

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
(Prof. Dr. med. M. Ghadimi)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

# **Die Rolle von CBP bei der Strahlenresistenzentwicklung im kolorektalen Karzinom**

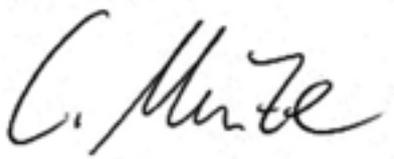
INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Cornelius Franz Menze**  
aus  
Lindau (Bodensee)

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer  
Referent/in: Prof. Dr. med. M. Ghadimi  
Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. B. Chapuy  
Drittreferent/in: Prof. Dr. med. M. Dobbelstein  
Datum der mündlichen Prüfung: 15.08.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von CBP bei der Strahlenresistenzentwicklung im kolorektalen Karzinom“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Münze'. The signature is written in a cursive style with a large initial 'C' and a long, sweeping underline.

Göttigen, den 29.08.2018

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>III.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Klinische Bedeutung des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie .....	1
1.1.3	Klinik und Diagnostik .....	2
1.1.4	Klassifikation und <i>Staging</i> .....	3
1.1.5	Stadien-adaptierte Therapie.....	5
<b>1.2</b>	<b>Molekularbiologie des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>6</b>
1.2.1	Tumorgenese .....	6
1.2.2	Posttranslationale Modifikationen von Histonen .....	9
1.2.3	CBP (CREB-binding protein) / p300 .....	11
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Methoden und Patientenkollektiv .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Immunhistochemische Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Herstellen von Paraffinschnitten.....	15
2.1.2	Immunhistochemische Färbung .....	15
2.1.3	Auswertung und Quantifizierung .....	15
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Zellkultur.....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Konditionen für Säugerzellen .....	16
2.2.2	Allgemeine Arbeiten mit der Zellkultur .....	17
2.2.3	<i>Plating Efficiency</i> - Test.....	17

---

2.2.4	<i>Gen-Silencing</i> mit RNA-Interferenz (RNAi) .....	18
<b>2.3</b>	<b>Klonierung</b> .....	<b>22</b>
2.3.1	Gelelektrophorese von DNA.....	22
2.3.2	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mittels <i>heat shock</i> ...	22
2.3.3	Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	23
2.3.4	Gewinnung von chromosomaler DNA aus Zellkulturen .....	23
<b>2.4</b>	<b>Analyseverfahren</b> .....	<b>23</b>
2.4.1	Zelllyse und Proteinextraktion .....	23
2.4.2	Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese .....	24
2.4.3	Western Blot.....	24
2.4.4	Immunfärbung .....	25
2.4.5	Visueller Letalitätstest nach <i>shRNA-knockdown</i> .....	26
2.4.6	<i>Colony Forming Assay</i> (CFA).....	26
<b>2.5</b>	<b>Patientenkollektiv</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6</b>	<b>Statistische Analysen</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Immunhistochemische Auswertung</b> .....	<b>30</b>
3.1.1	Korrelation zwischen CBP-Expression und Tumorregion .....	30
3.1.2	Korrelationen zwischen CBP-Expression und pathologischen Parametern .	31
3.1.3	Korrelation zwischen CBP-Expression und Tumorrezidivrate .....	33
3.1.4	Korrelation zwischen CBP-Expression und tumorspezifischem Überleben..	33
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Auswertung</b> .....	<b>35</b>
3.2.1	Einfluss von <i>CBP-knockdown</i> auf die Letalität .....	35
3.2.2	Der <i>knockdown</i> von CBP induziert eine erhöhte Strahlensensibilität .....	37
3.2.3	Der <i>CBP-knockdown</i> wirkt sich direkt auf Interaktionspartner aus .....	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Auswirkung von CBP auf Tumorwachstum und Morphologie</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Korrelation von CBP Expression des Tumors und Überleben</b> .....	<b>40</b>

---

<b>4.3</b>	<b>CBP ist ein stark regulatorisches Protein .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Der Resistenzverlust ist multifaktoriell bedingt .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Diskrepanz zwischen klinischen und molekularbiologischen Ergebnissen?.....</b>	<b>43</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>63</b>
<b>7.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>63</b>
7.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	63
7.1.2	Geräte .....	64
7.1.3	Chemikalien.....	66
7.1.4	Puffer und Lösungen .....	68
7.1.5	Zellkultur und Bakterienkultur .....	68
7.1.6	Zelllinien .....	69
7.1.7	Kits .....	70
7.1.8	Vektoren.....	70
7.1.9	shRNAis .....	70
7.1.10	siRNAs.....	71
7.1.11	Antikörper .....	71
7.1.12	Programme .....	72

---

## I. Abkürzungsverzeichnis

APC	adenomatöse Polyposis Coli (Tumorsuppressorgen)
ARR	anteriore Rektumresektion
ATCC	American Type Culture Collection
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CFA	<i>colony forming assay</i>
CpG	Cytosin – Phosphat – Guanin
CREB	<i>cAMP-response-elemente-binding-protein binding protein</i>
CSS	<i>cancer specific survival</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DRF	<i>dose reduction factor</i>
dsRNA	<i>double stranded ribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GTF	<i>general transcription factor</i>
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
KD	<i>knockdown</i>
LD	letale Dosis
MLH1	<i>mutL homolog 1</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MUTYH	<i>mutY Homolog (E. coli)</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PME	partielle mesorektale Exzision
RCT	Radiochemotherapie

---

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Radiotherapie
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	<i>small hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
TAD	<i>transactivation domain</i>
TARR	tiefe anteriore Rektumresektion
TAZ	<i>transcriptional adapter zinc finger</i>
TGF- $\beta$	<i>tumor growth factor <math>\beta</math></i>
TME	totale mesorektale Exzision
TNM	Klassifikation maligner Tumoren
TTLR	<i>time to local recurrence</i>
TTR	<i>time to recurrence</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
Wnt	<i>wingless Int-1</i>

---

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel H-Score – Drei Präparate unterschiedlicher Expressionsstärke .....	16
Abbildung 2: Übersicht über den pLKO.1 Puromycin-resistenten shRNAi-Vektor (modifiziert nach OpenBiosystems).....	19
Abbildung 3: CBP-Verteilung innerhalb des Tumors .....	30
Abbildung 4: Korrelation der CBP-Verteilung innerhalb des Tumors.....	31
Abbildung 5: Korrelation von CBP mit T-Stadium .....	31
Abbildung 6: Korrelation von CBP .....	31
Abbildung 7: Korrelation von CBP mit UICC-Stadium.....	32
Abbildung 8:Korrelation von CBP mit Lymphgefäßinfiltration.....	32
Abbildung 9: Korrelation von CBP mit Veneninfiltration .....	32
Abbildung 10: Korrelation von CBP mit <i>Grading</i> .....	32
Abbildung 11: CBP und TTR / TTLR .....	33
Abbildung 12: Korrelation von CBP-Expression und CSS.....	34
Abbildung 13: Western Blot <i>sh-knockdown</i> -Überstand (HEK-293T).....	35
Abbildung 14: Zelluntergang nach CBP- <i>knockdown</i> mit shRNAi .....	36
Abbildung 15: WB des CBP-KD der SW837 vom CFA .....	37
Abbildung 16: CFA mit RT (Radiotherapie) und RCT (Radiochemotherapie) von SW837 mit <i>si-knockdown</i> von CBP (3 Versuchsreihen).....	37
Abbildung 17: WB von Interaktionspartnern bei CBP-KD in HEK-293T.....	38

---

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC 2010 (Wittekind und Meyer 2010).....	4
Tabelle 2: TNM-Klassifikation und UICC-Stadien (Storch 2016).....	5
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und Kultivierungskonditionen.....	17
Tabelle 4: Abkürzungen der Vektorelemente des pLKO.1 Puromycin-resistenten shRNAi-Vektors .....	19
Tabelle 5: Benutzte Antikörper und verwendete Konditionen .....	26
Tabelle 6: Einzusetzende Zellzahlen bei CFA .....	27
Tabelle 7: Patientenkollektiv .....	28
Tabelle 8: Zusammenfassung: Korrelation CBP-Expression und pathologische Parameter .....	35
Tabelle 9: DRF der SW837 mit CBP-KD bei LD25/50/75 .....	38

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Klinische Bedeutung des kolorektalen Karzinoms

### 1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Malignome weltweit. Die höchste Inzidenz findet sich in den westlichen industrialisierten Ländern, die niedrigste Inzidenz für kolorektale Tumoren ist in den ärmeren afrikanischen und asiatischen Ländern. In Deutschland erkranken jährlich ca. 64000/Jahr (2013).(Fuchs et al. 2011; Kaatsch et al. 2012; Robert-Koch-Institut 2016).

Das mittlere Erkrankungsalter ist bei Frauen respektive Männern 68,3 Jahre und 69,3 Jahre (2013). Im Jahr 2013 war das kolorektale Karzinom nach dem Mamma-karzinom die zweithäufigste Tumorentität in Deutschland (Robert-Koch-Institut 2016). Die Inzidenz von kolorektalen Tumoren ist seit den 1980er Jahren bis zur Jahrtausendwende bei Frauen um 25 % und bei Männern um 45 % gestiegen. Der stärkste Anstieg bei Frauen ist in einem Alter über 80 Jahren, bei den Männern in einem Alter von 60 bis 79 Jahren zu verzeichnen. Das relative 5-Jahres-Überleben hat sich durch die besseren Therapiemöglichkeiten und die eingeführten Vorsorgeuntersuchungen in demselben Zeitraum von 45 % auf 60 % verbessert (Fuchs et al. 2011). Die Angaben bezüglich der Verteilung der Malignome auf Colon und Rektum variieren. Nach den Angaben des Robert Koch-Institutes sind etwa zwei Drittel im Colon, 30 % im Rektum und die übrigen Karzinome im rektosigmoidalen Übergang sowie im Analkanal lokalisiert (Kaatsch et al. 2012; Robert-Koch-Institut 2015).

### 1.1.2 Ätiologie

Die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms ist multifaktoriell, spezifische Risikofaktoren können in endogene und exogene Faktoren unterteilt werden. Zu den relevanten exogenen Risikofaktoren zählen der übermäßige Konsum von dunklem Fleisch, fettreiche Kost und Alkohol. Eine verminderte Aufnahme von Vitaminen und Spurenelemente wie beispielsweise Selen wird ebenfalls diskutiert. Auch die Zubereitungsart von Speisen kann sich negativ auswirken, wie beispielsweise

scharfes Anbraten oder Grillen. Adipositas, Rauchen, Asbestbelastung und körperliche Inaktivität gelten ebenfalls als exogene Risikofaktoren (Friedenreich 2001; Fuchs et al. 2011; Kaatsch et al. 2012; Liersch et al. 2007).

Ätiologisch relevante endogene Ursachen für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms sind genetische Prädispositionen wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), MUTYH-assoziierte Polypose (MAP), das hereditär nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), adenomatöse Polypen, Colitis ulcerosa oder die Verwandtschaft ersten Grades zu einem Betroffenen. Insgesamt treten in 5 % der Fälle hereditäre Karzinome auf. Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI), bedingt durch DNA-*Mismatch*-Reparatur-Gen-Defekte, spielt hier ebenfalls eine Rolle (Fuchs et al. 2011; Kaatsch et al. 2012; Liersch et al. 2007).

Die Entstehung erworbener kolorektaler Karzinome basiert auf der Annahme der sogenannten „Adenom-Karzinom-Sequenz“ nach Fearon und Vogelstein (Kinzler und Vogelstein 2002). Diese Sequenz beschreibt die Entwicklung vom Adenom über die Dysplasie hin zur Neoplasie. Das Karzinom entsteht aus einer epithelialen Proliferation, einer damit einhergehenden Hyperplasie und konsekutivem Differenzierungsverlust eines benignen Adenoms, welches in den meisten Fällen exophytisch in das Darmlumen wächst. Wird das Adenom nicht im Rahmen einer Vorsorgekoloskopie entfernt, besteht ein nicht unerhebliches Risiko, dass das Adenom weitere zellzyklische Kontrollmechanismen verliert und sich zu einem Karzinom weiterentwickelt. Ein Adenom > 1 cm wird innerhalb von 20 Jahren mit einer Wahrscheinlichkeit von 35% ein kolorektales Karzinom (Fuchs et al. 2011; Kinzler und Vogelstein 2002).

Neben der Entstehung gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz können sich Karzinome auch über den sogenannten *serrated pathway* aus hyperplastischen Polypen entwickeln. Hierbei führen ebenfalls mehrere Mutationen gemeinsam über sogenannte sessile serratierte Adenome (SSA) und traditionell serratierte Adenome (TSA) zu dem serratierten Adenokarzinom (Makinen 2007; Pox et al. 2014).

### **1.1.3 Klinik und Diagnostik**

Die Symptome sind in der Regel unspezifisch; meist treten veränderte Stuhlgewohnheiten wie Frequenz und Konsistenz, Blutauflagerungen auf dem Stuhl oder Schmerzen bei der Defäkation auf. Auch ein positiver fäkaler okkultes Bluttest

(FOBT) kann Hinweis auf einen gastrointestinalen Tumor geben. Die Zeichen einer B-Symptomatik wie Gewichtsverlust (mehr als 10 % des Körpergewichts in 6 Monaten), Nachtschweiß und Fieber können bei Vorhandensein eines kolorektalen Karzinoms auftreten, ebenso Tenesmus und Pruritus. In einem fortgeschrittenen Stadium ist auch das Auftreten eines mechanischen Ileus oder einer rektalen oder abdominellen tastbaren Raumforderung möglich (Hamilton und Sharp 2004).

Das klinische *Staging* umfasst eine ausführliche Anamnese mit besonderer Berücksichtigung der Familienanamnese, die klinische und rektal-digitale Untersuchung sowie die Durchführung einer starren Rektoskopie mit rektaler Endosonographie. Die Diagnose des kolorektalen Karzinoms wird durch die Endoskopie mit histologischer Sicherung gestellt (Ghadimi und Becker 2006). Zur Bestimmung der Tiefeninfiltration sowie zur Einschätzung des Nodalstatus bei lokal begrenzten Tumoren sollte die Diagnostik um eine rektale Endosonographie ergänzt werden. Bei ausgedehnteren Tumoren ist zur Beurteilung des kleinen Beckens und der Tiefeninfiltration ein MRT notwendig. Als wichtiger laborchemischer Verlaufsparemeter sollte schon präoperativ das CEA (carcinoembryonales Antigen) bestimmt werden (Pox et al. 2014).

#### **1.1.4 Klassifikation und *Staging***

Die Klassifikation richtet sich nach der anatomischen Ausbreitung, im Speziellen nach der Ausbreitung des Primärtumors (T), nach dem Befall von Lymphknoten (N) und nach dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (Wittekind und Meyer 2010). Diese TNM-Klassifikation wird ergänzt durch eine klinische Klassifikation (cTNM), welche prätherapeutisch anhand von klinischer Untersuchung, Bildgebung, Endoskopie und Biopsie erstellt wird. Die postoperative pathologische Klassifikation (pTNM), die anhand von exzidiertem Tumor und Proben durch den Pathologen bestimmt wird, wird nach stattgehabter neoadjuvanter System- oder Strahlentherapie und nach adäquatem Re-Staging mit yTN(M) vervollständigt. Einen weiteren wichtigen Parameter stellt das *Grading* (G) dar, welches den Differenzierungsstatus des Tumors angibt (Wittekind und Meyer 2010). Eine Übersicht bietet Tabelle 1:

T – Primärtumor:	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektalisches Gewebe
T4	Tumor Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
T4a	Tumor perforiert viszerales Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
N – regionäre Lymphknoten:	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in 1 bis 3 Lymphknoten
N1a	Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2 bis 3 regionäre Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen/ perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr Regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4 bis 6 Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M – Fernmetastasen:	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nicht-regionäre Lymphknoten)
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC 2010 (Wittekind und Meyer 2010)**

Tumoren unterschiedlicher TNM-Stadien, die dasselbe Therapieschema erfahren, werden im selben Stadium nach der *Union internationale contre le cancer* (UICC) eingeteilt. Dieses dient als Grundlage für die Therapieentscheidung und Prognose (Tabelle 2).

		T						
		is	1	2	3	4a	4b	1-4, M1
N	0	0	I	I	IIA	IIB	IIC	IV
	1a		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC	
	1b		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC	
	1c		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC	
	2a		IIIA	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	
	2b		IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	IIIC	

**Tabelle 2: TNM-Klassifikation und UICC-Stadien (Storch 2016)**

### 1.1.5 Stadien-adaptierte Therapie

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms erfolgt multimodal und adaptiert an das Erkrankungsstadium. Die Präparation umfasst eine *no-touch*-Technik sowie eine *En-bloc*-Resektion. Liegen bei einem Kolonkarzinom Tumorkonglomerate vor, welche in Nachbarorgane infiltrieren (in ca.10 % der Fälle), so kann eine multiviszzerale En-bloc-Resektion mit dem Ziel einer R0-Resektion und der dazugehörigen Lymphadenektomie angestrebt werden (Fuchs et al. 2011).

Patienten, bei denen ein Kolonkarzinom mit dem UICC-Stadium I onkologisch R0 reseziert wurde, sollten keiner adjuvanten Chemotherapie zugeführt werden. Eine klare Indikation zur adjuvanten Chemotherapie liegt bei Patienten mit einem Tumor im Stadium III vor. In diesem Fall wird eine Kombinationstherapie mit Oxaliplatin und 5-Fluorouracil empfohlen. Liegt ein Tumorstadium II vor, ist eine adjuvante Chemotherapie möglich, aussagekräftige Daten hierzu fehlen jedoch. Hier ist eine individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung notwendig, da der absolute Nutzen bei lediglich 2-5 % liegt (Fuchs et al. 2011). Ist das Tumorstadium II von Risikofaktoren (z. B. Tumorperforation, Tumoreinriss, Operation unter Notfallbedingungen, Anzahl

untersuchter Lymphknoten zu gering) vorhanden, so steht die Indikation für eine adjuvante Chemotherapie. Bei Patienten mit Stadium-II-Tumoren wird eine 5-Fluorouracil-Monotherapie empfohlen (Fuchs et al. 2011).

Liegt ein kolorektales Karzinom im Tumorstadium IV vor, so kann eine präoperative Radio- oder Radiochemotherapie zum *Downsizing* in kurativer Intention durchgeführt werden (Pox et al. 2014).

Bei der Therapie des Rektumkarzinoms muss generell zwischen Tumoren des unteren bzw. mittleren Rektumdrittels (0-12 cm ab Anokutanlinie) und Tumoren des oberen Rektumdrittels (12-16 cm ab Anokutanlinie) unterschieden werden. Liegt ein Rektumkarzinom im UICC-Stadium I vor, so wird eine alleinige operative Therapie im Sinne einer Resektion des Primärtumors im Gesunden und einer radikalen En-Bloc-Lymphknotendisektion empfohlen, im unteren und mittleren Rektumrittel kombiniert mit einer totalen mesorektalen Exzision (TME), im oberen Rektumrittel kombiniert mit einer partiellen mesorektalen Exzision (PME) (Fuchs et al. 2011).

Bei einem Karzinom der UICC-Stadien II/III der unteren beiden Rektumdrittels sollte eine neoadjuvante Radio- oder kombinierte Radio-/Chemotherapie durchgeführt werden. Ist der Tumor im oberen Rektumrittel lokalisiert, kann eine adjuvante Therapie ähnlich dem des Kolonkarzinoms oder eine perioperative Radio-/Chemotherapie durchgeführt werden. Im Rahmen der neoadjuvanten Radio-/Chemotherapie sollte eine 5-Fluorouracil-Monotherapie mit oder ohne Folinsäure angewandt werden (Fuchs et al. 2011).

## **1.2 Molekularbiologie des kolorektalen Karzinoms**

### **1.2.1 Tumorgenese**

Die intrazellulären Ursachen der Tumorentstehung sind zahlreich und auf vielen Ebenen der Zellbiologie zu finden. In der Regel führt die Akkumulation von Veränderungen gemeinsam zu einer Dedifferenzierung und einer unkontrollierten Zellteilung. Dies betrifft sowohl die Tumorgenetik als auch Störungen der enzymatischen Funktionen.

Die Mechanismen, die hierbei zur Dysregulation führen, reichen von chromosomaler Instabilität (Lengauer et al. 1997) über Defekte von DNA-Reparaturmechanismen (Bronner et al. 1994), aberranter DNA-Methylierung (Issa 2004) und mutationsbedingter Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Goss und Groden

2000) bis hin zur Aktivierung von onkogenen Signaltransduktionskaskaden (Bos et al. 1987).

Die häufigsten Formen der chromosomalen Instabilität beim kolorektalen Karzinom sind Instabilitäten, mit denen mehrere Veränderungen bezüglich Kopienzahl der Chromosomen und Chromosomenstruktur einhergehen (Barber et al. 2008; Lengauer et al. 1997). Chromosomale Instabilität geht mit einem Verlust von Tumorsuppressorgenen wie APC, P53 oder SMAD4 einher. Tumorsuppressorgene können den malignen Phänotyp unterdrücken (Fearon und Bommer 2008; Grady 2008; Kinzler und Vogelstein 2002). In kolorektalen Karzinomen gibt es eine Vielzahl von inaktivierenden Mutationen in Genen, die in ihrer physiologischen Funktion eine chromosomale Stabilität während der Replikation gewährleisten und durch Mutation die Tumorgenese durch Instabilität begünstigen (Barber et al. 2008). Im Gegensatz zu vielen anderen Karzinomen stellt beim kolorektalen Karzinom die Amplifikation von Genkopien eine eher untergeordnete Rolle bei der Entstehung der chromosomalen Instabilität (Leary et al. 2008) dar. Insgesamt sind bei 85 % der sporadischen und bei allen FAP-assoziierten kolorektalen Karzinomen chromosomale Instabilitäten zu finden (Schulmann und Schmiegel 2002).

Welchen Stellenwert die Defekte von DNA-Reparaturmechanismen in der Tumorgenese spielen, lässt sich an dem hereditärem non-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) erkennen. HNPCC-Patienten mit einer Keimbahnmutation in den *mismatch-repair*-Genen MLH1 (MutL homolog 1) und MSH2 (MutS homolog 2) haben ein Lebenszeitrisiko von 80% bis zu ihrem 45. Lebensjahr ein kolorektales Karzinom zu entwickeln (Boland et al. 2008; Bronner et al. 1994; Fishel et al. 1993; Leach et al. 1993; Lynch et al. 2008; Papadopoulos et al. 1994). Sind die Mutationen der *mismatch-repair*-Gene vergesellschaftet mit genomischer Instabilität, so steigt das Risiko einer Karzinomentstehung bei HNPCC-Patienten dramatisch. Einige Tumoren entstehen innerhalb von 36 Monaten nach unauffälliger Koloskopie (Jarvinen et al. 2000). Hieraus resultiert auch die Empfehlung der jährlichen Koloskopie bei HNPCC-Patienten (Lynch et al. 2008). Eine somatische Inaktivierung von *mismatch-repair*-Genen ist bei ca. 15 % der Patienten mit nicht-familiärem kolorektalen Karzinom zu finden. Bei diesen Patienten liegt in der Regel ein biallelisches *Silencing* der Promotor-Region des MLH1-Gens durch DNA-Methylierung vor (Herman et al. 1998; Kane et al. 1997; Veigl et al. 1998) Durch den Verlust der *mismatch*-Reparaturmechanismen kommt es außerdem als

Begleiterscheinung zur Mikrosatelliteninstabilität, welche in 15 % der sporadischen und in allen hereditären kolorektalen Karzinomen nachweisbar ist (Lynch und de la Chapelle 2003; Thibodeau et al. 1993; Yamamoto et al. 2002). Tumoren, deren Genese durch Defekte in den *mismatch-repair*-Genen charakterisiert sind, finden sich primär als nicht-hereditäre Tumoren im proximalen Kolon und sind mit höherem Lebensalter und weiblichem Geschlecht assoziiert (Lynch et al. 2008). Besonders anfällig für *mismatch-repair*-Defekte sind Tumorsuppressorgene, deren funktionelle Domänen *mono-* und *dinucleotide repeats* in ihren kodierenden Sequenzen enthalten. Beispiele hierfür sind TGFBR2 (*transforming growth factor  $\beta$  receptor type II*) und BAX (*BCL2-associated X protein*) (Fearon und Bommer 2008; Grady 2008; Kinzler und Vogelstein 2002).

Neben den *mismatch-repair*-Genen spielen unter den DNA-Reparaturmechanismen auch die *base-excision-repair*-Gene eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Als Beispiel für eine Keimzellbahnmutation ist das Gen MYH (*mutY homologue*, MUTYH) zu nennen (Al-Tassan et al. 2002; Kastrinos und Syngal 2007).

Intakte Genstrukturen können auch epigenetisch durch die Methylierungs- oder Histonstruktur inaktiviert werden. Hier ist das epigenetische *Silencing* zu nennen, welches in den meisten Fällen aus aberranter DNA-Methylierung besteht. Diese Art des *gene silencing* kann auch bei kolorektalen Karzinomen beobachtet werden (Issa 2004; Kondo und Issa 2004). Bei der DNA-Methylierung wird in CpG-Dinukleotiden das Cytosin am C<sub>5</sub>-Atom durch DNAmethylasen mit einer Methyl-Gruppe versehen. In nicht pathologisch verändertem Genom werden Cytosine vor allem in repetitiven DNA-Sequenzen außerhalb von Exonen methyliert. Werden Cytosine in *CpG-rich repeats* methyliert, die oft in Promotorregionen lokalisiert sind, kann es zu Dysregulationen kommen. Eben diese Methylierungen von Promotor-assoziierten *CpG-rich repeats* werden in kolorektalen Karzinomen gefunden (Issa 2004).

Durch diese genetischen Veränderungen sind die nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden, in die Tumorsuppressor-Proteine eingebunden sind, mitunter gestört. Die Aktivierung des *Wnt signaling pathways* ist als einer dieser Signalwege etabliert und sein Stellenwert in der Tumorgenese und dem Progress belegt (Moon 2005). Bestandteile des *Wnt signalling pathways* sind unter anderem bereits aus der Tumorgenese bekannte Proteine wie  $\beta$ -Catenin, TCF (*T-Cell factor*) und APC (*adenomatous polyposis coli*) (Pez et al. 2013). Der *Wnt signaling pathway*

wird aktiv, wenn das Onkoprotein  $\beta$ -Catenin an seine nukleären Partner bindet und der Transkriptionskomplex aktiviert ist (Fearon und Bommer 2008; Goss und Groden 2000; Kinzler und Vogelstein 2002). Ein wichtiger Gegenspieler des Protoonkogens  $\beta$ -Catenin ist das APC-Tumorsupressorgen, welches neben der Degradation des  $\beta$ -Catenins auch dessen Translokation in den Kern inhibiert. Wird das APC mutationsbedingt funktionslos, entfällt ein wichtiger Regulator und der *Wnt signaling pathway* wird konstitutiv aktiv. Liegt eine Keimbahnmutation im APC-Gen vor, entsteht die FAP (familiäre adenomatöse Polyposis). Träger dieser Keimbahnmutation entwickeln bis zum 40. Lebensjahr mit einer Wahrscheinlichkeit von nahezu 100% ein kolorektales Karzinom (Goss und Groden 2000; Kinzler und Vogelstein 2002; Lynch et al. 2008). Der aktivierte Tumorsupressor p53 geht mit einem Zellzyklusarrest einher (Zelltod-*Checkpoint*), der durch zellulären Stress aktiviert werden kann (Vazquez et al. 2008). In den meisten Tumoren liegt eine biallelische Inaktivierung des Gens vor. Für gewöhnlich liegt eine Kombination aus einer *missence*-Mutation und einer chromosomalen 17p-Deletion vor (Baker et al. 1989; Fearon und Bommer 2008; Grady 2008; Kinzler und Vogelstein 2002). Eine dritte wichtige Tumorsupressor-Signaltransduktionskaskade im kolorektalen Karzinom ist der TGF- $\beta$ -Pathway (*Transforming growth factor  $\beta$* ). Die Inaktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways koinzidiert mit der Transformation von Adenomen zu *high-grade*-Dysplasien oder Karzinomen (Grady et al. 1998).

Weitere Protoonkogene sind RAS (*rat sarcoma*) und BRAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma homolog B1*), welche die mitogen-aktivierende Proteinkinase (MAPK) aktivieren (Bos et al. 1987; Davies et al. 2002). Ein weiteres Protoonkogen stellt das PI3KCA-Gen dar. Dieses kodiert die katalytische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Samuels et al. 2004). Die PI3K beeinflusst Proliferation, Überleben, Zellmigration und Zellmorphologie (Bader et al. 2006; Miled et al. 2007).

### 1.2.2 Posttranslationale Modifikationen von Histonen

Histone sind Proteine, welche DNA organisieren, das Chromatin definieren und aus 5 Hauptgruppen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) bestehen. Acht Histone bilden ein Oktamer, bestehend aus 4 Paaren zwei gleicher Histone, das Nucleosom. Die DNA ist um eben diese Nucleosomen gewunden (Luger 2003).

Histone können an vielen Stellen dynamisch modifiziert werden, welche die Chromatinfunktion bedingen. Insgesamt sind über 60 verschiedene Aminosäurereste bekannt, an denen bislang Modifikationen nachgewiesen werden konnten. Folgende Modifikationen an Histonen sind bekannt: (De-)Acetylierung (Sterner und Berger 2000; Vaquero et al. 2006), Phosphorylierung (Macdonald et al. 2005), Lysin-(De-)Methylierung (Bannister und Kouzarides 2005; Shi et al. 2006), Arginin-Methylierung (Lee et al. 2005), Deimination (Cuthbert et al. 2004), (De-)Ubiquitylierung (Emre et al. 2005; Wang et al. 2006), Sumoylierung (Nathan et al. 2006), ADP-Ribosylierung (Hassa et al. 2006) und Prolinisomerisierung (Nelson et al. 2006).

Bezogen auf ihre Auswirkung auf die Transkription können die Modifikationen in Kategorien eingeteilt werden. Acetylierung und Phosphorylierung wirken transkriptionsfördernd, wohingegen Deacetylierung, Sumoylierung und Prolinisomerisierung transkriptionssinhibierend wirken. Ubiquitinierungen können sowohl transkriptionsfördernd als auch transkriptionssinhibierend wirken und sind somit bifunktional. (Kouzarides 2007; Vakoc et al. 2005). Methylierungen sind meist an Lysinresten zu finden und wirken meist bifunktional.

Die Acetylierung von Histonen ist mit der Aktivierung der Transkription assoziiert. Acetyltransferasen können in drei Hauptgruppen unterteilt werden (Selvi et al. 2010): GNAT (*GCN5-Related-N-acetyltransferase*), MYST (*MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60*) und CBP/p300 (*CREB-binding protein*). Generell modifizieren diese Enzyme mehr als einen Lysinrest, einige sind jedoch hochspezifisch und auf einzelne Lysine beschränkt. Die meisten Acetylierungsstellen finden sich an den N-terminalen Enden der Histone, welche auch morphologisch am zugänglichsten sind (Sterner und Berger 2000). Durch die Acetylierung der Histone wird die positive Ladung der Proteine neutralisiert und die verminderte Wechselwirkung führt zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur mit leichterem Zugang zur DNA für die Transkriptionsmaschinerie (Kouzarides 2007; Ruthenburg et al. 2007; Siomi und Siomi 2009).

Im Gegensatz zur Acetylierung führt die Deacetylierung zur transkriptionellen Repression. Auch hier sind drei Familien von Histondeacetylasen (HDAC) bekannt. Sie sind in viele Signaltransduktionskaskaden eingebunden und Bestandteil in zahlreichen repressiven Chromatinkomplexen. Deacetyltransferasen zeigen im

Gegensatz zu den Acetylasen eine wesentlich geringere Spezifität bezüglich ihrer Zielstrukturen (Kouzarides 2007; Vaquero et al. 2006).

### 1.2.3 CBP (CREB-binding protein) / p300

Transkriptionsaktivatoren binden an spezifische Sequenzen an Promotoren sowie *Enhancern* des Zielgens und initiieren die Transkription, indem sie die Transkriptionsmaschinerie, bestehend aus den *General Transcription Factors (GTFs)* (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIF) und der RNA-Polymerase II, an die Transkriptionsinitiationsstelle bringen (Ptashne und Gann 1997; Thomas und Chiang 2006). Co-Faktoren der Transkription ermöglichen das *Chromatin-Remodeling* und modifizieren enzymatisch die Chromatinstruktur, wodurch sich diese auflockert und die Gentranskription ermöglicht wird (Naar et al. 2001; Wang et al. 2013).

CBP (*CREB-protein [cAMP-response-element-binding-protein binding protein] binding protein*) und dessen Homolog p300 sind beides transkriptionelle Coaktivatoren. Sie verbinden DNA mit den GTFs und bedingen eine Auflockerung des Chromatins durch ihre intrinsische Histonacetyltransferase(HAT)-Aktivität (Bannister und Kouzarides 1996; Ogryzko et al. 1996; Shiama 1997). Neben der HAT-Funktion können CBP/p300 auch einige Transkriptionsfaktoren acetylieren und dadurch deren Aktivität modulieren. CBP und p300 erfüllen teils unterschiedliche Funktionen; aufgrund ihrer sowohl strukturellen als auch funktionellen Ähnlichkeit werden beide Proteine oft zusammengefasst (Kalkhoven 2004; Wang et al. 2013).

Bei CBP sind vier *Transactivation domains (TAD)* bekannt: die *Cysteine-Histidine-rich region 1 (CH1)*, welche einen *transcriptional adapter zinc finger 1 (TAZ1)* beinhaltet (Bhattacharya et al. 1999; De Guzman et al. 2000), eine CREB-interagierende KIX-Domäne unbekannter Funktion (Parker et al. 1996), eine *Cysteine-Histidine-rich region 3 (CH3)* in der ein weiterer *transcriptional adapter zinc finger 2 (TAZ2)* und eine *ZZ-type zinc finger domain* enthalten sind (Albanese et al. 1999; De Guzman et al. 2000) sowie eine *nuclear receptor co-activator binding domain (NCBD)*, welche auch *interferon-binding domain (IBiD)* genannt wird (Lin et al. 2001; Parker et al. 1996). Diese TADs vermitteln Protein-Protein-Interaktionen mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren und helfen der Transkriptionsmaschinerie. Darüber hinaus beinhaltet CBP noch eine Histonacetyltransferase-Aktivität, um

Histone und andere Proteine zu acetylieren und eine daran anschließende Bromodomäne, welche modifizierte Histone erkennt (Ragvin et al. 2004).

Die mit CBP assoziierten Faktoren beinhalten folgende pro-proliferative und onkogene Proteine (Wang et al. 2013): c-Myc (Vervoorts et al. 2003), c-Myb (Dai et al. 1996), CREB (Chrivia et al. 1993), c-Jun (Bannister et al. 1995) und c-Fos (Bannister und Kouzarides 1995). Darüber hinaus werden auch pro-apoptotische und Tumorsuppressorproteine reguliert (Wang et al. 2013): p53 (Avantaggiati et al. 1997; Lill et al. 1997), *Forkhead box class O (FOXO) transcription factor 1/3a/4* (Nasrin et al. 2000; So und Cleary 2002, 2003), *signal transducer and activator of transcription (STAT) 1/2* (Bhattacharya et al. 1996; Zhang et al. 1996), *Hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) (Arany et al. 1996; Kallio et al. 1998), *breast cancer 1 (BRCA1)* (Pao et al. 2000), *SMA/MAD homology (Smad) proteins* (Feng et al. 1998; Janknecht und Nordheim 1996), *Runt-related transcription factor (RUNX)* (Kitabayashi et al. 1998), *E2 Transcription Factor (E2F)* (Ait-Si-Ali et al. 2000) und E-Proteine (Denis et al. 2012; Wang et al. 2013).

CBP hat durch seine vier TADs eine große Fülle von Interaktionspartnern, von denen wiederum eine Vielzahl mehrere TADs beinhalten. Diese Kombination führt zu einer enormen kombinatorischen Möglichkeit der Komplexbildung (Teufel et al. 2007; Wang et al. 2012).

Neben den vier TADs und der HAT-Domäne fungiert CBP zusätzlich noch als Coaktivator für nukleäre Rezeptoren. Diese Interaktionen sind durch kurze Peptidmotive vermittelt, welche durch die *activation function-2 (AF-2) region* der ligand-bindenden Domänen (LBDs) von nukleären Rezeptoren erkannt wird (Wang et al. 2013). Zu den Rezeptoren gehören der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) (Chakravarti et al. 1996), der Androgen-Rezeptor (AR) (Fronsdal et al. 1998) und der Estrogen-Rezeptor (ER) (Hanstein et al. 1996; Wang et al. 2013).

Die vielen schon genannten Histonmodifikationen werden kombiniert miteinander als *histone code* bezeichnet und regulieren das Expressionslevel von Genen (Jenuwein und Allis 2001). Die von CPB enthaltene Histonacetyltransferase-Domäne acetyliert nucleosomale Histone in der Nähe der Promotorregionen. Diese HAT-Funktion oder die Adapterfunktion von CBP spielt eine entscheidende Rolle in der Promotor-Aktivator-spezifischen Transkription. Diese Histonacetylierung bewirkt eine Auflockerung des Chromatins und erleichtert den Zugriff auf chromosomale DNA (Bannister und Kouzarides 1996; Gorisch et al. 2005; Ogryzko et al. 1996; Wang et

al. 2013). Zu den von CBP/p300 acetylierten Lysinresten an Histonen gehören unter anderem H3K14, H3K18, H3K23, H3K27, H4K5, H4K8, H4K12 und diverse Lokalisationen an den Histonen H2A und H2B (Ding et al. 2014; Schiltz et al. 1999). Die Struktur der HAT-Domäne des CBP lässt einen katalytischen Mechanismus vermuten, bei dem Acetyl-CoA gebunden wird und der Lysinrest des Histons im „CBP-Tunnel“ acetyliert wird. Dieser Mechanismus unterscheidet sich von dem anderer Histonacetyltransferasen, was die Spezifität und Selektivität der HAT-Domäne des CBP erklärt (Liu et al. 2008; Wang et al. 2008). Die beiden Paraloge CBP und p300 unterscheiden sich insbesondere hinsichtlich der Spezifität einzelner Lysinreste. Mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren konnte gezeigt werden, dass p300 bei der Acetylierung der Lysinreste H3K14, H3K18 und H3K23 eine um den Faktor  $10^{10}$  erhöhte Spezifität besitzt (Henry et al. 2013). Auch konnte gezeigt werden, dass CBP und das Tumorsupressorgen PTEN miteinander interagieren und deren Expressionsmuster in Prostatakarzinomen korrelieren. Im Mausmodell (CBP<sup>pc-/-</sup>/PTEN<sup>pc+/-</sup>) konnten erhöhte Proliferationsraten und die Entstehung von *early onset high-grade*-Prostatakarzinomen nachgewiesen werden (Ding et al. 2014). Bei bestehendem CBP-Verlust und PTEN-Defizienz findet an dem Lysinrest H3K27 ein Wechsel von einer Acetylierung zur Trimethylierung statt, was mit einer reduzierten Expression des Tumorsupressorgens DAB2IP einhergeht (Ding et al. 2014). Jedoch acetyliert CBP mit seiner HAT-Domäne nicht ausschließlich Histone. Beispielsweise wird auch das Tumorsupressorprotein p53 modifiziert. Am c-terminalen Ende des p53 befindet sich eine unspezifische DNA-bindende Domäne, welche mit der sequenzspezifischen DNA-bindenden Domäne desselben Proteins interferiert. Wird die unspezifische DNA-Bindungsstelle durch das CBP acetyliert, führt dies zur Inaktivierung und zur Trennung von der sequenzspezifischen DNA-Bindungsstelle. Diese wird nun frei, erhöht dessen Aktivität und die Spezifität des p53 (Gu et al. 1997)

### 1.3 Zielsetzung

CBP ist als Histonacetyltransferase ein Coaktivator der Transkription. Es ermöglicht durch enzymatische Modifizierung am Chromatin und anderen Proteinen eine Umstrukturierung des Chromatins, wodurch eine Vielzahl regulativer Prozesse inklusive Mechanismen der Zellreparatur beeinflusst werden können. CBP ist in vielen pro-apoptischen und pro-proliferativen Prozessen involviert, und ein Zusammenhang mit malignen Erkrankungen konnte bereits gezeigt werden.

Ziel der Arbeit war es, eine vermutete CBP-vermittelte Modulation der Tumorproliferation und den etwaigen Einfluss auf die Resistenzentwicklung am Beispiel des Rektumkarzinoms zu untersuchen. Hierzu wurde drei wesentliche experimentelle Schritte geplant.

Zunächst sollte mit Hilfe immunhistochemischer Methoden untersucht werden, ob und inwieweit Zusammenhänge zwischen der CBP-Expression in Tumoren und den klinischen Parametern von Patienten mit rektalen Karzinomen existieren.

In einem zweiten Schritt wurden molekularbiologische Aspekte eines CBP-*knockdowns* auf die Tumorproliferation anhand CBP-relevanter Signalkaskaden überprüft.

Zuletzt wollten wir mit Hilfe genetischer Repression in Karzinomzelllinien eine etwaige Relevanz von CBP in der Resistenzbildung bei Strahlen- und Chemotherapien analysieren.

## **2 Methoden und Patientenkollektiv**

### **2.1 Immunhistochemische Methoden**

#### **2.1.1 Herstellen von Paraffinschnitten**

Bevor mit der immunhistochemischen Färbung begonnen werden kann, müssen Gewebeschnitte von den in Paraffin eingebetteten Präparaten hergestellt werden. Hierzu werden die Paraffinblöcke mit einem Schlittenmikrotom in 2 µm starke mikroskopische Präparate geschnitten. Diese Schnitte werden mit Hilfe eines Wasserbades auf einen Glasobjektträger gebracht, auf einer Heizplatte gestreckt und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 40 °C getrocknet.

#### **2.1.2 Immunhistochemische Färbung**

Die immunhistochemische Färbung erfolgt automatisiert mit dem Färbeautomaten BenchMark XT von Roche. Das Präparat wird zunächst mit einer wässrigen Entparaffinierungslösung (EZ Prep) behandelt. Anschließend erfolgt eine Antigen-Demaskierung durch eine Hitzevorbehandlung bei 100 °C über 90 Minuten. Das Präparat wird für diesen Schritt mit einem Tris-Borat-EDTA (pH 7,6)-Puffer bedeckt. Die folgende Antikörper-Inkubation (CBP-Antikörper 1:50-Verdünnung) dauert 88 Minuten bei Raumtemperatur. Der für die Färbung verwendete Zweitantikörper ist mit Meerrettichperoxidase konjugiert und wird mit einem Färbekit (Fast Red Kit) angewendet. Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgt im letzten Schritt mit Hämatoxylin.

#### **2.1.3 Auswertung und Quantifizierung**

Um ein möglichst reproduzierbares Ergebnis in der immunhistochemischen Analyse zu erlangen, wurde ein standardisiertes Vorgehen angewandt. Zunächst werden in jedem Präparat drei Areale ausgewählt, welche an der Basis des Tumors, also an der Grenzschicht zum gesunden Gewebe, im Zentrum des Tumors und am Apex, also zum Lumen des Darmes, liegen. Jedes dieser Areale umfasst etwa 7500 µm<sup>2</sup>. Zur Quantifizierung der Expressionsstärke wurde der *H-Score* verwendet (Goulding

et al. 1995). Hierzu werden alle Zellen in den Arealen ausgezählt und nach ihrem Färbegrad eingeteilt.

0 = Nicht gefärbt

1 = Leicht gefärbt

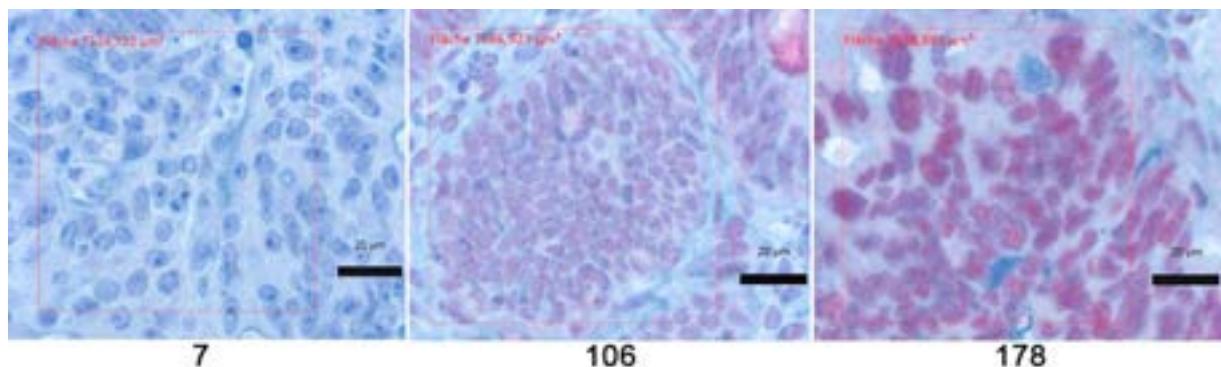
2 = Mittel gefärbt

3 = Stark gefärbt

Nach der folgenden Formel wird der *H-Score* ermittelt:

$\% \text{ (schwach gefärbt)} \times 1 + \% \text{ (moderat gefärbt)} \times 2 + \% \text{ (stark gefärbt)} \times 3 = 0\text{-}300$

Beispiel für *H-Score*:  $19,59 \times 1 + 70,74 \times 2 + 5,85 \times 3 = 178,6$



**Abbildung 1: Beispiel H-Score – Drei Präparate unterschiedlicher Expressionsstärke**

## 2.2 Methoden der Zellkultur

### 2.2.1 Konditionen für Säugerzellen

Alle für die Versuche verwendeten Zelllinien sind humanen Ursprungs und können bei der *American Type Culture Collection* (ATCC) kommerziell erworben werden. Die Zellen werden bei 37 °C sowohl bei Raumluft als auch bei 5%igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Es werden die von ATCC empfohlenen Medien verwendet. Alle Medien werden zusätzlich mit 10% FBS (*fetal bovine serum*), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt. Alle verwendeten Zelllinien weisen ein adhärentes Wachstum auf.

Zelllinie	Herkunft	Medium	Atmosphäre
HEK-293T	Embryonale Nierenzellen	DMEM	5% CO <sub>2</sub>
PC-3	Adenokarzinom der Prostata	DMEM	5% CO <sub>2</sub>

SW480	Adenokarzinom des Colons	L15	Raumluft
SW837	Adenokarzinom des Rektums	L15	Raumluft
SW620	LK-Metastase Colonadenokarzinom	L15	Raumluft
HT29	Adenokarzinom des Colons	McCoy's 5A	5% CO <sub>2</sub>

**Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und Kultivierungsbedingungen**

### 2.2.2 Allgemeine Arbeiten mit der Zellkultur

Alle Zellen werden zur Langzeitlagerung bei -150 °C in Flüssigstickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen werden die Zellen in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut sind, werden sie in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt und bei 800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das *Zellpellet* wird in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen können ausplattiert werden.

Bei der weiteren Kultivierung der Zellen wird angestrebt, die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Daher ist darauf zu achten, dass die Zellen eine Konfluenz von 80 % nicht überschreiten. Ein Wechsel des Mediums sollte alle 2-3 Tage erfolgen.

Haben die Zellen eine Konfluenz von 50-80 % erreicht, können diese gesplittet, d. h. in mehrere Petrischalen aufgeteilt werden. Hierzu wird zunächst das Medium verworfen und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt ein Ablösen der Zellen mit einer 0,25 %igen Trypsin-EDTA-Lösung. Der Lysevorgang wird durch die Zugabe von Medium gestoppt. Es folgt eine Zentrifugation, Resuspendierung und das Ausplattieren in neue Kultivierungsschalen.

Zur Ermittlung der genauen Zellkonzentration der Zellsuspension wird eine Neubauerzählkammer verwendet. Um abgestorbene Zellen bei der Zählung identifizieren zu können wird die Suspension in dem Verhältnis 1:10 mit Trypanblau versetzt.

### 2.2.3 *Plating Efficiency-Test*

Bei dem *Plating Efficiency Test* soll die optimale Zellzahl für eine Zelllinie, in diesem Fall PC-3, bestimmt werden, die für einen CFA (*Colony Forming Assay*) eingesetzt wird. Hierzu werden die Zellen in bestimmter Zahl (200, 400, 600, 800, 1000 und 1200 Zellen je *well*) in Duplikaten in *6-well-plates* ausplattiert. Ziel ist es, die Zellzahl zu finden, bei der nach einer bestimmten Zeit ungefähr 200 Kolonien je *well* mit mindestens 50 Zellen wachsen.

#### **2.2.4 Gen-Silencing mit RNA-Interferenz (RNAi)**

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen bei allen eukaryoten Lebewesen vorkommenden Mechanismus, der u.a. dazu dient, die Genexpression auf mRNA-Ebene zu regulieren. Der Organismus hat mit dieser Methode die Möglichkeit, auch posttranskriptionell auf die Expression einzuwirken und ein *Gen-Silencing*, also die Verminderung der Expressionsstärke eines Gens, zu ermöglichen (Kurreck 2009).

Bei dem Mechanismus der RNA-Interferenz sind mehrere Strukturen beteiligt. Das zentrale Biomolekül stellt eine doppelsträngige RNA (dsRNA) mit einer Länge von ca. 20-30 Basenpaaren dar. Außerdem sind die Proteine Dicer und RISC (*RNA-induced silencing complex*) beteiligt. Die dsRNA wird durch die Endoribonuklease Dicer geschnitten und anschließend an den RISC angelagert, welcher die dsRNA in Einzelstränge teilt. (Bagasra und Prilliman 2004; Siomi und Siomi 2009) Der Komplex aus ssRNA (*single-stranded RNA*) und RISC bindet die komplementäre mRNA, welche darauf hin abgebaut wird (Liu et al. 2004).

Dieses Phänomen des posttranskriptionellen *Gen-Silencing* kann experimentell genutzt werden.

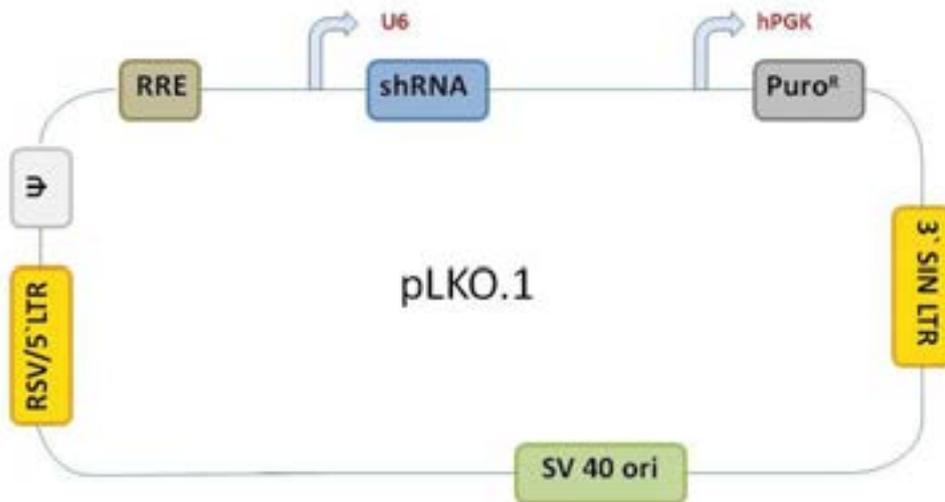
##### **2.2.4.1 Gen-Silencing mit siRNA**

Eine Möglichkeit, diesen Mechanismus zu nutzen, bieten die siRNAs (*small interfering RNA*). Diese stellen kleine dsRNA Moleküle dar, welche die Kodierung der Komplementärsequenz der mRNA des Gens enthalten, das supprimiert werden soll. Über verschiedene Wege wie Elektroporation oder Lipofektion können die siRNAs in das Zellinnere eingebracht werden und dort durch den oben beschriebenen Mechanismus das *Gen-Silencing* bewirken. Jedoch ist dieser *knockdown* nur von passagerer Dauer, da die siRNAs degradiert werden.

##### **2.2.4.2 Lentivirale Integration von shRNAi in Säugerzellen**

Eine weitere Möglichkeit, RNA-Interferenz experimentell einzusetzen, ist die Verwendung von shRNA (*small hairpin RNA*) durch lentivirale Integration. Hierzu werden lentivirale Partikel hergestellt, welche einen Expressionsvektor in die Wirtszelle einbringen. Der Vektor enthält die Kodierungen der shRNA für das

Zielmolekül, welches herunterreguliert werden soll, von Promotoren und eines Resistenzgens.



**Abbildung 2: Übersicht über den pLKO.1 Puromycin-resistenten shRNAi-Vektor (modifiziert nach OpenBiosystems); Abkürzungen siehe unten**

<b>Vektorelement</b>	<b>Funktion</b>
U6	Promotor; sorgt für Expression des Zielgens in den Zielzellen
shRNA	<i>knockdown</i> des entsprechenden Zielmoleküls
hPGK	Humaner Phosphoglyceratekinase-Promotor für die Expression des Puromycin-Resistenzgens
Puro <sup>R</sup>	Puromycin-Resistenzgen
3' SIN LTR	<i>3' self-inactivating long terminal repeat</i> für mehr lentivirale Sicherheit
SV 40 ori	Promotor für stetige Expression
RSV/ 5'LTR	<i>RSV Promotor / 5' long terminal repeat</i> für eine starke lentivirale Transkription
Ψ	<i>Psi packing sequence</i> für lentivirales "Genompacking"
RRE	<i>Rev response element</i> für effizienteres Packing"

**Tabelle 4: Abkürzungen der Vektorelemente des pLKO.1 Puromycin-resistenten shRNAi-Vektors**

Ist der Vektor durch das Viruspartikel in die Wirtszelle eingeschleust, werden die Gene über lentivirale Mechanismen in das Genom der Zelle integriert. Die shRNA wird nun von der Wirtszelle selbst synthetisiert und ist dauerhaft auch nach weiteren Zellteilungen vorhanden. Wie die siRNA wird auch die shRNA durch Dicer und den RISC weiterverarbeitet.

### 2.2.4.3 Amplifikation von shRNAi-Vektoren

Die für diese Arbeit verwendeten Vektoren wurden in bereits transformierten E.coli-Stämmen (*Escherichia coli*) bereitgestellt. Mit den E.coli-Stämmen, welche mit einer Carbenicillinresistenz ausgestattet sind, werden jeweils 250 ml LB-Medium angeimpft. Das Medium ist carbenicillinhaltig (100 µg/ml). Am Folgetag werden die Bakteriensuspensionen entsprechend dem Versuchsprotokoll (*HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit*) bearbeitet. Mit den aufgereinigten Plasmiden können nun Transfektionen durchgeführt werden.

### 2.2.4.4 Transfektion und Herstellung lentiviraler Überstände

Um Viruspartikel herzustellen, welche den shRNAi-Vektor tragen und übermitteln können, müssen zunächst diese shRNAi-Vektoren zusammen mit sogenannten Helfervektoren, die unter anderem für lentivirale Hüllproteine kodieren, in eine Zelle eingebracht werden. Hierzu wird die Modellzelllinie HEK-293T verwendet.

Für die Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 60-70 % in einer P10-Petrischale erreicht haben. In einem Eppendorfgefäß werden 30 µl TransIT®-293 vorsichtig mit 900 µl Opti-MEM vermischt. In einem weiteren Gefäß werden 2 µg Helfervektor-Mix (0,8 µg pHDM-VSVG, 0,4 µg pHDM-tat1b, 0,4 µg pHDM-HgPM2 und 0,4 µg pRC-CMV-Rall) und 8 µg shRNAi-Vektor zu 100 µl Opti-MEM hinzugegeben und vermengt. Beide Lösungen werden nun miteinander vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden 10 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und die Vektor-Mixtur darauf geträufelt. Die Zellen werden dann unter entsprechenden zellspezifischen Konditionen circa 48 Stunden inkubiert. In diesem Zeitraum produzieren die Zellen Viruspartikel, welche in das Medium abgegeben werden. Das Medium wird entnommen, durch einen Filter (Porengröße 0,45 µm) gepresst und anschließend frisch verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.4.5 Lentivirale Infektion von Zellen

Mit den zuvor hergestellten Viruspartikeln können nun diverse Zelllinien infiziert und somit der shRNAi-Vektor integriert werden. Hierzu werden die Zellen in einer bestimmten Zellzahl in 6-well-Platten ausplattiert. Die Zellzahl ist abhängig von

Zellreihe und Versuchsaufbau und variiert zwischen  $1 \cdot 10^5$  bis  $5 \cdot 10^5$  Zellen je *well*. Am Folgetag wird das alte Medium verworfen und 1ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Hinzu kommt ein 1 ml lentiviraler Überstand. Das Medium wird mit Polybrene (10  $\mu\text{g/ml}$  Endkonzentration) versetzt. Dieses kationische Polymer reduziert die ladungsbedingten Wechselwirkungen zwischen Viruspartikel und Zelloberfläche und soll so das Eindringen in die Zelle erleichtern. Das mit Viruspartikeln angereicherte Medium wird nach ca. 12 Stunden durch frisches Medium ersetzt.

Nach weiteren 24 Stunden können die Zellen in eine P10-Schale überführt werden. Da jene Zellen, bei denen die Integration der shRNA erfolgreich war, auch ein Resistenzgen gegen Puromycin integriert haben, kann nun eine Selektion mit Puromycin begonnen werden.

#### 2.2.4.6 Puromycintitration

Da jede Zelllinie unterschiedlich sensibel auf Puromycin reagieren kann, wird für die verwendeten Zelllinien eine Puromycintitration durchgeführt. Hierfür müssen die Zellen wie in den vorherigen Schritten mit einem Leervektor (*shEmpty*) versehen werden, welcher keine Kodierung für eine Suppression enthält. Anschließend werden verschiedene Puromycinkonzentrationen getestet. Die höchste nicht letal wirkende Puromycinkonzentration ist zu wählen. In den Versuchen zeigten sich folgende optimale Puromycinkonzentrationen:

- HEK-293T            2,0  $\mu\text{g/ml}$
- SW480              2,5  $\mu\text{g/ml}$
- SW620              2,5  $\mu\text{g/ml}$
- SW837              5,0  $\mu\text{g/ml}$
- PC-3                1,5  $\mu\text{g/ml}$

#### 2.2.4.7 Elektroporation

Eine weitere Methode, siRNA in das Zellinnere zu befördern, ist die Elektroporation. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, mit Hilfe eines elektrischen Feldes eine permeable Zellmembran zu erhalten. In der Phase der erhöhten Permeabilität kann die siRNA die Zellmembran passieren. Für diese Arbeiten wurde das *Lonza Amaxa*

*Cell Line Nucleofector Kit V* verwendet. Die Versuche wurden nach dem Versuchsprotokoll durchgeführt.

Der stärkste *knockdown* von CBP kann 24-48 h nach der Elektroporation erreicht werden. Dies ist der optimale Zeitpunkt, um die Zellen weiter zu analysieren oder einem *Colony Forming Assay* zuzuführen.

## 2.3 Klonierung

### 2.3.1 Gelelektrophorese von DNA

Mit der Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Proben und ein Größenmarker werden auf ein Agarosegel aufgetragen, das in einer Elektrophoresekammer liegt und mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Die Proben werden zuvor mit 6x *LoadingDye* versetzt, welches durch den Glycerolgehalt das Absinken der DNA in die Taschen des Gels bewirkt.

Anschließend wird Spannung an die Kammer angelegt. Da die DNA negativ geladen ist, wandert diese zum Pluspol. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zu der Größe der DNA-Fragmente. Die Elektrophorese läuft bei 80-120 V. Die Agarosekonzentration des Gels ist abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Bei kleinen Fragmenten wird eine höhere Konzentration verwendet als bei großen. Um die DNA sichtbar zu machen, wird das Gel mit einer DNA-interkalierenden Substanz (Biotium GelRed) versetzt. Die Banden werden danach unter UV-Licht deutlich erkennbar.

Für ein 1 %iges Agarosegel werden 100 ml 1xTAE-Puffer und 1 g Agarose vermischt. Zusätzlich werden 10 µl GelRed hinzugefügt. Diese Lösung wird in der Mikrowelle mehrfach aufgekocht, bis sich die gesamte Agarose gelöst hat. Anschließend lässt man die Agarose leicht abkühlen. Nun können die Gelkammern befüllt werden.

### 2.3.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mittels *heat shock*

Bei einer Transformation wird ein verändertes Plasmid wieder in ein Bakterium eingebracht. Möchte man ein unverändertes Plasmid wieder in ein Bakterium einfügen, spricht man von einer Retransformation. Für eine Transformation werden

10 – 500 ng Plasmid-DNA und 50 µl kompetente Bakterien vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien für 30 sec dem *Heat shock* in einem 42 °C warmen Wasserbad ausgesetzt und direkt darauf für weitere 2 min auf Eis gelegt. Nun wird das SOC-Medium hinzugegeben. Die Bakterien werden 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Bakterien auf Agarplatten ausplattiert. In der Regel wird je eine Platte mit 10 % und eine mit 90 % der Bakterien ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.3.3 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA macht man sich die klonale Vermehrung von Bakterien zunutze. Von den am Vortag präparierten Agarplatten der Transformation wird jeweils eine Kolonie mit einem Zahnstocher gepickt und 200 ml LB-Medium, das mit Ampicillin oder Kanamycin versetzt ist (1:1000), angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Die nächsten Arbeitsschritte bis zum isolierten Plasmid sind in dem von Invitrogen mitgeliefertem Versuchsprotokoll (HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit) nachzulesen.

### **2.3.4 Gewinnung von chromosomaler DNA aus Zellkulturen**

Um chromosomale DNA aus Zellkulturen zu gewinnen, muss eine ausreichende Menge Zellen ( $5 \times 10^6$  Zellen) zentrifugiert werden. Das Zellpellet wird anschließend mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert.

Die folgende Präparation wird nach dem von QIAGEN mitgelieferten Versuchsprotokoll (QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit) durchgeführt.

## **2.4 Analyseverfahren**

### **2.4.1 Zelllyse und Proteinextraktion**

Um die Proteine der Zellen untersuchen zu können, müssen die Zellen zunächst lysiert und die Proteine extrahiert werden. Zunächst werden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin aus der Petrischale gelöst und anschließend ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Nun wird der Lysepuffer hinzugegeben. Der Lysepuffer (Nonidet P40) wird mit Proteaseinhibitor (1:100), Phospho-Stopp (1:10) und DTT

(1:10) versetzt, um Dephosphorylierung und Proteinabbau zu verhindern und die Tertiärstruktur der Proteine aufrecht zu erhalten.

Mit dem Lysepuffer erfolgt eine Inkubation auf Eis (45-60 Minuten). Die Suspension wird anschließend zentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteine und kann bei -80 °C gelagert werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird das Verfahren nach Bradford verwendet. Hierzu werden in einer *96-well-Plate* in Triplikaten 50 µl der Proteinlösung vorgelegt. Als Standard wird eine Verdünnungsreihe einer Lösung mit fest definierter Konzentration von bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet. Anschließend wird je *well* 200 µl Roti Quant-Reagenz hinzugegeben, ein kommerziell erhältliches Reagenz, bei dem eine Umwandlung des Coomassie-Blau-Farbstoffes durch die Interaktion mit den Proteinen zustande kommt. Dieser Farbumschlag kann nach 5 Minuten Inkubation photometrisch bei 595 nm gemessen werden.

#### **2.4.2 Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese**

Um die zuvor isolierten Proteine weiter analysieren zu können, werden diese mit Hilfe einer Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierzu wird ein Bis-Tris-Gradientengel (4-12 %) der Firma Invitrogen verwendet. Die Verwendung eines Gradientengel ermöglicht die Auftrennung eines besonders großen Spektrums von Proteinen. Für die Elektrophorese wird ein MES-SDS-Laufpuffer verwendet. Es werden etwa 8-15 µg Protein je Probe aufgetragen. Anschließend wird eine Spannungsquelle an die Gelkammer angeschlossen. Die negativ geladenen Proteine wandern nun in Richtung Anode. Um die Proben zu sammeln und später scharf begrenzte Banden zu bekommen, läuft das Gel die ersten Minuten mit 100 Volt, anschließend wird die Spannung auf 150 Volt erhöht.

#### **2.4.3 Western Blot**

Um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, müssen diese von dem Gel auf eine Membran übertragen werden. Für diese Arbeit wird ein *Wet-Blot* mit einer *Mini-Trans-Blot-Cell* von *Bio-Rad* verwendet. Es wird eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) verwendet, welche vor dem Transfer in Methanol getränkt wird um diese für die Proteine aufnahmefähig zu machen.

Das Gel wird auf die PVDF-Membran gelegt. Auf beiden Seiten werden drei Lagen Filterpapier aufgelegt. Dieses Paket wird wiederum zwischen zwei Schwämmen in den Einspannrahmen der Blot-Kammer eingespannt und in die Blot-Kammer gestellt. Es ist darauf zu achten, dass die Membran zur Kathode und das Gel zur Anode gerichtet ist, damit die Proteine korrekt übertragen werden: Anschließend wird die Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transferpuffer besteht aus 100 ml Transferpuffer (10x), 700 ml H<sub>2</sub>O und 200 ml Methanol. Das Blotting erfolgt über 3 h bei 260 mA.

#### **2.4.4 Immunfärbung**

Im Anschluss sind die Proteine auf die Membran zu übertragen, und es kann mit der Immunfärbung begonnen werden. Zunächst müssen auf der Membran unspezifische Proteinbindestellen geblockt werden. Hierdurch erhöht sich die Sensitivität des Western-Blots. Dies geschieht bei einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit einer 5 %igen Milchpulver-Lösung auf der Basis eines PBS-Puffers. Nach dem Blocken wird die Membran für 5 Minuten mit PBST (PBS mit 0,05 % Tween versetzt) gewaschen.

Die spezifische Detektion von Proteinen erfolgt durch die sog. Primärantikörper. Inkubationszeit, Konzentration und Lösungsmittel (5 % Milchpulver oder 5 % BSA) variieren bei den unterschiedlichen Antikörpern und sind der unten aufgeführten Tabelle (siehe Tabelle 5) zu entnehmen. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wird die Membran wieder dreimal für 5 Minuten mit PBST gewaschen. Es folgt die zweistündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher gegen die jeweilige Spezies des Primärantikörpers (Kaninchen oder Maus) gerichtet ist. Nach der Inkubation wird die Membran wieder dreimal für 5 Minuten gewaschen. Die Sekundärantikörper sind mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert, welches nun zur Visualisierung der Proteinbanden auf der Membran benötigt wird. Hierfür wird ein Substrat für die Meerrettichperoxidase, das *Luminata forte*, auf die Membran gegeben, welches nun über mehrere Schritte zu Luminol oxidiert wird, welches wiederum luminesziert. Diese Lumineszenz kann nun durch eine sensitive Kamera aufgenommen werden.

In allen Immunfärbungen wurde das Histon H3 als Proteinladekontrolle gefärbt.

Antikörper	Größe Zielprotein	Verdünnung	Lösungs- mittel	Inkubations- zeit	Sekundär- antikörper
CBP	265 kDa	1:2000	Milchpulver	2 h	Kaninchen
β-cat	92 kDa	1:1000	BSA	Über Nacht	Kaninchen
act-β-cat	92 kDa	1:4000	Milchpulver	Über Nacht	Maus
c-myc	57-65 kDa	1:1000	BSA	Über Nacht	Kaninchen
c-jun	43-48 kDa	1:1000	BSA	Über Nacht	Kaninchen
p53	53 kDa	1:2000	Milchpulver	Über Nacht	<i>konjugiert</i>
p21	21 kDa	1:500	Milchpulver	Über Nacht	Maus
H3	17 kDa	1:3333	Milchpulver	30 min	Kaninchen

**Tabelle 5: Benutzte Antikörper und verwendete Konditionen**

#### 2.4.5 Visueller Letalitätstest nach shRNA-*knockdown*

Um den Einfluss eines *knockdowns* auf die Vitalität zu überprüfen wurde dieser Test durchgeführt. Zur Veranschaulichung werden in einer Versuchsanordnung nach festen Zeitpunkten Fotoaufnahmen gemacht um den Zelluntergang zu dokumentieren. Hierzu wird die Zelllinie HEK-293T verwendet. Es werden erstens Wildtypzellen wachsen gelassen, zweitens Zellen mit einem Leervektor und drittens Zellen, die mit einer gegen CBP gerichteten shRNA infiziert sind.

Zur Überprüfung des *knockdowns* wird mit den Proteinen der toten Zellen ein *Western Blot* durchgeführt.

#### 2.4.6 Colony Forming Assay (CFA)

Der *Colony Forming Assay* misst, wie stark die Resistenz der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt gegenüber einer Radio- oder Radiochemotherapie sind. Dazu wird eine bestimmte Zellzahl, die je nach Zelllinie variiert, in Triplikaten in einer *6-well-Plate* ausgesät. Nach einer Adhärenzzeit von 24 h kann mit der Bestrahlung begonnen werden. Die Zellen werden mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gray (Gy) bestrahlt (Geräteeinstellung: 200 kV, 15 mA, Filter: 0,5 mm Kupfer, Tischhöhe: 351 mm). Die Behandlung mit 5-FU (100 µM/ml) beginnt 12 h nach dem Setzen der Zellen und hält 24h an; danach wird das Medium gegen ein Frisches ausgetauscht.

Werden für den Versuch Zellen mit einem *knockdown* eingesetzt, so wird ein Teil der Zellen weiter kultiviert, um zum Zeitpunkt der Bestrahlung eine Proteinextraktion

vorzunehmen. Damit kann sichergestellt werden, dass während der Schadenssetzung (Bestrahlung) auch tatsächlich ein *knockdown* vorgelegen hat.

Sobald die Zellen die Bestrahlung und Chemotherapie erfahren haben, werden sie zu den üblichen Konditionen weiter kultiviert, bis sie Kolonien von mindestens 50 Zellen gebildet haben. Dies entspricht in etwa 5-6 Teilungszyklen. Daraus kann man schlussfolgern, dass Zellen, die eine ebensolche Kolonie bilden, den gesetzten Schaden adäquat kompensieren konnten.

Um die Zellen zu fixieren und zu färben wird zunächst das Medium verworfen, der Boden mit 70 %igem Ethanol bedeckt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Ethanol verworfen und für 5 Minuten Hämalaunblau (bei SW480 Kristallviolett) auf die Zellen gegeben. Nach dem Spülen mit Wasser können die Platten getrocknet werden.

		<b>Zellzahl je well</b>		
		HEK-283T	SW480	SW837
Dosis (Gy)	0	400	250	750
	1	400	250	750
	2	400	250	750
	4	800	500	1500
	6	1200	750	2250
	8	2000	1000	3000

**Tabelle 6: Einzusetzende Zellzahlen bei CFA**

## 2.5 Patientenkollektiv

Bei dem Patientenkollektiv handelt es sich um Teilnehmer einer prospektiv randomisierten und multizentrischen Phase II-Studie (GAST-05-Studie | ISRCTN 35198481), in der die Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms im oberen Rektumdrittel untersucht wurde. Die beiden randomisierten Versuchsarme unterscheiden sich in der gewählten Operationsart. Patienten in Versuchsarm A erhielten begleitend zu der TARR/ARR eine TME, Patienten in Versuchsarm B eine PME. Vor dem operativen Eingriff erhielten alle Patienten dieselben diagnostischen Voruntersuchungen. Da keine neoadjuvante Chemotherapie vorgesehen war, unterlag der Tumor keinen Selektionseinflüssen. 4-5 Wochen nach der Operation

erhielten die Patienten ggf. die adjuvante Chemotherapie. Die Nachsorge fand gemäß den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft statt. Das für die immunhistochemische Untersuchung verwendete Patientenkollektiv bestand aus 30 Frauen und 63 Männern. Der jüngste Patient des Kollektivs war 38 Jahre alt, der älteste Patient war 88 Jahre alt. Im Median betrug das Patientenalter 70 Jahre.

<b>Parameter</b>	<b>Patientenanzahl absolut (Prozent)</b>
Frauen	30 (32,3%)
Männer	63 (67,7%)
Altersmedian	70
ARR	37 (39,8%)
TARR	53 (57%)
TME	38 (40,9%)
PME	52 (55,9%)
Adjuvante Therapie	61 (65,6%)
pT1	3 (3,2%)
pT2	18 (19,4%)
pT3	61 (65,6%)
pT4	11 (11,8%)
pN0	53 (57%)
pN1	22 (23,7%)
pN2	18 (19,4%)
L0	68 (73,1%)
L1	23 (24,7%)
V0	80 (86%)
V1	12 (12,9%)
G1	0 (0%)
G2	67 (72%)
G3	25 (26,9%)
pUICC I	13 (14%)
pUICC II	39 (41,9%)
pUICC III	38 (40,9%)
pUICC IV	2 (2,2%)

Tabelle 7: Patientenkollektiv

## 2.6 Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Tim Reißbarth vom Institut für Medizinische Statistik Göttingen.

Bei der Berechnung der Verteilung der CBP-Expression in basalen, apikalen und zentralen Bereichen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet. Der Pearson-Korrelationskoeffizient lässt Aussagen über statistische Zusammenhänge zu, sofern die Daten dichotom und intervallskaliert sind. Es ist notwendig, dass die Variablen normalverteilt sind.

Die Korrelation des CBP-Status mit den klinischen Parametern (pT, pN, L, V, grade, pUICC) wurde nach Kendall's Tau berechnet und die Signifikanz bestimmt.

Bei den Analysen bezüglich des TTR (*time to any recurrence*), TTLR (*time to local recurrence*) und CSS (*cancer specific survival*) wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt. Hier sind der p-Wert und die Hazard Ratio aus dem Cox Proportional Hazards Model bestimmt worden. Bei sämtlichen Analysen wurde das Signifikanzniveau auf  $\alpha = 5\%$  ( $p < 0.05$ ) festgelegt. Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm R (R Core Team 2013) verwendet. In ähnlicher Weise wurden die statistischen Analysen in der Arbeit von L.-C. Conradi verwendet (Conradi et al. 2011).

Um die Daten über die Expressionsstärke in den immunhistochemischen Schnitten zu erhalten, wurde der *H-Score* verwendet (Goulding et al. 1995).

Dieser wurde wie folgt berechnet:

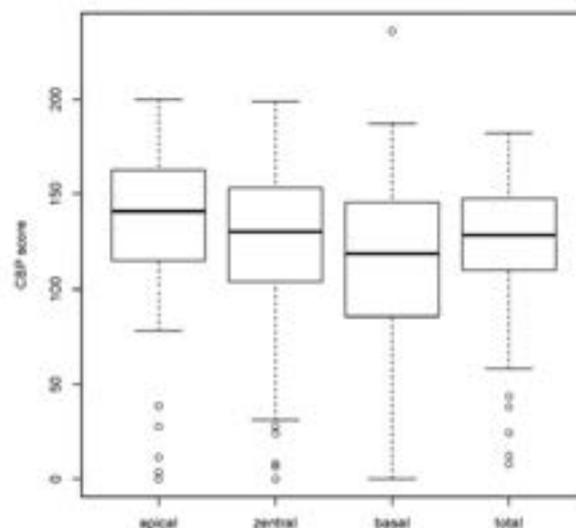
$\% \text{ (schwach gefärbt)} \times 1 + \% \text{ (moderat gefärbt)} \times 2 + \% \text{ (stark gefärbt)} \times 3 = 0-300$

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Immunhistochemische Auswertung

#### 3.1.1 Korrelation zwischen CBP-Expression und Tumorregion

Bei den Analysen der CBP-Expression bezogen auf die Lokalisierung innerhalb des Tumors, nämlich die basalen, zentralen und apikalen Bereiche, lässt sich ein Trend erkennen.



**Abbildung 3: CBP-Verteilung innerhalb des Tumors**

Es zeigt sich, dass in den basalen Bereichen des Tumors die geringste CBP-Expression vorliegt. In den apikalen Bereichen ist die höchste Konzentration von CBP zu finden (Abbildung 3). Setzt man die CBP-Expressionen zueinander in Beziehung, ist dieser Trend ebenfalls klar erkennbar (Abbildung 4).

Nach statistischer Auswertung zeigt sich dieser Trend zwar bestätigt, ist jedoch nicht signifikant ( $p$ -Wert  $>0,05$ ).

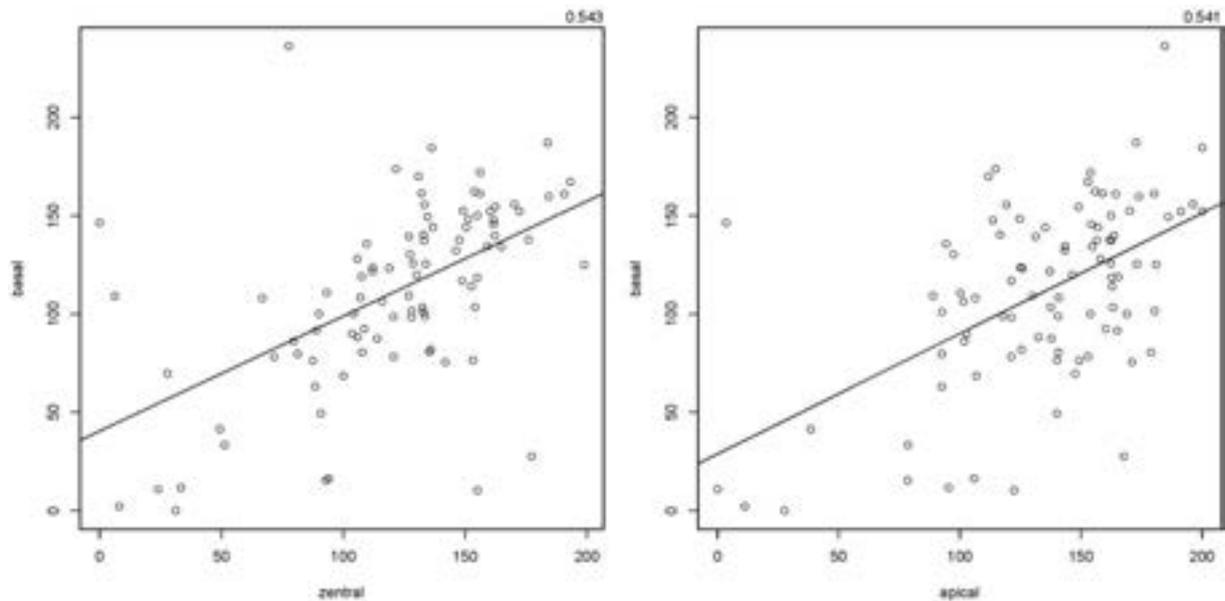


Abbildung 4: Korrelation der CBP-Verteilung innerhalb des Tumors

### 3.1.2 Korrelationen zwischen CBP-Expression und pathologischen Parametern

Neben der Verteilung des CBP innerhalb des Tumors wurden die Präparate auch auf einen Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von CBP und pathologischen Parametern hin untersucht. Zu den untersuchten Parametern gehörten die Tumorausdehnung (T), der Lymphknotenstatus (N), Lymphgefäßstatus (L), Tumoreinbruch in Venen (V), das UICC-Stadium und das *Grading* (G). Bei keinem dieser Parameter konnte eine signifikante Korrelation festgestellt werden (Abb.5-10).

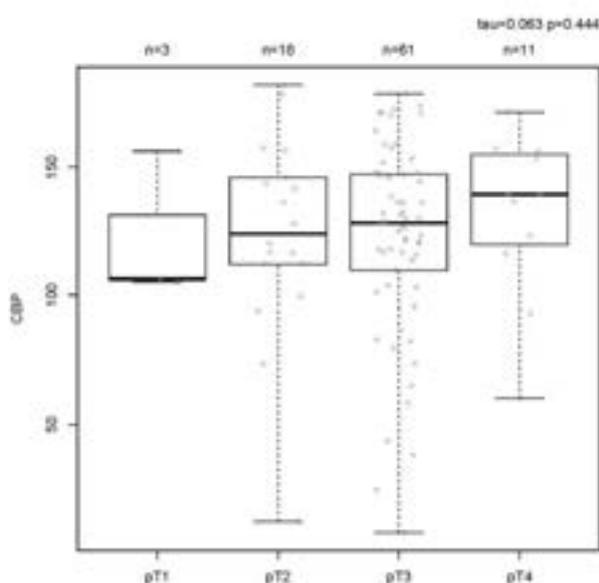


Abbildung 5: Korrelation von CBP mit T-Stadium

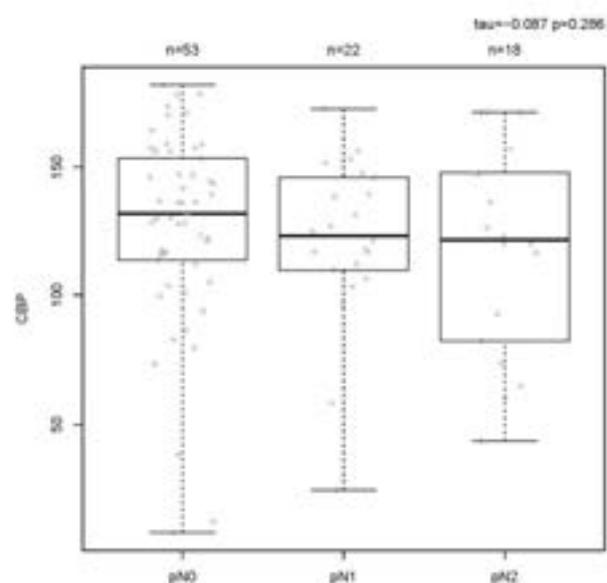


Abbildung 6: Korrelation von CBP mit N-Stadium

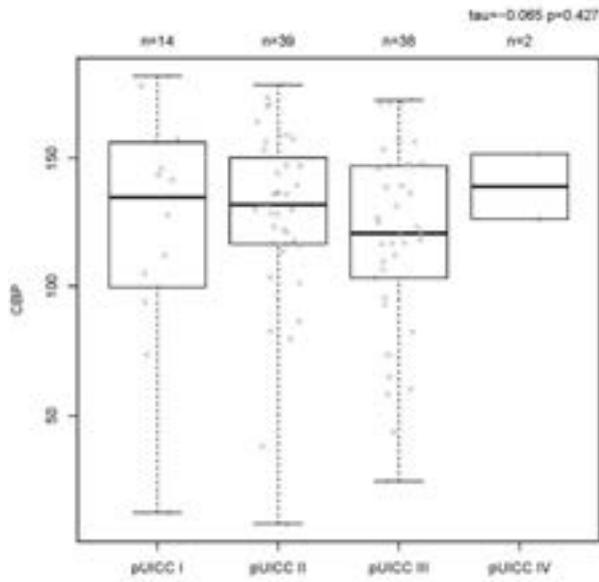


Abbildung 7: Korrelation von CBP mit UICC-Stadium

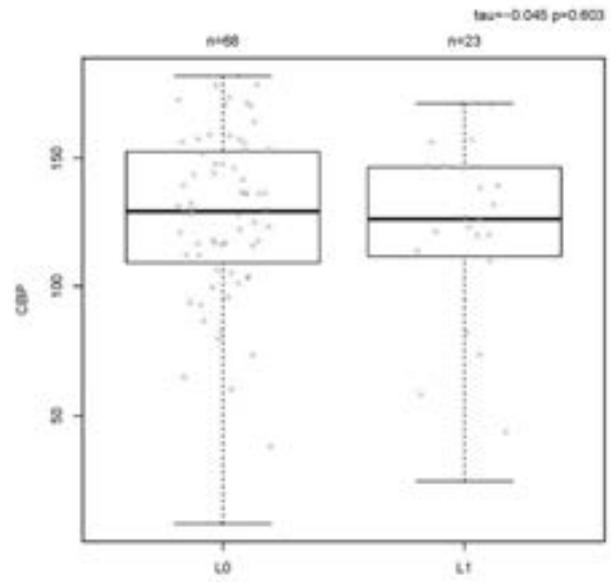


Abbildung 8: Korrelation von CBP mit Lymphgefäßinfiltration

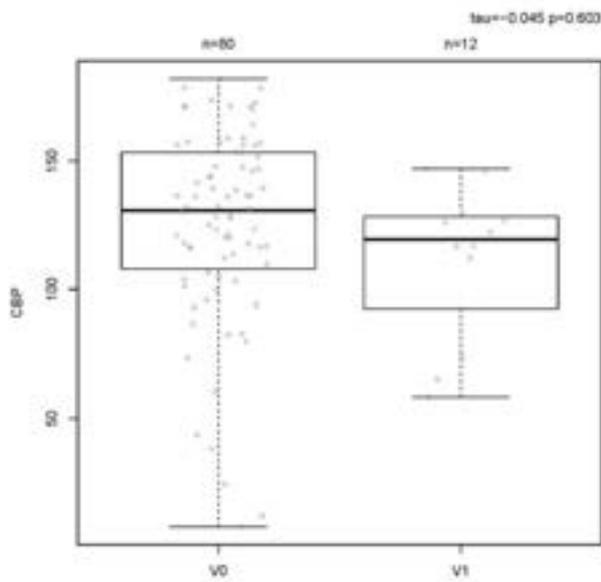


Abbildung 9: Korrelation von CBP mit Veneninfiltration

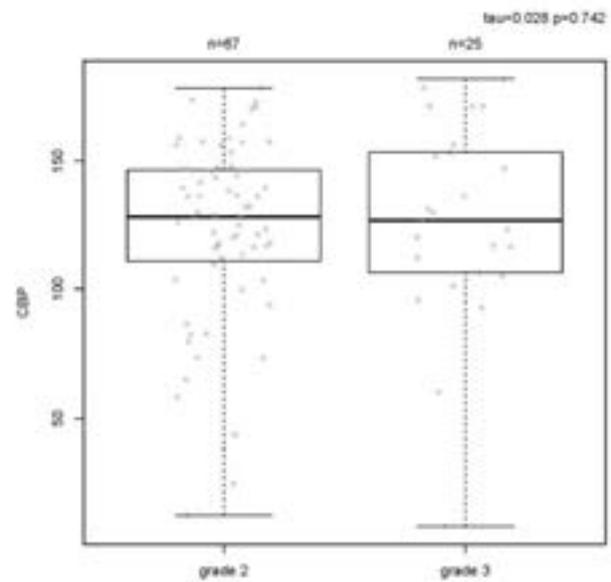
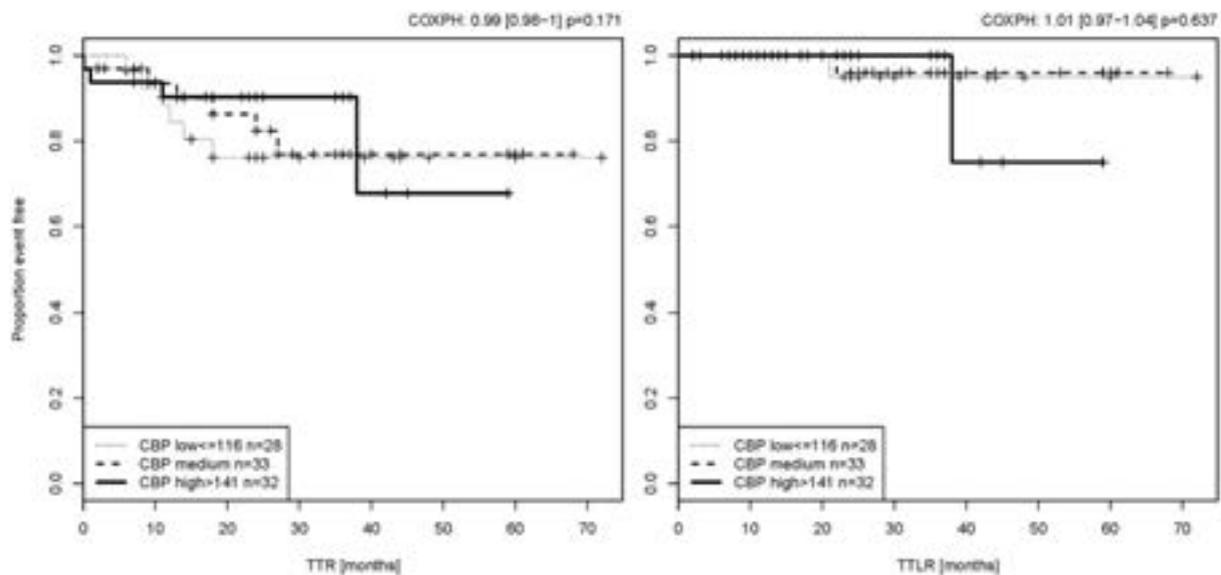


Abbildung 10: Korrelation von CBP mit Grading

### 3.1.3 Korrelation zwischen CBP-Expression und Tumorrezidivrate

Neben den pathologischen Parametern wurden auch Faktoren wie beispielsweise die Rezidivraten und das Überleben überprüft. Bei diesen Analysen ist der Trend zu erkennen, dass sowohl bei der *time to recurrence* (TTR) als auch bei der *time to local recurrence* (TTLR) eine hohe Expression von CBP sich zeitlich positiv auf das Auftreten von Rezidiv und lokalem Rezidiv auswirkt (Abbildung 11).

Unter der TTR ist die Zeit zwischen der Operation und dem Auftreten eines Lokalrezidivs oder einer Metastase zu verstehen.

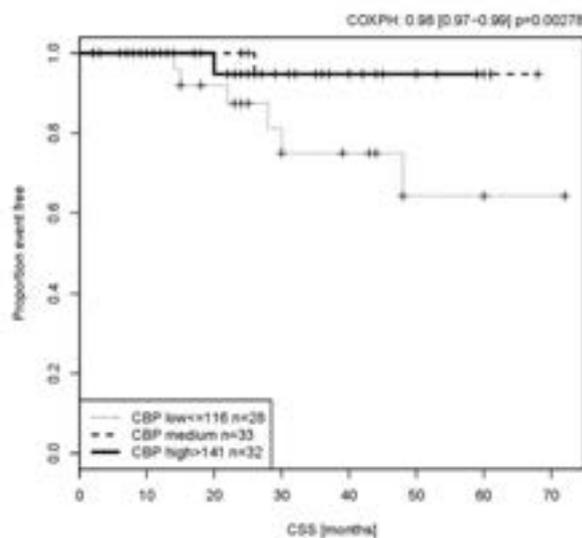


**Abbildung 11: CBP und TTR / TTLR**

Eine klare statistische Signifikanz ist nicht gegeben (TTR:  $p=0,171$ ; TTLR:  $p=0,637$ ).

### 3.1.4 Korrelation zwischen CBP-Expression und tumorspezifischem Überleben

Bei der Korrelation der CBP-Expression mit klinischen Daten konnte eine hohe statistische Signifikanz zwischen der Expressionsstärke von CBP und dem tumorspezifischen Überleben (CSS) festgestellt werden. Patienten, deren Tumoren eine hohe oder mittlere CBP-Expression aufweisen, zeigen ein verlängertes tumorbezogenes Überleben ( $p=0,00278$ ) (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Korrelation von CBP-Expression und CSS**

Das 5-Jahres-Überleben ist für Patienten mit niedriger CBP-Expression im Tumor über 30 % geringer als für Patienten mit mittlerer bis hoher CBP-Expression. Die Einteilung der Patienten nach Tumoren mit niedriger, mittlerer und hoher CBP-Expression wurde so gewählt, dass drei gleich große Gruppen zustande kommen.

Variable	Anzahl Patienten	CBP-Expression			p-Wert
		Niedrig	Mittel	Hoch	
Total	93	28 (30,1%)	33 (35,5%)	32 (34,4%)	
Tumorausdehnung					0,444
pT1	3	2 (66,7%)	0 (0%)	1 (33,3%)	
pT2	18	6 (33,3%)	5 (27,8%)	7 (38,9%)	
pT3	61	18 (29,5%)	23 (37,7%)	20 (32,8%)	
pT4	11	2 (18,2%)	5 (45,5%)	4 (36,3%)	
Lymphknotenstatus					0,286
pN0	53	15 (28,3%)	18 (34%)	20 (37,7%)	
pN1	22	7 (31,8%)	9 (40,9%)	6 (27,3%)	
pN2	18	6 (33,3%)	6 (33,3%)	6 (33,3%)	
Lymphgefäßstatus					0,603
L0	68	20 (29,4%)	24 (35,3%)	24 (35,3%)	
L1	23	7 (30,4%)	9 (39,1%)	7 (30,4)	

Venenstatus					0,603
V0	80	24 (30%)	27 (33,8%)	29 (36,2%)	
V1	12	4 (33,3%)	6 (50%)	2 (16,7%)	
Grading					0,742
G1	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
G2	67	20 (30%)	25 (37,2%)	22 (32,8%)	
G3	25	8 (32%)	8 (32%)	9 (36%)	
UICC-Stadium					0,427
pUICC I	14	6 (42,9%)	1 (7,1%)	7 (50%)	
pUICC II	39	9 (23%)	17 (43,7%)	13 (33,3%)	
pUICC III	38	13 (34,2%)	14 (36,9%)	11 (28,9%)	
pUICC IV	2	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	

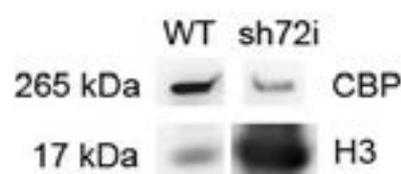
**Tabelle 8: Zusammenfassung: Korrelation CBP-Expression und pathologische Parameter**

## 3.2 Molekularbiologische Auswertung

### 3.2.1 Einfluss von CBP-*knockdown* auf die Letalität

*Knockdown*-Versuche mit shRNA in verschiedenen Konstellationen haben gezeigt, dass ein dauerhaftes Herunterregulieren des CBP für Zellen *in vitro* letal ist. Es wurden unterschiedliche Zeitreihen und Zelllinien getestet. Zu den getesteten Zelllinien gehören sowohl Rektum-, Colon-, Prostata als auch Nieren-Zelllinien: SW480, SW837, SW620, PC-3, HEK-293T.

Sowohl der Wildtyp als auch die mit dem Leervektor infizierten Zellen wachsen gleichermaßen zu einem dichten „Zellrasen“. Lediglich die Zellen mit einem CBP-*knockdown* sterben (Abbildung 14). Um den *knockdown* nachzuweisen, wurde das Protein für den Western Blot aus dem Überstand, also den bereits toten Zellen gewonnen (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Western Blot *sh*-*knockdown*-Überstand (HEK-293T)**

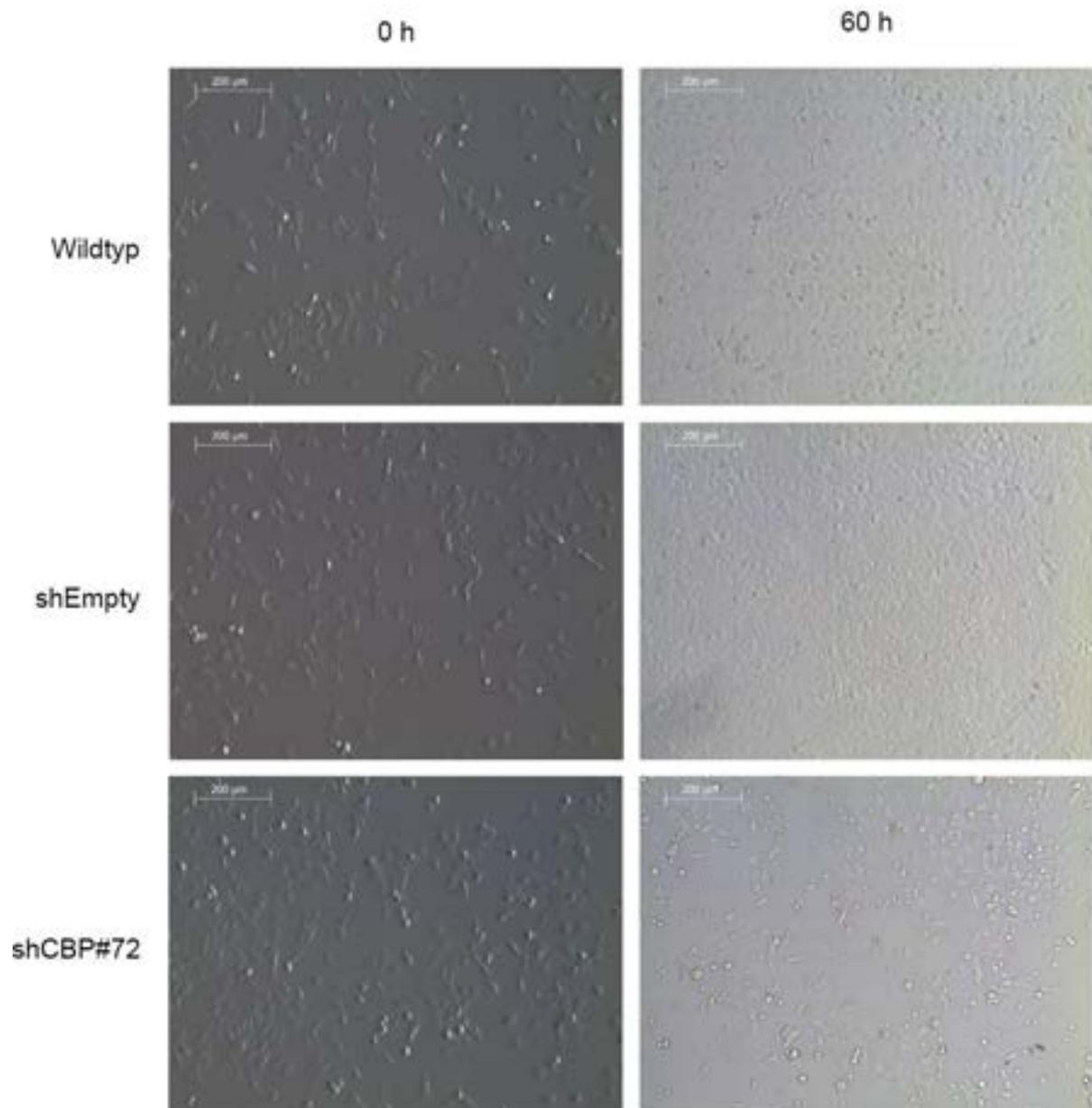


Abbildung 14: Zelluntergang nach CBP-*knockdown* mit shRNAi

### 3.2.2 Der *knockdown* von CBP induziert eine erhöhte Strahlensensibilität

Bei dem folgenden Versuch wurde ein passagerer *knockdown* mittels siRNA erreicht. Für den Versuch wurden die Rektumzelllinie SW837 verwendet.



Abbildung 15: WB des CBP-KD der SW837 vom CFA

Anschließend wurde ein CFA durchgeführt. In Abbildung 16 ist die Tendenz erkennbar, dass sowohl bei der Radiotherapie als auch bei der kombinierten Radiochemotherapie durch den *knockdown* eine gesteigerte Strahlensensibilität erreicht werden konnte.

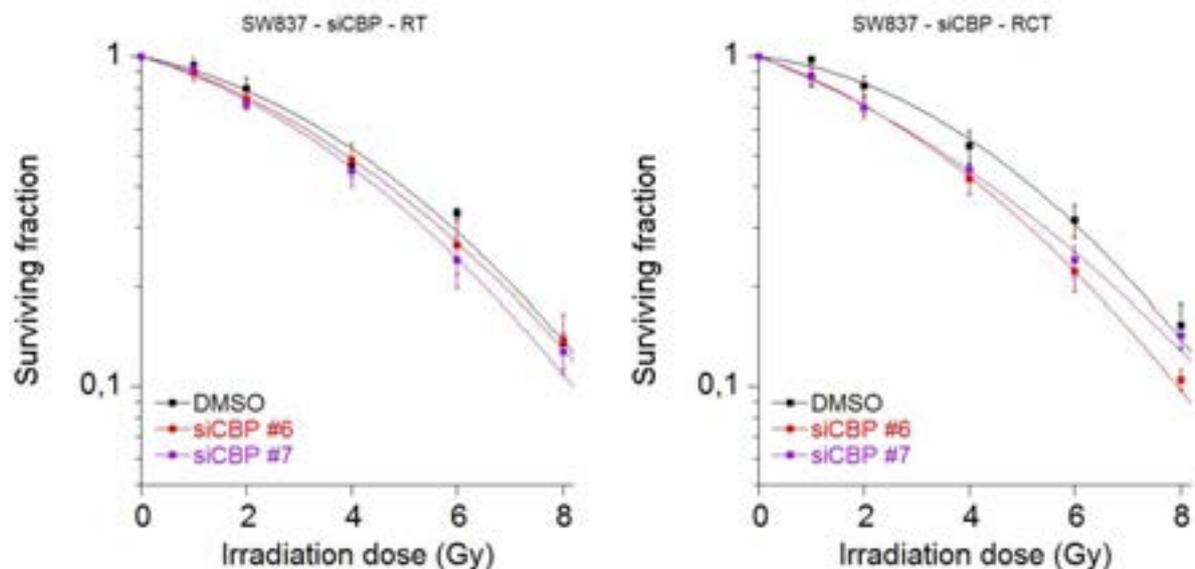


Abbildung 16: CFA mit RT (Radiotherapie) und RCT (Radiochemotherapie) von SW837 mit si-*knockdown* von CBP (3 Versuchsreihen)

Der Effekt des *knockdown* bei reiner Radiotherapie ist jedoch bei genauer Betrachtung des *dose reduction factor* nicht besonders ausgeprägt. Ein stärkerer Effekt kann bei der kombinierten Radiochemotherapie erzielt werden (Tabelle 9). Der größte DRF kann bei niedrigerer Strahlendosis beobachtet werden. So erzielt man

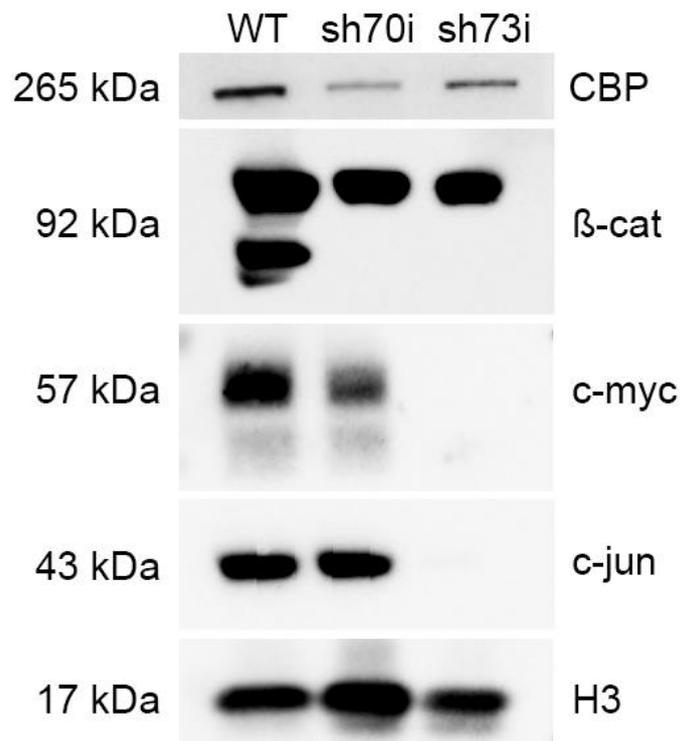
mit dem *CBP-knockdown* sowohl bei der Radio- als auch bei der kombinierten Radiochemotherapie den stärksten Effekt bei einer LD (letalen Dosis) von 25 %.

<i>Dose reduction factor (DRF)</i>						
	Radiotherapie			Radiochemotherapie		
	LD <sub>25</sub>	LD <sub>50</sub>	LD <sub>75</sub>	LD <sub>25</sub>	LD <sub>50</sub>	LD <sub>75</sub>
siCBP#6	1,16	1,08	1,05	1,51	1,28	1,20
siCBP#7	1,21	1,14	1,11	1,54	1,24	1,14

**Tabelle 9: DRF der SW837 mit CBP-KD bei LD<sub>25/50/75</sub>; DFR: Dose reduction factor, LD<sub>25/50/75</sub>: Letale Dosis mit Letalität bei 25/50/75% der Zellen**

### 3.2.3 Der *CBP-knockdown* wirkt sich direkt auf Interaktionspartner aus

Neben der Strahlen- und Chemosensibilität wurde überprüft, ob und inwieweit sich der *knockdown* des CBP auch auf Proteinebene auswirkt. Hierzu wurden Proteine von HEK-293T-Zellen mit einem shRNA-*knockdown* verwendet. Die ausgewählten Proteine spielen in der Onkogenese eine wichtige Rolle und sind direkte oder indirekte Interaktionspartner von CBP.



**Abbildung 17: WB von Interaktionspartnern bei CBP-KD in HEK-293T**

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wurde bei dem *CBP-knockdown* mit sh73i ein gänzlicher *knockout* von  $\beta$ -Catenin, c-myc und c-jun induziert. Bei dem *knockdown* mit sh70i wurde zumindest ein *knockout* von  $\beta$ -Catenin und ein *knockdown* von c-myc erreicht. Diese Auswirkungen auf die Interaktionspartner konnten nicht reproduziert werden. Vermutlich ist es aufgrund der hohen Letalität bei einem effizienten und konstanten *knockdown* von CBP schwierig, den Versuch am richtigen Zeitpunkt abzustoppen. Ein passagerer *knockdown* mit siRNA ist nicht ausreichend, um die oben gezeigten Effekte hervorzurufen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Auswirkung von CBP auf Tumorwachstum und Morphologie

Wie in den Ergebnissen gezeigt, wirkt sich die CBP-Konzentration des Tumors nicht signifikant auf dessen Wachstumsverhalten und Morphologie aus. Alle klinikopathologischen Parameter (Absatz 3.1.2) wie Tumorausdehnung (T), der Lymphknotenstatus (N), Lymphgefäßinfiltration (L), Tumoreinbruch in Venen (V), das UICC-Stadium und das *Grading* (G) zeigen keinerlei Zusammenhang. Bezüglich der Tumormorphologie ist jedoch auffällig, wenn auch nicht signifikant ( $p=0,541$ ), dass in den apikalen Tumorbereichen tendenziell eine höhere CBP-Konzentration vorliegt als in den basalen Tumorbereichen (Abbildung 4). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Zellschichten, die apikal und somit am weitesten entfernt von der Basis liegen, sich tumorbiologisch im Vergleich zu den ursprünglichen Tumorzellen an der Basis progredient entwickelt haben bzw. entartet sind. Das könnte ein Hinweis auf das Entwicklungsstadium des Tumors sein. Eigentlich wäre in diesem Fall zu erwarten, dass bei Tumoren, die CBP in einem besonders hohen Maße exprimieren, auch die Malignitätskriterien wie das *Grading* signifikant verändert wären.

### 4.2 Korrelation von CBP Expression des Tumors und Überleben

Mit hoher Signifikanz ( $p=0,00278$ ) besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen der CBP-Expressionsstärke und dem *cancer specific survival* (Abbildung 12). Warum die Patienten, die an einem Tumor mit hoher CBP-Expression leiden, länger überleben, lässt sich unterschiedlich erklären. CBP spielt in vielen zellbiologischen Prozessen eine wichtige Rolle, sowohl bei pro-proliferativen (Bannister und Kouzarides 1995; Bannister et al. 1995; Chrivia et al. 1993; Dai et al. 1996; Vervoorts et al. 2003; Wang et al. 2013) als auch bei pro-apoptotischen (Ait-Si-Ali et al. 2000; Arany et al. 1996; Avantaggiati et al. 1997; Bhattacharya et al. 1996; Denis et al. 2012; Feng et al. 1998; Janknecht und Nordheim 1996; Kallio et al. 1998; Kitabayashi et al. 1998; Lill et al. 1997; Nasrin et al. 2000; Pao et al. 2000; So und Cleary 2002, 2003; Wang et al. 2013; Zhang et al. 1996) Signaltransduktionskaskaden. Exprimiert ein Tumor im hohen Maße CBP und ist auf dessen regulatorisches Potential angewiesen, könnte das für eine insgesamt sehr hohe molekularbiologische Aktivität in der Tumorzelle sprechen. Ein derart hyperaktives System ließe sich wesentlich schneller aus dem

Gleichgewicht bringen als ein System mit vergleichsweise niedrigerer Aktivität. Ein möglicher Störfaktor für ein so fragiles System wäre beispielsweise eine adjuvante Chemotherapie. Dies könnte bedeuten, dass ein Tumor durch eine erhöhte CBP-Expression eine größere Sensibilität bezüglich einer Strahlen- oder Chemotherapie aufweist.

Basierend auf diesen Überlegungen lassen sich auch die Zusammenhänge von CBP-Expression und Rezidivrate erklären (Abbildung 11). Zwar sind diese Beobachtungen nicht statistisch relevant, jedoch ist ein Trend dahingehend zu erkennen, dass Patienten mit einem Tumor, welcher eine starke CBP-Expression aufweist, tendenziell länger tumorrezidiv frei sind.

Um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können, haben wir experimentell die Auswirkungen des CBP auf die Strahlen- und Chemosensibilität und den Zusammenhang zu den in der Onkogenese wichtigen Proteinen wie c-myc, c-jun und  $\beta$ -Catenin untersucht. Einen Zusammenhang zwischen CBP-*knockdown* und Expression von MYC konnte in der Arbeit von H. Ogiwara gezeigt werden. Eine Herunterregulierung von p300 in einem CBP-defizienten Tumor führte zu einer Suppression von MYC (Ogiwara et al. 2016).

### **4.3 CBP ist ein stark regulatorisches Protein**

Dass CBP eine regulatorische Funktion in vielen Signaltransduktionskaskaden innehat, konnte bereits in einigen Publikationen gezeigt werden. Nicht zuletzt aufgrund des direkten Bezuges zu pro-proliferativen und onkogenen Proteinen wie c\_Myc, c-myb, CREB, c-jun und c-fos (Bannister und Kouzarides 1995; Chrivia et al. 1993; Dai et al. 1996; Vervoorts et al. 2003; Wang et al. 2013) und der Einflußnahme auf  $\beta$ -Catenin und somit die wnt-Signaltransduktionskaskade (Teo und Kahn 2010) war es zu erwarten, dass sich der KD auf die Proliferation auswirkt. Das konnte besonders nach dem KD mit der shRNA beobachtet werden (Abbildung 14), der dauerhafte KD führt zum Zelltod. CBP besitzt offenbar eine enorme Regulationsfähigkeit und führt bei einigen der direkt interagierenden Proteine, in diesem Fall bei  $\beta$ -Catenin, c-myc und c-jun gezeigt (Abbildung 17), nicht nur zu einer Aktivierung/Deaktivierung, sondern auch zu einer Beeinflussung der Transkription. Daher ist es nachvollziehbar, dass ein gelungener und dauerhafter KD, wie es bei der shRNA der Fall ist, zum Untergang der Zellen führt und sich eine Reproduktion

der Ergebnisse als schwierig gestaltet. Dass ein gänzlicher *knockout* des CBP für die Zellen letal ist, wird durch die Tatsache gestützt, dass die Embryonen der Mäuse, bei denen ein homozygoter *knockout* für CBP besteht, nicht überlebensfähig sind (Kasper et al. 2006). Es erklärt auch, warum eine Zellreihe mit einem stabilen KD nicht möglich war, sodass die weiteren Arbeiten auf einem passageren KD mittels siRNA basieren.

#### 4.4 Der Resistenzverlust ist multifaktoriell bedingt

Da es uns experimentell nicht gelungen ist, die Zellen am Leben zu erhalten, bei denen mittels shRNA ein dauerhafter KD des CBP durchgeführt wurde, musste die Methodik gewechselt werden. Für den *Colony forming assay* (Absatz 3.2.2) wurde ein passagerer KD mittels siRNA verwendet.

In dem CFA ist der Trend erkennbar, dass vor allem in einer kombinierten Radiochemotherapie die Zellen mit CBP-KD sensitiver auf die Behandlung reagieren (Abbildung 16). Eine Erklärung dafür ist eine Reduktion der Reparaturfähigkeit der durch die Strahlen- und Chemotherapie zugefügten DNA-Schäden, wie DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche. Dieser Funktionsverlust könnte möglicherweise auf einer verminderten HAT-Aktivität des supprimierten CBP beruhen. Die direkte Wirkung der Acetylierung von Histonen auf die Reparatur von DNA-Strangbrüchen konnten (Bird et al. 2002) in ihren Arbeiten nachweisen. *Robert et al.* (Robert et al. 2016) zeigten im Zusammenhang mit Leukämien, dass es mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A zu einer differenzierten Acetylierung von DNA-Reparatur-Faktoren wie Ku70/Ku80 und poly ADP-ribose polymerase-1 kommt. Ebendieser positive Reparatoreffekt konnte durch die Inhibierung von p300/CBP mit dem Inhibitor C646 rückgängig gemacht werden.

Das wäre eine Erklärung für die erhöhte Strahlensensibilität von Zellen mit einem supprimierten CBP, verursacht durch die verminderten acetylierungsbedingten Reparaturmechanismen.

Da CBP neben der HAT-Aktivität über viele weitere in der Einleitung erläuterte funktionelle Domänen verfügt, ist ein monokausaler Rückschluss nicht möglich. Nicht zuletzt die Interaktionen mit den zahlreichen pro-proliferativen, onkogenen, pro-apoptotischen und Tumorsupressorproteinen (Ait-Si-Ali et al. 2000; Arany et al. 1996; Avantiaggiati et al. 1997; Bannister und Kouzarides 1995; Bannister et al. 1995;

Chrivia et al. 1993; Dai et al. 1996; Denis et al. 2012; Feng et al. 1998; Janknecht und Nordheim 1996; Kallio et al. 1998; Kitabayashi et al. 1998; Lill et al. 1997; Pao et al. 2000; Vervoorts et al. 2003; Wang et al. 2013; Zhang et al. 1996) lassen eine Vielzahl von Erklärungen zu. Beispielsweise konnten *Cui, F. et al* (Cui et al. 2015) in ihren Arbeiten nachweisen, dass HeLa-Zellen nach einem KD von c-Myc (Abbildung 17) einen starken Resistenzverlust gegenüber einer Radiotherapie erfahren, basierend auf einer verminderten Fähigkeit, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. Auch in Bezug auf die Sensibilisierung bezüglich einer Chemotherapie ließ sich ein Zusammenhang mit CBP und  $\beta$ -Catenin herstellen (Zhao et al. 2015). *Zhao, Y. et al* konnten mit dem Inhibitor ICG-001, welcher die Interaktion zwischen CBP und  $\beta$ -Catenin hemmt, zeigen, dass bei resistenten CML-Zellen durch die Inhibition dieser Interaktion wieder eine Sensibilisierung gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren erreicht werden konnte (Zhao et al. 2015).

Insgesamt lässt sich vermuten, dass hier ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren zu einer verminderten Kompensationsfähigkeit des Strahlen- und Chemotherapie-schadens nach CBP-KD eine Rolle spielt.

#### **4.5 Diskrepanz zwischen klinischen und molekularbiologischen Ergebnissen?**

Einerseits ließen die molekularbiologischen Ergebnisse erwarten, dass Tumoren mit einer hohen CBP-Expression widerstandsfähiger wären. Andererseits könnte bei einer antitumorösen Therapie erwartet werden, dass ein Tumor die Schäden effektiver kompensiert mit einer negativen Auswirkung auf die Prognose des Patienten.

Jedoch stellt es sich bei der Korrelation der CBP-Expression mit den klinischen Parametern entgegengesetzt dar. Patienten, die eine erhöhte CBP-Expression im Tumor aufwiesen, zeigten ein signifikant längeres Überleben. Auf die Gründe hierfür wurde in Absatz 4.2 eingegangen.

Bei diesen scheinbar diskrepanten Ergebnissen sollte kritisch hinterfragt werden, ob eine nachgewiesene erhöhte CBP-Expression zugleich auch eine erhöhte Aktivität bedeutet? Falls man davon ausgeht, dass es aufgrund der verstärkten Expression auch zu einer erhöhten Aktivität kommt, lässt dieses noch keinen Rückschluss darüber zu, ob alle funktionellen Domänen in gleichem Maße aktiv sind oder ob es

aufgrund von anderen regulatorischen Mechanismen zu einer verstärkten Aktivität einzelner Domänen kommt. Sollte dies der Fall sein, ist es beispielsweise durchaus denkbar, dass ein Tumor mit erhöhter CBP-Expression ein Gleichgewicht der onkogenen pro-proliferativen und der anti-proliferativen apoptotischen Singaltransduktionskaskaden hergestellt hat. Führt man diesen Gedanken weiter, ist es sogar vorstellbar, dass es aufgrund eines Missverhältnisses zugunsten der anti-proliferativen und apoptotischen Aktivität des CBP zu einer Stabilisierung des Tumorwachstums kommt und es sich somit durchaus positiv auf die Malignität und somit auf das Überleben der Patienten auswirken kann.

#### 4.6 Ausblick

Diese Arbeit untersucht den Einfluss von CBP im kolorektalen Karzinom *in vitro* wie *in vivo*. Da CBP mit multiplen Interaktionspartnern agiert und offensichtlich auch im Hinblick auf das kolorektale Karzinom eine Rolle zu spielen scheint, sollte die Bedeutung von CBP im kolorektalen Karzinom weiter untersucht werden.

Bezüglich der klinischen Daten ist es zu überlegen, das Patientenkollektiv zu erweitern. Sicherlich wäre es auch interessant, Patienten, die eine neoadjuvante oder adjuvante Therapie erhalten haben, vermehrt in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Hierdurch könnten vor allem weitere klinische Erkenntnisse über den Zusammenhang von CBP und Resistenzbildung gewonnen werden. Auch andere Karzinome könnten diesbezüglich untersucht werden.

Immunhistochemisch wäre es interessant zu wissen, ob die CBP-Expression bei Tumoren mit der Expression direkt interagierender pro-proliferativer und onkogener Proteine wie c-myc, c-jun und  $\beta$ -Catenin korreliert.

Auf molekularbiologischer Ebene gibt es ebenfalls eine Vielzahl von Ansatzpunkten. Zum einen sollte weiterhin versucht werden, die von uns gezeigten Effekte eines CBP-*knockdown* auf die Interaktionspartner zu verifizieren. Ein weiterer interessanterer Ansatz ist die Möglichkeit, CBP mit Hilfe eines Überexpressionsvektors in den Zellen verstärkt exprimieren zu lassen und die Effekte auf Interaktionspartner und Strahlen-/Chemosensibilität zu überprüfen. Darüber hinaus könnte man bei Zellen mit hoher CBP-Expression mittels einer Co-

Immunopräzipitation überprüfen, welche Proteine hier tatsächlich gebunden und somit tatsächlich mit dem CBP interagieren.

Die nächsten Schritte wären Analysen auf genomischer Ebene, beispielsweise mit einem DNA-Microarray. Hierdurch ließe sich ein direkter quantitativer Expressionsnachweis durchführen.

Sollten sich in weiteren Experimenten die Hinweise verdichten, dass CBP tatsächlich eine entscheidende Rolle in der Onkogenese spielt, wären auch Versuche in Tiermodellen denkbar. Da ein homozygoter *knockout* bei Mäusen letal endet (Kasper et al. 2006), wären andere *knockout*-Systeme vorstellbar. Zum Beispiel könnte ein Liganden-aktivierbares Cre/loxP-System zur Anwendung kommen, in dem ein *knockout* gezielt getriggert werden kann.

## 5 Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit befasst sich mit dem Protein CBP (*CREB-binding protein*) im kolorektalen Karzinom. CBP ist eine Histonacetyltransferaseaktivität mit 4 *transactivation domains* und acetyliert eine Vielzahl von Eiweißen. Biologisch-funktionell ist CBP ein multifunktionales Protein, welches eine Vielzahl von pro-proliferativen onkogenen und pro-apoptotischen anti-proliferativen Signaltransduktionskaskaden beeinflusst, auch in Tumoren.

Ziel der Arbeit war es, die vermutete CBP-vermittelte Modulation der Tumorproliferation und den etwaigen Einfluss auf die Resistenzentwicklung am Beispiel des Rektumkarzinoms zu untersuchen.

Zunächst haben wir mit Hilfe immunhistochemischer Methoden untersucht, ob und inwieweit Zusammenhänge zwischen der CBP-Expression in Tumoren und den klinischen Parametern bei Patienten mit rektalen Karzinomen existieren. Wir konnten feststellen, dass sich eine hohe CBP-Expression in Tumoren positiv auf das Überleben von Patienten auswirkt. Das 5-Jahres-Überleben ist für Patienten mit niedriger CBP-Expression im Tumor über 30 % geringer als für Patienten mit mittlerer bis hoher CBP-Expression. Darüber hinaus ist zumindest in der Tendenz ein positiver Einfluss von erhöhter CBP-Expression auf das Rezidiv-Verhalten von Tumoren erkennbar.

Als zweiter Schritt wurden molekularbiologische Aspekte eines CBP-*knockdowns* auf die Tumorproliferation anhand CBP-relevanter Signalkaskaden überprüft. Auf zellbiologischer Ebene konnten wir zeigen, dass CBP ein überlebensnotwendiges Protein für den Organismus darstellt und ein vollständiger *knockdown* sich letal auswirkt. Wir konnten zeigen, dass, wenn auch sehr dynamisch, CBP an der Regulation einiger Signalmoleküle, welche wichtig für die Tumorproliferation sind, beteiligt ist. Ein gänzlicher *knockout* von CBP hat außerdem einen Einfluss auf die Expression von Interaktionspartnern zur Folge. Es war begleitend ein *knockout* der onkogenen Proteinen c-myc, c-jun und  $\beta$ -Catenin nachweisbar. Darüber hinaus haben wir die biologisch funktionelle Rolle von CBP bei der Resistenzentwicklung untersucht und konnten zeigen, dass eine Suppression tendenziell zu einer Sensibilisierung gegenüber einer Strahlen- und Chemotherapie in Rektumkarzinomen führt.

Betrachtet man diese Ergebnisse in ihrer Gesamtheit, wird deutlich, dass das Protein CBP eine zentrale Schaltstelle im Organismus darstellt und eine wichtige Rolle bei der Tumorzellproliferation spielen kann. Die Folgen einer Dysregulation der CBP-Expression können vielfältig sein. Um die tatsächliche Bedeutung dieses vielseitigen Proteins in der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen abschätzen zu können, bedarf es jedoch noch weiterer funktioneller Analysen.

## 6 Literaturverzeichnis

Ait-Si-Ali S, Polesskaya A, Filleur S, Ferreira R, Duquet A, Robin P, Vervish A, Trouche D, Cabon F, Harel-Bellan A (2000): CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition *Oncogene*. 19, 2430-2437

Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, et al. (2002): Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30, 227-232

Albanese C, D'Amico M, Reutens AT, Fu M, Watanabe G, Lee RJ, Kitsis RN, Henglein B, Avantaggiati M, Somasundaram K, et al. (1999): Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J Biol Chem* 274, 34186-34195

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM (1996): An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12969-12973

Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K (1997): Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89, 1175-1184

Bader AG, Kang S, Vogt PK (2006): Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1475-1479

Bagasra O, Prilliman KR (2004): RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histo* 35, 545-553

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, et al. (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221

Bannister AJ, Kouzarides T (1995): CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J* 14, 4758-4762

Bannister AJ, Kouzarides T (1996): The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643

Bannister AJ, Kouzarides T (2005): Reversing histone methylation. *Nature* 436, 1103-1106

Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T (1995): Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene* 11, 2509-2514

Barber TD, McManus K, Yuen KW, Reis M, Parmigiani G, Shen D, Barrett I, Nouhi Y, Spencer F, Markowitz S, et al. (2008): Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3443-3448

Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, Oldread E, Arany Z, D'Andrea A, Livingston DM (1996): Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature* 383, 344-347

Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM (1999): Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13, 64-75

Bird AW, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu Q, Harmon KE, Megee PC, Grant PA, Smith MM, Christman MF (2002): Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 419, 411-415

Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM (2008): The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 7, 41-52

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B (1987): Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293-297

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. (1994): Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258-261

Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M, Evans RM (1996): Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103

Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (1993): Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859

Conradi LC, Bleckmann A, Schirmer M, Sprenger T, Jo P, Homayounfar K, Wolff HA, Rothe H, Middel P, Becker H, et al. (2011): Thymidylate synthase as a prognostic biomarker for locally advanced rectal cancer after multimodal treatment. *Ann Surg Oncol* 18, 2442-2452

Cui F, Fan R, Chen Q, He Y, Song M, Shang Z, Zhang S, Zhu W, Cao J, Guan H, et al. (2015): The involvement of c-Myc in the DNA double-strand break repair via regulating radiation-induced phosphorylation of ATM and DNA-PKcs activity. *Mol Cell Biochem* 406, 43-51

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, et al. (2004): Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553

Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Hou DX, Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Takahashi T, Ishii S (1996): CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb. *Genes Dev* 10, 528-540

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, et al. (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954

De Guzman RN, Liu HY, Martinez-Yamout M, Dyson HJ, Wright PE (2000): Solution structure of the TAZ2 (CH3) domain of the transcriptional adaptor protein CBP. *J Mol Biol* 303, 243-253

Denis CM, Chitayat S, Plevin MJ, Wang F, Thompson P, Liu S, Spencer HL, Ikura M, LeBrun DP, Smith SP (2012): Structural basis of CBP/p300 recruitment in leukemia induction by E2A-PBX1. *Blood* 120, 3968-3977

Ding L, Chen S, Liu P, Pan Y, Zhong J, Regan KM, Wang L, Yu C, Rizzardi A, Cheng L, et al. (2014): CBP loss cooperates with PTEN haploinsufficiency to drive prostate cancer: implications for epigenetic therapy. *Cancer Res* 74, 2050-2061

Emre NC, Ingvarsdottir K, Wyce A, Wood A, Krogan NJ, Henry KW, Li K, Marmorstein R, Greenblatt JF, Shilatifard A, et al. (2005): Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol Cell* 17, 585-594

Fearon ER, Bommer GT: Molecular Biology of Colorectal Cancer. In: DeVita, V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A.(Hrsg.): DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 8. Auflage. Auflage; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2008

Feng XH, Zhang Y, Wu RY, Derynck R (1998): The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev* 12, 2153-2163

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R (1993): The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-1038

Friedenreich CM (2001): Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 287-301

Fronsdal K, Engedal N, Slagsvold T, Saatcioglu F (1998): CREB binding protein is a coactivator for the androgen receptor and mediates cross-talk with AP-1. *J Biol Chem* 273, 31853-31859

Fuchs R, Guggenberger D, Neumann U, Trautwein C: *Kolorektale Karzinome / Kolonkarzinom / Rektumkarzinom*. In: *GI-Tumore 2011/2012*. 13; hrsg. Nora-Verlag, Stolberg 2011

Ghadimi B, Becker H: *Chirurgische Onkologie*. In: Becker H, Enke A, Röher H-D (Hrsg.): *Viszeralchirurgie*. Elsevier, Urban und Fischer, München Jena 2006

Gorsch SM, Wachsmuth M, Toth KF, Lichter P, Rippe K (2005): Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J Cell Sci* 118, 5825-5834

Goss KH, Groden J (2000): Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 18, 1967-1979

Goulding H, Pinder S, Cannon P, Pearson D, Nicholson R, Snead D, Bell J, Elston CW, Robertson JF, Blamey RW, et al. (1995): A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Hum Pathol* 26, 291-294

Grady WM: *Colorectal Cancer: Molecular Biology and Genetics*. In: Kelsen D, Daly J, Kern S, Levin B, Tepper J (Hrsg.): *Gastrointestinal oncology: principles and practice*. 2. Auflage. Auflage; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2008

Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J, Markowitz S (1998): Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 58, 3101-3104

Gu W, Shi XL, Roeder RG (1997): Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 387, 819-823

Hamilton W, Sharp D (2004): Diagnosis of colorectal cancer in primary care: the evidence base for guidelines. *Fam Pract* 21, 99-106

Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, Kurokawa R, Brown M (1996): p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11540-11545

Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO (2006): Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 789-829

Henry RA, Kuo YM, Andrews AJ (2013): Differences in specificity and selectivity between CBP and p300 acetylation of histone H3 and H3/H4. *Biochemistry* 52, 5746-5759

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, et al. (1998): Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6870-6875

Issa JP (2004): CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 988-993

Janknecht R, Nordheim A (1996): MAP kinase-dependent transcriptional coactivation by Elk-1 and its cofactor CBP. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 831-837

Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomaki P, De La Chapelle A, Mecklin JP (2000): Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 118, 829-834

Jenuwein T, Allis CD (2001): Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, et al.: Krebs in Deutschland 2007/2008. hrsg. v.: Koch-Institut R. 2012

Kalkhoven E (2004): CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* 68, 1145-1155

Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L (1998): Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* 17, 6573-6586

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R (1997): Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57, 808-811

Kasper LH, Fukuyama T, Biesen MA, Boussouar F, Tong C, de Pauw A, Murray PJ, van Deursen JM, Brindle PK (2006): Conditional knockout mice reveal distinct functions for the global transcriptional coactivators CBP and p300 in T-cell development. *Mol Cell Biol* 26, 789-809

Kastrinos F, Syngal S (2007): Recently identified colon cancer predispositions: MYH and MSH6 mutations. *Semin Oncol* 34, 418-424

Kinzler W, Vogelstein B: Colorectal Tumors. In: Vogelstein B, Kinzler A, Kenneth W (Hrsg.): *The Genetic Basis of Human Cancer*. 2. Auflage; Mcgraw-Hill Professional, New York 2002

Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M (1998): Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J* 17, 2994-3004

Kondo Y, Issa JP (2004): Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 29-39

Kouzarides T (2007): Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705

Kurreck J (2009): RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 1378-1398

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, et al. (1993): Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215-1225

Leary RJ, Lin JC, Cummins J, Boca S, Wood LD, Parsons DW, Jones S, Sjoblom T, Park BH, Parsons R, et al. (2008): Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16224-16229

Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR (2005): Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* 26, 147-170

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997): Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-627

Liersch T, Becker H, Langer C (2007): Rektumkarzinom Allgemein- und Viszeralchirurgie up2date, 41-69

Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM (1997): Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 387, 823-827

Lin CH, Hare BJ, Wagner G, Harrison SC, Maniatis T, Fraenkel E (2001): A small domain of CBP/p300 binds diverse proteins: solution structure and functional studies. *Mol Cell* 8, 581-590

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441

Liu X, Wang L, Zhao K, Thompson PR, Hwang Y, Marmorstein R, Cole PA (2008): The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature* 451, 846-850

Luger K (2003): Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev* 13, 127-135

Lynch HT, de la Chapelle A (2003): Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348, 919-932

Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T (2008): Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 7, 27-39

Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, et al. (2005): Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell* 20, 199-211

Makinen MJ (2007): Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* 50, 131-150

Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM, Williams RL (2007): Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* 317, 239-242

Moon RT (2005): Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* 2005, cm1

Naar AM, Lemon BD, Tjian R (2001): Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* 70, 475-501

Nasrin N, Ogg S, Cahill CM, Biggs W, Nui S, Dore J, Calvo D, Shi Y, Ruvkun G, Alexander-Bridges MC (2000): DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10412-10417

Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, et al. (2006): Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20, 966-976

Nelson CJ, Santos-Rosa H, Kouzarides T (2006): Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* 126, 905-916

Ogiwara H, Sasaki M, Mitachi T, Oike T, Higuchi S, Tominaga Y, Kohno T (2016): Targeting p300 Addiction in CBP-Deficient Cancers Causes Synthetic Lethality by Apoptotic Cell Death due to Abrogation of MYC Expression. *Cancer Discov* 6, 430-445

Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996): The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959

Pao GM, Janknecht R, Ruffner H, Hunter T, Verma IM (2000): CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1020-1025

Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. (1994): Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263, 1625-1629

Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy MR (1996): Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16, 694-703

Pez F, Lopez A, Kim M, Wands JR, Caron de Fromentel C, Merle P (2013): Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol* 59, 1107-1117

Pox SA, S. Bischoff, U. Graeven, M. Hass, P. Heußner, W. Hohenberger,, A. Holstege JH, F. Kolligs, M. Kreis, P. Lux, J. Ockenga, R. Porschen, S. Post,, N. Rahner AR-S, J.F. Riemann, R. Sauer, A. Sieg, W. Scheppach,, W. Schmitt H-JS, K. Schulmann, A. Tannapfel, W. Schmiegel (2014): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Leitlinien der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.)

Ptashne M, Gann A (1997): Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386, 569-577

R Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing. 3.1.2; hrsg. <http://www.R-project.org/> 2013

Ragvin A, Valvatne H, Erdal S, Arskog V, Tufteland KR, Breen K, AM OY, Eberharter A, Gibson TJ, Becker PB, et al. (2004): Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300. *J Mol Biol* 337, 773-788

Robert-Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2011/2012. hrsg. 2015

Robert-Koch-Institut: Epidemiologie von Krebserkrankungen – Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. hrsg. 2016

Robert C, Nagaria PK, Pawar N, Adewuyi A, Gojo I, Meyers DJ, Cole PA, Rassool FV (2016): Histone deacetylase inhibitors decrease NHEJ both by acetylation of repair factors and trapping of PARP1 at DNA double-strand breaks in chromatin. *Leuk Res* 45, 14-23

Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD (2007): Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 983-994

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, et al. (2004): High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554

Schiltz RL, Mizzen CA, Vassilev A, Cook RG, Allis CD, Nakatani Y (1999): Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* 274, 1189-1192

Schulmann K, Schmiegel W: Kolorektales Karzinom. In: Ganten, D., Ruckpaul, K. Hahn, S., Schmiegel, W. (Hrsg.): Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen. 1. Auflage. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2002

Selvi BR, Cassel JC, Kundu TK, Boutillier AL (2010): Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1799, 840-853

Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, et al. (2006): ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96-99

Shiama N (1997): The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol* 7, 230-236

Siomi H, Siomi MC (2009): On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457, 396-404

So CW, Cleary ML (2002): MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. *Mol Cell Biol* 22, 6542-6552

So CW, Cleary ML (2003): Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. *Blood* 101, 633-639

Sterner DE, Berger SL (2000): Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459

Storch M: Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors Her2/neu in Rektumkarzinomen des lokal fortgeschrittenen Stadiums UICC II / III - Validierung an Patienten der Phase-III-Studien der German Rectal Cancer Study Group. 2016

Teo JL, Kahn M (2010): The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1149-1155

Teufel DP, Freund SM, Bycroft M, Fersht AR (2007): Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7009-7014

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 816-819

Thomas MC, Chiang CM (2006): The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 105-178

Vakoc CR, Mandat SA, Olenchock BA, Blobel GA (2005): Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* 19, 381-391

Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R, Reinberg D (2006): SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* 20, 1256-1261

Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL (2008): The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7, 979-987

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, et al. (1998): Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8698-8702

Vervoorts J, Luscher-Firzlaff JM, Rottmann S, Lilischkis R, Walsemann G, Dohmann K, Austen M, Luscher B (2003): Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4, 484-490

Wang F, Marshall CB, Ikura M (2013): Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell Mol Life Sci* 70, 3989-4008

Wang F, Marshall CB, Yamamoto K, Li GY, Gasmi-Seabrook GM, Okada H, Mak TW, Ikura M (2012): Structures of KIX domain of CBP in complex with two FOXO3a transactivation domains reveal promiscuity and plasticity in coactivator recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6078-6083

Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y (2006): Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* 22, 383-394

Wang L, Tang Y, Cole PA, Marmorstein R (2008): Structure and chemistry of the p300/CBP and Rtt109 histone acetyltransferases: implications for histone acetyltransferase evolution and function. *Curr Opin Struct Biol* 18, 741-747

Wittekind C, Meyer HJ: TNM-Klassifikation Maligner Tumoren. 7. Auflage. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2010

Yamamoto H, Imai K, Perucho M (2002): Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *J Gastroenterol* 37, 153-163

Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE, Jr. (1996): Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15092-15096

Zhao Y, Masiello D, McMillian M, Nguyen C, Wu Y, Melendez E, Smbatyan G, Kida A, He Y, Teo JL, et al. (2015): CBP/catenin antagonist safely eliminates drug-resistant leukemia-initiating cells. *Oncogene*

## 7 Anhang

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Verbrauchsmaterialien

0,2µm Filter, Rotilabo R-Spritzenfilter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
4-12% NuPAGE Bis-Tris Gele 1.0mm	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Auslaufpipetten, serologisch	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Einfrierröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Einmalreagenzreservoirs, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier, Chromatography Paper 3MM Chr.	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Amersham, United Kingdom
Flüssigkeitsreservoirs, Rotilabo® PVC	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glasobjektträger	Engelbrecht, Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Mini Trans-Blot Filter Papier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Petrischalen (P10, P15)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze (10 ml), für Multipette® Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, Safe Seal-Tips® professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One®	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Platten, 6-Well, Cyto One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Platten, 96-Well, Cyto One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland

Reagiergefäße Biosphere® Safe Seal (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, Falcon Tube (15 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Transfermembran, Immobilon®-P Membran, Polyvinylidenfluorid (PVDF), Filterporengröße 0,45 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen Cyto One® (25, 75 und 225 cm <sup>2</sup> )	STARLAB GmbH, Hamburg Deutschland
Zellschaber, 300 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellspachtel, 195 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 7.1.2 Geräte

Autoklav, HST 32/25	Zirbus technology GmbH, Bad Grund/Harz, Deutschland
Bestrahlungsgerät, Xstrahl RS225 X-Ray irradiator	Gulmay Medical Ltd., Camberley (Surrey), United Kingdom
Charge-coupled device (CCD) Kamera, ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden
Freezing Container, 5100 Cryo 1 °C, „Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gelelektrophoresekammer, Minigel-Twin	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Glasplatte, ausgeschnitten, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Glasplatte, fixe Spacer, 1,0 mm, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Heißluftsterilisator, Heraeus ST6060	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Inkubator CO2, Incubator C200	Labotect GmbH, Göttingen, Deutschland
Inkubator, Water-Jacketed Incubator 3250	Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA
Kämme (10- und 16-zähnig), für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Membranpumpe, Miniport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Mikroskop, invers, Leica DM IL	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop, Leica S6 E	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera, High-speed Leica EC3	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Mini Trans-Blot-Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Multilabel Plate Reader, Victor™ X4	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Netzgerät, PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Netzgerät, Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
pH-Meter, PB-11	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Pipette, elektrisch, 8-Kanal Research pro 50-1200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette, Multipipette® Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer, accu-jet®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Präzisionswaage, BP 610	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage, ED224S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schlittenmikrotom, Microm HM 430	MICROM International, Walldorf, Deutschland
Schüttler, MS 3 digital	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Silikonabdichtung, 1,0 mm, für Minigel	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Spektrophotometer NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sterilbank, SterilGARD Hood Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transfektionsgerät, Nucleofector™ 2b Device	Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 3100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vortexer, IKA® MS1 Shaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad, GFL 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Water Purification System, Milli-Q Reference Ultrapure	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Wippschüttler, WS42	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg/ Versbach, Deutschland
Zählkammer, Neubauer improved	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge, Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge, Heraeus Labofuge 400 R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge, Mini, Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### 7.1.3 Chemikalien

1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

	Deutschland
Brilliant Blau R250 Tabletten	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100 % Ph. Eur., reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, ROTIPURAN® ≥99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 M, pH = 8,0	Quality Biological Inc., Gaithersburg, MD, USA
Glyzin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hämalaun, Mayers	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hexadimethrine bromide (Polybrene)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luminata™ Forte, Western horse raddish peroxidase (HRP) Substrate	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Marker, Magic Mark™ XP Western Standard	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Marker, Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Methanol, ROTIPURAN® ≥99,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver Blotting grade, pulver, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) ≥99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10 % für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nonidet® P40 (NP40)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tabletten, PhosSTOP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Protease-Inhibitor Cocktail, Protease Block™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Roti® - Quant 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl) 5 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

#### 7.1.4 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphat buffered saline) (10x)	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14, 2g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	17, 8g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,7 g
	H <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
WB-Transferpuffer (10x)	Glycin	29,3 g
	Tris base	58,1 g
	SDS	3,7 g
	H <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

#### 7.1.5 Zellkultur und Bakterienkultur

0,25 % Trypsin -EDTA (1x)	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Bad Stabil Konzentrat	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetal Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamine 200 mM in 0,85 % NaCl Solution	Boehringer Ingelheim GmbH & Co.KG, Ingelheim, Deutschland
Nährmedium, (1:1) Dulbecco's Modified	Gibco® by life technologies™, Carlsbad,

Eagle Medium: F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12)	CA, USA
Nährmedium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Nährmedium, Leibovitz's L-15 Medium	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Nährmedium, McCoy's 5A	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Nährmedium, RPMI-1640 Medium	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,2	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Puromycin-Dihydrochlorid	life technologies™, Carlsbad, CA, USA
TransIT®-293 Transfection Reagent	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA 0.05%	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA

### 7.1.6 Zelllinien

HEK-293T	Embryonale Nierenzellen	American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, USA
HT29	Adenokarzinom des Colons	American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, USA
PC-3	Adenokarzinom der Prostata	American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, USA
SW480	Adenokarzinom des Colons	American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, USA
SW620	Lymphknotenmetastase eines Colorektalen Karzinoms	American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, USA
SW837	Adenokarzinom des Rektums	American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, USA

### 7.1.7 Kits

Fast Red Kit	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA
Lonza Amaxa Cell line Nucleofector Kit V	Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland

### 7.1.8 Vektoren

Helper Vector pHDM-Hg-PM2	Yang Shi Lab, Harvard University, Boston, USA
Helper Vector pHDM-tat1b	Yang Shi Lab, Harvard University, Boston, USA
Helper Vector pHDM-VSVG	Yang Shi Lab, Harvard University, Boston, USA
Helper Vector pRC-CMV-Rall	Yang Shi Lab, Harvard University, Boston, USA
TRC Lentiviral pLKO.1 Empty Vector Control	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK

### 7.1.9 shRNAs

TRC Human PAG1 shRNA antiCBP #69 - Clone ID: TRCN0000123269	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK
TRC Human PAG1 shRNA antiCBP #70 - Clone ID: TRCN0000123270	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK
TRC Human PAG1 shRNA antiCBP #71 - Clone ID: TRCN0000123271	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK
TRC Human PAG1 shRNA antiCBP #72 - Clone ID: TRCN0000123272	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK
TRC Human PAG1 shRNA antiCBP #73 - Clone ID: TRCN0000123273	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK
TRC Lentiviral eGFP shRNA positive control	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK

**7.1.10 siRNAs**

siAllStarsNEG	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Hs_CREBBP_2 FlexiTube siRNA (#2)	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Hs_CREBBP_6 FlexiTube siRNA (#6)	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Hs_CREBBP_7 FlexiTube siRNA (#7)	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Hs_CREBBP_8 FlexiTube siRNA (#8)	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland

**7.1.11 Antikörper**

Antikörper	Ursprung	Katalog-nummer	Hersteller
Polyclonal Antibody to Mouse IgG (H&L) - HRP	Kaninchen	R1253HRP	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
Polyclonal Antibody to Rabbit IgG (H&L) - HRP	Ziege	R1364HRP	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
Anti-CBP (WB)	Kaninchen	ab2832	Abcam, Cambridge, MA, USA
Anti-CBP (IHC)	Kaninchen	IHC-00023	Bethyl Laboratories Inc., TX, 77356
Anti-active- $\beta$ -Catenin	Maus	05-665	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Anti- $\beta$ -Catenin (Carboxy-Terminal Antigen)	Kaninchen	#9587	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti-c-Myc	Kaninchen	#5605S	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti-c-jun	Kaninchen	#9165	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti-p21	Maus	#OP64	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Anti-p53	HRP-Konj.	SC126HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
Anti-H3	Kaninchen	ab1791	Abcam, Cambridge, USA

**7.1.12 Programme**

Adobe Acrobat XI Pro	Adobe, San Jose, CA, USA
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, NY, USA
KaleidaGraph V.4.1.0	Synergy Software, Reading, PA, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Program R V. 3.1.2	R Foundation, Wien, Österreich