-induzierter Apoptose bei der Wirkung von BEZ235 zu untersuchen, wurde in SW480-Zellen, die auf gleiche Weise *siMYC*- bzw. *siCTR*-transfiziert und mit 150 nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt wurden, Proteinlevel des Apoptose-Markers *cleaved*-PARP detektiert. Die Depletion von MYC senkte das basale Proteinlevel von *cleaved*-PARP gegenüber den Kontrollzellen, ließ jedoch ebenso dessen Induktion durch Inkubation mit BEZ235 zu (Abbildung 4.3 B). Dies impliziert, dass BEZ235-induzierte Apoptose nicht bedingt durch MYC-Induktion stattfindet.

Dass durch PI3K/mTOR-Hemmung induziertes MYC jedoch transkriptionell aktiv vorliegt, wurde im Vorfeld dieser Arbeit durch Analyse des Expressionsmusters einer Vielzahl anerkannter MYC-Zielgene mittels cDNA-Microarray-Analyse gezeigt. Um die MYC-Abhängigkeit von Veränderungen beurteilen zu können, wurden dabei die Expressionsmuster verschiedener Gengruppen in *siMYC*-transfizierten und somit MYC-depletierten Zellen mit *siCTR*-transfizierten SW620-Zellen, jeweils für 24 h mit 200 nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt, verglichen. Nach Behandlung mit BEZ235 fanden sich Gengruppen mit entscheidender Rolle in Ribosomen-Funktion und Translation konsistent und MYC-abhängig hochreguliert, während sich Proliferations-assoziierte Gene im Einklang mit der Zellzyklus-arretierenden Wirkung von BEZ235 schwächer exprimiert fanden. Die verminderte Expression einiger solcher proliferationsassoziierten, normalerweise MYC-aktivierten Gene, trotz MYC-Induktion nach Behandlung mit BEZ235, wurde in SW480-Zellen mittels RQ-PCR verifiziert. In BEZ235-behandelten Zellen fanden sich konzentrationsabhängig supprimierte mRNA-Expressionslevel der für Progression des Zellzyklus und Zellwachstum entscheidenden Gene *CCND1* (*Cyclin D1*), *ODC1* (*Ornithin Decarboxylase 1*), *CDC25A* (*Cell division cycle 25A*), *PCNA* (*Proliferating cell nuclear antigen*) und des Mediators MYC-induzierter Apoptose, *BAX* (*Bcl-2-associated X protein*) (Abbildung 4.3 C).

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges trotz Induktion eines prinzipiell funktionalen, Translations-fördernden MYC-Proteins, MYC-unabhängig eine Proliferationshemmung bewirkt.

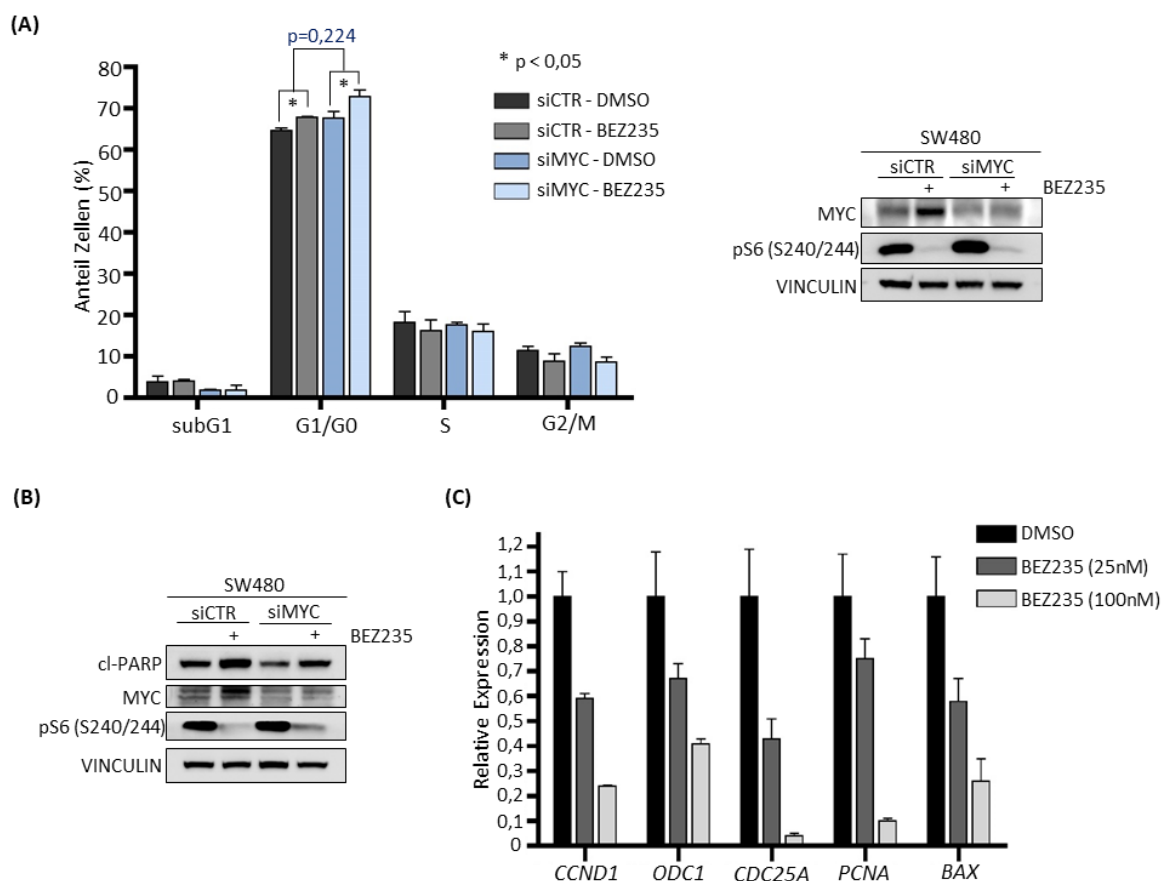


Abbildung 4.3: Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose durch BEZ235 erfolgt MYC-unabhängig

(A) Depletion von MYC beeinflusst nicht signifikant die Induktion eines G1/G0-Arrests durch BEZ235. SW480-Zellen wurden transient mit 25 nM *siMYC* bzw. einer Kontroll-siRNA (*siCTR*) transfiziert und 48 h später mit 25nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet, in Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Mittels PI-FACS wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen in biologischen Triplikaten analysiert und als prozentualer Anteil der Gesamtpopulation dargestellt (jeweils als Mittelwert + SD). Die Berechnung der Signifikanzniveaus (angegeben als p-values) erfolgte mittels Student's T-Test. (links)

Der zugrundeliegende MYC-Knockdown in den Zellen wurde mittels Immunoblot nachgewiesen (rechts).

(B) Depletion von MYC senkt Proteinlevel des Apoptose-Markers *cleaved*-PARP, beeinflusst jedoch nicht dessen Induktion durch BEZ235. SW480-Zellen wurden mit 150 nM BEZ235 behandelt und nach 24 h geerntet. Die Proteinmengen von pS6 (S240/244), MYC, cl-PARP und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot nachgewiesen.

(C) Verminderte Expression der MYC-Zielgene *CCND1*, *ODC1*, *CDC25A*, *PCNA* und *BAX* durch Behandlung mit BEZ235. SW480-Zellen wurden für 24 h mit 25 nM oder 100 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach Isolation der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese wurden mittels RQ-PCR die mRNA-

Expressionslevel von *CCND1*, *ODC1*, *CDC25A*, *PCNA* und *BAX* in technischen Triplikaten bestimmt, wobei β 2M als Referenzgen diente. Dargestellt sind Mittelwerte + SD der relativen Expression.

4.4 Duale PI3K/mTOR-Hemmung führt zu einer verstärkten Expression von Rezeptortyrosinkinasen und Aktivierung des MAPK-Signalweges

Eine kompensatorische Aktivierung zahlreicher überlebensfördernder Signalwege nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges, welche die Wirkung spezifischer Inhibitoren limitieren dürften, wurde bereits beschrieben (95). Besonders ein Feedback-Mechanismus zwischen dem PI3K/mTOR- und dem MAPK-Signalweg u. a. via Induktion von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wurde mehrfach gezeigt (94, 154, 155).

Um diesen Effekt in der hier untersuchten Zelllinien zu überprüfen, wurden SW480-Zellen für 24 h mit BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurden mittels RQ-PCR die mRNA-Expressionslevel von *INSR* (*Insulin Receptor*) und *IGF1R* (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*) bestimmt. Beide RTK zeigten nach BEZ235-Behandlung eine 2- bis 3-fach erhöhte Expression im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen (Abbildung 4.4 A).

Mittels Immunoblot wurden die Proteinlevel von Ser338-phosphoryliertem cRAF, Thr202/Tyr204-phosphoryliertem ERK1/2 und Ser217/221-phosphoryliertem MEK1/2 als Korrelate eines aktivierten MAPK-Signalweges nachgewiesen (siehe Abschnitt 1.6). Wie auch schon durch A. Wiegering und M. Hüttenrauch in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien sowie der Mammakarzinomzelllinie MDA gezeigt (dargestellt für HCT116, Abbildung 4.4 B, links), erfolgte nun auch in SW480-Zellen der Nachweis einer verstärkten Phosphorylierung und somit Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 durch Behandlung mit BEZ235 (Abbildung 4.4 B, rechts und Abbildung 4.6).

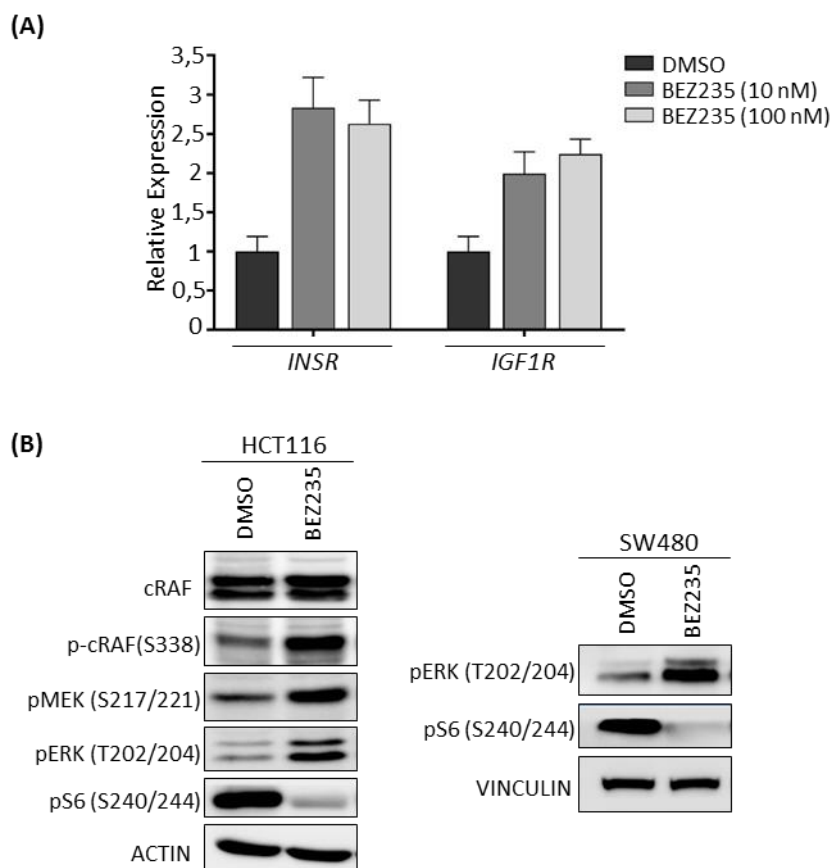


Abbildung 4.4: Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges induziert die Expression von Rezeptortyrosinkinasen und Aktivierung des MAPK-Signalweges

(A): Behandlung mit BEZ235 führt zu einer verstärkten Expression von *INSR* und *IGFR*. SW480-Zellen wurden für 24 h mit 10 nM, 100 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und im Anschluss deren RNA isoliert. Mittels RQ-PCR wurden die Expressionslevel von *INSR* und *IGFR* bestimmt, wobei $\beta 2M$ als Referenzgen diente. Dargestellt sind MW + SD (n=3) der relativen mRNA-Expression.

(B) Behandlung mit BEZ235 führt zu einer verstärkten Phosphorylierung der MAP-Kinasen RAF, MEK und ERK. HCT116-Zellen wurden mit 500 nM und SW480-Zellen mit 150 nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt und nach 24 h geerntet. Die Proteinmengen von pS6 (S240/244), cRAF, p-cRAF (S338), pERK (T202/204), pMEK (S217/221) und MYC wurden mittels Immunoblot nachgewiesen, wobei VINCULIN bzw. ACTIN als Ladekontrolle diente. Die Daten für HCT116 (links) entstammten der Arbeit M. Hüttenrauchs (143).

4.5 MYC-Induktion und RTK/MAPK-Aktivierung nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges ist abhängig von FOXO3A

Hemmung der PI3-Kinase führt über Hemmung von AKT zu einer Dephosphorylierung und somit Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren (90). Für die Behandlung mit BEZ235 konnte dieser Effekt für FOXO3A, dessen einhergehende Translokation in den

Zellkern und eine folgliche Aktivierung bekannter FOXO3A-Zielgene gezeigt werden (151).

FOXOs sind entscheidend beteiligt an einem negativen Rückkopplungs-Mechanismus des RTK/PI3K/AKT-Signalweges (104). So ist eine FOXO-abhängige Expression und Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen nach AKT-Inhibition beschrieben (94).

Um zu untersuchen, ob die BEZ235-induzierte Expression von RTK und MAPK-Aktivierung mit nachfolgender MYC-Induktion, durch FOXO3A vermittelt stattfindet, wurde mittels siRNA-Transfektion ein Knockdown von FOXO3A in SW480-Zellen erzeugt. In den erfolgreich *siFOXO3A*-transfizierten Zellen mit kaum mehr nachweisbarem FOXO3A-Proteinlevel, zeigte sich eine deutlich abgeschwächte MYC-Induktion unter Behandlung mit BEZ235 im Vergleich zu den mit einer Kontroll-siRNA (*siCTR*-) transfizierten Zellen. Eine Reduzierung von FOXO3A führte zu einer schwächeren Phosphorylierung von ERK an Thr202/204 unter BEZ235, was eine FOXO3A-abhängige Aktivierung des MAPK-Signalweges bestätigt (Abbildung 4.5 A).

Die beobachtete Induktion der Rezeptortyrosinkinasen *IGFR*, *INSR*, *HER3* durch Behandlung mit BEZ235 findet sich in den FOXO3A-depletierten Zellen verringert (Abbildung 4.5 B).

Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass die Induktion von MYC nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges abhängig ist von einer FOXO3A-Aktivierung mit einhergehender Induktion von Rezeptortyrosinkinasen und MAPK-Aktivierung.

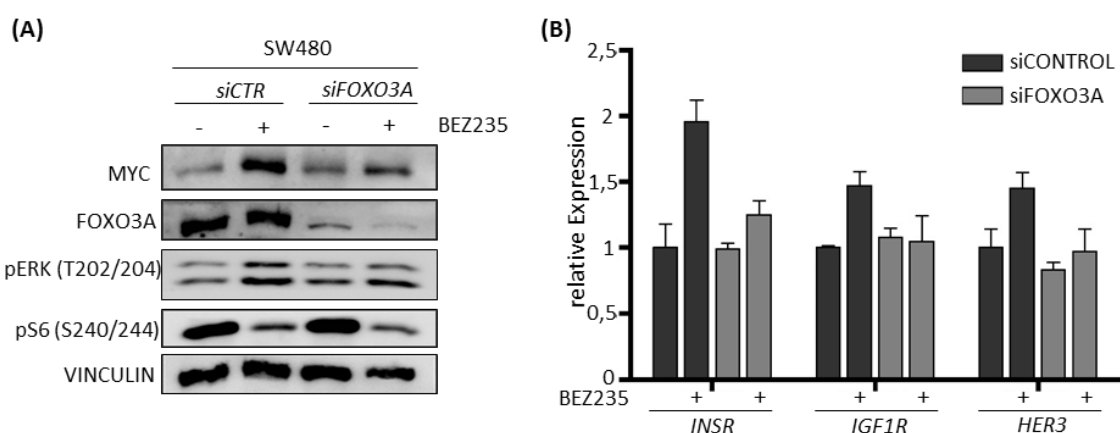


Abbildung 4.5: MYC-Induktion sowie Induktion von RTK und MAPK-Aktivierung nach PI3K/mTOR-Hemmung erfolgen FOXO3A-abhängig

SW480-Zellen wurden transient mit 25 nM *siFOXO3A* bzw. einer Kontroll-siRNA (*siCTR*) transfiziert und 48 h später mit 200nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet

(A) FOXO3A-Knockdown führt zu einer abgeschwächten MYC-Induktion und MAPK-Aktivierung durch BEZ235. Die Proteinlevels von FOXO3A, MYC, pERK(T202/204), pS6(S240/244) und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot nachgewiesen.

(B) FOXO3A-Knockdown verringert die Induktion von *IGFR*, *INSR* und *HER3* durch BEZ235. Nach Isolation der RNA und cDNA-Synthese wurde die Expression der Rezeptortyrosinkinasen *IGFR*, *INSR* und *HER3* in technischen Triplikaten mittels RQ-PCR bestimmt, wobei $\beta 2M$ als Referenzgen diente. Dargestellt sind Mittelwerte + SD der relativen Expression.

4.6 MYC-Induktion nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges ist bedingt durch einen aktivierten MAPK-Signalweg

Die Transkription von *MYC* steht über eine gemeinsame ETS/E2F-Bindungsstelle des *MYC*-Promoters unter der Kontrolle von ETS-Transkriptionsfaktoren (45). Diese wiederum werden entscheidend über Phosphorylierung durch MAP-Kinasen und Rezeptortyrosinkinasen-Aktivierung reguliert (156).

Um die Frage zu klären, ob die gesteigerte Expression von *MYC* nach PI3K/mTOR-Hemmung als Effekt eines aktivierten MAPK-Signalweg auftritt, wurde zur Blockade des MAPK-Signalweges zusätzlich der MEK1/2-Inhibitor UO126 angewandt (157). SW480 wurden entweder mit BEZ235 oder UO126 allein oder mit einer Kombination beider Wirkstoffe behandelt. Hemmung der MAPK-Aktivität durch UO126 verhinderte den BEZ235-induzierten *MYC*-Anstieg, was sowohl für die *MYC*-mRNA-Expression als auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte (Abbildung 4.6).

Dies lässt darauf schließen, dass eine – wie vorangehend gezeigt FOXO-abhängige – MAPK-Aktivierung den entscheidenden Mechanismus für die *MYC*-Induktion nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges darstellt.

Zudem konnte ein Anstieg des Apoptose-Markers *cleaved*-PARP in den kombiniert behandelten gegenüber den singulär behandelten Zellen nachgewiesen werden, was auf eine Steigerung des Apoptose-induzierenden Potentials durch kombinierte Hemmung der PI3K/mTOR- und MAPK-Signalwege hindeutet (Abbildung 4.6 B).

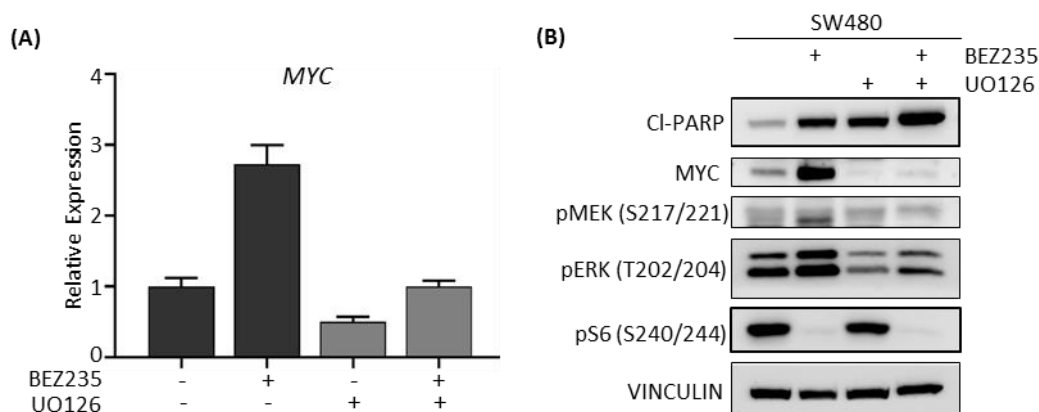


Abbildung 4.6: MYC-Induktion nach PI3K/mTOR-Hemmung ist Folge eines aktivierten MAPK-Signalwegs

(A) Verringerung der BEZ235-induzierten *MYC*-Expression bei gleichzeitiger MEK1/2-Hemmung. SW480-Zellen wurden für 24 h mit 200 nM BEZ235, 10 μ M UO126 oder einer Kombination beider Wirkstoffe bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die Expression von *MYC* mittels RQ-PCR bestimmt, wobei β 2M als Referenzgen diente. Dargestellt sind MW + SD der relativen mRNA-Expression.

(B) Verhinderung des BEZ235-induzierten *MYC*-Anstiegs bei gleichzeitiger MAPK-Hemmung. SW480-Zellen wurden mit 100 nM BEZ235, 10 μ M UO126 oder einer Kombination beider Wirkstoffe bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 48 h geerntet. Nachweis der Proteine pS6 (S240/244), pERK (T202/204), pMEK (S217/221), *MYC* und *cleaved*-PARP mittels Immunoblot, wobei VINCULIN als Ladekontrolle diente.

4.7 PI3K/mTOR-Hemmung induziert die Expression des MYC-bindenden FOXO-Zielgens *HBP1*

Ein kürzlich beschriebenes Zielgen von FOXO-Transkriptionsfaktoren ist der Tumorsuppressor *HBP1* (*HMG-Box Protein 1*) mit hemmendem Einfluss auf Zellwachstum und -proliferation. Dessen Regulation erfolgt PI3K/FOXO-abhängig über eine konservierte FOXO-Bindungsstelle im *HBP1*-Promoter (84). Das Gendprodukt *HBP1* ist ein MYC-bindendes Protein, das dessen transaktivierende Funktion als Transkriptionsfaktor hemmt, indem es die DNA-Bindung an Promotoren von MYC-Zielgenen verhindert (158).

In BEZ235-bahandelten SW480-Zellen zeigte sich ein 5- bis 6-fach erhöhtes Expressionslevel von *HBP1*-mRNA im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrollgruppe. Diese Induktion wird durch gleichzeitige MAPK-Hemmung durch UO126 nicht abgeschwächt und findet somit – übereinstimmend mit dem Model der FOXO-abhängigen Aktivierung – MAPK-unabhängig statt (Abbildung 4.7).

Nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges liegt somit neben der Induktion von MYC eine verstärkte Expression von *HBP1* vor, welches posttranslational inhibierend auf die MYC-Aktivität einwirken und so die proliferationshemmende Wirkung von BEZ235 unterstützen könnte.

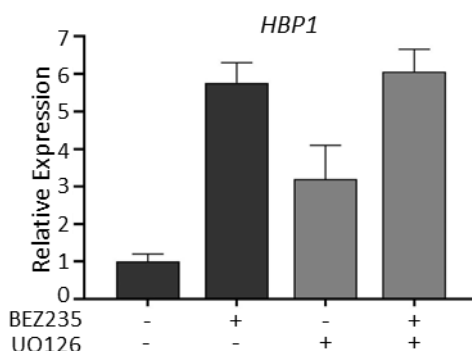


Abbildung 4.7: BEZ235 induziert MAPK-unabhängig eine erhöhte Expression von *HBP1*

SW480 Zellen wurden mit 200 nM BEZ235, 10µM UO126 oder einer Kombination beider Inhibitoren bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, deren Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mittels RQ-PCR wurden die Expressionslevel von *HBP1* in technischen Triplikaten bestimmt, wobei $\beta 2M$ als Referenzgen diente. Dargestellt sind Mittelwerte + SD der relativen Expression.

4.8 DNA-Demethylierung via 5-Aza-2'-deoxycytidin verringert die MYC-Expression in Kolonkarzinomzellen

Neben Mutationen können epigenetische Veränderungen, Ursache für veränderte Genexpression im KKK sein, insbesondere ein verändertes Methylierungsmuster CpG-Dinukleotid-reicher DNA-Sequenzen. Hypermethylierung von Promotoren resultiert so in einer Stilllegung bestimmter Gene (159), deren Häufung stellt ein Merkmal maligner Tumoren dar (160).

Folglich wäre denkbar, dass die MYC-Induktion in Kolonkarzinomzellen dadurch ermöglicht wird, dass bestimmte Faktoren aufgrund von Hypermethylierung inaktiviert vorliegen, welche physiologischerweise der Expression von MYC entgegenwirken würden.

Um den möglichen Einfluss einer Hypermethylierung von Genen auf die verstärkte MYC-Expression zu untersuchen, erfolgte die Behandlung der Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC). Dieses Nukleosid-Analogon als Inhibitor von DNA-

Methyltransferasen (DNMTs) führt zu Demethylierung und somit Aktivierung stillgelegter Gene (161).

In SW620-Zellen verhinderte eine 72-stündige Inkubation mit 8 μ M 5-AzadC die Induktion erhöhter MYC-Proteinlevel durch PI3K/mTOR-Hemmung (Abbildung 4.8 A, links) bei deutlich vermindertem Expressionslevel von *MYC*-mRNA in 5-AzadC-behandelten Zellen (Abbildung 4.8 B). DNA-Demethylierung beeinflusste jedoch nicht die BEZ235-induzierte Expression von *INSR* und *IGF1R* (Abbildung 4.8 C) und Phosphorylierung von ERK (Abbildung 4.8 A, links), sodass auf einen, der Induktion von RTK und MAPK-Aktivierung nachgeschalteten, hemmenden Einfluss auf die MYC-Expression geschlossen werden kann. Dieser beobachtete Effekt wäre, neben verminderter Transkription von *MYC*-mRNA, möglich durch veränderte posttranskriptionelle Regulation bereits exprimierter mRNA. Eine solche kann z. B. durch translationshemmende, mRNA-bindende und -abbauende *microRNAs* (*miRs*) stattfinden (15), deren Promotoren ein häufiges Ziel von Hypermethylierung in kolorektalen Tumoren darstellen (13, 14).

Eine verminderte MYC-Expression nach dreitägiger Inkubation mit 5-AzadC wurde auch in der *CIMP*-negativen Zellenlinie LS174T (162) beobachtet, welche eine wenig beeinflusste Expression von MYC nach PI3K/mTOR-Hemmung aufweist (Abbildung 4.8 A).

Ein durch Hypermethylierung bestimmter Gene beeinflusster Mechanismus, denkbar z. B. durch inaktivierte *MYC*-reprimierende *miRs*, scheint somit sowohl verstärkte basale Expression von MYC als auch dessen MAPK-abhängige Induktion durch PI3K/mTOR-Hemmung in Kolonkarzinomzellen zu ermöglichen.

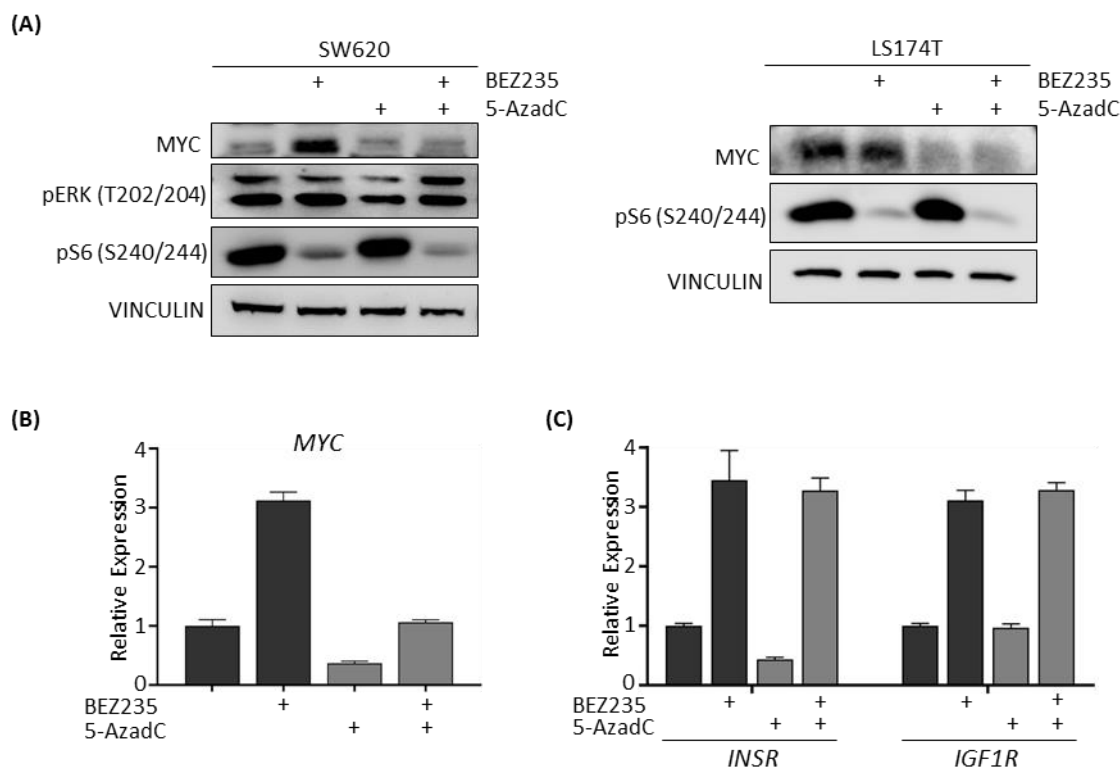


Abbildung 4.8: DNA-Demethylierung durch 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-AzadC) hemmt MYC-Expression trotz aktiviertem RTK/MAPK-Signalweg

(A) Inkubation mit 5-AzadC verhindert MYC-Induktion in SW620-Zellen und vermindert MYC-Proteinexpression in LS174T-Zellen. SW620- und LS174T-Zellen wurden für 72 h mit 8 μ M 5-AzadC bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert und 24 h vor Ernten der Zellen zusätzlich mit 200nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt. Proteinlevel von MYC, pERK (T202/204) und pS6 (S240/244) wurden mittels Immunoblot nachgewiesen, wobei VINCULIN als Ladekontrolle diente.

(B) Inkubation mit 5-AzadC verringert die Expression von MYC-mRNA in SW620 Zellen. Durchführung siehe unten.

(C) Inkubation mit 5-AzadC beeinflusst nicht die Induktion der Rezeptortyrosinkinasen *INSR* und *IGF1R* durch PI3K/mTOR-Hemmung. Durchführung siehe unten.

(B) und (C) SW620-Zellen wurden für 72 h mit 8 μ M 5-AzadC bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert und 24 h vor Ernten der Zellen zusätzlich mit 200nM BEZ235 bzw. DMSO behandelt. Anschließend erfolgte die Isolation deren Gesamt-RNA und Synthese von cDNA. Mittels RQ-PCR wurden die Expressionslevel von *MYC*, *INS*, *IGF1R* in technischen Triplikaten bestimmt, wobei β 2M als Referenzgen diente. Dargestellt sind Mittelwerte + SD der relativen Expression.

4.9 Hemmung der Translationsinitiation via eIF4A-Inhibition verringert die MYC-Proteinexpression in Kolonkarzinomzellen

Eine Möglichkeit, neben der Kombination von Inhibitoren, den kompensatorischen Feedback-Mechanismus zwischen PI3K/mTOR- und MAPK-Signalweg zu umgehen, ist die inhibitorische Intervention weiter distal im Signalweg.

Zudem ist eine mTOR-Hemmung mit einhergehender 4EBP1-Dephosphorylierung in Kolonkarzinomzellen möglicherweise aufgrund eines deregulierten 4EBP1:eIF4E-Verhältnisses nicht ausreichend, die eIF4E-Aktivität und somit Formation des eIF4E-Komplexes vollständig zu hemmen (109).

Um beiden Aspekten zu begegnen und eine effektivere Hemmung der Proteinbiosynthese, insbesondere der MYC-Translation, zu erzielen, erfolgte die direkte Hemmung der Translationsinitiation auf Stufe des eIF4F-Initiationskomplexes (siehe Abschnitt 1.8.2). Eingesetzt wurden hierzu Cyclopenta[b]benzofuran-Derivative als *small-molecule*-Inhibitoren der eIF4A-Helikase, deren Leitsubstanz Rocaglamid und das hochpotente Derivat Silvestrol (106, 114). Silvestrol weist dabei möglicherweise eine spezifischere inhibitorische Wirkung auf die eIF4A/II-Aktivität als Rocaglamid auf, für welches zudem die Hemmung der Proteine PHB1/2 (*Prohibitin1/2*) und somit des RAF-MEK-ERK-Signalweges beschrieben wurde (119, 163).

SW480-Zellen wurden zunächst mit 5-25 nM Rocaglamid oder 10-25 nM Silvestrol jeweils allein oder in Kombination mit 150 nM BEZ235 behandelt. Bei Hemmung der Translationsinitiation durch beide Inhibitoren wurde der BEZ235-induzierte Anstieg der MYC-Proteinlevel aufgehoben, maximal ausgeprägte bei 25 nM Rocaglamid und bereits bei 10nM Silvestrol. In den Silvestrol-behandelten Zellen war bereits hierbei eine Senkung der basalen MYC-Proteinexpression durch 10 nM Silvestrol deutlich (Abbildung 4.9 A, C). Doch auch für Rocaglamid konnte, durch alleinige Inkubation der Zellen mit aufsteigenden Dosierungen (10 nM, 25 nM und 50 nM) des Inhibitors, eine Hemmung der MYC-Proteinexpression in SW480-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.9 B). Die mTOR-Aktivität blieb durch beide Substanzen ungehemmt, gegenteilig fand sich sogar eine verstärkte Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 an Ser240/244

unter Behandlung mit Silvestrol. Silvestrol hatte keinen Einfluss auf Proteinlevel von phosphoryliertem ERK mit unveränderter Induktion durch BEZ235. Auch die Behandlung mit Rocaglamid führte in den verwendeten Konzentrationen nicht zu einer Inhibierung der RAF-MEK-ERK-Signalkaskade, gezeigt durch eher erhöhte pERK-Level im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen. (Abbildung 4.9 A,C)

Die *MYC*-mRNA-Level wurden durch Silvestrol, gemäß einer Wirkung auf Translationsebene, nicht vermindert. Es fand sich sogar eine erhöhte *MYC*-mRNA-Expression unter Behandlung mit Silvestrol im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Induktion von *MYC*-mRNA durch BEZ235 zeigte sich verstärkt bei gleichzeitiger Inkubation mit Silvestrol (Abbildung 4.9 D).

Schließlich konnte eine Senkung der *MYC*-Proteinexpression durch Silvestrol, neben SW480, auch in den Zelllinien LS174T und HCT116 nachgewiesen werden. Die 24-stündige Inkubation der Zellen mit aufsteigend 10 nM, 25 nM oder 50 nM Silvestrol zeigte hierbei eine dosisabhängige Abnahme der *MYC*-Proteinmenge gegenüber DMSO-behandelten Kontrollzellen (Abbildung 4.9 E).

Im Gegensatz zur dualen PI3K/mTOR-Inhibition, kann somit durch direkte Blockade der Translationsinitiation mittels eIF4A-Inhibition, die *MYC*-Proteinexpression in Kolonkarzinomzellen gesenkt werden.

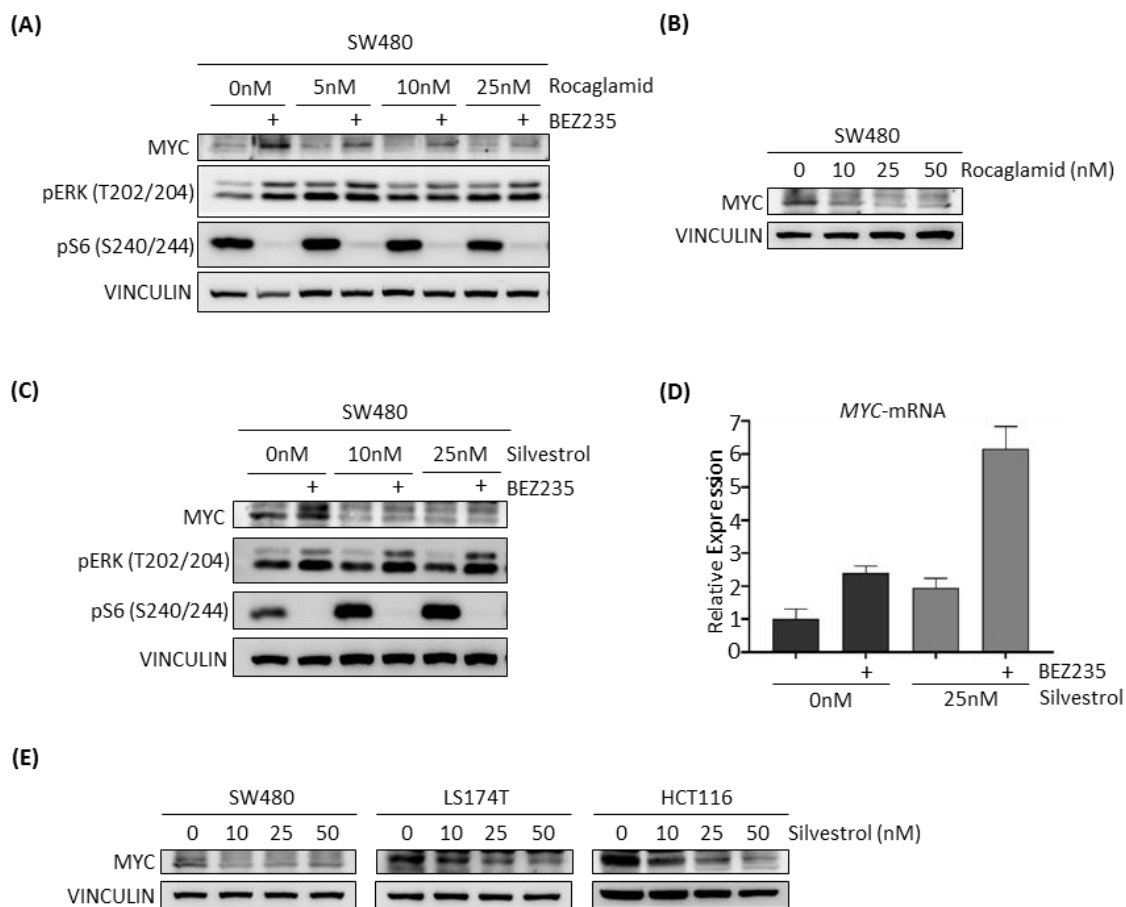


Abbildung 4.9: Hemmung der Translationsinitiation via eIF4A-Inhibition senkt MYC-Proteinexpression in Kolonkarzinomzellen

(A) Inkubation mit Rocaglamid verhindert MYC-Induktion durch BEZ235 ohne Hemmung der ERK-Phosphorylierung. SW480-Zellen wurden mit 0, 5, 10 oder 25 nM Rocaglamid und jeweils 150 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 24 h geerntet. Die Proteinlevel von MYC, pERK (T202/204), pS6 (S240/244) und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot nachgewiesen.

(B) Inkubation mit Rocaglamid senkt MYC-Proteinlevel in SW480-Zellen. Die Zellen wurden mit 10, 25 oder 50 nM Rocaglamid bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 24 h geerntet. Die Proteinlevel von MYC und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot nachgewiesen.

(C) Inkubation mit Silvestrol senkt die basale und BEZ235-induzierte MYC-Proteinexpression. SW480-Zellen wurden mit 0, 10 oder 25 nM Silvestrol und jeweils 150 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 24 h geerntet. Die Proteinlevel von MYC, pERK (T202/204), pS6 (S240/244) und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot nachgewiesen.

(D) Inkubation mit Silvestrol führt zu einer verstärkten MYC-mRNA-Expression. SW480-Zellen wurden mit 150 nM BEZ235, 25 nM Silvestrol oder einer Kombination beider Inhibitoren bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, deren Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mittels RQ-PCR wurden die Expressionslevel von MYC in technischen Triplikaten bestimmt, wobei $\beta 2M$ als Referenzgen diente. Dargestellt sind Mittelwerte + SD der relativen Expression.

(E) Inkubation mit Silvestrol senkt MYC-Proteinlevel in den Zelllinien SW480, LS174T und HCT116. Die Zellen wurden jeweils mit 10, 25 oder 50 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 24 h geerntet. Die Proteinlevel von MYC und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot nachgewiesen.

4.10 MYC-Induktion nach Hemmung der Cap-abhängigen Translation erfolgt IRES-abhängig und wird durch verminderte eIF4A-Aktivität gehemmt

Eine weitere Möglichkeit erhöhter MYC-Proteinlevel nach Hemmung der Cap-abhängigen Translation, könnte in einer kompensatorisch induzierten, Cap-unabhängigen Translation von MYC liegen. Für die 5'-UTR von *MYC* sind dies ermöglichende IRES-Strukturen (*internal ribosome entry site*) bekannt (130). Eine Hemmung von AKT und die gezeigte MAPK-Aktivierung durch gleichzeitige PI3K- und mTOR-Hemmung dürften diesen Mechanismus verstärken (140).

Um die Relevanz einer IRES-medierten MYC-Translation auf erhöhte MYC-Proteinexpression zu untersuchen, wurde die IRES-Aktivität von *MYC* gehemmt und der Effekt auf MYC-Proteinlevel dargestellt. Hierfür verwendet wurde das Herzglykosid Cymarin mit nachgewiesener, potenter *MYC*-IRES-inhibitorischer Wirkung (164).

Inkubation der Zellen mit 100 nM Cymarin verhinderte die MYC-Induktion durch BEZ235, was eine bedeutende Rolle IRES-abhängiger MYC-Translation nach Hemmung der Cap-abhängigen Translation bestätigt. Auffällig ist, dass der Effekt von Silvestrol auf MYC-Proteinlevel dem von Cymarin identisch ist (Abbildung 4.10) und somit impliziert, dass Silvestrol das Potential besitzt, sowohl Cap-abhängige als auch IRES-abhängige Translation von MYC zu inhibieren.

Die MYC-Induktion in Kolonkarzinomzellen nach PI3K/mTOR-Hemmung geht somit, neben einer unvollständigen Unterdrückung der mTOR- und MAPK-regulierten Cap-abhängigen Translation, zudem auf verstärkte IRES-abhängige Translation zurück. Durch Inhibierung der eIF4A-Aktivität mit Silvestrol können beide Mechanismen gehemmt und somit die MYC-Expression in Kolonkarzinomzellen reduziert werden.

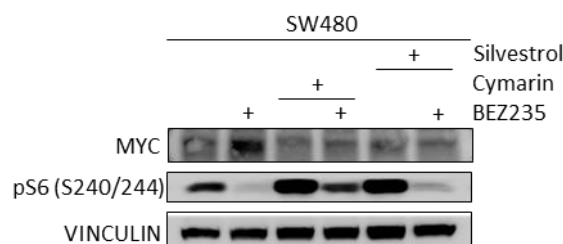


Abbildung 4.10: MYC-Induktion nach PI3K/mTOR-Hemmung erfolgt IRES-abhängig und kann durch eIF4A-Inhibition unterdrückt werden

Inkubation mit dem *MYC*-IRES-Inhibitor Cymarin verhindert BEZ235-induzierte *MYC*-Proteinexpression; vergleichbarer Effekt auf *MYC*-Proteinlevel durch Inkubation mit dem eIF4A-Inhibitor Silvestrol.

SW480-Zellen wurden mit 100 nM Cymarin oder 100 nM Silvestrol und jeweils 150 nM BEZ235 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 24 h geerntet. Die Proteinlevel von *MYC*, pS6 (S240/244) und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot nachgewiesen.

4.11 Silvestrol wirkt proliferationshemmend auf Kolonkarzinomzellen

Der eIF4A-Inhibitor Silvestrol besitzt *in vitro* eine ausgeprägte proliferationshemmende Wirkung auf Kolonkarzinomzellen – als Voraussetzung für das Potential als Tumorchemmendes Agens. Bereits mit 10 nM Silvestrol inkubierte Zellen zeigten einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber den Kontrollzellen nach wenigen Tagen, der für die Zelllinien SW480, LS174T und HCT116 durch Kristallviolettfärbung visualisiert wurde. Bei HCT116- und LS174T-Zellen war unter dieser Konzentration eine im Vergleich zu SW480-Zellen ausgeprägtere Wachstumshemmung zu beobachten, ohne makroskopisch wahrnehmbare Bildung von Kolonien bzw. durch Verlust initial gebildeter Kolonien nach wenigen Behandlungstagen (Abbildung 4.11 A).

Zur Darstellung der antiproliferativen Wirkung Silvestrols wurde eine Wachstumskurve erstellt. Hierfür wurden initial jeweils 5×10^4 SW480-Zellen ausgesät und nach 24 h kontinuierlich mit 20 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Mithilfe des CASY-Zellzählers wurden alle 48 h die Zellzahlen jeweils biologischer Triplikate pro Bedingung bestimmt. Die Behandlung mit Silvestrol führte zu einem Proliferationsarrest gegenüber den exponentiell wachsenden Kontrollzellen. Nach Aussetzen der Silvestrol-Behandlung zeigten die verbliebenen Zellen wieder eine Aufnahme der Proliferation. Dies zeigt, dass der proliferationshemmende Effekt durch Silvestrol reversibel ist (Abbildung 4.11 B).

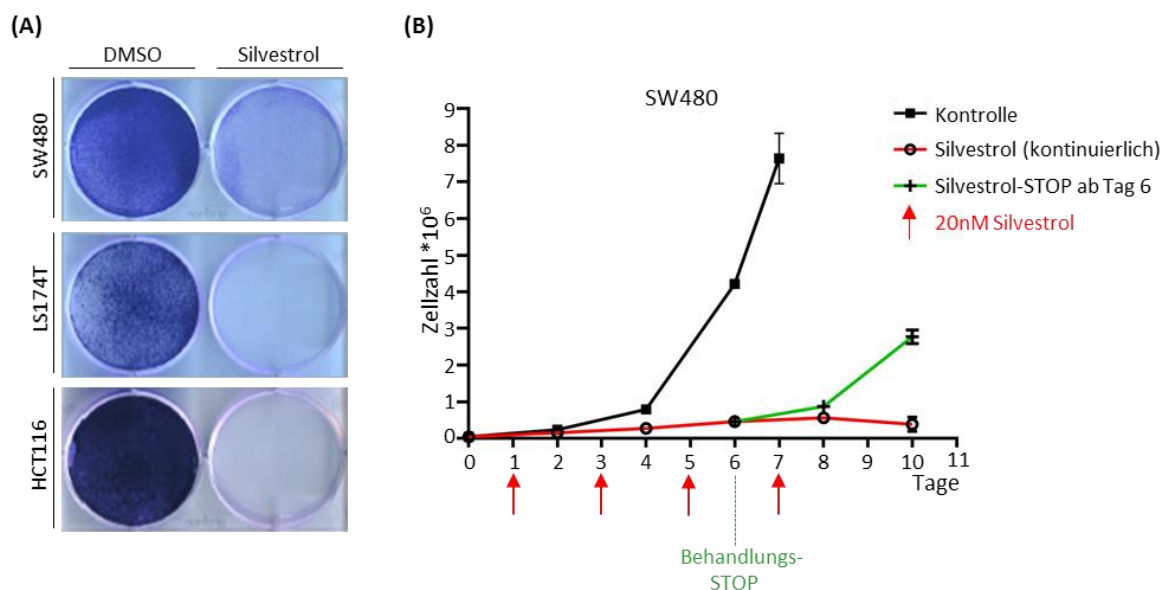


Abbildung 4.11: Proliferationshemmende Wirkung von Silvestrol auf Kolonkarzinomzellen

(A) Darstellung der Wachstumshemmung Silvestrol-behandelter Zellen. Jeweils 50.000 SW480-, LS174T- und HCT116-Zellen wurden in 6 cm Schalen ausplattiert und nach 24 h mit 10 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Bei Beinahe-Konfluenz der Kontrolle nach 4 Tagen kontinuierlicher Behandlung erfolgte die Fixierung und Kristallviolett-Färbung der Zellen zur Visualisierung der Zelldichte.

(B) Behandlung mit Silvestrol bewirkt einen reversiblen Proliferationsarrest. Jeweils 50.000 SW480-Zellen wurden in biologischen Triplikaten ausgesät. Nach 24 h erfolgte die kontinuierliche Behandlung mit 20 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle. Ab Tag 6 wurde bei der Hälfte der behandelten Zellen die Inkubation mit Silvestrol ausgesetzt. Alle 48 h über 10 Tage hinweg wurden die absoluten Zellzahlen jeder Bedingung mithilfe eines Zellzählers bestimmt und deren Mittelwerte + SD (n = 3, biologische Triplikate) als Wachstumskurven dargestellt. Die roten Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Inhibitor-Zugabe im Rahmen eines Mediumwechsels an.

4.12 Silvestrol bewirkt eine uneinheitliche Arretierung des Zellzyklus in Kolonkarzinomzellen

Die proliferationshemmende Wirkung durch Rocaglamid-Derivate ist uneinheitlich als Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase (165) bzw. G1/G0-Phase (166) beschrieben.

Für Kolonkarzinomzellen wurde eine Kumulation in der späten G2-/frühen M-Phase nach Behandlung mit Flavaglinen (strukturelle Zugehörigkeit Silvestrols) gezeigt (126), auch Chen et al. (125) wiesen einen G2/M-Arrest durch Silvestrol in Melanomzellen nach.

Um den Mechanismus des proliferationshemmenden Effekts Silvestrols auf hier verwendete Kolonkarzinomzellen zu untersuchen, erfolgte die Analyse der Zellzyklusphasenverteilung. SW480- und LS174T-Zellen wurden hierzu in jeweils biologischen Triplikaten für 24 h mit 25 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert, anschließend in Ethanol fixiert und nach Färbung mit Propidiumiodid einer Durchflusszytometrie unterzogen (PI-FACS). Diese zeigte unterschiedliche Zellzyklusphasenverteilung nach Behandlung mit Silvestrol für beide Zelllinien. Während SW480-Zellen einen Anstieg der G2/M-Population von 14,2% auf 20,5% unter entsprechender Abnahme der G1/G0-Population aufwiesen, zeigten LS174T-Zellen vorrangig eine Zunahme der Zellen in G1/G0-Phase von 57,6% auf 65,3%. Weiterhin kam es zu einer Verdopplung der subG1-Population, mit höherem Anteil von 7,8% in Silvestrol-behandelten LS174T-Zellen, als Korrelat für zusätzliche Apoptoseinduktion. (Abbildung 4.12 A)

Damit einhergehend, fand sich nach Behandlung mit Silvestrol eine erhöhte Genexpression von *CDKN1A* (*Cyclin dependend kinase inhibitor 1A*; p21) als Marker für Zellzyklusinhibition sowie von *MUC2* (*Mucin 2*) und *EPHB1* (*Ephrinrezeptor B1*) als Differenzierungsmarker in Kolonepithelzellen, welche durch MYC reprimiert werden (167) (Abbildung 4.12 B).

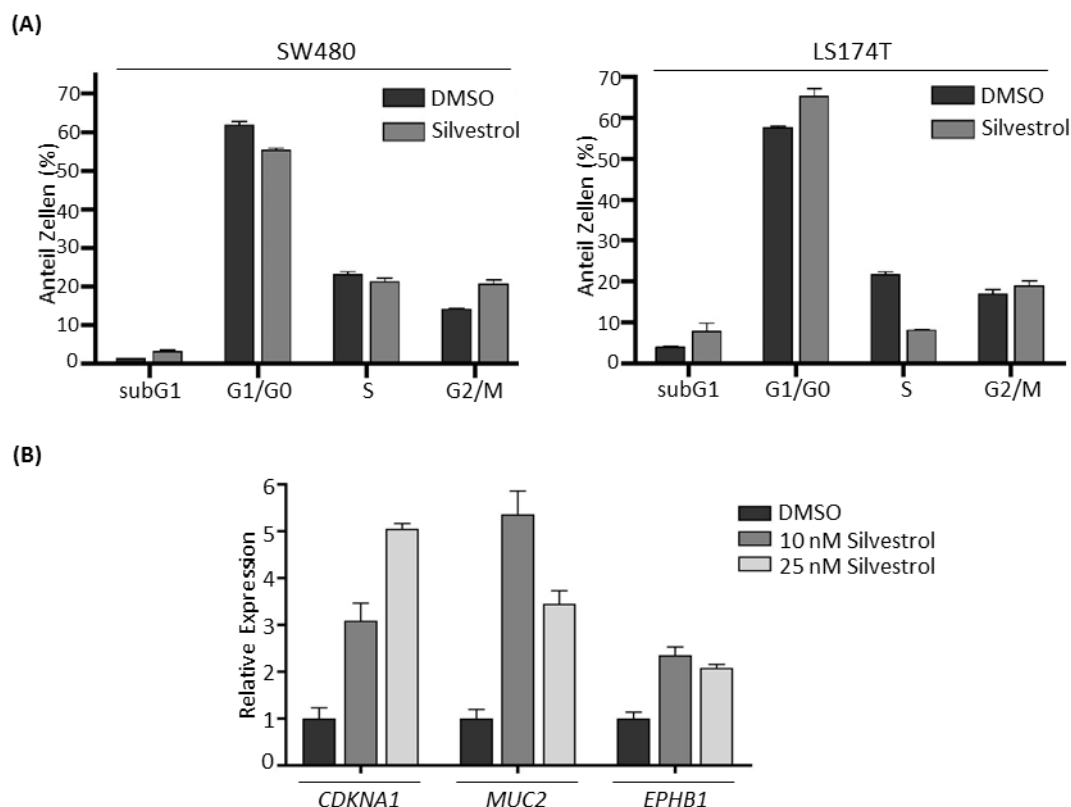


Abbildung 4.12: Silvestrol bewirkt unspezifischen Zellzyklusarrest in Kolonkarzinomzellen

(A) Behandlung mit Silvestrol führt zu mäßigem G2/M-Zellzyklusarrest in SW480-Zellen und G1/G0-Arrest in LS174T-Zellen. SW480- und LS174T-Zellen wurden je für 24 h mit 25 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach Fixierung der Zellen in Ethanol und Färbung mit Propidiumiodid wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen in jeweils biologischen Triplikaten mittels PI-FACS analysiert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Gesamtpopulation in verschiedenen Zellzyklusphasen als MW + SD.

(B) Erhöhte mRNA-Expression der MYC-reprimierten Differenzierungsgene *CDKNA1* (*p21*), *MUC2* und *EPHB1* nach Behandlung mit Silvestrol. LS174T-Zellen wurden für 24 h mit 10 nM und 25 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach Isolation der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese wurde die mRNA-Expression von *CDKNA1*, *MUC2* und *EPHB1* in technischen Triplikaten mittels RQ-PCR bestimmt, wobei $\beta 2M$ als Referenzgen diente. Dargestellt sind Mittelwerte + SD der relativen Expression.

4.13 Silvestrol induziert Apoptose in Kolonkarzinomzellen

Unumstritten ist, dass eine Behandlung mit Silvestrol zudem Zelltod induziert. Eine Induktion von Apoptose über den intrinsischen/mitochondrialen Signalweg durch Silvestrol ist für Zelllinien zahlreicher Tumorentitäten nachgewiesen, darunter Prostatakarzinom (123), Akute/Chronische Lymphatische Leukämie (120), Manzelzelllymphom (121), Hepatozelluläres Karzinom (124) und malignes Melanom (125).

Die Apoptose-induzierende Wirkung Silvestrols geht dabei u. a. auf einen Verlust des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 zurück und tritt zeitabhängig ein, mit maximaler Zelltodrate nach 72 h in lymphatischen Leukämie-Zellen (120, 121).

Nachdem im PI-FACS bereits eine mäßige Zunahme der subG1-Population nach 24-stündiger Silvestrol-Behandlung zu verzeichnen war (siehe Abschnitt 4.12), wurde der Apoptose-induzierende Effekt Silvestrols in den entsprechenden Kolonkarzinomzellen über diesen Zeitraum hinaus untersucht. SW480- und LS174T-Zellen wurden hierbei für 48 h bzw. 72 h mit Silvestrol (25 nM) und im Falle von SW480 zusätzlich mit BEZ235 (150 nM) allein oder in Kombination mit Silvestrol inkubiert. Die Bestimmung des Anteils aviabler Zellen erfolgte anschließend mittels Durchflusszytometrie nach Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC, unter Gegenfärbung mit Propidiumiodid zur Abgrenzung apoptotischer Zellen (Annexin V +, PI -).

Beide Zelllinien zeigten eine zeitabhängige Zunahme apoptotischer Zellen durch Behandlung mit Silvestrol im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen, mit insgesamt stärker ausgeprägtem Effekt in LS174T. Während die Behandlung mit Silvestrol in SW480-Zellen erst nach 72 h zu einem Anteil apoptotischer Zellen von 7,2% gegenüber 1,7% in den Kontrollzellen führte, fanden sich bei LS174T-Zellen bereits nach 48 h 13,4% und nach 72 h sogar 28,4% apoptotische Zellen bei ebenso niedriger Apoptoserate um 2% in den Kontrollzellen. Eine mögliche Dosis-Abhängigkeit dieses Apoptose-induzierenden Effekts Silvestrols wurde nicht untersucht.

Die kombinierte Behandlung mit BEZ235 und Silvestrol in SW480-Zellen führte zu einem kumulativen Effekt bzgl. Apoptoseinduktion beider Inhibitoren und steigerte den Anteil apoptotischer Zellen auf knapp 15% nach 48-stündiger- und knapp 35% nach 72-stündiger Inkubation (Abbildung 4.13 A).

Übereinstimmend mit dem bekannten Mechanismus Silvestrol-induzierter Apoptose in lymphatischen Zellen (120, 121), führte die Inkubation mit Silvestrol in beiden untersuchten Zelllinien bereits nach 24 h zu einem reduzierten Proteinlevel von MCL1, ein Apoptose-hemmendes Protein der BCL2-Familie (152). Der Rückgang von MCL1 zeigte sich dosisabhängig und wiederum bei Silvestrol-Konzentrationen von 25 nM und 50 nM in LS174T-Zellen ausgeprägter als in SW480-Zellen (Abbildung 4.13 B).

Einhergehend mit den Ergebnissen der FACS-Analysen konnte mittels Immunoblot ein erhöhtes Proteinlevel des Apoptose-Markers *cleaved*-PARP in Silvestrol-behandelten SW480-Zellen verglichen mit DMSO-behandelten Kontrollzellen nachgewiesen werden. Es fand sich ein jedoch schwächerer *cleaved*-PARP-induzierender Effekt durch Silvestrol als durch BEZ235 und ein kumulativer Effekt durch Inkubation mit einer Kombination beider Inhibitoren (Abbildung 4.13 C). Da der vorliegende Nachweis allerdings nach lediglich 24-stündiger Inhibitor-Behandlung der Zellen erfolgte, darf das Ergebnis nicht als direktes Korrelat zu den Apoptoseraten im Annexin V-/PI-FACS gesehen werden – mit erwartbar stärkerem Anstieg der Proteinmenge von *cleaved*-PARP nach länger andauernder Inkubation mit Silvestrol.

Das Auftreten erhöhter Level von *cleaved*-PARP deutet auf Beteiligung von Caspasen (*cysteine-aspartic acid protease*, CASP) als PARP-inaktivierende Enzyme hin (168). Allerdings war in den Silvestrol-behandelten SW480-Zellen, bei detektiertem Proteinlevel von Pro-Caspase 3, keine aktivierte Form von Caspase 3 (*cleaved*-Caspase 3) nachweisbar (Abbildung 4.13 C). Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen von Kim et al. (2007) für Silvestrol-induzierte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen (123), wobei jedoch für andere Zelllinien die Beteiligung von Caspase 3 und weiteren Caspasen nachgewiesen wurde (120).

Zusammenfassend besitzt Silvestrol zytostatisches und zytotoxisches Potential in Kolonkarzinomzellen *in vitro*. Der eIF4A-Inhibitor vereint somit, neben der translationshemmenden Wirkung auf MYC, wünschenswerte Eigenschaften eines tumorhemmenden Wirkstoffes zur Therapie des KRK.

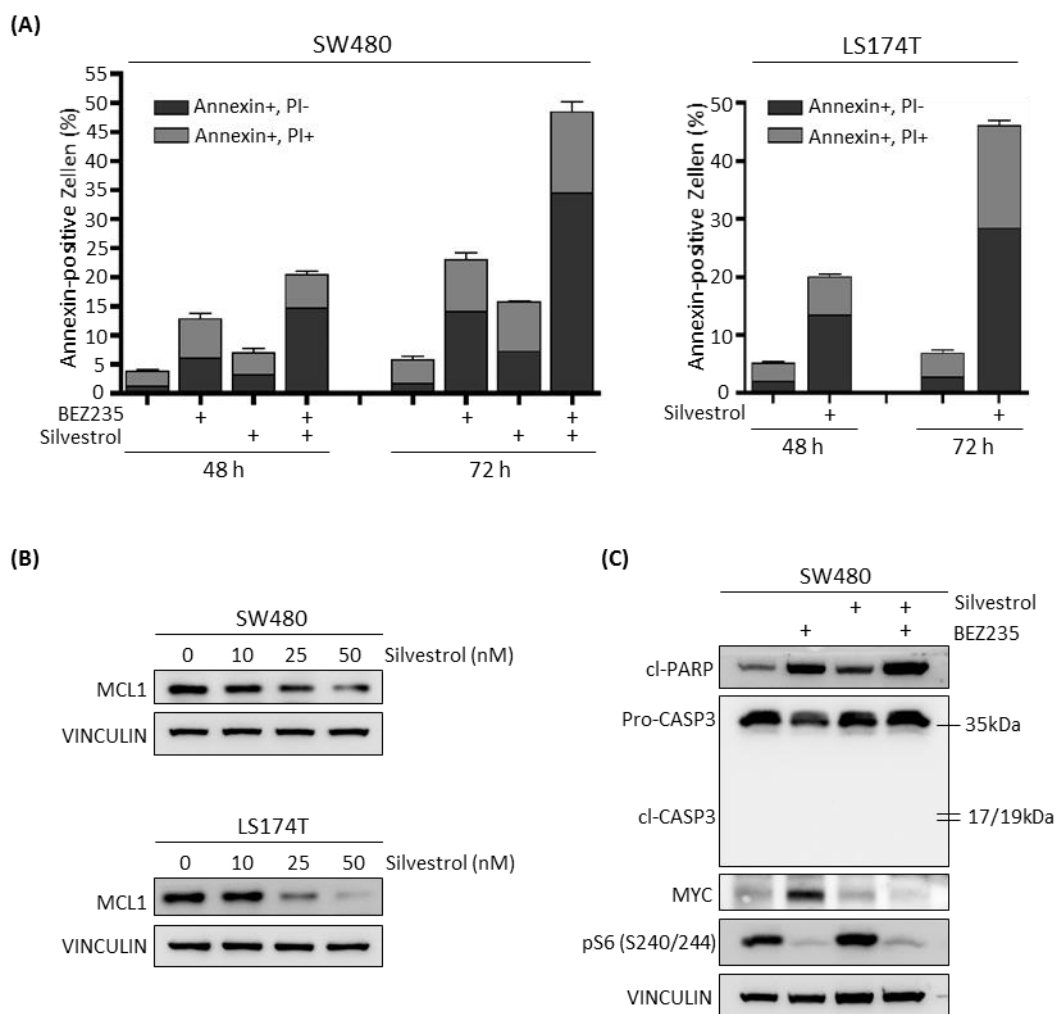


Abbildung 4.13: Silvestrol induziert zeitabhängig Apoptose in Kolonkarzinomzellen

- (A) Mäßige Apoptoseinduktion durch Silvestrol in SW480-Zellen; kumulativer Effekt durch kombinierte Behandlung mit BEZ235 und Silvestrol. Deutliche Apoptoseinduktion durch Silvestrol in LS174T-Zellen. Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen nach 72 h gegenüber 48 h. SW480- und LS174T-Zellen wurden für mit 25 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle, SW480-Zellen zusätzlich mit 150 nM BEZ235 oder einer Kombination beider Inhibitoren, behandelt und nach 48 h bzw. 72 h geerntet. Nach Färbung mit Annexin V-FITC und Gegenfärbung mit Propidiumiodid erfolgte die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in jeweils biologischen Triplikaten mittels Annexin V-/PI-FACS. Dargestellt ist der Anteil Annexin V-positiver Zellen, unterteilt in zusätzlich PI-negativer (= apoptotischer) und PI-positiver (= nekrotischer) Zellen, jeweils als Mittelwert + SD.
- (B) Behandlung mit Silvestrol führt zu verminderter Expression des antiapoptotischen Proteins MCL1 in Kolonkarzinomzellen. SW480- und LS174T-Zellen wurden mit 10 nM, 25 nM oder 50 nM Silvestrol bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 24 h geerntet. Proteinlevel von MCL1 und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot nachgewiesen.
- (C) Silvestrol und BEZ235 induzieren Caspase-3-unabhängig erhöhte Proteinlevel des Apoptose-Markers *cleaved*-PARP; kumulativer Effekt durch kombinierte Behandlung.

SW480 wurden mit 25 nM Silvestrol, 150 nM BEZ235 oder einer Kombination beider Inhibitoren bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 24 h geerntet. Proteinlevel von pS6 (S240/244), MYC, *cleaved*-PARP (cl-PARP), Pro-/aktive Caspase 3 (Pro-/cl-CASP3) und VINCULIN als Ladekontrolle wurden mittels Immunoblot bestimmt.

5 Diskussion

5.1 Hemmung der MYC-Expression als zentrales therapeutisches Ziel im kolorektalen Karzinom

Eine Deregulation des Transkriptionsfaktors MYC wird als entscheidender Faktor für Tumorentstehung und -progression im KRK gesehen. Trotz Diversität der genetischen Veränderungen in kolorektalen Karzinomen, findet sich in nahezu 100% eine veränderte Expression von MYC-Zielgenen (11). In mehr als 90% der Tumore liegt ein aktivierter WNT-Signalweg vor, was in verstärkte Transkription und transformierende Wirkung von MYC mündet (44, 167). MYC konnte *in vivo* als entscheidender Effektor für Tumorentstehung im Intestinaltrakt nach APC-Verlust gezeigt werden, wobei die gleichzeitige Deletion von *APC* und *MYC* im Mausmodell den malignen Phänotyp verhinderte (142). Auch die häufig auftretende Inhibierung des TGF β -Signalwegs oder Aktivierung von MAPK- und PI3K-Signalwegen führen zu veränderter MYC-Expression (siehe Abschnitt 1.3). Zudem wird die Abbaurate des MYC-Proteins entscheidend durch die häufige, aktivierende *RAS*-Mutation, wie sie auch in den verwendeten Zelllinien dieser Arbeit vorliegt, gehemmt. Dies geschieht, wie unter Abschnitt 1.3 beschrieben, sowohl über den MAPK- als auch den PI3K/GSK3-Effektorarm von *RAS* (169).

Insgesamt erscheint die Senkung der MYC-Proteinexpression bzw. die Hemmung dessen Funktion in Kolonkarzinomzellen als favorisiertes und vorrangiges Ziel einer zielgerichteten Therapie des KRK.

5.2 Hemmung des PI3K-/mTOR-Signalweges

5.2.1 Rationale für eine Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges im KRK

Aufgrund der fehlenden enzymatischen Funktion sowie seiner Proteinstruktur, galt MYC lange Zeit als direktes Inhibitor-Target ungeeignet. Bei physiologischer Expression von *MYC* in allen proliferierenden Zellen wurde von einer hohen Toxizität mit fehlendem therapeutischem Index ausgegangen (170, 171). Dennoch sind verschiedene

mechanistische Ansätze, die Funktion von MYC zu hemmen, zunehmend Gegenstand der Forschung – so die Inhibierung der Interaktion von MYC mit Koaktivator-Proteinen, insbesondere durch *small molecule*-Inhibitoren der MYC-MAX-Heterodimerisierung (172) oder BET-*bromodomain*-Proteinen (173), die Beeinflussung der MYC-Proteinstabilität (34) oder die induzierte, kompetitive Expression des dominant-negativen Allels von *MYC*, *OmoMYC* (43).

Vordergründig ist bislang jedoch die Hemmung übergeordneter Signalwege. Mehrere Aspekte begründen den Einsatz des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors BEZ235 in Kolonkarzinom-Zellen als Ansatz, verminderte MYC-Aktivität zu erreichen. PI3K- und mTOR-nachgeschaltete Signalkaskaden regulieren sowohl die Halbwertszeit von MYC als auch dessen Translation.

Die proteasomale Abbaurate von MYC-Protein ist in kolorektalen Tumoren häufig erniedrigt, was als Folge von Inaktivierung beteiligter Ubiquitin-Ligasen wie *FBW7* (174) bzw. erhöhter Expression der Deubiquitinase *USP28* auftritt (35, 175). Deshalb erscheint die Senkung der MYC-Proteinstabilität bzw. Steigerung dessen Abbaurate als adäquate Strategie im KRK. Durch Hemmung der PI3-Kinase und somit AKT wird die Aktivität von GSK3 und die nachfolgende proteasomale Degradation von MYC erhöht (48, 169, 176). Dieser Effekt erniedrigter N-MYC-Proteinlevel durch PI3K-Hemmung konnte im Neuroblastom gezeigt werden (177), während eine Induktion von *MYC* in Mammakarzinomzellen zu einer Resistenz gegenüber PI3K-Hemmung führte (178, 179). Zum anderen bewirkt die Hemmung von mTOR eine Hemmung der Proteinbiosynthese und lässt somit auch verminderte Translation von MYC erwarten. mTORC1 und sein Effektor S6-Kinase aktivieren die Initiation der Cap-abhängigen Translation durch Phosphorylierung von 4EBP1 und PDCD4, indem die Formation des eIF4F-Komplexes aus Initiationsfaktoren ermöglicht wird ((99, 103); für Details siehe Abschnitt 1.8.1). Dass auch die Translation von MYC abhängig ist von der mTOR/4EBP1-vermittelten Translationsinitiation, ist lange bekannt (180), für lymphoide Zellen wurde ein Rückgang von MYC-Protein nach mTORC1-Blockade nachgewiesen (181). Zudem zielt die Hemmung der ribosomalen Funktion und Translations-Maschinerie auf die zentrale transaktivierende Wirkung von MYC (182) – unabhängig von dessen eigener

verminderter Translation. Der Initiationsfaktor eIF4E selbst z. B. ist ein bekanntes direktes MYC-Zielgen (183). So wurde das Vorliegen einer synthetischen Lethalität zwischen MYC und mTOR in MYC-abhängigen hämatologischen Tumoren beschrieben (184).

Die duale Hemmung beider Kinasen (PI3K und mTOR) bringt den Vorteil, negative Rückkopplungs-Mechanismen, wie die S6K- und mTORC2-abhängige Aktivierung von AKT nach ausschließlicher mTORC1-Hemmung, zu umgehen (58, 61) und den Einfluss verschiedener Signalkaskaden breiter inhibierend abzudecken.

Neben Einfluss auf die MYC-Proteinstabilität ist auch die inhibierende Wirkung des PI3K/AKT-Signalwegs auf FOXO-Transkriptionsfaktoren von Bedeutung. Die Hemmung der PI3-Kinase und somit AKT lässt eine verstärkte nukleäre Aktivität von FOXOs zu, welche auf unterschiedliche Weise die Wirkung von MYC antagonisieren (siehe Abschnitt 1.7). Beispielsweise führt eine Aktivierung von FOXO3A zu einer Induktion von MAD/MNT-Proteinen, welche als Repressoren MYC-abhängiger Genexpression fungieren (85).

Des Weiteren wird MIZ1 durch AKT phosphoryliert und dadurch dessen DNA-Bindung inhibiert, wodurch bei PI3K-Inhibition die reprimierende Wirkung von MYC, v. a. auf Zellzyklus-inhibierende Gene wie *p21*, unterstützt wird (185, 186).

All diese Aspekte rechtfertigen in theoretischen Überlegungen die gleichzeitige Hemmung von PI3K und mTOR für einen kumulativen Effekt hinsichtlich einer Repression von MYC in Kolonkarzinomzellen.

5.2.2 Erhöhte Expression von MYC nach Behandlung mit BEZ235 bei MYC-unabhängiger proliferationshemmender Wirkung in Kolonkarzinomzellen

Eine Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges durch 10-200 nM BEZ235, gezeigt durch Rückgang der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 an Serin 240/244, führte nicht zu verminderten MYC-Proteinlevel in Kolonkarzinomzellen. Gegenteilig fand sich in SW480- und SW620-Zellen nach Inkubation mit BEZ235, eine deutlich erhöhte Expression von MYC-mRNA und MYC-Protein nach Inhibitor-Behandlung (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.8). Eine ausbleibende Herunterregulation von MYC nach Inkubation mit

BEZ235 wurde vorangehend in weiteren Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen (151) (siehe auch Abschnitt 5.2.5).

Trotz dieses Effekts induzierte die Behandlung mit BEZ235 in SW480-Zellen einen Proliferationsarrest via Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus mit einer GI_{50} (*growth inhibition of 50%*)-Konzentration um 18nM (Abbildung 4.2). Die Induktion eines G1-Arrests als proliferationshemmende Wirkung von BEZ235 und GI_{50} -Konzentrationen in diesem Bereich sind vielfach beschrieben (62-64).

Entgegen den Ergebnissen von Roper et al. (2011) für Kolonkarzinomzelllinien, jedoch in Übereinstimmung mit Kim et al. (2013), konnte in SW480-Zellen ein Anstieg des Apoptosemarkers *cleaved*-PARP (153) sowie eine verminderte Proteinmenge des anti-apoptotischen Proteins MCL1 (152) nach 48-stündiger Inkubation mit BEZ235 nachgewiesen werden. Dementsprechend fand sich mittels FACS-Analyse eine Zunahme Annexin-positiver, PI-negativer und somit (früh-)apoptotischer SW480-Zellen bei protrahierter Behandlung der Zellen für 48 bzw. 72 h mit BEZ235 (Abbildung 4.2), sodass BEZ235 in dieser Zelllinie bei Inkubation über 24 h hinaus zudem Apoptose-induzierendes Potential besitzt. Auch in Mammakarzinom-Zellen wurde eine verstärkte Apoptoserate nach Behandlung mit BEZ235 beschrieben (63), für Zelllinien verschiedener Tumorentitäten (Prostatakarzinom, Glioblastom (62), Sarkom(65)) ist jedoch keine Apoptose-induzierende Wirkung nachgewiesen, sodass dabei in erster Linie von einem Zelltyp-spezifischen und zudem zeitabhängigen Effekt durch BEZ235 ausgegangen werden muss.

Einhergehend mit der Proliferationshemmung, führte BEZ235 in SW480-Zellen zu einer Repression von proliferationsassoziierten, MYC-aktivierten Genen (Abbildung 4.3). Dass insgesamt dennoch von einem funktionalen, transkriptionell aktiven MYC ausgegangen werden kann, bestätigt eine darüber hinaus durchgeführte Microarray-Analyse. Dabei fanden sich nach Behandlung mit BEZ235, Genklassen mit Funktion für Proteinbiosynthese und somit Zellwachstum einheitlich und MYC-abhängig hochreguliert, während jedoch unabhängig von MYC eine verminderte Expression von Gengruppen für Zellzyklus-Progression zu beobachten war (siehe auch Abschnitt 4.3; (151)). Zur Bestärkung dieser These, führte eine Depletion von MYC in SW480-Zellen

nicht zu einer signifikant stärkeren G1-Arretierung durch BEZ235 und beeinflusste auch nicht wesentlich die Apoptoseinduktion durch BEZ235, sodass man demnach von einer MYC-unabhängigen proliferationshemmenden und Apoptose-induzierenden Wirkung von BEZ235 ausgehen kann (Abbildung 4.3). Allerdings führte die Depletion von MYC allein auch nicht zum erwarteten G1-Arrest, sodass die erreichte Depletion möglicherweise nicht ausreichend für einen biologischen Effekt war und zur Begegnung dieser Frage, eine Wiederholung des Versuchs angestrebt werden sollte.

5.2.3 Ausbleibende stabilitätsmindernde Wirkung auf MYC und unvollständige Hemmung der Cap-abhängigen Translationsinitiation durch PI3K/mTOR-Hemmung im KRK

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die MYC-Proteinstabilität in Kolonkarzinomzellen nicht entscheidend durch PI3K-Aktivität reguliert wird. Eine Hemmung von PI3K/AKT führte nicht zu verminderter Phosphorylierung von GSK3, sodass sich durch Behandlung mit BEZ235, entgegen der Erwartung, der Proteinumsatz von MYC nicht erhöhen ließ (151).

Weiterhin liegt der Initiationsfaktor eIF4E im Kolonkarzinom häufig überexprimiert (188) bzw. dessen inhibierendes Protein 4EBP1 reprimiert vor (109), wodurch die durch mTOR-Inhibition bedingte Dephosphorylierung und Aktivierung von 4EBP1 möglicherweise nicht ausreicht, die Formation des eIF4F-Komplexes und somit die Translationsinitiation vollständig zu hemmen. Dies bestätigend, wurde über diese Arbeit hinaus, in hier untersuchten SW480-Zellen unter Behandlung mit BEZ235, zwar die Dephosphorylierung von 4EBP1 an vier mTORC1-abhängigen Stellen (Thr37/46, Ser65, Thr70) mit nachfolgend reduzierter mRNA-Bindung von eIF4G und eIF4A nachgewiesen, wobei jedoch erst eine Induktion von 4EBP1 über endogene Level hinaus die MYC-Proteinexpression verhinderte (151).

Diese Erkenntnis deckt sich mit dem Nachweis, dass der entscheidende wachstumshemmende Mechanismus einer mTORC1-Inhibition nicht in 4EBP1-abhängiger Hemmung der Translationsinitiation, sondern in S6K/eEF2K-abhängiger Regulation der Translationelongation, besteht – ohne Effekt auf MYC-Proteinlevel (189).

5.2.4 MYC-Induktion durch Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges als Folge einer FOXO3A-abhängigen Induktion von RTK und Aktivierung des RAF/MEK/ERK-Signalweges

Eine insuffiziente Hemmung der Proteinstabilität und Translation von MYC allein erklärt nicht die verstärkte Expression von MYC unter PI3K/mTOR-Inhibition, über dessen Mechanismus Aufschluss gewonnen werden sollte.

Es wurde der Einfluss einer PI3K/mTOR-Hemmung auf die Aktivität des RTK/MAPK-Signalweges, welche über ETS-Transkriptionsfaktoren in verstärkte MYC-Expression münden kann (45, 156), untersucht. Hierbei wurde für das KRK eine Wechselwirkung zwischen dem PI3K/mTOR- und MAPK-Signalweg als wohl konservierter überlebensfördernder Feedback-Mechanismus, wie er sich vielfach diskutiert findet (65, 94, 154, 155), nachgewiesen.

In SW480-Zellen konnten, wie auch schon für MYC, erhöhte Proteinlevel von phosphoryliertem MEK1/2 (pSer217/221) und ERK1/2 (pThr202/Tyr204) nach Behandlung mit BEZ235 nachgewiesen werden (Abbildung 4.4 und Abbildung 4.6), womit die Aktivierung der RAF/MEK/ERK-Signalkaskade durch PI3K/mTOR-Hemmung, wie sie vorausgehend bereits in HCT116, SW620, LS174T und CACO2 beobachtet wurde (151), in dieser Kolonkarzinomzelllinie bestätigt wurde.

Es sei zu erwähnen, dass es sich bei SW480 um eine *KRAS*-mutierte Zelllinie handelt und somit die duale PI3K/mTOR-Hemmung eine zusätzliche Aktivierung in Richtung des RAF/MEK/ERK-Signalweges induziert. Interessanterweise tritt dieser Mechanismus der ERK-Aktivierung durch PI3K/mTOR-Hemmung sowohl in Zelllinien mit bereits vorliegender *KRAS*-Mutation, wie SW480, HCT116, LS174T und SW620, als auch in der *KRAS*-Wildtyp-Zelllinie CACO2 in gleicher Weise auf (151).

Eine Hemmung der MAPK-Aktivität durch den spezifischen MEK1/2-Inhibitor UO126 verringerte die *MYC*-mRNA-Expression und verhinderte die MYC-Proteinexpression nach Behandlung mit BEZ235, wodurch sich die MAPK-Aktivierung als entscheidender Mechanismus der MYC-Induktion herausstellt (Abbildung 4.6).

Zudem fand sich nach PI3K/mTOR-Hemmung eine verstärkte Expression der Rezeptortyrosinkinasen *INSR*, *IGF1R* und *HER3* in SW480- und SW620-Zellen (Abbildung

4.4Abbildung 4.8), welche neben Rückkopplung auf PI3K selbst, einer RAS-vermittelten MAPK-Aktivierung zugrunde liegen könnte (75).

Eine kompensatorische Aktivierung des MAPK-Signalweges u. a. durch Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen nach Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges ist vielfach, jedoch durch unterschiedliche Mechanismen, beschrieben: Carracedo et al. (155) und O'Reilly et al. (61) zeigen den Effekt durch alleinige mTORC1-Inhibition; Serra et al. (154) und Manara et al. (65) beschreiben eine Aktivierung der ERK1/2-MAP-Kinasen bedingt durch PI3K-Inhibition.

Es konnte vorab gezeigt werden, dass eine spezifische Hemmung bzw. Depletion der PI3-Kinase in Kolonkarzinomzellen für die MYC-Induktion ausreicht (151). Hierzu passt auch, dass der Effekt verstärkter MYC-Expression zwar schon bei niedrignanomolaren BEZ235-Konzentration vorhanden ist, in welcher BEZ235 überwiegend mTOR-inhibitorisch wirkt (63), mit steigender BEZ235-Konzentration jedoch zunimmt.

Mit FOXO-Transkriptionsfaktoren als Substrat von AKT, führt eine Hemmung der PI3-Kinase zu verstärkter Phosphorylierung und Aktivität von FOXOs (90), ein Effekt, der für die Behandlung mit BEZ235 nachgewiesen wurde (63, 187). Im Vorfeld dieser Arbeit konnte in BEZ235-behandelten Kolonkarzinomzellen die Dephosphorylierung von FOXO3A an Threonin 32, dessen einhergehende Translokation in den Zellkern und folglich eine Aktivierung bekannter FOXO3A-Zielgene gezeigt werden (151). Da eine FOXO-abhängige Induktion von RTK nach Hemmung von AKT bekannt ist (94, 95, 104), wurde der mögliche Einfluss dieses Rückkopplungsmechanismus auf die nachgewiesene MAPK-Aktivierung mit nachfolgender MYC-Induktion durch PI3K/mTOR-Hemmung untersucht. Eine siRNA-vermittelte Depletion von *FOXO3A* in SW480-Zellen verringerte die unter BEZ235 beobachtete Induktion von *INSR*, *IGF1R* und *HER3*, Phosphorylierung von ERK1/2 und schließlich den Anstieg des MYC-Proteinlevels (Abbildung 4.5).

So wurde gezeigt, dass die MYC-Induktion unter PI3K/mTOR-Hemmung – zumindest teilweise – bedingt durch eine FOXO-vermittelte Induktion von *RTK* mit nachfolgender MAPK-Aktivierung stattfindet. Doch auch mTOR-abhängige Rückkopplungsmechanismen könnten in gewissem Maße mitverantwortlich sein für die

Aktivierung von RTK mit Signallenkung in Richtung MAPK-Signalweg (61, 155), dessen Einfluss in vorliegenden Zellen nicht expliziert untersucht wurde.

5.2.5 Unterschiedliches Ausmaß der MYC-Induktion nach PI3K/mTOR-Hemmung in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien

Zusammenfassend zeigten alle getesteten Kolonkarzinomzelllinien eine erhöhte Expression von MYC nach PI3K/mTOR-Hemmung, mit starker MYC-Induktion in CACO2-, SW480-, SW620-Zellen und schwächerem Effekt in LS174T- und HCT116-Zellen. Nie fand sich dabei ein Rückgang der MYC-Proteinlevel.

Eine verstärkte Aktivierung von ERK ließ sich jedoch in allen Zelllinien gleichermaßen nachweisen (151). Eine Korrelation dieser Beobachtung findet sich zum unterschiedlichen *PI3K*-Mutationsstatus der Zelllinien: ausgeprägte MYC-Induktion erfolgte bei Vorliegen von *PIK3CA*-Wildtyp (SW480, SW620, CACO2), schwächer bei Vorliegen einer aktivierenden *PIK3CA*-Mutation (LS174T, HCT116), mit jedoch vergleichbarem proliferationshemmenden Effekt durch BEZ235 (Abbildung 4.2 A).

Neben dem unterschiedlichen Mutationsstatus können sich Kolonkarzinomzellen durch ein verändertes Methylierungsmuster CpG-reicher Promotoren und somit Stilllegung bestimmter Gene, unterscheiden (159, 160). Es stellt sich die Frage, ob in den stark MYC-induzierenden Zelllinien, z. B. durch Inaktivierung bestimmter Gene, posttranskriptionelle Regulationsmechanismen versagen, die physiologischerweise eine verstärkte MYC-Expression trotz aktivierenden MAPK-Signalen verhindern. In Betracht zu ziehen wären beispielsweise *micro-RNAs* (*miRs*) mit häufig hypermethyliertem Promotor in kolorektalen Tumoren (13, 14), welche als posttranskriptionelle Regulatoren *MYC*-mRNA binden und deren verminderte Translation oder auch Degradation bewirken könnten (15).

Die *in vivo*-demethylierende Substanz 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) (161) verhinderte zwar die ausgeprägte MYC-Induktion trotz RTK/MAPK-Aktivierung durch PI3K/mTOR-Hemmung in SW620-Zellen, jedoch wurde kein – in der Zelllinie hypermethyliert vorliegender – Effektor dafür gefunden (Abbildung 4.8). Der Nachweis eines verminderten Expressionslevels von *MYC*-mRNA trotz weiterhin relativer mRNA-Induktion durch BEZ235, bei gehemmter Proteinexpression, wäre passend zur

reprimierenden Wirkung von *miRs* (s.o.). Zunächst in Betracht gezogen wurde die in der Literatur beschriebene *miR-34a* mit bekannter *MYC*-reprimierender Wirkung, deren Promotor in SW620-Zellen hypermethyliert vorliegt (18, 190). Da *miR-34a* über ETS-Transkriptionsfaktoren MAPK-abhängig exprimiert wird, würde diese somit bei aktivem Promotor parallel zu *MYC* durch BEZ235 induziert und wiederum inhibitorisch auf verstärkt transkribiertes *MYC* wirken (190). Allerdings wurde der Effekt einer verminderten *MYC*-Expression durch DNA-Demethylierung auch in LS174T-Zellen, einer nicht *miR-34a*-inaktivierten Zelllinie, nachgewiesen (Abbildung 4.8 A). Zudem weisen SW480-Zellen mit ausgeprägter *MYC*-Induktion durch PI3K/mTOR-Hemmung – wie in dieser Arbeit mehrfach gezeigt – keinen hypermethylierten *miR-34a*-Promotor auf (Abbildung 4.1, (18)), sodass diese Möglichkeit äußerst unwahrscheinlich erscheint. Zur Bestätigung wurde für LS174T-Zellen das erwartet höhere Expressionslevel von *miR-34a* gegenüber SW620 mittels RQ-PCR nachgewiesen, jedoch keine verstärkte Expression nach Inkubation mit BEZ235. Ein Knockdown von *miR-34a* in LS174T-Zellen führte dementsprechend nicht zu erhöhten basalen oder BEZ235-induzierten *MYC*-Proteinlevel (nicht dargestellt).

Interessant hinsichtlich *MYC*-Induktion durch PI3K/mTOR-Hemmung wären weiterhin *miR-34b* und *-c*, da diese ebenso *MYC*-reprimierend wirken und zudem FOXO3A-abhängig exprimiert werden (16, 49). Allerdings finden sich die Promotoren von *miR-34b/c* in kolorektalen Tumoren durch Hypermethylierung weitgehend stillgelegt (17), weshalb diese ebenso wenig für den Unterschied bzgl. *MYC*-Induktion zwischen den Zelllinien verantwortlich zu machen wären. Durchaus jedoch kommt deren Inaktivierung als Faktor für die ausbleibende Hemmung der *MYC*-Expression nach PI3K/mTOR-Inhibition mit einhergehender FOXO3A-Aktivierung in Betracht. Zur Beantwortung dieser Frage sollte die Expression von *miR-34b/c* nach Behandlung mit BEZ235 in Kolonkarzinomzellen überprüft werden und man sollte weiterhin testen, ob eine exogene Expression von *miR-34b/c* in stillgelegten Zellen die basale bzw. BEZ235-induzierte *MYC*-Expression hemmt.

So geht die unterschiedliche *MYC*-Induktion nach PI3K/mTOR-Hemmung in erster Linie auf den *PIK3CA*-Mutationsstatus der Zellen zurück, bei jedoch weiterhin unklarem

Mechanismus und fraglicher Konsequenz dieses Effekts – zumal eine gewünschte Senkung der MYC-Expression durch duale PI3K/mTOR-Hemmung in keiner der Zelllinien erreicht wurde.

5.2.6 Konsequenzen der Aktivierung von FOXOs und MAPK-Signalweg hinsichtlich MYC-Aktivität und Aktivität des PI3K/mTOR-Signalweges

Der wohl zentrale Mechanismus für die verstärkte Expression von *MYC* nach PI3K/mTOR-Hemmung ist die nachgewiesene MAPK-Aktivierung (Abbildung 4.6), welche auf vielfache Weise sowohl aktivierenden Einfluss auf MYC-Transkription als auch -Translation nehmen kann.

Die Transkription von *MYC* ist MAPK-abhängig, über bereits erwähnte ETS-Transkriptionsfaktoren, reguliert (45, 156). Hierdurch lässt sich die verstärkte *MYC*-mRNA-Expression nach PI3K/mTOR-Hemmung erklären.

Neben mTOR beeinflusst jedoch auch die MAPK-Aktivität direkt die Translationsinitiation, wodurch die Wirkung der mTORC1-Inhibition möglicherweise abgeschwächt wird. Zum einen enthält 4EBP1 zusätzliche MAPK-Phosphorylierungsstellen, die auch eine ERK-abhängige Phosphorylierung ermöglichen (99, 191, 192). Zum anderen ist eine ERK/MNK1/2-abhängige Phosphorylierung von eIF4E (100, 101) relevant für dessen Funktion und onkogenes Potential (96, 193, 194). Der RAF/MEK/ERK-Signalweg reguliert zudem die transkriptionelle Aktivität von bereits translatiertem MYC-Protein. So bewirkt eine ERK-abhängige (aminoternale) Phosphorylierung von MYC an Serin 62 eine erhöhte Proteinstabilität und fördert die Bildung von transaktivierenden MYC/MAX-Heterodimeren (75).

Die MAPK-Aktivierung nach PI3K/mTOR-Hemmung ist, neben einem möglichen zusätzlichen, mTOR-abhängigen Rückkopplungsmechanismus, im Wesentlichen Folge der Aktivierung von FOXO3A mit nachfolgender Induktion von RTK, wie vorangehend dargestellt.

Durch einen weiteren Feedback-Mechanismus unter Behandlung mit BEZ235 könnten FOXOs durch verstärkte *RICTOR*-Expression zu einer mTORC2-abhängigen

Phosphorylierung von AKT führen, antagonistisch zur erwünschten Wirkung der PI3K/mTOR-Hemmung (195).

Andererseits lässt eine FOXO-Aktivierung eine negative Regulation von MYC erwarten. Gezeigt werden konnte die erhöhte mRNA-Expression von *HBP1* in BEZ235-behandelten Zellen, dessen Genprodukt ein MYC-bindendes Protein mit inhibitorischer Wirkung auf dessen Funktion darstellt (Abbildung 4.7; (84, 158)). Eine FOXO-abhängige Induktion von MXI1, einem Mitglied der MAD/MXD-Proteinfamilie, mediiert möglicherweise die Repression von MYC-Zielgenen (85).

Neben bereits gezeigter Abhängigkeit des MAPK-Signalweges von der Aktivität des PI3K/mTOR-Signalweges ist auch die umgekehrte Wechselwirkung bekannt.

Zu nennen wäre beispielsweise die ERK-vermittelte mTOR-Aktivierung durch TSC2-Phosphorylierung (196, 197) und die MEK-abhängige Regulation der PTEN-Aktivität (198), wodurch ein aktivierter MAPK-Signalweg wiederum aktivierenden Einfluss auf den PI3K/mTOR-Signalweg nimmt und so auch die inhibitorische Wirkung von BEZ235 abschwächen könnte. In *KRAS*-aktivierten Bronchialkarzinom-Zellen wurde eine ERK-abhängige Reaktivierung von AKT nach PI3K-Inhibition beschrieben (199) und damit die Beobachtung gestützt, dass sich *KRAS*-mutierte Lungentumoren resistent gegenüber PI3K-Hemmung verhielten (200). Dies wirft die Frage auf, ob ein entsprechender Zusammenhang auch im Kolonkarzinom von Bedeutung ist – liegt doch in einem beträchtlichen Prozentsatz, eine aktivierende Mutation von *KRAS* vor. Zumindest für das gleichzeitige Vorliegen einer *PIK3CA*- und *KRAS*-Mutation in Kolonkarzinomzelllinien wurde eine Resistenz gegenüber BEZ235 beschrieben (187). Diese Beobachtung kann in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, zeigten auch LS174T^{PI3K-mut/KRAS-mut}-Zellen sowie HCT116^{PI3K-mut/KRAS-mut} *in vitro* keine geringere Wachstumshemmung durch BEZ235 als SW480^{PI3K-wt/KRAS-mut}-Zellen (Abbildung 4.2 A).

All diese komplexen Interaktionen zwischen dem PI3K/mTOR- und MAPK-Signalweg begründen das Potential einer gleichzeitigen Hemmung beider Signalwege durch Inhibitor-Kombination, wie BEZ235 und UO126, als therapeutische Strategie.

5.2.7 IRES-abhängige Translation von MYC nach Hemmung der Cap-abhängigen Translation durch PI3K/mTOR-Inhibition

In Situationen einer Zelle mit insgesamt reduzierter Proteinbiosynthese kann die Translation von MYC und anderen überlebensfördernden Proteinen 5'-Cap-unabhängig durch eine IRES-Struktur in deren 5'-UTR aufrechterhalten werden ((129, 137, 138); siehe auch Abschnitt 1.8.3). Für das Multiple Myelom wurde eine verstärkte IRES-Aktivität von MYC nach Hemmung von mTORC1 und somit der Cap-abhängigen Translation beschrieben, wobei ein Zusammenhang dieses Mechanismus mit der Wirkstoff-Resistenz bestimmter Zelllinien besteht (139). Auch für die induzierte Proteinexpression von MYC nach PI3K/mTOR-Hemmung in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 konnte eine entscheidende Rolle dessen IRES-abhängigen Translation nachgewiesen werden. Als Hinweis fand sich *MYC*-mRNA auch nach Behandlung mit BEZ235 bzw. 4EBP1-Induktion mit Polysomen assoziiert (151). Durch Inkubation mit Cymarin, einem Wirkstoff aus der Gruppe der Herzglykoside mit nachgewiesener *MYC*-IRES-inhibitorischer Wirkung (164), konnte die MYC-Induktion aufgehoben werden, was eine verstärkte IRES-abhängige Translation von MYC nach Hemmung der Cap-abhängigen Translation bestätigt (Abbildung 4.10; siehe auch Abschnitt 5.3.3).

Gefördert werden könnte die IRES-Aktivität von MYC wiederum durch aktivierte ERK/MNK-Kinasen sowie durch Wegfall einer negativen Regulation durch AKT (139, 140). Dies wäre eine weitere Erklärung für die verstärkte MYC-Proteinexpression nach Aktivierung des MAPK-Signalweges und somit für die ausgeprägte MYC-reprimierende Wirkung durch UO126 (Abbildung 4.6).

Neben unvollständiger Hemmung der Cap-abhängigen Translation ermöglicht also eine IRES-abhängige Translation, die durch MAPK-Aktivität verstärkte Expression von MYC nach PI3K/mTOR-Hemmung.

Der Einfluss einer Inkubation mit Cymarin auf das basale Proteinlevel von MYC kann anhand der Qualität des Ergebnisses nicht sicher beurteilt werden. Möglicherweise findet in Tumorzellen MYC-Translation jedoch sowohl Cap- als auch IRES-abhängig statt, was eine weitere Anforderung an den therapeutischen Ansatz der

Translationshemmung darstellt und dem somit durch alleinige mTOR-Inhibition nicht begegnet werden kann.

5.3 Hemmung der Translationsinitiation

5.3.1 Rationale für eine Hemmung der Translationsinitiation durch eIF4A-Inhibition im kolorektalen Karzinom

Therapeutisches Ziel ist es, vorangehend erörterte Feedback-Mechanismen zu umgehen, die u. a. erhöhte MYC-Level aufrechterhalten und möglicherweise zu verminderter Chemosensitivität von Tumoren beitragen. Dies kann teilweise durch gezielte Kombination von Inhibitoren erreicht werden, wie in dieser Arbeit z. B. für die gleichzeitige Anwendung von BEZ235 und UO126 gezeigt werden konnte. Eine weitere erfolgsversprechende Strategie hierbei ist die gezielte Inhibition weiter distal im Signalweg auf einer Stufe der Konvergenz verschiedener translationsfördernden Signale. Zudem erfordert das häufig verschobene 4EBP1/eIF4E-Verhältnis mit transformierender Wirkung in kolorektalen Tumoren, eine effizientere Hemmung von eIF4E und somit der Translation tumorfördernder Proteine wie MYC, als sie durch Inhibition regulierender Signalwege möglich ist ((108); siehe auch Abschnitt 5.2.3).

Beiden Forderungen würde durch direkte Hemmung der Translationsinitiation auf Stufe des eIF4F-Initiationskomplexes begegnet. Rocaglamid-Derivate mit dem bekannten Vertreter Silvestrol erreichen dies, indem sie spezifisch die Aktivität der eIF4A/II-Helikase hemmen und so die Formation eines funktionalen Komplexes aus eIF4E, eIF4G und eIF4A (eIF4F), als Voraussetzung für Initiation der Translation, verhindern ((106, 114); siehe auch Abschnitt 1.8.1).

In Lymphom-Zellen wurde die erfolgreiche Hemmung der Translation von MYC durch Silvestrol nachgewiesen (107).

Es wird von einer besonderen Abhängigkeit MYCs von eIF4F ausgegangen. Lange bekannt ist, dass eIF4E MYC-abhängig exprimiert wird (183, 201). Durch eIF4E/eIF4F-regulierte Translation von MYC einerseits und wiederum MYC-abhängiger Transkription von eIF4F-Komponenten andererseits, ergibt sich eine *Feedforward*-Schleife zwischen MYC und eIF4F (113, 144). Lin et al. und Robert et al. beschreiben eine synthetische

Lethalität zwischen MYC und eIF4F in MYC-abhängigen lymphoiden Tumorzellen (111, 145). Unter entsprechender Annahme für Kolonkarzinomzellen, ergibt sich eIF4F als vulnerabler und möglicherweise tumorspezifischer Angriffspunkt, MYC-Proteinexpression zu senken.

Im KRK findet sich weitgehend eine verminderte Expression von PDCD4 (202), was histopathologisch für einige Kolonkarzinome im Vergleich zu normaler Kolon-Schleimhaut bestätigt werden konnte (151). Durch Wegfall der negativen eIF4A-Regulation durch PDCD4 mündet dies in erhöhte eIF4A-Aktivität (103), welche somit als therapeutisches Ziel im KRK geeignet erscheint.

5.3.2 Erfolgreiche Reduktion der MYC-Proteinexpression durch eIF4A-Inhibition in Kolonkarzinomzellen

Durch Hemmung der Translationsinitiation mit den *small molecule*-Inhibitoren der eIF4A-Helikase, Silvestrol und Rocaglamid, wurde im Gegensatz zur PI3K/mTOR-Hemmung eine verminderte Proteinexpression von MYC in SW480-Zellen erreicht. Beide Inhibitoren verhinderten in niedrignanomolaren Konzentrationen die beobachtete BEZ235-induzierte MYC-Proteininduktion in SW480-Zellen und senkten zudem deren basale MYC-Proteinexpression mit dosisabhängigem Effekt (Abbildung 4.9 A-C).

Der posttranskriptionelle Effekt Silvestrols auf die Expression von MYC bestätigte sich durch nicht supprimierte MYC-mRNA-Expression (Abbildung 4.9 D). Ein gegenteilig sogar erhöhtes MYC-mRNA-Level nach Inkubation mit Silvestrol erklärt sich möglicherweise durch einen autoregulatorischen Effekt von MYC mit negativer transkriptioneller Rückkopplung auf seinen eigenen Promotor (203), wobei weitere Feedback-Mechanismen anhand dieser Datenlage jedoch nicht auszuschließen sind.

Die Aktivität von mTORC1 wurde durch beide Substanzen, in klarer Unterscheidung zu BEZ235, nicht gehemmt (Abbildung 4.9 A, C). Die beobachtete, verstärkte Ser240/244-Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 unter Behandlung mit Silvestrol weist auf eine negative Rückkopplung durch eIF4F bzw. abhängige Komponenten auf mTOR/S6K hin, der genaue Mechanismus bzw. dessen Auswirkung bleibt jedoch unklar.

Silvestrol hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des MAPK-Signalweges, gezeigt durch unveränderte Proteinlevel von pERK, mit weiterhin eher verstärkter Aktivierung von

pERK nach PI3K/mTOR-Hemmung. Auch unter Rocaglamid war keine hemmende Wirkung auf die Phosphorylierung von ERK zu verzeichnen, wie sie eine beschriebene Hemmung von Prohibitin 1/2 durch Rocaglamid erwarten ließe (163) (Abbildung 4.9 A, C). Dies unterstützt die Daten, dass Rocaglamid bezüglich inhibitorischer Wirkung auf Translationsinitiation eine vergleichbare Selektivität für eIF4A1/II wie Silvestrol aufweist (119).

Eine Hemmung der MYC-Proteinexpression durch Behandlung mit Silvestrol wurde neben SW480 weiterhin in den Zelllinien LS174T und HCT116 nachgewiesen (Abbildung 4.9 E).

5.3.3 Hemmung der Cap- und IRES-abhängigen Translation von MYC durch eIF4A-Inhibition

Anhand des Effekts einer IRES-Inhibition durch Cymarin wurde gezeigt, dass die verstärkte MYC-Expression nach PI3K/mTOR-Hemmung weitgehend durch Cap-/eIF4E-unabhängige Translation erfolgt (siehe auch Abschnitt 5.2.7). Da eine Behandlung mit Silvestrol in SW480-Zellen die MYC-Induktion jedoch verhindert und einen nahezu identischen Effekt wie die Inkubation mit Cymarin aufweist, wird für Silvestrol ebenso eine inhibitorische Wirkung auf die IRES-Aktivität von *MYC* angenommen (Abbildung 4.10). Diese These wird bestärkt durch den Nachweis Spriggs' et al., dass die IRES-abhängige Translation von MYC mit seiner komplex strukturierten 5'-UTR zwar eIF4E-unabhängig, jedoch unter Beteiligung der eIF4A-Helikase erfolgt (204).

Die Beobachtung bestätigend, konnte über diese Arbeit hinaus, nach Behandlung mit Silvestrol im Gegensatz zu BEZ235, eine reduzierte Bindung von *MYC*-mRNA an Polysomen nachgewiesen werden. Ein Reporter-Assay in SW480-Zellen zeigte zudem die verminderte Translation einer Luciferase unter der Kontrolle eines *MYC*-5'-UTR- bzw. *MYC*-IRES-Elements in Relation zur Aktivität eines Kontroll-Reporters bei Inkubation mit Silvestrol. (151).

Somit ist durch Silvestrol als eIF4A-Inhibitor sowohl die Cap/eIF4E-abhängige als auch die IRES/eIF4A-abhängige Translation von MYC hemmbar.

Es ist folglich möglich bzw. sogar wahrscheinlich, dass eine Silvestrol-bedingte IRES-Inhibition auch Einfluss bei zahlreichen Experimenten zur Abhängigkeit von MYC und

eIF4F hatte (wie z.B. bei Lin et al. (2012), Robert et al. (2014)), sodass aufgrund einer zusätzlichen, eIF4F-unabhängigen Funktion von eIF4A möglicherweise nur von einer synthetischen Letalität zwischen eIF4A und MYC in Tumorzellen gesprochen werden kann.

Die Abhängigkeit bestimmter mRNAs von der eIF4A-Helikasefunktion für Translationsinitiation und somit deren Silvestrol-Sensitivität ist bedingt durch die Länge und Komplexität ihrer 5'-UTR-Struktur, wodurch die Initiation von Translation somit keiner universalen, für alle Gene gleichermaßen geltenden Regulation durch eIF4F unterliegt (205, 206). So ist eine Teilmenge der durch eIF4A-Hemmung hinsichtlich ihres Ribosomen-Profiles beeinflussten mRNAs nicht identisch mit mRNAs, deren Translation durch mTOR/eIF4E reguliert wird (206). Unter den eIF4A-abhängigen, Silvestrolsensitiven Gentranskripten befinden sich überwiegend Onkogene (mit Funktion für Zellzyklusprogression) und Transkriptionsregulatoren – mit Korrelation zu einer Anreicherung von Guanin-reichen Quadruplex-Strukturen (*G-Quadruplexe*) in deren 5'-UTR (207). Diese stellen somit eine vielversprechende Zielgruppe der therapeutischen Translationshemmung in Tumoren dar.

In dieser Arbeit wurde die eIF4A-Abhängigkeit der Translation von *MYC* in SW480-Zellen gezeigt, sei es bei Cap-abhängiger Translationsinitiation oder Cap-unabhängigen Mechanismen. Somit erweist sich der Einsatz von Silvestrol als probates Mittel, die Proteinexpression von *MYC* in Kolonkarzinomzellen zu hemmen.

5.3.4 Proliferationshemmende Wirkung von Silvestrol auf Kolonkarzinomzellen durch Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose *in vitro*

Eine Inkubation mit 10-25 nM Silvestrol, bei der eine supprimierende Wirkung auf *MYC*-Proteinlevel nachgewiesen wurde, führte bei kontinuierlicher Behandlung zu einer deutlichen Proliferationshemmung in SW480-, HCT116- und LS174-Zellen. Bei LS174T- und HCT116-Zellen war dieser wachstumshemmende Effekt stärker ausgeprägt als bei SW480-Zellen bzw. trat bereits bei niedrigerer Silvestrol-Konzentration ein, mit deutlichem Verlust bereits gebildeter Kolonien bei kontinuierlicher Behandlung als Hinweis auf eine zusätzliche Zelltod-induzierende Wirkung Silvestrols. Durch eine

beobachtete Wiederaufnahme der Proliferation nach Aussetzen der Silvestrol-Behandlung in SW480-Zellen, zeigt sich eine Reversibilität der proliferationshemmenden Wirkung Silvestrols in den verbliebenen Zellen (siehe Abbildung 4.11).

Eine Analyse der Zellzyklusphasenverteilung mittels PI-FACS zeigte keine einheitliche Silvestrol-induzierte Arretierung des Zellzyklus in einer bestimmten Phase zwischen den Zelllinien, mit Akkumulation von SW480-Zellen in der G2/M-Phase und von LS174-Zellen in der G1/G0-Phase nach 24-stündiger Inkubation mit Silvestrol (siehe Abbildung 4.12). Das Ergebnis geht einher mit bereits veröffentlichten, unterschiedlichen Beobachtungen von sowohl G1/G0-arretierender (165, 166) als auch G2/M-arretierender (125, 126) Wirkung durch Rocaglamid-Derivate für zahlreiche Zelllinien verschiedener Tumorentitäten. Diese ist möglicherweise abhängig von der vorherrschenden Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Behandlung mit Silvestrol, wobei Silvestrol bei in G1-befindlichen Zellen den Übertritt in die S-Phase verhindert und Zellen, die den G1/S-Kontrollpunkt bereits überschritten haben, in der G2-Phase arretiert werden (206).

Die unspezifischen und zudem insgesamt mäßigen Effekte Silvestrols auf die Verteilung der Zellzyklusphasen spiegeln die Tatsache wider, dass durch Silvestrol, neben MYC (entscheidend für G1-S-Transition), die Translation verschiedener Zellzyklus-regulierender Proteine, insbesondere D-Zykline, gehemmt wird (116, 121) und somit die Progression des Zellzyklus in verschiedenen Phasen beeinflusst wird.

Im Einklang mit Zellzyklusarrest und verminderter MYC-Expression ließ sich in Silvestrol-behandelten Zellen eine verstärkte Expression des MYC-abhängig reprimierten Gens *CDKN1A* (*p21*), als Marker für Zellzyklusinhibition, sowie von *MUC2* und *EPHB1*, als Differenzierungsmarker in Kolonepithelzellen, nachweisen (167) (siehe Abbildung 4.12 B). Allerdings wurde die verstärkte Expression dieser Gene nicht auf Proteinebene untersucht, weshalb der Effekt nicht sicher beurteilbar ist.

Zudem war unter 24-stündiger Behandlung mit Silvestrol eine leichte Zunahme der subG1-Population in der PI-FACS-Analyse zu verzeichnen, mit wiederum höherem Anteil in LS174T-Zellen, als Zeichen einer gewissen Apoptose-induzierenden Wirkung Silvestrols. Die Induktion von Apoptose über den intrinsischen/mitochondrialen

Signalweg durch Silvestrol ist vielfach für hämatologische und solide Tumoren beschrieben (120, 121, 123-125). Als möglicher Auslöser mitochondrialer Membranstörung bestätigte sich eine verminderte Expression des anti-apoptotischen Proteins MCL1 (152) in Silvestrol-behandelten Zellen (Abbildung 4.13 B). Der in Leukämie-Zellen nachgewiesene, zeitabhängige Effekt mit maximaler Apoptoserate nach deutlich mehr als 24 h nach Silvestrol-Behandlung (120) konnte auch in Kolonkarzinomzellen bestätigt werden. Mittels Annexin V/PI-FACS-Analyse zeigte sich eine zeitabhängige Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Silvestrol – mit insgesamt deutlich höheren Apoptoseraten in LS174T-Zellen gegenüber SW480-Zellen (Abbildung 4.13 A). Ob die Apoptose-induzierende Wirkung Silvestrols jedoch Dosis-abhängig auftritt und der gezeigte Unterschied zwischen den Zelllinien lediglich unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien auf die gleiche Silvestrol-Dosis widerspiegelt, kann anhand der Daten nicht beurteilt werden.

Die Apoptose-induzierende Wirkung bestätigend, fand sich ein Anstieg des Apoptose-markierenden Proteins *cleaved*-PARP in Silvestrol-behandelten Zellen, jedoch ohne gleichzeitigen Nachweis einer Aktivierung von Caspase 3 als PARP-inaktivierendes Enzym (168) (Abbildung 4.13 C). Eine entsprechende Beobachtung mit fehlender Beteiligung von Caspase 3 und 7 im Rahmen Silvestrol-induzierter Apoptose findet sich auch durch Kim et al. für Prostatakarzinom-Zellen beschrieben (123), jedoch ebenso für lymphatische Zelllinien durch Lucas et al. widerlegt (120). Ob der ausbleibende Nachweis von Caspase 3 also wirklich auf deren fehlende Beteiligung bei Silvestrol-induzierter Apoptose oder auf ein durch die angewandte Methode nicht nachweisbares Proteinlevel nach nur 24-stündiger Inkubation zurückzuführen ist, bleibt offen. Die Beteiligung weiterer Caspasen, insbesondere Caspase 7, wurde nicht untersucht.

Die zytostatische und zytotoxische Wirkung des eIF4A-Inhibitors Silvestrol auf Kolonkarzinomzellen, welche in dieser Arbeit zumindest *in vitro* gezeigt wurde, bildet die Voraussetzung für eine potentielle Eignung als tumorhemmender Wirkstoff. Zusammen mit dem Potential einer eIF4A-Inhibition, MYC-Proteinexpression in Kolonkarzinomzellen zu senken, könnte damit ein zentrales Ziel bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms erreicht werden.

5.4 Zusammenfassendes Modell

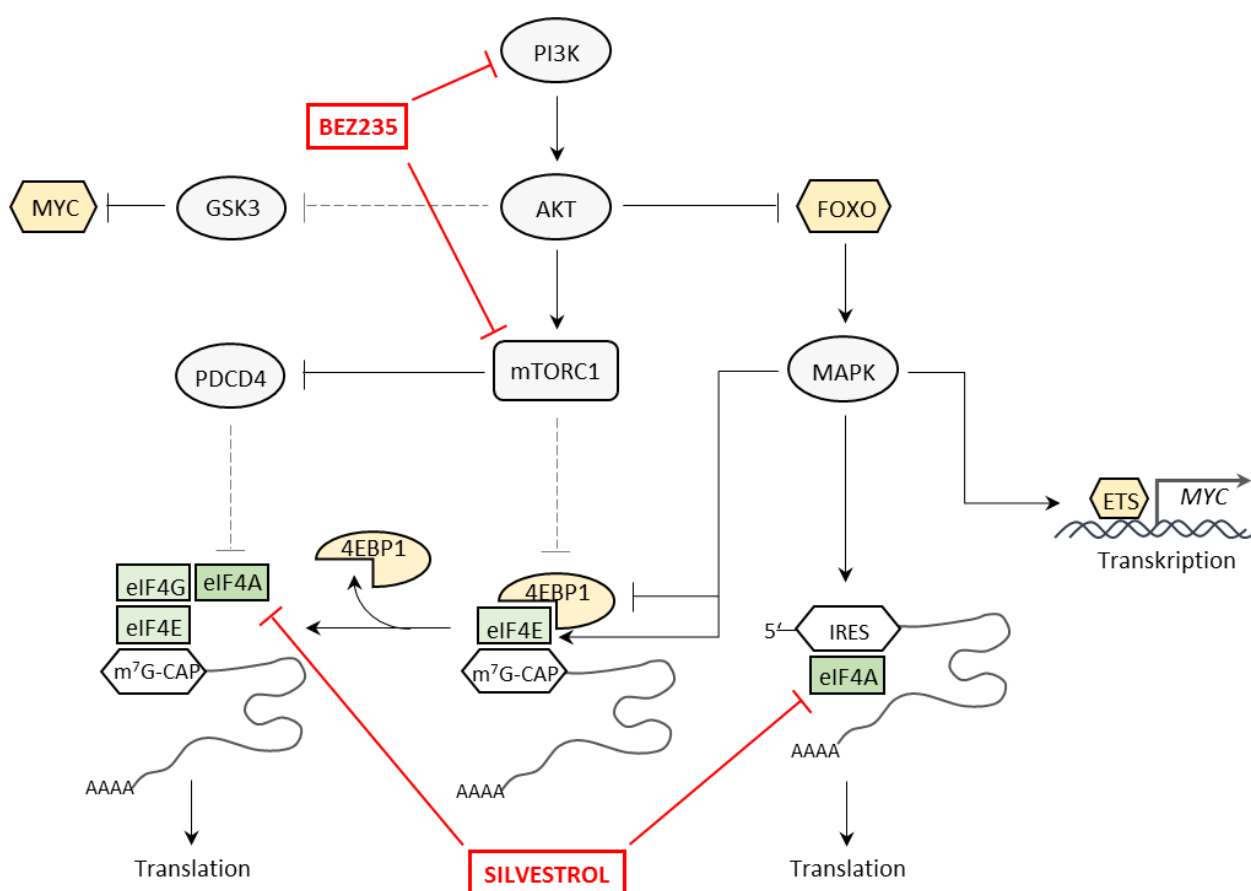


Abbildung 5.1: Zusammenfassendes Modell

Behandlung mit BEZ235 als dualer PI3K/mTOR-Inhibitor führt durch einen FOXO-abhängigen Feedback-Mechanismus zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges mit der Folge einer verstärkten Transkription sowie Cap- und IRES-abhängigen Translation von MYC.

Negative Regulation der MYC-Stabilität via PI3K/GSK3 und der Translationsinitiation via mTOR/4EBP1 und PDCD4/eIF4A finden sich vermindert im KRK (*gestrichelte Linien*).

eIF4A-Inhibition durch Silvestrol umgeht diese Mechanismen und hemmt die Cap-abhängige und IRES-abhängige Translation von MYC.

5.5 Limitationen und Ausblick

Zwar tritt bei Behandlung mit Silvestrol keine kompensatorische MAPK-Aktivierung auf, ob durch eIF4A-Inhibition jedoch ebenso eine Feedback-Aktivierung weiterer vorangeschalteter Signalmoleküle verursacht wird, ist anhand dieser Daten nicht auszuschließen. So wurde nach Inkubation mit Silvestrol eine verstärkte Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 beobachtet, als möglicher Hinweis auf eine verstärkte mTOR/S6K-Aktivität (Abbildung 4.9). Es bleibt anzumerken, dass bestimmte (Onko-)Gene auch Cap-unabhängig und ohne Bedarf an eIF4A translatiert werden können, was z. B. für Wachstumsfaktorrezeptoren gezeigt wurde (105). So würde Silvestrol die verstärkte IRES-abhängige Translation von RTK in Tumorzellen im Gegensatz zu der von MYC nicht verhindern, was interessanter Gegenstand weiterer Experimente darstellen könnte. Schließlich wurde für eine Gruppe von Genen in humanen Mammakarzinomzellen, je nach eIF4A-Abhängigkeit deren 5'-UTR-Struktur, auch eine verstärkte Translation unter Silvestrol beobachtet (206).

Ob weiterhin ein therapeutischer Vorteil einer gezielten Inhibitor-Kombination mit Silvestrol zu erzielen ist, bleibt offen. Die unterschiedliche eIF4E- und eIF4A-Abhängigkeit von Genen (206) rechtfertigt möglicherweise sogar die gleichzeitige Anwendung eines mTOR/eIF4E-Inhibitors und eIF4A-Inhibitors, welche folglich – möglicherweise synergistisch – die Translation verschiedener Gengruppen beeinflussen. Ein additiver Effekt einer Behandlung mit BEZ235 und Silvestrol konnte zumindest bzgl. Apoptoseinduktion in Kolonkarzinomzellen gezeigt werden (Abbildung 4.13).

Neben den vorliegenden *in vitro*-Daten zur proliferationshemmenden Wirkung Silvestrols auf Kolonkarzinomzelllinien, sind weiterführende *in vivo*-Experimente notwendig, v. a. um eine Aussage bzgl. Verträglichkeit und wünschenswerter tumorspezifischer Wirkung treffen zu können. Für die Selektivität der zytotoxischen Wirkung Silvestrols auf maligne B-Zellen gibt es für hämatologische Tumoren bereits positive Hinweise (120, 145).

Durch die Arbeitsgruppe O. Sansoms erfolgte über diese Arbeit hinaus bereits die Anwendung von BEZ235 und Silvestrol im Mausmodell mit *Knockout* des Tumorsuppressorgens *APC*.

Kolonepithelzellen entwickeln nach *APC*-Verlust den sog. „*crypt progenitor phenotype*“ mit verändertem Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsverhalten (167), für welchen aktiviertes *MYC* als entscheidender Mediator nachgewiesen wurde (142, 208). Trotz proliferationshemmender Wirkung *in vitro* (Abbildung 4.2), hatte BEZ235 *in vivo* keinen Effekt auf den hyperproliferativen Phänotyp der Darmkrypten in *APC*-defizienten Mäusen (151), während für alleinige *mTORC1*-Hemmung durch Rapamycin jedoch ein wachstumshemmender Effekt in *APC*-defizienten Darmkrypten gezeigt ist (189). Dies lässt vermuten, dass eine duale *PI3K*- und *mTOR*-Hemmung mit nachfolgender *FOXO*- und kompensatorischer *MAPK*-Aktivierung, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, dessen tumorhemmende Wirkung limitiert.

Im Gegensatz zu BEZ235 unterdrückte Silvestrol die Hyperproliferation in Krypten der Darmschleimhaut nach *APC*-Deletion und senkte (posttranskriptionell) deren *MYC*-Expression. Jedoch wurde kein Einfluss einer Silvestrol-Behandlung auf Proliferation und *MYC*-Expression in *APC-Wildtyp*-Krypten beobachtet, wodurch sich ein therapeutisches Fenster für die Inhibition der Translationsinitiation ergibt (151).

Durch die Abhängigkeit *MYCs* von der *eIF4A*-Helikasefunktion in transformierten Kolonepithelzellen eröffnet sich so mit *eIF4A* möglicherweise ein tumorspezifisches Ziel für die Therapie des kolorektalen Karzinoms.

Insgesamt erweist sich die Hemmung der Translation, sei es der *eIF4A*-abhängigen Initiation oder vorrangig der *mTOR*-abhängigen Elongation (189) als erfolgreicher Ansatz, *MYC*-abhängiges Wachstum im Kolonkarzinom zu unterdrücken.

6 Zusammenfassung

Eine veränderte Expression des Transkriptionsfaktors MYC, u. a. als Folge verschiedener deregulierter Signalwege, wird als entscheidender Faktor für Tumorentstehung und -progress im kolorektalen Karzinom gesehen. Somit gilt die Hemmung dessen Expression und Funktion als zentrales Ziel bei Ansätzen zur zielgerichteten Tumorthherapie.

Als geeignete Strategie, sowohl die Halbwertszeit als auch die Translation von MYC zu verringern sowie dessen Funktion zu hemmen, erschien eine duale PI3K-/mTOR-Hemmung durch den *small molecule*-Inhibitor BEZ235. Gegenteilig war jedoch unter Behandlung mit BEZ235 – trotz proliferationsarretierender Wirkung des Inhibitors – eine verstärkte MYC-Expression in verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien zu beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von MYC nach PI3K-/mTOR-Hemmung durch eine kompensatorische Aktivierung des MAPK-Signalwegs, wiederum als Folge einer Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren und Induktion von Rezeptortyrosinkinasen, stattfindet.

Es ist hierbei von einem wirkungsabschwächenden Feedback-Mechanismus zwischen den Signalwegen auszugehen – mit vielfach möglichen Interaktionen zwischen der PI3K- und MAPK-Signalkaskade.

So konnte in Kolonkarzinomzellen, neben verstärkter Transkription von *MYC*, eine verstärkte IRES-abhängige Translation von MYC nach Hemmung der mTOR-/5'Cap-abhängigen Translation durch BEZ235 als Ursache der MYC-Induktion nachgewiesen werden.

Neben der kombinierten Anwendung verschiedener Inhibitoren sahen wir eine Hemmung der Translationsinitiation, somit ein Ansatz auf Stufe der Konvergenz verschiedener translationsfördernder Signale, als mögliche Strategie, diese Feedback-Mechanismen zu umgehen. Hierfür wurden Rocaglamid und dessen Derivat Silvestrol als *small molecule*-Inhibitoren der eIF4A-Helikase, einem Translations-Initiationsfaktor und u. a. Bestandteil des eIF4F-Initiationskomplexes, verwendet.

Im Gegensatz zur PI3K/mTOR-Hemmung war durch direkte Hemmung der Translationsinitiation eine Reduktion der MYC-Proteinexpression in verschiedenen

Kolonkarzinom-Zelllinien zu erreichen – ohne einhergehende MAPK-Aktivierung. Durch die nachgewiesene, vollständige Aufhebung der BEZ235-induzierten MYC-Expression nach eIF4A-Inhibition besitzt Silvestrol somit das Potential, sowohl die Cap-/eIF4F-abhängige als auch die somit eIF4A-abhängige IRES-vermittelte Translation von MYC zu hemmen.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit eine proliferationshemmende Wirkung von Silvestrol auf Kolonkarzinom-Zellen, via Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose *in vitro*, gezeigt werden. Dies stellt die Voraussetzung für eine potentielle Eignung als tumorhemmender Wirkstoff in der Therapie des kolorektalen Karzinoms dar, bedarf jedoch weiterer, u. a. notwendiger *in vivo*-Experimente.

7 Literaturverzeichnis

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2013*. CA: a cancer journal for clinicians. 2013;63(1):11-30.
2. Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. H. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Berlin: RKI. 2013;9. Ausgabe.
3. Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. H. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Kapitel 2 Epidemiologie von Krebserkrankungen*. Berlin: RKI. 2016.
4. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. *The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence*. International journal of cancer. 2009;125(1):171-80.
5. Fearon ER. *Molecular genetics of colorectal cancer*. Annual review of pathology. 2011;6:479-507.
6. Kerber RA, Neklason DW, Samowitz WS, Burt RW. *Frequency of familial colon cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) in a large population database*. Familial cancer. 2005;4(3):239-44.
7. Lynch HT, de la Chapelle A. *Hereditary colorectal cancer*. The New England journal of medicine. 2003;348(10):919-32.
8. Fearon ER, Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell. 1990;61(5):759-67.
9. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. *Natural history of untreated colonic polyps*. Gastroenterology. 1987;93(5):1009-13.
10. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. *Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy*. The National Polyp Study Workgroup. The New England journal of medicine. 1993;329(27):1977-81.
11. Cancer Genome Atlas N. *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer*. Nature. 2012;487(7407):330-7.
12. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. Nature genetics. 2006;38(7):787-93.
13. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, et al. *Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer*. International journal of oncology. 2009;34(4):1069-75.
14. Rossi S, Kopetz S, Davuluri R, Hamilton SR, Calin GA. *MicroRNAs, ultraconserved genes and colorectal cancers*. The international journal of biochemistry & cell biology. 2010;42(8):1291-7.

15. Bartel DP. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell. 2004;116(2):281-97.
16. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. *A microRNA component of the p53 tumour suppressor network*. Nature. 2007;447(7148):1130-4.
17. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, et al. *Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer*. Cancer research. 2008;68(11):4123-32.
18. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, et al. *Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer*. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2008;7(16):2591-600.
19. Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. *Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29*. Journal of virology. 1982;42(3):773-9.
20. Pelengaris S, Khan M, Evan GI. *Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression*. Cell. 2002;109(3):321-34.
21. Pelengaris S, Khan M, Evan G. *c-MYC: more than just a matter of life and death*. Nature reviews Cancer. 2002;2(10):764-76.
22. Dang CV. *MYC on the path to cancer*. Cell. 2012;149(1):22-35.
23. Adhikary S, Eilers M. *Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins*. Nature reviews Molecular cell biology. 2005;6(8):635-45.
24. Blackwood EM, Eisenman RN. *Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc*. Science. 1991;251(4998):1211-7.
25. Blackwood EM, Luscher B, Eisenman RN. *Myc and Max associate in vivo*. Genes Dev. 1992;6(1):71-80.
26. Ayer DE, Kretzner L, Eisenman RN. *Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity*. Cell. 1993;72(2):211-22.
27. Hurlin PJ, Queva C, Eisenman RN. *Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites*. Genes Dev. 1997;11(1):44-58.
28. Ayer DE, Eisenman RN. *A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation*. Genes Dev. 1993;7(11):2110-9.
29. Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, et al. *Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1*. Molecular cell. 2002;10(3):509-21.
30. Herbst A, Salghetti SE, Kim SY, Tansey WP. *Multiple cell-type-specific elements regulate Myc protein stability*. Oncogene. 2004;23(21):3863-71.
31. Welcker M, Orian A, Grim JE, Eisenman RN, Clurman BE. *A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size*. Current biology : CB. 2004;14(20):1852-7.

32. Kim SY, Herbst A, Tworkowski KA, Salghetti SE, Tansey WP. *Skp2 regulates Myc protein stability and activity*. Molecular cell. 2003;11(5):1177-88.
33. Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, et al. *The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation*. Cell. 2005;123(3):409-21.
34. Peter S, Bultinck J, Myant K, Jaenicke LA, Walz S, Muller J, et al. *Tumor cell-specific inhibition of MYC function using small molecule inhibitors of the HUWE1 ubiquitin ligase*. EMBO molecular medicine. 2014;6(12):1525-41.
35. Popov N, Wanzel M, Madiredjo M, Zhang D, Beijersbergen R, Bernards R, et al. *The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability*. Nature cell biology. 2007;9(7):765-74.
36. Eilers M, Eisenman RN. *Myc's broad reach*. Genes Dev. 2008;22(20):2755-66.
37. Zeller KI, Zhao X, Lee CW, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, et al. *Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(47):17834-9.
38. Li Z, Van Calcar S, Qu C, Cavenee WK, Zhang MQ, Ren B. *A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(14):8164-9.
39. Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, et al. *c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells*. Cell. 2012;151(1):68-79.
40. Lin CY, Loven J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, et al. *Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc*. Cell. 2012;151(1):56-67.
41. Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, et al. *c-Myc regulates transcriptional pause release*. Cell. 2010;141(3):432-45.
42. Walz S, Lorenzin F, Morton J, Wiese KE, von Eyss B, Herold S, et al. *Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles*. Nature. 2014;511(7510):483-7.
43. Jung LA, Gebhardt A, Koelmel W, Ade CP, Walz S, Kuper J, et al. *OmoMYC blunts promoter invasion by oncogenic MYC to inhibit gene expression characteristic of MYC-dependent tumors*. Oncogene. 2017;36(14):1911-24.
44. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science. 1998;281(5382):1509-12.
45. Roussel MF, Davis JN, Cleveland JL, Ghysdael J, Hiebert SW. *Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1*. Oncogene. 1994;9(2):405-15.
46. Sears R, Leone G, DeGregori J, Nevins JR. *Ras enhances Myc protein stability*. Molecular cell. 1999;3(2):169-79.
47. Gregory MA, Qi Y, Hann SR. *Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization*. The Journal of biological chemistry. 2003;278(51):51606-12.

48. Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JE, Harper JW, Eisenman RN, et al. *The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(24):9085-90.
49. Kress TR, Cannell IG, Brenkman AB, Samans B, Gaestel M, Roepman P, et al. *The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis*. Molecular cell. 2011;41(4):445-57.
50. Vivanco I, Sawyers CL. *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nature reviews Cancer. 2002;2(7):489-501.
51. Ali IU, Schriml LM, Dean M. *Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity*. Journal of the National Cancer Institute. 1999;91(22):1922-32.
52. Cantley LC. *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science. 2002;296(5573):1655-7.
53. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. *PI3K signalling: the path to discovery and understanding*. Nature reviews Molecular cell biology. 2012;13(3):195-203.
54. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nature cell biology. 2002;4(9):648-57.
55. Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. *Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation*. The Biochemical journal. 1999;344 Pt 2:427-31.
56. Schmelzle T, Hall MN. *TOR, a central controller of cell growth*. Cell. 2000;103(2):253-62.
57. Fingar DC, Blenis J. *Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression*. Oncogene. 2004;23(18):3151-71.
58. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science. 2005;307(5712):1098-101.
59. Vogt PK. *PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer*. Trends in molecular medicine. 2001;7(11):482-4.
60. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, et al. *The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins*. The Journal of cell biology. 2004;166(2):213-23.
61. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. Cancer research. 2006;66(3):1500-8.
62. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, et al. *Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity*. Molecular cancer therapeutics. 2008;7(7):1851-63.

63. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, et al. *NVP-BE2235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations*. *Cancer research*. 2008;68(19):8022-30.
64. Roper J, Richardson MP, Wang WV, Richard LG, Chen W, Coffee EM, et al. *The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE2235 induces tumor regression in a genetically engineered mouse model of PIK3CA wild-type colorectal cancer*. *PLoS One*. 2011;6(9):e25132.
65. Manara MC, Nicoletti G, Zambelli D, Ventura S, Guerzoni C, Landuzzi L, et al. *NVP-BE2235 as a new therapeutic option for sarcomas*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(2):530-40.
66. Gil Del Alcazar CR, Hardebeck MC, Mukherjee B, Tomimatsu N, Gao X, Yan J, et al. *Inhibition of DNA Double-Strand Break Repair by the Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BE2235 as a Strategy for Radiosensitization of Glioblastoma*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(5):1235-48.
67. Kudoh A, Oishi T, Itamochi H, Sato S, Naniwa J, Sato S, et al. *Dual Inhibition of Phosphatidylinositol 3'-Kinase and Mammalian Target of Rapamycin Using NVP-BE2235 as a Novel Therapeutic Approach for Mucinous Adenocarcinoma of the Ovary*. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2014;24(3):444-53.
68. Gobin B, Battaglia S, Lanel R, Chesneau J, Amiaud J, Redini F, et al. *NVP-BE2235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, inhibits osteosarcoma cell proliferation and tumor development in vivo with an improved survival rate*. *Cancer letters*. 2014;344(2):291-8.
69. Hong SW, Shin JS, Moon JH, Kim YS, Lee J, Choi EK, et al. *NVP-BE2235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, induces cell death through alternate routes in prostate cancer cells depending on the PTEN genotype*. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2014.
70. Lin G, Gai R, Chen Z, Wang Y, Liao S, Dong R, et al. *The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE2235 prevents epithelial-mesenchymal transition induced by hypoxia and TGF-beta1*. *European journal of pharmacology*. 2014;729C:45-53.
71. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Kitahara T, Kimura S, Maekawa T, et al. *Efficacy of the dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BE2235 in combination with nilotinib against BCR-ABL-positive leukemia cells involves the ABL kinase domain mutation*. *Cancer biology & therapy*. 2014;15(2):207-15.
72. Ding J, Romani J, Zaborski M, MacLeod RA, Nagel S, Drexler HG, et al. *Inhibition of PI3K/mTOR overcomes nilotinib resistance in BCR-ABL1 positive leukemia cells through translational down-regulation of MDM2*. *PLoS One*. 2013;8(12):e83510.
73. Bendell JC, Kurkjian C, Infante JR, Bauer TM, Burris HA, 3rd, Greco FA, et al. *A phase 1 study of the sachet formulation of the oral dual PI3K/mTOR inhibitor BE2235 given twice daily (BID) in patients with advanced solid tumors*. *Investigational new drugs*. 2015;33(2):463-71.
74. Fazio N, Buzzoni R, Baudin E, Antonuzzo L, Hubner RA, Lahner H, et al. *A Phase II Study of BE2235 in Patients with Everolimus-resistant, Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumours*. *Anticancer research*. 2016;36(2):713-9.

75. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention*. Leukemia. 2003;17(7):1263-93.
76. Zhang W, Liu HT. *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell research. 2002;12(1):9-18.
77. Hahn SM, Bernhard E, McKenna WG. *Farnesyltransferase inhibitors*. Seminars in oncology. 2001;28(5 Suppl 16):86-93.
78. Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. *Discovery of a novel Raf kinase inhibitor*. Endocrine-related cancer. 2001;8(3):219-25.
79. Sebolt-Leopold JS. *MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors*. Current pharmaceutical design. 2004;10(16):1907-14.
80. Ward RA, Colclough N, Challinor M, Debreczeni JE, Eckersley K, Fairley G, et al. *Structure-Guided Design of Highly Selective and Potent Covalent Inhibitors of ERK1/2*. Journal of medicinal chemistry. 2015;58(11):4790-801.
81. Jackson BC, Carpenter C, Nebert DW, Vasiliou V. *Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families*. Human genomics. 2010;4(5):345-52.
82. Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. *Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues*. The Biochemical journal. 2000;349(Pt 2):629-34.
83. Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, Koo CY. *Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony*. Nature reviews Cancer. 2013;13(7):482-95.
84. Coomans de Brachene A, Bollaert E, Eijkelenboom A, de Rocca Serra A, van der Vos KE, Burgering BM, et al. *The expression of the tumour suppressor HBP1 is down-regulated by growth factors via the PI3K/PKB/FOXO pathway*. The Biochemical journal. 2014;460(1):25-34.
85. Delpuech O, Griffiths B, East P, Essafi A, Lam EW, Burgering B, et al. *Induction of Mxi1-SR alpha by FOXO3a contributes to repression of Myc-dependent gene expression*. Molecular and cellular biology. 2007;27(13):4917-30.
86. Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, et al. *FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis*. Cell. 2007;128(2):309-23.
87. Fu Z, Tindall DJ. *FOXOs, cancer and regulation of apoptosis*. Oncogene. 2008;27(16):2312-9.
88. Myatt SS, Lam EW. *The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer*. Nature reviews Cancer. 2007;7(11):847-59.
89. Vogt PK, Jiang H, Aoki M. *Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins*. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2005;4(7):908-13.
90. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell. 1999;96(6):857-68.

91. Burgering BM, Kops GJ. *Cell cycle and death control: long live Forkheads*. Trends in biochemical sciences. 2002;27(7):352-60.
92. Fernandez de Mattos S, Villalonga P, Clardy J, Lam EW. *FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells*. Molecular cancer therapeutics. 2008;7(10):3237-46.
93. Hui RC, Gomes AR, Constantinidou D, Costa JR, Karadedou CT, Fernandez de Mattos S, et al. *The forkhead transcription factor FOXO3a increases phosphoinositide-3 kinase/Akt activity in drug-resistant leukemic cells through induction of PIK3CA expression*. Molecular and cellular biology. 2008;28(19):5886-98.
94. Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, et al. *AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity*. Cancer cell. 2011;19(1):58-71.
95. Muranen T, Selfors LM, Worster DT, Iwanicki MP, Song L, Morales FC, et al. *Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive resistance in matrix-attached cancer cells*. Cancer cell. 2012;21(2):227-39.
96. Sonenberg N, Gingras AC. *The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth*. Current opinion in cell biology. 1998;10(2):268-75.
97. Pestova TV, Kolupaeva VG. *The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection*. Genes Dev. 2002;16(22):2906-22.
98. Sonenberg N, Hinnebusch AG. *Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets*. Cell. 2009;136(4):731-45.
99. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, et al. *Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism*. Genes Dev. 1999;13(11):1422-37.
100. Scheper GC, Morrice NA, Kleijn M, Proud CG. *The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells*. Molecular and cellular biology. 2001;21(3):743-54.
101. Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA. *Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo*. Molecular and cellular biology. 1999;19(3):1871-80.
102. Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ, Proud CG. *Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA*. The Journal of biological chemistry. 2002;277(5):3303-9.
103. Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. *S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth*. Science. 2006;314(5798):467-71.
104. Puig O, Marr MT, Ruhf ML, Tjian R. *Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway*. Genes Dev. 2003;17(16):2006-20.
105. Olson CM, Donovan MR, Spellberg MJ, Marr MT, 2nd. *The insulin receptor cellular IRES confers resistance to eIF4A inhibition*. eLife. 2013;2:e00542.

106. Bordeleau ME, Robert F, Gerard B, Lindqvist L, Chen SM, Wendel HG, et al. *Therapeutic suppression of translation initiation modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model*. The Journal of clinical investigation. 2008;118(7):2651-60.
107. Schatz JH, Oricchio E, Wolfe AL, Jiang M, Linkov I, Maragulia J, et al. *Targeting cap-dependent translation blocks converging survival signals by AKT and PIM kinases in lymphoma*. The Journal of experimental medicine. 2011;208(9):1799-807.
108. De Benedetti A, Graff JR. *eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases*. Oncogene. 2004;23(18):3189-99.
109. Dilling MB, Germain GS, Dudkin L, Jayaraman AL, Zhang X, Harwood FC, et al. *4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin*. The Journal of biological chemistry. 2002;277(16):13907-17.
110. Avdulov S, Li S, Michalek V, Burrichter D, Peterson M, Perlman DM, et al. *Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells*. Cancer cell. 2004;5(6):553-63.
111. Robert F, Roman W, Bramoulle A, Fellmann C, Roulston A, Shustik C, et al. *Translation initiation factor eIF4F modifies the dexamethasone response in multiple myeloma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(37):13421-6.
112. Boussemaert L, Malka-Mahieu H, Girault I, Allard D, Hemmingsson O, Tomasic G, et al. *eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies*. Nature. 2014;513(7516):105-9.
113. Pelletier J, Graff J, Ruggero D, Sonenberg N. *Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development*. Cancer research. 2015;75(2):250-63.
114. Pan L, Woodard JL, Lucas DM, Fuchs JR, Kinghorn AD. *Rocaglamide, silvestrol and structurally related bioactive compounds from Aglaia species*. Natural product reports. 2014;31(7):924-39.
115. Hwang BY, Su BN, Chai H, Mi Q, Kardono LB, Afriastini JJ, et al. *Silvestrol and episilvestrol, potential anticancer rocaglate derivatives from Aglaia silvestris*. The Journal of organic chemistry. 2004;69(10):3350-8.
116. Cencic R, Carrier M, Galicia-Vazquez G, Bordeleau ME, Sukarieh R, Bourdeau A, et al. *Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol*. PLoS One. 2009;4(4):e5223.
117. Chambers JM, Lindqvist LM, Webb A, Huang DC, Savage GP, Rizzacasa MA. *Synthesis of biotinylated episilvestrol: highly selective targeting of the translation factors eIF4A1/II*. Organic letters. 2013;15(6):1406-9.
118. Hawkins BC, Lindqvist LM, Nhu D, Sharp PP, Segal D, Powell AK, et al. *Simplified silvestrol analogues with potent cytotoxic activity*. ChemMedChem. 2014;9(7):1556-66.
119. Chambers JM, Lindqvist LM, Savage GP, Rizzacasa MA. *Total synthesis of a biotinylated rocaglate: Selective targeting of the translation factors eIF4A1/II*. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2016;26(2):262-4.

120. Lucas DM, Edwards RB, Lozanski G, West DA, Shin JD, Vargo MA, et al. *The novel plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo*. Blood. 2009;113(19):4656-66.
121. Alinari L, Prince CJ, Edwards RB, Towns WH, Mani R, Lehman A, et al. *Dual targeting of the cyclin/Rb/E2F and mitochondrial pathways in mantle cell lymphoma with the translation inhibitor silvestrol*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012;18(17):4600-11.
122. Patton JT, Lustberg ME, Lozanski G, Garman SL, Towns WH, Drohan CM, et al. *The translation inhibitor silvestrol exhibits direct anti-tumor activity while preserving innate and adaptive immunity against EBV-driven lymphoproliferative disease*. Oncotarget. 2015;6(5):2693-708.
123. Kim S, Hwang BY, Su BN, Chai H, Mi Q, Kinghorn AD, et al. *Silvestrol, a potential anticancer rocaglate derivative from Aglaia foveolata, induces apoptosis in LNCaP cells through the mitochondrial/apoptosome pathway without activation of executioner caspase-3 or -7*. Anticancer research. 2007;27(4b):2175-83.
124. Kogure T, Kinghorn AD, Yan I, Bolon B, Lucas DM, Grever MR, et al. *Therapeutic potential of the translation inhibitor silvestrol in hepatocellular cancer*. PLoS One. 2013;8(9):e76136.
125. Chen WL, Pan L, Kinghorn AD, Swanson SM, Burdette JE. *Silvestrol induces early autophagy and apoptosis in human melanoma cells*. BMC cancer. 2016;16:17.
126. Hausott B, Greger H, Marian B. *Flavaglines: a group of efficient growth inhibitors block cell cycle progression and induce apoptosis in colorectal cancer cells*. International journal of cancer. 2004;109(6):933-40.
127. Clemens MJ. *Regulation of eukaryotic protein synthesis by protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2*. Molecular biology reports. 1994;19(3):201-10.
128. Hinnebusch AG. *The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation*. Annual review of biochemistry. 2014;83:779-812.
129. Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE. *Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate*. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization. 2008;100(1):27-38.
130. Johannes G, Carter MS, Eisen MB, Brown PO, Sarnow P. *Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96(23):13118-23.
131. Mitchell SA, Spriggs KA, Bushell M, Evans JR, Stoneley M, Le Quesne JP, et al. *Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry*. Genes Dev. 2005;19(13):1556-71.
132. Ray PS, Grover R, Das S. *Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms*. EMBO reports. 2006;7(4):404-10.
133. Coldwell MJ, Mitchell SA, Stoneley M, MacFarlane M, Willis AE. *Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry*. Oncogene. 2000;19(7):899-905.

134. Blau L, Knirsh R, Ben-Dror I, Oren S, Kuphal S, Hau P, et al. *Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(42):E2875-84.
135. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. *Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia.* Molecular and cellular biology. 1998;18(6):3112-9.
136. Webb TE, Hughes A, Smalley DS, Spriggs KA. *An internal ribosome entry site in the 5' untranslated region of epidermal growth factor receptor allows hypoxic expression.* Oncogenesis. 2015;4:e134.
137. Nanbru C, Lafon I, Audigier S, Gensac MC, Vagner S, Huez G, et al. *Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site.* The Journal of biological chemistry. 1997;272(51):32061-6.
138. Stoneley M, Paulin FE, Le Quesne JP, Chappell SA, Willis AE. *C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment.* Oncogene. 1998;16(3):423-8.
139. Shi Y, Frost P, Hoang B, Yang Y, Fukunaga R, Gera J, et al. *MNK kinases facilitate c-myc IRES activity in rapamycin-treated multiple myeloma cells.* Oncogene. 2013;32(2):190-7.
140. Shi Y, Sharma A, Wu H, Lichtenstein A, Gera J. *Cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation is regulated by AKT activity and enhanced by rapamycin through a p38 MAPK- and ERK-dependent pathway.* The Journal of biological chemistry. 2005;280(12):10964-73.
141. Chappell SA, LeQuesne JP, Paulin FE, deSchoolmeester ML, Stoneley M, Soutar RL, et al. *A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation.* Oncogene. 2000;19(38):4437-40.
142. Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V, Phesse TJ, Wilkins JA, Reed KR, et al. *Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine.* Nature. 2007;446(7136):676-9.
143. Hüttenrauch M. *Untersuchung des regulatorischen Einflusses des PI3-Kinase/mTOR-Inhibitoren BEZ235 auf die Aktivität des MAP-Kinase-Signalweges.* Würzburg: Julius-Maximilian Universität; 2012.
144. Lin CJ, Cencic R, Mills JR, Robert F, Pelletier J. *c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation.* Cancer research. 2008;68(13):5326-34.
145. Lin CJ, Nasr Z, Premssirirut PK, Porco JA, Jr., Hippo Y, Lowe SW, et al. *Targeting synthetic lethal interactions between Myc and the eIF4F complex impedes tumorigenesis.* Cell reports. 2012;1(4):325-33.
146. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.* Blood. 1994;84(5):1415-20.

147. Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. *Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers.* The Journal of biological chemistry. 1990;265(9):4923-8.
148. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical biochemistry. 1976;72:248-54.
149. Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature. 1970;227(5259):680-5.
150. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979;76(9):4350-4.
151. Wiegner A, Uthe FW, Jamieson T, Ruoss Y, Huttenrauch M, Kuspert M, et al. *Targeting Translation Initiation Bypasses Signaling Crosstalk Mechanisms That Maintain High MYC Levels in Colorectal Cancer.* Cancer Discov. 2015;5(7):768-81.
152. Reynolds JE, Yang T, Qian L, Jenkinson JD, Zhou P, Eastman A, et al. *Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells.* Cancer research. 1994;54(24):6348-52.
153. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. *Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.* Cancer research. 1993;53(17):3976-85.
154. Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJ, Ibrahim YH, Chandarlapaty S, et al. *PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer.* Oncogene. 2011;30(22):2547-57.
155. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer.* The Journal of clinical investigation. 2008;118(9):3065-74.
156. Hsu T, Trojanowska M, Watson DK. *Ets proteins in biological control and cancer.* J Cell Biochem. 2004;91(5):896-903.
157. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, et al. *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.* The Journal of biological chemistry. 1998;273(29):18623-32.
158. Escamilla-Powers JR, Daniel CJ, Farrell A, Taylor K, Zhang X, Byers S, et al. *The tumor suppressor protein HBP1 is a novel c-myc-binding protein that negatively regulates c-myc transcriptional activity.* The Journal of biological chemistry. 2010;285(7):4847-58.
159. Herman JG, Baylin SB. *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.* The New England journal of medicine. 2003;349(21):2042-54.
160. Issa JP. *CpG island methylator phenotype in cancer.* Nature reviews Cancer. 2004;4(12):988-93.
161. Christman JK. *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy.* Oncogene. 2002;21(35):5483-95.

162. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, et al. *Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines*. *Oncogenesis*. 2013;2:e71.
163. Polier G, Neumann J, Thuaud F, Ribeiro N, Gelhaus C, Schmidt H, et al. *The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2*. *Chemistry & biology*. 2012;19(9):1093-104.
164. Didiot MC, Hewett J, Varin T, Freuler F, Selinger D, Nick H, et al. *Identification of cardiac glycoside molecules as inhibitors of c-Myc IRES-mediated translation*. *Journal of biomolecular screening*. 2013;18(4):407-19.
165. Bohnenstengel FI, Steube KG, Meyer C, Quentmeier H, Nugroho BW, Proksch P. *1H-cyclopenta[b]benzofuran lignans from Aglaia species inhibit cell proliferation and alter cell cycle distribution in human monocytic leukemia cell lines*. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of biosciences*. 1999;54(12):1075-83.
166. Lee SK, Cui B, Mehta RR, Kinghorn AD, Pezzuto JM. *Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1H-cyclopenta[b]benzofuran lignans isolated from Aglaia elliptica*. *Chemico-biological interactions*. 1998;115(3):215-28.
167. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*. *Cell*. 2002;111(2):241-50.
168. Decker P, Muller S. *Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress*. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2002;3(3):275-83.
169. Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. *Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability*. *Genes Dev*. 2000;14(19):2501-14.
170. McKeown MR, Bradner JE. *Therapeutic Strategies to Inhibit MYC*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014;4(10).
171. Fletcher S, Prochownik EV. *Small-Molecule Inhibitors of the Myc Oncoprotein*. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1849(5):525-43.
172. Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. *Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function*. *Oncogene*. 2003;22(40):6151-9.
173. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. *BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc*. *Cell*. 2011;146(6):904-17.
174. Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. *Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability*. *Nature*. 2004;428(6978):77-81.
175. Diefenbacher ME, Popov N, Blake SM, Schulein-Volk C, Nye E, Spencer-Dene B, et al. *The deubiquitinase USP28 controls intestinal homeostasis and promotes colorectal cancer*. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(8):3407-18.
176. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.

177. Chesler L, Schlieve C, Goldenberg DD, Kenney A, Kim G, McMillan A, et al. *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma*. Cancer research. 2006;66(16):8139-46.
178. Liu P, Cheng H, Santiago S, Raeder M, Zhang F, Isabella A, et al. *Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms*. Nature medicine. 2011;17(9):1116-20.
179. Muellner MK, Uras IZ, Gapp BV, Kerzendorfer C, Smida M, Lechtermann H, et al. *A chemical-genetic screen reveals a mechanism of resistance to PI3K inhibitors in cancer*. Nature chemical biology. 2011;7(11):787-93.
180. West MJ, Stoneley M, Willis AE. *Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signalling pathway*. Oncogene. 1998;17(6):769-80.
181. Yun S, Vincelette ND, Knorr KL, Almada LL, Schneider PA, Peterson KL, et al. *4EBP1/c-MYC/PUMA and NF-kappaB/EGR1/BIM pathways underlie cytotoxicity of mTOR dual inhibitors in malignant lymphoid cells*. Blood. 2016;127(22):2711-22.
182. Ji H, Wu G, Zhan X, Nolan A, Koh C, De Marzo A, et al. *Cell-type independent MYC target genes reveal a primordial signature involved in biomass accumulation*. PLoS One. 2011;6(10):e26057.
183. Jones RM, Branda J, Johnston KA, Polymenis M, Gadd M, Rustgi A, et al. *An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc*. Molecular and cellular biology. 1996;16(9):4754-64.
184. Pourdehnad M, Truitt ML, Siddiqi IN, Ducker GS, Shokat KM, Ruggero D. *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. 2013;110(29):11988-93.
185. Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, et al. *Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter*. Oncogene. 2003;22(3):351-60.
186. Wanzel M, Kleine-Kohlbrecher D, Herold S, Hock A, Berns K, Park J, et al. *Akt and 14-3-3beta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage*. Nature cell biology. 2005;7(1):30-41.
187. Kim A, Lee JE, Lee SS, Kim C, Lee SJ, Jang WS, et al. *Coexistent mutations of KRAS and PIK3CA affect the efficacy of NVP-BE2235, a dual PI3K/MTOR inhibitor, in regulating the PI3K/MTOR pathway in colorectal cancer*. International journal of cancer. 2013;133(4):984-96.
188. Berkel HJ, Turbat-Herrera EA, Shi R, de Benedetti A. *Expression of the translation initiation factor eIF4E in the polyp-cancer sequence in the colon*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2001;10(6):663-6.

189. Faller WJ, Jackson TJ, Knight JR, Ridgway RA, Jamieson T, Karim SA, et al. *mTORC1-mediated translational elongation limits intestinal tumour initiation and growth*. Nature. 2015;517(7535):497-500.
190. Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, et al. *p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC*. Cell death and differentiation. 2010;17(2):236-45.
191. Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, et al. *PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation*. Science. 1994;266(5185):653-6.
192. Haystead TA, Haystead CM, Hu C, Lin TA, Lawrence JC, Jr. *Phosphorylation of PHAS-I by mitogen-activated protein (MAP) kinase. Identification of a site phosphorylated by MAP kinase in vitro and in response to insulin in rat adipocytes*. The Journal of biological chemistry. 1994;269(37):23185-91.
193. Wendel HG, Silva RL, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, et al. *Dissecting eIF4E action in tumorigenesis*. Genes Dev. 2007;21(24):3232-7.
194. Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL. *Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities*. Cancer research. 2004;64(23):8639-42.
195. Lin A, Piao HL, Zhuang L, Sarbassov dos D, Ma L, Gan B. *FoxO transcription factors promote AKT Ser473 phosphorylation and renal tumor growth in response to pharmacologic inhibition of the PI3K-AKT pathway*. Cancer research. 2014;74(6):1682-93.
196. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. Cell. 2005;121(2):179-93.
197. Ma L, Teruya-Feldstein J, Bonner P, Bernardi R, Franz DN, Witte D, et al. *Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer*. Cancer research. 2007;67(15):7106-12.
198. Ciuffreda L, Di Sanza C, Cesta Incani U, Eramo A, Desideri M, Biagioni F, et al. *The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade controls phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression through multiple mechanisms*. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany). 2012;90(6):667-79.
199. Toulany M, Minjgee M, Saki M, Holler M, Meier F, Eicheler W, et al. *ERK2-dependent reactivation of Akt mediates the limited response of tumor cells with constitutive K-RAS activity to PI3K inhibition*. Cancer biology & therapy. 2014;15(3):317-28.
200. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. *Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers*. Nature medicine. 2008;14(12):1351-6.
201. Rosenwald IB, Rhoads DB, Callanan LD, Isselbacher KJ, Schmidt EV. *Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth*

-
- induction by c-myc*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(13):6175-8.
202. Mudduluru G, Medved F, Grobholz R, Jost C, Gruber A, Leupold JH, et al. *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. 2007;110(8):1697-707.
203. Penn LJ, Brooks MW, Laufer EM, Land H. *Negative autoregulation of c-myc transcription*. The EMBO journal. 1990;9(4):1113-21.
204. Spriggs KA, Cobbold LC, Jopling CL, Cooper RE, Wilson LA, Stoneley M, et al. *Canonical initiation factor requirements of the Myc family of internal ribosome entry segments*. Molecular and cellular biology. 2009;29(6):1565-74.
205. Svitkin YV, Pause A, Haghighat A, Pyronnet S, Witherell G, Belsham GJ, et al. *The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure*. RNA (New York, NY). 2001;7(3):382-94.
206. Rubio CA, Weisburd B, Holderfield M, Arias C, Fang E, DeRisi JL, et al. *Transcriptome-wide characterization of the eIF4A signature highlights plasticity in translation regulation*. Genome biology. 2014;15(10):476.
207. Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, Drewe P, Rajasekhar VK, Sanghvi VR, et al. *RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer*. Nature. 2014;513(7516):65-70.
208. Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, et al. *Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration*. Genes Dev. 2004;18(12):1385-90.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Die Angabe von physikalischen Größen basiert auf dem internationalen Einheitensystem.

Abkürzung	Vorsilbe	Faktor
n	Nano-	10^{-9}
μ	Mikro-	10^{-6}
m	Milli-	10^{-3}
c	Centi-	10^{-2}
k	Kilo-	10^3

A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B; <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
AP1	<i>Activator protein 1</i> ; Transkriptionsfaktor
APAF1	<i>Apoptotic Protease-Activating Factor-1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	<i>American type culture collection</i>
5-AzadC	5-Aza-2'-deoxycytidin
β 2M	Beta-2-Mikroglobulin
BAD	<i>BCL-2 antagonist of cell death</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	bovines Serumalbumin

bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
C	Cytosin
ca.	circa
CASP	<i>Caspase; cysteine-aspartic acid protease</i>
CCND	Zyclin D
CDK	<i>cyclin dependent kinase; Zyclin-abhängige Kinase</i>
CDKN1A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIN	chromosomale Instabilität
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTNNB1	<i>Catenin Beta 1</i>
Da	Dalton; atomare Masseneinheit
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium; Zellkulturmedium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase(n)
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat-Gemisch
DTT	Dithiothreitol
E-Box	<i>Enhancer-Box</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
eIF	<i>eukaryotic translation initiation factor</i>
4E-BP	<i>eukaryotic initiation factor 4 binding protein</i>

ELK-1	<i>ETS-like gene 1</i>
EPHB1	Ephrinrezeptor B1
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	<i>et alia</i> ; und andere
Et-OH	Ethanol
ETS	„ <i>E twenty-six</i> “-Transkriptionsfaktoren (nach Onkogen des aviären Erythroblastose-Virus E26)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FAP	<i>familiar adenopolyposis</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fetales Kälberserum
FBW7	<i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOS	<i>FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog</i> ; Komponente von AP1
FOX	<i>Forkhead-Box</i>
fwd	<i>forward</i> ; 5`-Primer
g	Erdbeschleunigung; $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
g	Gramm
G	Guanin
G1-Phase	Gap 1-Phase
G2-Phase	Gap 2-Phase
GDP	Guanosindiphosphat
GI ₅₀	<i>growth inhibition of 50%</i>
GLUT	Glucose Transporter
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GSK3 β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HBP1	<i>HMG-Box Transcription Factor 1</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER3	ERBB3; <i>human epidermal growth factor receptor 3</i>

bHLHZ	<i>basic Helix-Loop-Helix-Zipper-Motiv</i>
HNPC	<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase</i>
HUWE1	<i>E3 ubiquitin-protein ligase</i>
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IGF1R	<i>Insulin growth factor receptor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IR	Insulinrezeptor
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ITAF	<i>IRES trans-acting factor</i>
CJUN	<i>V-Jun Sarcoma Virus 17 Oncogene Homolog; Komponente von AP1</i>
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRK	Kolorektale(s) Karzinom(e)
Ktr.	Kontrolle
KV	Kristallviolett
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
m	Meter
M	Molar; mol/l
MAD	<i>MXD1; MAX-dimerization protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase; MAP-Kinase</i>
MAX	<i>Myc associated factor X</i>
MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MEK	MAPKK; MAP-Kinase-Kinase
Met	Methionin
min	Minute(n)
miR(s)	microRNA(s)
MIZ1	<i>Myc interacting Zinc finger protein 1</i>

MLH1	<i>mutL homolog 1</i>
MMR	<i>missmatch repair</i>
MNK	<i>MAPK-interacting kinase</i>
MNT	<i>MAX Network Transcriptional Repressor</i> ; MAX-bindendes Protein
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSH2	<i>MutS protein homolog 2</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
mTORC1/2	<i>mammalian target of rapamycin complex 1/2</i>
MUC2	<i>Mucin 2</i>
MW	Mittelwert
MXI1	<i>MAX Interactor 1</i> ; MXD2
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n	Probenzahl
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ODC1	<i>Ornithin Decarboxylase 1</i>
p	phospho-...
PABP	<i>Poly(A)-binding protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	<i>p21 activated kinase</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDCD4	<i>programmed cell death protein 4</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ³⁰⁺ -Ionen Konzentration
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	<i>PI3K-Catalytic Subunit Alpha</i>

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4, 5-Diphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD1	<i>phosphatidyl dependent kinase 1</i>
PTB1	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>
P-TEF	<i>positive transcription elongation factor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAC	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma/rat fibrosarcoma</i>
RAPTOR	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
rev	<i>reverse; 3`-Primer</i>
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RICTOR	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid; Ribonukleinsäure</i>
rpm	<i>revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium</i>
RPS6, S6	ribosomales Protein S6
RQ-PCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction; Quantitative Echtzeit-PCR</i>
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase(n)
s	Sekunde(n)
S	Svedberg-Zentrifugationskonstante, nichtlineare Massenangabe
Ser, S	Serin
S6K, RSK	ribosomale S6-Kinase
SCP2	<i>sterol carrier protein 2</i>
SD	<i>standard deviation; Standardabweichung</i>

SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SHC	<i>Src homology 2 (SH2) domain containing transforming protein</i>
sog.	sogenannte/-s/-r
SOS	<i>son of sevenless</i>
S-Phase	Synthese-Phase
Thr, T	Threonin
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Lösung
TBS-T	TBS mit <i>Tween-2</i> versetzt
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i> ; p53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
Tyr, Y	Tyrosin
u. a.	unter anderem
USP28	<i>Ubiquitin Specific Peptidase 28</i>
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	<i>volume per volume</i> ; Volumenanteil pro Volumen
WNT	<i>Wingless/Int-1</i>
WT	Wilttyp
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewichtsanteil pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Veränderte Signalwege im KRK.....	4
Abbildung 1.2:	Funktionen des Transkriptionsfaktors MYC.....	7
Abbildung 1.3:	Der PI3K/mTOR-Signalweg.....	11
Abbildung 1.4:	Der MAPK-Signalweg (RAF-MEK-ERK-Kaskade)	14
Abbildung 1.5:	Regulationsmechanismen für Initiation der 5'Cap-abhängigen Translation.....	17
Abbildung 4.1:	Gesteigerte Protein- und mRNA-Expression von MYC nach Behandlung mit BEZ235	42
Abbildung 4.2:	Proliferationshemmung in SW480 durch Behandlung mit BEZ235 via G1-Arrest und gesteigerter Apoptoserate	44
Abbildung 4.3:	Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose durch BEZ235 erfolgt MYC-unabhängig	47
Abbildung 4.4:	Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges induziert die Expression von Rezeptortyrosinkinasen und Aktivierung des MAPK-Signalweges	49
Abbildung 4.5:	MYC-Induktion sowie Induktion von RTK und MAPK-Aktivierung nach PI3K/mTOR-Hemmung erfolgen FOXO3A-abhängig	50
Abbildung 4.6:	MYC-Induktion nach PI3K/mTOR-Hemmung ist Folge eines aktivierten MAPK-Signalwegs	52
Abbildung 4.7:	BEZ235 induziert MAPK-unabhängig eine erhöhte Expression von <i>HBP1</i>	53
Abbildung 4.8:	DNA-Demethylierung durch 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) hemmt MYC-Expression trotz aktiviertem RTK/MAPK-Signalweg.....	55
Abbildung 4.9:	Hemmung der Translationsinitiation via eIF4A-Inhibition senkt MYC-Proteinexpression in Kolonkarzinomzellen.....	58
Abbildung 4.10:	MYC-Induktion nach PI3K/mTOR-Hemmung erfolgt IRES-abhängig und kann durch eIF4A-Inhibition unterdrückt werden	60
Abbildung 4.11:	Proliferationshemmende Wirkung von Silvestrol auf Kolonkarzinomzellen	61
Abbildung 4.12:	Silvestrol bewirkt unspezifischen Zellzyklusarrest in Kolonkarzinomzellen	63
Abbildung 4.13:	Silvestrol induziert zeitabhängig Apoptose in Kolonkarzinomzellen .	66
Abbildung 5.1:	Zusammenfassendes Modell	86

Danksagung

DANKE an PD Dr. Armin Wiegering und Prof. Dr. Martin Eilers für die Betreuung meiner Arbeit, Überlassung des Themas, Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für zahlreiche anregende Diskussionen.

DANKE an Dr. Steffi Herold für die konstruktive Durchsicht meiner Arbeit.

DANKE an PD Dr. Nicolas Schlegel für die Übernahme des Korreferates.

DANKE an meine Laborkollegen Melli und Fritz für die geduldige Einarbeitung und viele erheiternde Stunden, sowie den übrigen Mitarbeitern des Labors für die hilfreiche Unterstützung – bei den begrenzten experimentellen Vorkenntnissen eines Mediziners.

DANKE für die Möglichkeit der Aufnahme und Förderung durch das Integrierte Graduiertenkolleg SFB-Transregio 17 während meiner Laborzeit.

DANKE an meine Familie, die für regelmäßige, nötige Ablenkung gesorgt hat. Insbesondere meinen Eltern, deren Unterstützung meinen Weg mit Medizinstudium überhaupt ermöglicht hat.

DANKE all meinen Freunden für die wunderbare Zeit mit geteilten Sorgen und Freuden im und neben Studium sowie über die Studentenzeit hinaus.

DANKE schließlich an Daniel für deine (scheinbar) unendliche Geduld und Optimismus, und dadurch unersetzliche Unterstützung – nicht zu vergessen deinen Einsatz bei der Festplatten-Rettung!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christina Pfann, geboren am 28.02.1990 in Neustadt a. d. Aisch, dass ich diese Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zu neuen therapeutischen Ansätzen zur Beeinflussung der MYC-Expression im kolorektalen Karzinom“ selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe, wobei übernommene Inhalte eindeutig gekennzeichnet wurden. Ich versichere außerdem, dass mir die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt wurde und ich insbesondere keine Person oder Organisation eingeschaltet habe, die gegen Entgelt Betreuer oder Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis wurden eingehalten. Die Dissertation bzw. Teile daraus wurden in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule bzw. Prüfungsbehörde mit dem Ziel der Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Meiner Person wurde weder ein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen meine Person ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder ein Disziplinarverfahren eingeleitet.

Würzburg, Dezember 2017

Christina Pfann