

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

REGULATION UND FUNKTION DES ONKOGENS *MYC* DURCH DIE NICHT-STEROIDALEN
ANTIRHEUMATIKA DICLOFENAC UND DIFLUNISAL

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
SABINE EINHELL

2014

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

REGULATION UND FUNKTION DES ONKOGENS *MYC* DURCH DIE NICHT-STEROIDALEN
ANTIRHEUMATIKA DICLOFENAC UND DIFLUNISAL

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
SABINE EINHELL

2014

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

PLoS One 2013 Jul 9; 8(7)

New aspects of an old drug – diclofenac targets MYC and glucose metabolism in tumor cells

Gottfried E, Lang SA, Renner K, Bosserhoff A, Gronwald W, Rehli M, Einhell S, Gedig I, Singer K, Seilbeck A, Mackensen A, Grauer O, Hau P, Dettmer K, Andreesen R, Oefner PJ, Kreutz M

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Marina Kreutz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Peter Hau
Tag der mündlichen Prüfung:	19. März 2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Tumormetabolismus.....	1
1.1.1. Glukosestoffwechsel	1
1.1.2. Weitere metabolische Veränderungen in Tumorzellen.....	2
1.2. Das Onkogen <i>MYC</i> als Regulator zentraler Zellmechanismen	3
1.2.1. Das Gen <i>MYC</i>	3
1.2.2. Das Protein <i>MYC</i> und seine Aufgaben.....	4
1.2.3. <i>MYC</i> als Regulator von Zellproliferation und Zelldifferenzierung.....	5
1.2.4. <i>MYC</i> als Regulator der Apoptose.....	6
1.2.5. <i>MYC</i> als zentraler Regulator des Zellstoffwechsels	6
1.3. Der Tumorstoffwechsel als therapeutisches Target	8
1.3.1. Therapieansätze	8
1.3.2. Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAIDs)	9
2. Zielsetzung.....	11
3. Material	12
3.1. Geräte	12
3.2. Verbrauchsmaterialien	12
3.3. Chemikalien, Kits, Reagenzien	13
3.4. Medien und Zusätze.....	14
3.5. Vektoren.....	14
3.6. Antikörper.....	16
3.7. Bakterienstämme	16
3.8. Tumorzelllinien.....	16
3.9. Datenbanken und Software.....	17
4. Methoden	18
4.1. Zellbiologische Methoden	18
4.1.1. Kultur und Passage von Zelllinien	18
4.1.2. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	18

4.1.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	19
4.2.	Molekularbiologische Methoden.....	19
4.2.1.	Anzucht und Kultivierung von Bakterien.....	19
4.2.2.	Transformation von <i>E. coli</i>	20
4.2.3.	Glycerin-Stock.....	20
4.2.4.	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
4.2.5.	Restriktionsverdau	21
4.2.6.	Agarosegelelektrophorese	21
4.2.7.	Aufreinigung von DNA per Gelextraktion	22
4.2.8.	Ligation	22
4.2.9.	Klonierung der Reporterkonstrukte zur Analyse der Promotoraktivität von <i>MYC</i>	22
4.2.10.	Transiente Transfektion	24
4.2.11.	Bestimmung der Luziferaseaktivität	25
4.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	25
4.3.1.	Proteinlysate für Western-Blot-Analysen.....	26
4.3.2.	SDS-Gelelektrophorese	26
4.3.3.	Western-Blot	28
4.4.	Durchflusszytometrische Methoden	29
4.4.1.	Intrazelluläre Messung der Expression von <i>MYC</i>	29
4.4.2.	Bestimmung von Apoptose	30
5.	Ergebnisse	31
5.1.	Regulation der <i>MYC</i> -Expression durch NSAIDs auf Protein-Ebene.....	31
5.1.1.	Effekt von NSAIDs auf die Expression von <i>MYC</i> in der Melanomzelllinie Mellm	31
5.1.2.	Effekt von NSAIDs auf die Expression von <i>MYC</i> in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 ..	33
5.1.3.	Effekt von NSAIDs auf die Expression von <i>MYC</i> in der Histozytomzelllinie U937	34
5.1.4.	Effekt von NSAIDs auf die Expression von <i>MYC</i> in den Jurkat Leukämiezellen	35
5.1.5.	Effekt von α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure auf die Expression von <i>MYC</i> in der Melanomzelllinie Mellm	36
5.2.	Analyse von <i>MYC</i> mittels Durchflusszytometrie	38
5.3.	Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Promotoraktivität von <i>MYC</i>	39
5.3.1.	Reporterkonstrukte zur Analyse der Promotoraktivität von <i>MYC</i>	39
5.4.	Apoptoseinduktion durch nicht-steroidale Antirheumatika (NSAIDs).....	43
5.4.1.	Veränderung der Apoptose in der Melanomzelllinie Mellm durch NSAIDs.....	43
5.4.2.	Veränderung der Apoptose in der Histozytomzelllinie U937 durch NSAIDs.....	45

6.	Diskussion.....	50
6.1.	Regulation von MYC durch NSAIDs.....	51
6.2.	Apoptoseinduktion durch Diclofenac und Diflunisal.....	52
7.	Zusammenfassung.....	55
8.	Summary.....	57
9.	Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glukosemetabolismus in normalen Zellen und Tumorzellen	2
Abbildung 2: Das Proto-Onkogen <i>MYC</i>	4
Abbildung 3: Das Protein <i>MYC</i>	5
Abbildung 4: Einfluss von <i>MYC</i> auf den Glukose- und Glutaminstoffwechsel.....	7
Abbildung 5: Angriffspunkte für Medikamente im Tumorstoffwechsel.....	8
Abbildung 6: Der Vektor pCR-TOPO.....	14
Abbildung 7: Die Vektoren pGL4.10 und pGL4.11	15
Abbildung 8: Der Vektor pRL-TK	15
Abbildung 9: Promotorregion des Proto-Onkogens <i>MYC</i>	23
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte	24
Abbildung 11: Regulation von <i>MYC</i> auf Proteinebene durch NSAIDs in Mellm	32
Abbildung 12: Kinetik von <i>MYC</i> unter dem Einfluss von Diclofenac in Mellm	32
Abbildung 13: STAT3 Expression unter dem Einfluss von Diclofenac in Mellm.....	33
Abbildung 14: Regulation von <i>MYC</i> auf Proteinebene durch NSAIDs in PC3.....	33
Abbildung 15: Regulation von <i>MYC</i> auf Proteinebene durch NSAIDs in U937	34
Abbildung 16: Kinetik von <i>MYC</i> unter dem Einfluss Diclofenac in U937	34
Abbildung 17: Reaktion von STAT3 auf Proteinebene durch NSAIDs in U937	35
Abbildung 18: Regulation von <i>MYC</i> auf Proteinebene durch Diclofenac in Jurkat.....	35
Abbildung 19: Regulation von <i>MYC</i> auf Proteinebene durch α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CINN) in der Melanomzelllinie Mellm.....	37
Abbildung 20: Intrazelluläre Färbung von <i>MYC</i> in Mellm, U937 und Monozyten	38
Abbildung 21: Aufbau des Promotortests.....	40
Abbildung 22: Einfluss von Diclofenac auf die Aktivität verschiedener Promotorkonstrukte im Luziferaseassay	41
Abbildung 23: Fehlender Einfluss von Diflunisal auf die Aktivität verschiedener Promotorkonstrukte im Luziferaseassay	42
Abbildung 24: Einfluss von Diclofenac auf die Vitalität der Melanomzelllinie Mellm.....	44
Abbildung 25: Einfluss von Diflunisal auf die Vitalität der Melanomzelllinie Mellm.....	44
Abbildung 26: Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Vitalität der Melanomzelllinie Mellm	45
Abbildung 27: Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Histozytomzelllinie U937	46
Abbildung 28: Einfluss von Diclofenac auf die Vitalität der Histozytomzelllinie U937	47

Abbildung 29: Einfluss von Diflunisal auf die Vitalität der Histozytomzelllinie U937	48
Abbildung 30: Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Vitalität der Histozytomzelllinie U937.....	49
Abbildung 31: Vergleich der Einzel- und Kombinationsanwendung von Diclofenac und Diflunisal auf die Vitalität der Histozytomzelllinie U937.....	49
Abbildung 32: Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf verschiedene Tumorzelllinien.....	54

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumpersulfat-Lösung
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
CINN	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometer)
H	Stunden
HIF	Hypoxia-inducible Factor
MCS	Multiple Cloning Site
MCT	Monocarboxylat-Transporter
Min	Minuten
NSAID	non steroidal anti-inflammatory drugs (Nicht-steroidale Antirheumatika)
NTP	Nukleosidtriphosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

Rpm	Revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
UTR	Untranslated Region (untranslatierter Bereich)

1. Einleitung

1.1. Tumormetabolismus

Hanahan und Weinberg beschrieben im Jahr 2000 die wichtigsten Kennzeichen von Krebs als sogenannte „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan, et al., 2000). Die Liste wurde 2011 unter anderem durch das Charakteristikum des „deregulierten Energiemetabolismus“ ergänzt (Hanahan, et al., 2011). Der gegenüber normalen Zellen veränderte Zellmetabolismus gibt dem Tumor die Möglichkeit, sich an geänderte Bedingungen und veränderten Nährstoffbedarf anzupassen, um die für Proliferation und Überleben nötigen Bausteine und Energie zur Verfügung zu haben (Vander Heiden, et al., 2009).

1.1.1. Glukosestoffwechsel

Glukose stellt einen der Hauptnährstoffe von Zellen dar, um deren Bedarf an Kohlenstoff und Reduktionsäquivalenten zu decken, welche für die Makromolekülsynthese benötigt werden (Vander Heiden, et al., 2009). Bei nicht-proliferierenden Zellen findet sich ein vorwiegend kataboler Metabolismus von Glukose. Diese wird dem Citratzyklus über Pyruvat zugeführt, wobei es zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten kommt, die in der mitochondrialen, oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Gewinnung genutzt werden (Lodish, et al., 2001).

Bei stark proliferierenden Zellen, wie Tumorzellen, erfolgt eine Umschaltung des Glukosemetabolismus mit verstärkter Verstoffwechselung von Glukose über Pyruvat zu Laktat (Levine, et al., 2010). Otto Warburg entdeckte bereits in den 1930er Jahren, dass Tumore hohe Mengen an Laktat freisetzen, was als „Warburg-Effekt“ bekannt ist. Die „Warburg-Hypothese“ besagt, dass in Tumorzellen die Energiegewinnung primär durch Umwandlung von Glukose zu Laktat erreicht wird. Otto Warburg erklärte dies mit einer gestörten Funktion der Mitochondrien, was für ihn die grundlegende Ursache von Krebs darstellte (Warburg, 1956). Da diese Verstoffwechselung in Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt, wird sie auch „aerobe Glykolyse“ genannt (Levine, et al., 2010). Das entstandene Laktat wird im Kotransport mit Protonen (H^+) durch Monocarboxylat-Transporter (MCT) aus der Zelle ausgeschleust, wodurch der pH-Wert im Tumormilieu sinkt (Abbildung 1). Inzwischen ist auch gezeigt, dass die Laktatakkumulation und Ansäuerung mit der Metastasierung korreliert und das Überleben der Patienten beeinflusst (Walenta, et al., 2000; Gatenby, et al., 2004).

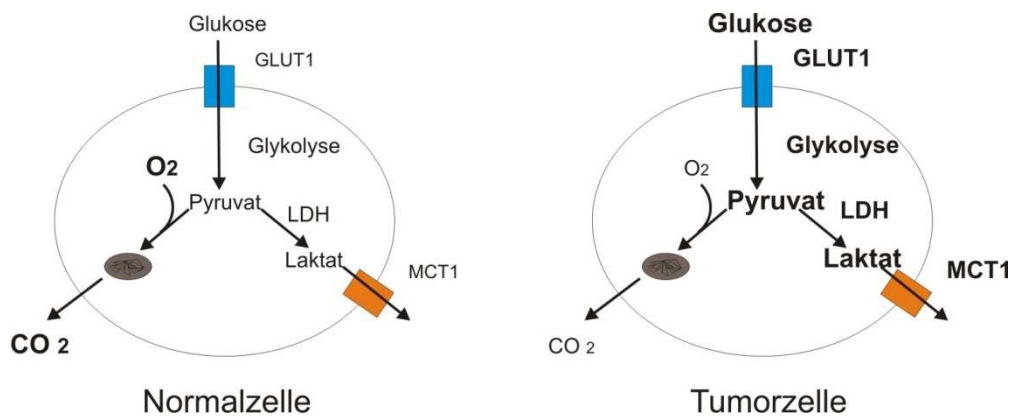


Abbildung 1: Glukosemetabolismus in normalen Zellen und Tumorzellen

Glukose wird über den Transporter GLUT1 aufgenommen und in der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. In normalen Zellen findet die Energiegewinnung in den Mitochondrien über die oxidative Phosphorylierung statt. In Tumorzellen hingegen erfolgt die Verstoffwechslung von Glukose und Energiegewinnung hauptsächlich über die Glykolyse, wobei das entstandene Laktat über den Monocarboxylat-Transporter MCT1 aus der Zelle geschleust wird.

1.1.2. Weitere metabolische Veränderungen in Tumorzellen

Neben dem Glukosestoffwechsel sind der Aminosäure- und Lipidstoffwechsel sowie die Nukleotidbiosynthese im Tumor verändert.

So ist einerseits der Verbrauch der Aminosäure Glutamin gesteigert. Glutamin wird in der Glutaminolyse zu Glutamat verstoffwechselt, in den Citratzyklus eingeschleust und letztendlich über Malat in Laktat umgewandelt (Mazurek, et al., 2003). Dies lässt sich an der Korrelation des Tumorwachstums und einer gesteigerten Glutamintransportrate (Bode, et al., 2002), wie auch an der Aktivität von Glutaminase, dem Enzym, das Glutamin in Glutamat umwandelt, feststellen (Linder-Horowitz, et al., 1969). Durch den gesteigerten Glutamin-Verbrauch kann zum einen NADPH mit Hilfe der Malatdehydrogenase gebildet werden (Vander Heiden, et al., 2009), zum anderen werden anaplerotische Funktionen erfüllt. Diese Befunde werden durch die Tatsache unterstützt, dass ein Mangel an Glutamin die Zellen sterben lässt (Zindy, et al., 1998). Neben dem Glutaminstoffwechsel ist auch der Stoffwechsel der Aminosäuren Tryptophan und Arginin im Tumor gesteigert, was sich in einer erhöhten Expression der beteiligten Enzyme wie der Indolamin-2,3-Dioxygenase zeigt (Uyttenhove, et al., 2003).

Des Weiteren zeigen sich in Tumorzellen Besonderheiten im Lipidstoffwechsel (DeBerardinis, et al., 2008). Hier ist insbesondere die erhöhte Expression der Cyclooxygenasen (COX-1 und -2) zu nennen, welche die Fettsäure Arachidonsäure in Prostaglandine (PG) und Thromboxane umwandeln. In Tumorzellen findet man eine Überexpression von COX-2, was auf eine eher schlechte Prognose hinweist, wie bei Untersuchungen von Brust- und Eierstockkrebs gezeigt werden konnte (Denker, et al.,

2004; Denkert, et al., 2006). Auch konnte festgestellt werden, dass PGE₂ die Zellproliferation stimuliert und die Apoptose in kolorektalen Tumoren supprimiert (Shen, et al., 1998).

1.2. Das Onkogen *MYC* als Regulator zentraler Zellmechanismen

Viele der Stoffwechselveränderungen werden in einem komplexen System über Onkogene und Tumorsuppressorgenen wie *p53*, *MYC* und *HIF* reguliert (Dang, et al., 2008). Die Überexpression von Onkogenen und der Verlust von Tumorsuppressorgenen sind mit der malignen Transformation assoziiert. Proto-Onkogene stellen an sich ungefährliche DNA-Abschnitte dar, die durch Mutation zu Onkogenen werden und auf diese Weise einen Beitrag zur Tumorentstehung leisten. Tumorsuppressorgene verhindern unter normalen Bedingungen die Zelltransformation, sodass der Verlust dieser ebenso zur Tumorigenese beiträgt (Buselmaier, et al., 2007).

MYC ist ein Onkogen, das in etwa 30% aller Tumoren durch Punktmutation, Genamplifikation, Translokation oder Überexpression dysreguliert vorliegt (Vita, et al., 2006). Als häufigste Ursache ist die Genamplifikation beschrieben, wie beispielsweise für das kleinzellige Lungenkarzinom und das maligne Melanom (Vita, et al., 2006). Beim Burkitt-Lymphom wurde Überexpression von *MYC* aufgrund von Mutationen oder Translokationen festgestellt, was zur Aktivierung von *MYC* führt (Vita, et al., 2006). Auch die Stabilisierung der mRNA oder des Proteins, sowie die Veränderung assoziierter Signalkaskaden können zur Entstehung eines Tumors beitragen (Pelengrais, et al., 2002).

1.2.1. Das Gen *MYC*

Das *MYC*-Gen (*MYC*) wurde ursprünglich 1978 als virales Onkogen (*v-MYC*) des MC29 Stammes des „avian leukemia virus (AVL)“ entdeckt. Dieses Virus bewirkt neben Karzinomen in Leber und Niere unter anderem die **Myelocymatose** in Vögeln (Sheiness, et al., 1979), von der der Name des Gens abgeleitet ist (Sheiness, et al., 1978). *C-MYC* wurde einige Jahre später als zelluläres Homolog („c“, cellular) aus dem Huhn isoliert (Vennstrom, et al., 1982). Auch in der Maus und im Menschen wurden die Gene charakterisiert (Dalla-Favera, et al., 1982). Pathologisch wird es oft mit hämatologischen Erkrankungen oder soliden Tumoren in Verbindung gebracht (Vita, et al., 2006). Außer *c-MYC* finden sich noch weitere vier Homologe, die wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind und somit zur *MYC*-Genfamilie zusammengefasst werden: *N-MYC* und *L-MYC* wurden anfangs im humanen Neuroblastom beziehungsweise im kleinzelligen Lungenkarzinom gefunden (Laurenti, et al., 2009). *S-* und *B-MYC*

finden sich in Nagern und wurden erst einige Jahre später als *c-MYC* isoliert (Sugiyama, et al., 1989; Cornwall, et al., 2001).

MYC ist auf Chromosom 8 lokalisiert und gliedert sich in drei Exons, wobei Exon 2 und Exon 3 den offenen Leserahmen für das Protein bilden. Das Gen besitzt mehrere Promotoren. Die Transkription startet vor allem vom zweiten der beiden Hauptpromotoren (P2) aus. Regulatorische Domänen finden sich in der 5' upstream-Region, in der 5' und 3' UTR sowie innerhalb von Intron I (Facchini, et al., 1998) (Abbildung 2).

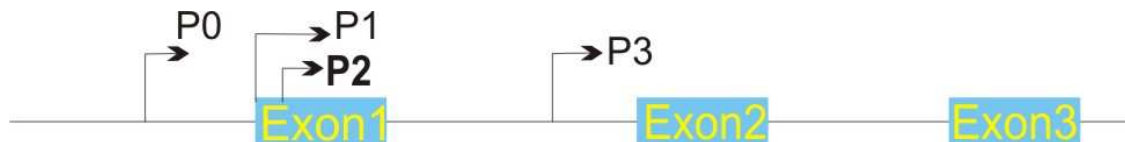


Abbildung 2: Das Proto-Onkogen *MYC*

Das Proto-Onkogen *MYC* liegt auf Chromosom 8 und besitzt drei Exons. Des Weiteren finden sich vier Promotoren, unter denen P2 den Hauptstartbereich darstellt.

1.2.2. Das Protein *MYC* und seine Aufgaben

MYC codiert für einen Transkriptionsfaktor mit 64 (MYC 2) beziehungsweise 67 kDa (MYC 1), der zelltypspezifisch unterschiedlich stark exprimiert wird. Das Protein wird grob in drei Bereiche unterteilt: Am C-terminalen Ende sitzt eine basische Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Domäne (bHLH-LZ) (Abbildung 3). Diese befähigt *MYC* zur Bindung mit *MAX* (MYC associated factor X), einem weiteren Transkriptionsfaktor, der ebenfalls ein bHLH-LZ-Motiv trägt. Nur durch Bildung dieses Heterodimers kann *MYC* seine Funktion in der Genregulation ausüben und an die entsprechenden Zielstrukturen binden. Ein Homodimer ist nicht möglich. Am N-Terminus findet sich eine Transaktivierungsdomäne (TAD) mit Glutamin- und Prolin-reichen Regionen, welche für die transkriptionelle Aktivierung essentiell ist. Des Weiteren finden sich vier konservierte Regionen (MYC boxes, MB). MB I liegt in der TAD und trägt zur Genaktivierung und zum Proteinabbau bei. MB II ist für den Hauptteil der Genaktivierungen verantwortlich. MB III ist für transkriptionelle Repression, Transformation und Apoptose von Bedeutung. MB IV moduliert zusätzlich zu Apoptose und Transformation die DNA-Bindung (Facchini, et al., 1998; Vita, et al., 2006). Neben der aktivierenden Funktion des Heterodimers *MYC/ MAX* kann in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor *MIZ1* auch eine reprimierende Funktion ausgeübt werden (Eiler, et al., 2008).

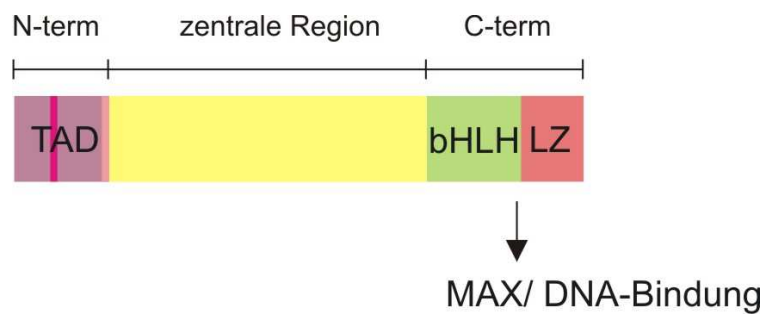


Abbildung 3: Das Protein MYC

C-terminal findet sich ein basisches Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH) und eine Leucin-Zipper-Domäne (LZ). Auf diese Weise wird die Dimerisierung mit dem MYC-associated factor X (MAX) ermöglicht, wodurch letztendlich die Bindung an die DNA erfolgen kann. Am N-terminalen Ende findet sich eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die gleichzeitig die beiden ersten MYC-Boxen enthält.

Mehr als 1500 Gene werden durch MYC über unterschiedliche Mechanismen reguliert (Cohen, et al., 2006). Es bestehen Interaktionen mit den RNA-Polymerasen I, II und III (Gomez-Roman, et al., 2003; Arabi, et al., 2005; Gomez-Roman, et al., 2006), sowie mit microRNAs (Lotterman, et al., 2008). Ebenso gibt es Hinweise, dass MYC seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor über Chromatin-Remodeling-Prozesse ausübt (Pelengrais, et al., 2002). Die aus MYC und MAX gebildeten Dimere erkennen dabei so genannte E-Box-Elemente, die die Kernerkennungssequenz CACGTG besitzen (Blackwood, et al., 1991).

1.2.3. MYC als Regulator von Zellproliferation und Zelldifferenzierung

Eine wesentliche Rolle kommt MYC bei der Zellzyklusregulation zu. Der Zellzyklus in Säugetierzellen stellt ein komplexes Zusammenspiel aus Wachstumsfaktor-regulierten cyclinabhängigen Kinasen (Cdks) und Cyclinen dar. Cycline besitzen die Fähigkeit, die Kinase-Funktion durch Komplexbildung zu aktivieren. Ihre Konzentration selbst ist dabei zyklusabhängig reguliert (Gillett, et al., 1998). Tumorzellen sind meist unabhängig vom Vorhandensein von Wachstumsfaktoren (Keath, et al., 1984).

Während in ruhenden Zellen kein MYC detektiert werden kann, steigt das MYC-Level bei Proliferation an und die Zellen treten in die G1-Phase des Zellzyklus ein (Amati, et al., 1998; Dang, 1999). Die Expression korreliert somit eng mit dem Proliferationspotential der Zellen (Facchini, et al., 1998). Das Cdk4-Gen und Cyclin-D-Gen sind dabei direkte Zielstrukturen von MYC. Das Ausschalten beider MYC-Allele in einer Fibroblastenzelllinie resultierte in einem Zyklusdefekt in G1 und einer folglich reduzierten Proliferationsrate (Mateyak, et al., 1997). Die Bildung von Cdk-Inhibitoren, welche den Zellzyklus unterbrechen würden, wird verhindert, indem entsprechende Transkriptionsfaktoren (z.B. MIZ1) aktiviert

werden (Pelengrais, et al., 2002). Ebenso wird das Zellwachstum selbst durch MYC reguliert (Schuhmacher, et al., 1999).

Da bei Anwesenheit von MYC stets die Proliferation gefördert wird, ist zu diesem Zeitpunkt keine terminale Differenzierung möglich. Erst die Anwesenheit von Differenzierungssignalen hemmt die Expression und ermöglicht somit den Ausstieg aus dem Zellzyklus. Dabei spielt im Gegensatz zur Proliferation nicht der Komplex aus MYC und MAX, sondern ein Komplex aus MAX und MAD, einem weiteren Transkriptionsfaktor mit bHLH/ LZ-Domäne, eine Rolle (Lüscher, 2001). Auch konnte durch Blockade der MYC-Aktivität durch antisense-Moleküle die Differenzierung verschiedener Zellen erreicht werden (Facchini, et al., 1998).

1.2.4. MYC als Regulator der Apoptose

Neben der Proliferation wird auch die Apoptose-Induktion durch MYC reguliert (Shi, et al., 1992; Fuhrmann, et al., 1999; Pelengrais, et al., 2002; Larsson, et al., 2010).

Apoptose kann über zwei Wege eingeleitet werden, erstens über externe Signale wie Todesrezeptoren (z.B. FAS/CD95) und zweitens über einen intrinsischen Weg, bei dem Proteine der BCL-2 Familie beteiligt sind. MYC sensibilisiert die Zelle für pro-apoptotische Signale, z.B. Hypoxie, DNA-Schäden oder Stimulation von FAS/CD95. In die Regulation ist beispielsweise der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 involviert, der die Expression von BAX, einem pro-apoptotischen Protein steigert und somit die Apoptose einleitet (Zindy, et al., 1998; Larsson, et al., 2010). Zum anderen reprimiert MYC die Expression von anti-apoptotischen Proteinen der BCL-2-Familie, die wiederum die Lokalisation des Cytochrom c - Komplexes kontrollieren (Eischen, et al., 2001). Über Bildung des Apoptosom wird schließlich die Aktivierung der Caspasen ausgelöst, die die Degradation von Zellkomponenten vornehmen (Ehlert, et al., 2001; Vermeulen, et al., 2005).

Für Apoptose und Proliferation werden dieselben Interaktionsregionen von MYC benutzt und auch die Bindung mit MAX ist wichtig (Evan, et al., 1992; Amati, et al., 1993). Entscheidend sind Wachstumsfaktoren, wie der Insulin Growth Factor oder der Platelet-derived Growth Factor (Harrington, et al., 1994), deren Vorhandensein die Proliferation ermöglichen. Ohne sie wird die Zelle apoptotisch (Fuhrmann, et al., 1999), wie anhand von Fibroblasten gezeigt werden konnte (Pelengrais, et al., 2002).

1.2.5. MYC als zentraler Regulator des Zellstoffwechsels

MYC spielt auch eine zentrale Rolle in der Regulation wichtiger Stoffwechselwege, wie dem Glukose- und dem Glutaminmetabolismus (Dang, et al., 2009). So steigert MYC die Expression des

Glukosetransporters GLUT-1, der Laktatdehydrogenase (LDHA), der Phosphofruktokinase und somit zentraler Enzyme und Transporter im Glukosestoffwechsel (Shim, et al., 1997; Dang, et al., 2008; Dang, et al., 2009). Daneben greift MYC in den Glutaminmetabolismus ein, indem es den Glutamintransporter SLC1A5 und die Glutaminase stimuliert und so den Glutaminmetabolismus steigert (Yuneva, et al., 2007; Wise, et al., 2008; Dang, et al., 2009) (Abbildung 4).

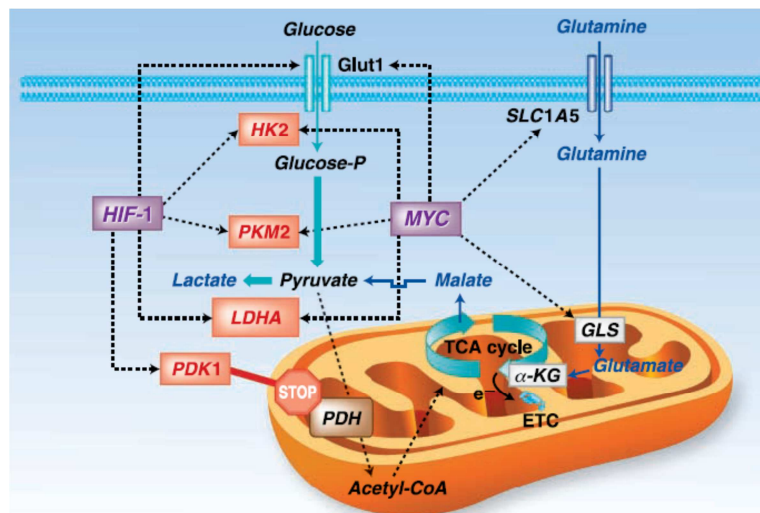


Abbildung 4: Einfluss von MYC auf den Glukose- und Glutaminstoffwechsel (Dang, et al., 2009)

Im Glukosestoffwechsel reguliert MYC den Glukosetransporter GLUT1, die Laktatdehydrogenase LDHA, die Phosphofruktokinase PKM2, die Hexokinase HK2, sowie die Pyruvatdehydrogenase PDK1. Außerdem stimuliert MYC den Glutaminmetabolismus durch Regulation des Transporters SLC1A5 sowie der Glutaminase GLS.

Unter hypoxischen Bedingungen ist das Zusammenspiel von MYC mit dem Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) 1 und 2 von großer Bedeutung. HIF besteht jeweils aus einer über Sauerstoff regulierten alpha-Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten beta-Untereinheit. Unter Normoxie wird HIF-alpha nach Prolyl-Hydroxylierung und Ubiquitylierung unter Beteiligung des Tumorsuppressorgens „Von Hippel-Lindau“ (VHL) abgebaut. Unter Hypoxie und bei Mutation von VHL ist dieser Mechanismus ausgesetzt und HIF-alpha akkumuliert. Durch Komplexbildung mit HIF-beta werden zahlreiche Gene, unter anderem im Metabolismus relevante Gene wie LDHA, eingeschaltet (Semenza, 2003).

Daneben beeinflusst MYC den Proteinstoffwechsel über RNA-Polymerasen (Gomez-Roman, et al., 2006), die Ribosomenbiogenese (Schlosser, et al., 2003; Grandori, et al., 2005) und Enzyme der Nukleotidsynthese (Bello-Fernandez, et al., 1993; Facchini, et al., 1998).

Weitere Analysen setzten an der Inhibition der Laktatdehydrogenase an. So konnte durch genetische Reduktion der LDHA mittels siRNA ein vermindertes Tumorwachstum erreicht werden (Le, et al., 2010). Den gleichen Effekt zeigte die Hemmung des für den Laktatexport verantwortlichen Transporters MCT (Monocarboxylat-Transporter) durch shRNA (Mathupala, et al., 2004).

Dichloracetat (DCA), welches die mitochondriale Pyruvatdehydrogenase hemmt, wird ebenfalls im Hinblick auf eine Tumorthherapie untersucht. Für die Substanz wurde gezeigt, dass sie den Metabolismus von Glykolyse in Richtung der Glukoseoxidation verschiebt, Apoptose induziert und auf diese Weise das Tumorwachstum inhibiert (Bonnet, et al., 2007).

Neben dem direkten Eingreifen an Transportern und Enzymen des Glukosestoffwechsels stellt MYC als Regulator des Glukosestoffwechsels eine attraktive Möglichkeit zur Therapie dar (Nesbit, et al., 1999; Dang, et al., 2006; Vita, et al., 2006). Allerdings sind nur wenige klinisch einsetzbare Substanzen zur MYC-Inhibition beschrieben. So ist gezeigt, dass das Glukokortikoid Dexamethason, das klinisch zur Immunsuppression eingesetzt wird, zur Repression von MYC *in vitro* führt (Ausserlechner, et al., 2004). Aufgrund der Nebenwirkungen dieses Medikaments beim Patienten ist sein Einsatz aber nur begrenzt möglich, sodass Alternativen zu suchen sind.

1.3.2. Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAIDs)

Bereits 1994 wurde berichtet, dass der Gebrauch von Aspirin mit einer verringerten Inzidenz von Kolon-, Brust- und Lungenkarzinomen einhergeht (Schreinemacher, et al., 1994). Behandlungen mit dem unspezifischen COX-Inhibitor Indomethacin verlängerten sogar das Überleben von Patienten mit Metastasen und erhöhten die Radiosensitivität von Tumoren (Lundholm, et al., 1994; Choy, et al., 2003). Mehrere epidemiologische Studien legen einen Zusammenhang von NSAIDs (non steroidal anti-inflammatory drugs) und der Verringerung des Tumorrisikos nahe (Elwood, et al., 2009).

NSAIDs stellen eine vielfältige Gruppe an klinisch häufig eingesetzten Medikamenten dar, zu denen unter anderen Acetylsalicylsäure (ASS), Diclofenac, Ibuprofen, Indomethacin und Naproxen zählen. Sie wirken analgetisch, antipyretisch, antiphlogistisch und hemmen die Blutgerinnung, womit ihre Indikation bei Schmerz, Fieber und akuten bzw. chronischen Entzündungen erklärt wird (Dellas, 2006). Auf molekularer Ebene hemmen NSAIDs die Cyclooxygenasen (COX) 1 und 2 und verhindern so die Bildung von Prostaglandinen und Thromboxan. COX-1 wird im Gewebe konstitutiv exprimiert, während COX-2 nur im Entzündungsgewebe induziert wird (Dellas, 2006; Trevor, et al., 2008).

Ein Zusammenhang von chronischer Entzündung und Tumorentwicklung wurde bereits von R. Virchow im Jahr 1863 beschrieben und wird nach wie vor als wichtige Komponente im Tumorgeschehen angesehen (Coussens, et al., 2002). Anti-tumorale Effekte von NSAIDs wurden bisher allerdings meist

auf COX-abhängige Effekte zurückgeführt. Wenige COX-unabhängige Effekte auf Tumorzellen sind ebenso beschrieben (Hanif, et al., 1996; Zhou, et al., 2010). So ist gezeigt, dass das NSAID Diclofenac, den Laktattransport in humanen Trophoblastenlinien und chinesischen Hamsteroarialzellen (CHO-Zellen) reduziert (Tamai, et al., 1995; Emoto, et al., 2002), was auf einen Einfluss von Diclofenac auf den Glukosestoffwechsel hindeutet. Aufbauend hierauf konnte unsere Arbeitsgruppe beschreiben, wie Diclofenac nicht nur die Proliferation von Tumorzellen *in vitro* und das Tumorwachstum *in vivo*, sondern auch den Glukosestoffwechsel der Zellen hemmt (Gottfried, et al., 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der NSAIDs Diclofenac und Diflunisal auf Expression und Funktion von MYC in Tumorzellen untersucht.

2. Zielsetzung

Tumorzellen zeigen einen gegenüber normalen Zellen deutlich veränderten Metabolismus. Dabei sind Änderungen im Aminosäure-, Lipidstoff- und Glukosestoffwechsel von großer Bedeutung für Proliferation und Progression. Beim Glukosestoffwechsel sind sie unter dem Synonym des „Warburg-Effekts“ bekannt, wobei es zur erhöhten Laktatproduktion von Tumorzellen kommt. Dieses Phänomen wird unter anderem durch die Aktivierung von Onkogenen und den Verlust von Tumorsuppressorgenen beeinflusst.

Das Onkogen *MYC* ist in 30% aller Tumore überexprimiert und entscheidend an Proliferation, Differenzierung und Zelltod beteiligt. Außerdem gilt es als zentraler Regulator des Glukose- und Glutaminmetabolismus und kontrolliert entsprechende Enzyme wie die Laktatdehydrogenase A. Aufgrund seiner zentralen Rolle in Tumorzellen stellt *MYC* somit einen aussichtsreichen Ansatzpunkt für eine spezifische Tumorthherapie dar.

Nachdem unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass das nicht-steroidale Antirheumatikum (NSAID) Diclofenac die Proliferation und Laktatproduktion von Tumorzellen inhibiert, sollte im Rahmen der Arbeit der Einfluss der NSAIDs Diclofenac und Diflunisal auf die Expression und Funktion von *MYC* in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht werden. Hierbei wurde einerseits die Wirkung von Diclofenac und Diflunisal auf die Expression von *MYC* auf Proteinebene betrachtet und andererseits die transkriptionelle Regulation mittels Reporterkonstrukten der Promotorregion von *MYC* analysiert. Als funktioneller Parameter sollte die Induktion von Apoptose nach Inkubation mit Diclofenac und Diflunisal untersucht werden.

3. Material

3.1. Geräte

	Firma, Ort
BD FACS	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese-Apparaturen	Biometra, Göttingen, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus, Hanau, Deutschland
Luminometer (Sirius)	Berthold Detect. Systems, Pforzheim, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
NanoDrop	Qubit, Erlangen, Deutschland
Neubauerzählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR-Thermocycler (PTC-200)	MJ-Research/ Biometra, Oldendorf, Deutschland
PCR-Thermocycler Veriti 384 well	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries Inc., New York, USA
Western-Blot-Kammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus/Eppendorf Hanau/Hamburg, Deutschland

3.2. Verbrauchsmaterialien

	Firma, Ort
FACS-Röhrchen (Polystyren)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Luminometerröhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Multiwell Zellkulturplatten und Röhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Flaschen	Costar, Cambridge, USA

3.3. Chemikalien, Kits, Reagenzien

	Firma, Ort
7-AAD	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim, Deutschland
Annexin V-FITC konjugiert	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Arginin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ASS	Fagron, Barsbüttel, Deutschland
DC Protein Assay	Biorad, München, Deutschland
Diclofenac	Fagron, Barsbüttel, Deutschland
Diflunisal	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNA Leiter 1 kb plus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs	NEB, Frankfurt, Deutschland
Dual-Luziferase Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
ECL Detektions-Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
FastStart Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Kaleidoscope pre-stained standard protein marker	Biorad, München, Deutschland
Lipofectamine™2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure/ Extract II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
OptiMEM	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Plasmid Midi-Kit/ Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gelextraktions-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quick Ligation-Kit	NEB, Frankfurt, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	NEB/ Roche, Frankfurt/ Mannheim, Deutschland
RIPA-Puffer	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution, 10x	Millipore, Eschborn, Deutschland
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, USA
TOPO TA Cloning-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Weitere Chemikalien wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Für alle Lösungen, Puffer und Reaktionsansätze wurde Millipore-gereinigtes, entionisiertes Wasser oder DEPC-behandeltes H₂O-USB der Firma Amersham (Braunschweig, Deutschland) verwendet.

3.4. Medien und Zusätze

	Firma, Ort
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640-Medium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein, Deutschland

3.5. Vektoren

pCR-TOPO diente als Klonierungsvektor. In ihn wurde das von genomischer DNA replizierte Fragment eingefügt. Dies geschah mit Hilfe der Topoisomerase I, die an den Vektor gebunden vorliegt. Anschließend ist es durch einen 3'-Überhang möglich, den Vektor direkt zu ligieren. Über Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzen erfolgte die Selektion.

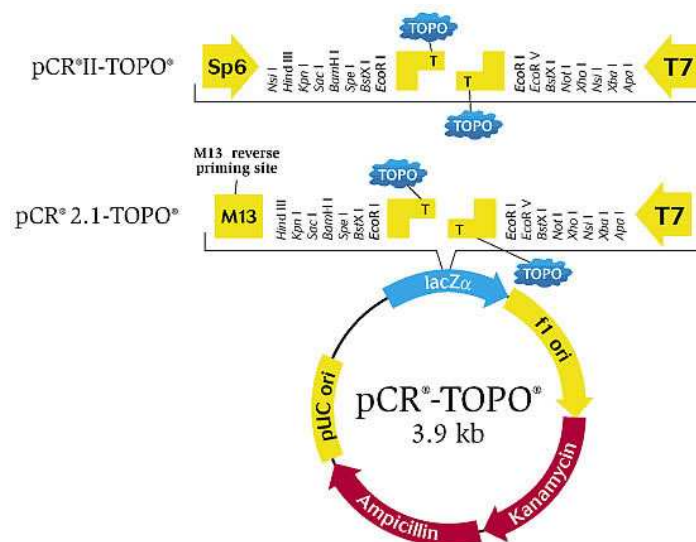


Abbildung 6: Der Vektor pCR-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

In den Vektor pCR-TOPO wurde das von genomischer DNA replizierte Fragment mit Hilfe der Topoisomerase I eingefügt, die kovalent an den Vektor gebunden ist. Aufgrund des 3'-Überhangs konnte das PCR-Produkt direkt ligiert werden. Die Selektion erfolgte über Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzen.

Die für die Promotoranalyse eingesetzten Vektoren pGL4.10 und pGL4.11 (Promega, Madison, USA) besitzen selbst keine Promotoren, sodass der zu untersuchende Promotor über die „multiple cloning

site“ (MCS) eingefügt werden kann. Dies ermöglicht das Ablesen des Luziferasereportergens *luc2*. Der Unterschied zwischen beiden Vektoren liegt in der Halbwertszeit der Luziferase - mRNA. Während *luc2* im Vektor pGL4.10 eine Halbwertszeit von drei Stunden besitzt, beträgt diese bei *luc2P* im Vektor pGL4.11 nur eine Stunde, wodurch eine Kurzzeitreaktion messbar ist.

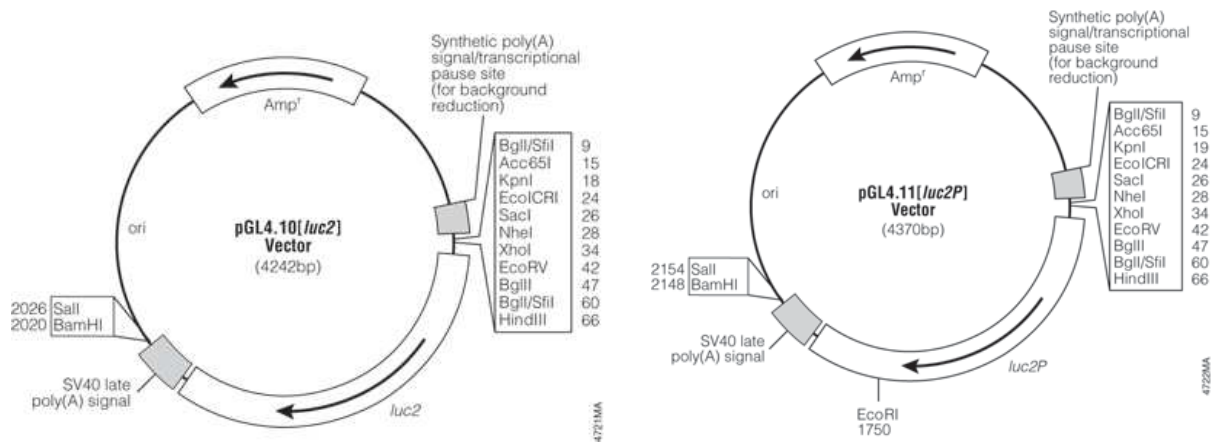


Abbildung 7: Die Vektoren pGL4.10 und pGL4.11 (Promega, Madison, USA)

Die Vektoren pGL4.10 und pGL4.11 wurden für die Promotoranalysen verwendet. Der Promotor von Interesse wurde über die „multiple cloning site“ eingefügt und ermöglichte auf diese Weise das Ablesen des Luziferasereportergens *luc2* beziehungsweise *luc2P*.

Der Vektor pRL-TK (Promega, Madison, USA) wurde als interne Kontrolle eingesetzt. Er besitzt einen HSV Thymidinkinase - Promotor, der vor einem Renilla Luziferase-Gen (*Rluc*) liegt und konstitutive Expression der Renilla-Luziferase ermöglicht.

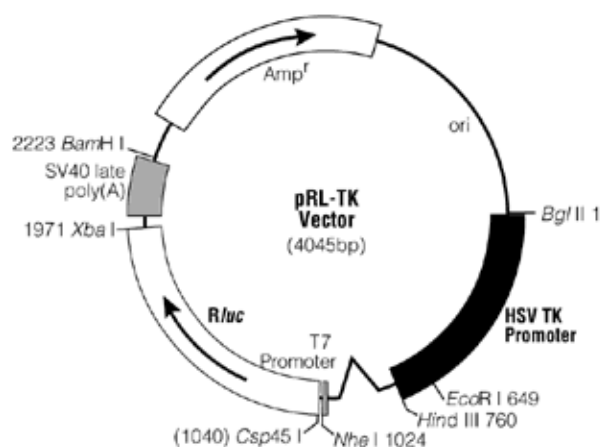


Abbildung 8: Der Vektor pRL-TK (Promega, Madison, USA)

Der Vektor pRL-TK ist ähnlich wie die beiden Vektoren pGL4.10 beziehungsweise pGL4.11 aufgebaut. Er trägt jedoch anstatt des Luziferasereportergens *luc2* ein Gen aus Renilla und besitzt einen Promotor aus der HSV Thymidinkinase. Er diente als interne Kontrolle und wurde mit den beiden genannten Vektoren kotransfiziert.

3.6. Antikörper

Western-Blot

Reaktivität	Isotyp	Herkunft	Verdünnung	Firma, Ort
anti- β -Aktin (Mensch)	IgG	Kaninchen	1:2000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
anti-IgG, HRP konj. (Maus)	IgG	Ziege	1:2500	Dako, Hamburg, Deutschland
anti-MYC (Mensch)	IgG	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK

Durchflusszytometrie

Reaktivität	Isotyp	Herkunft	Konzentration	Firma, Ort
MYC (9E10) (Mensch), Alexa Fluor 647 konjugiert	IgG	Maus	1 μ g/Mio. Zellen	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
p53 (1C12) (Mensch), Alexa Fluor 647 konjugiert	IgG	Maus	1 μ g/Mio. Zellen	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-IgG1, Alexa Fluor 647 konjugiert	IgG	Maus	1 μ g/Mio. Zellen	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

3.7. Bakterienstämme

DH 10B und TOP 10F

3.8. Tumorzelllinien

Zelllinie	Organismus	Gewebe	Tumortyp
Mellm	Homo sapiens	Haut	Melanom
PC3	Homo sapiens	Prostata	Prostatakarzinom
U937	Homo sapiens	Monozyt/Makrophage	Histiozytom
Jurkat	Homo sapiens	T-Lymphozyt	Leukämie

3.9. Datenbanken und Software

BLAT <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>

Ensembl Genome Browser <http://www.ensembl.org>

Generunner version 3.05

Microsoft Office 2003 <http://www.microsoft.com>

PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>

UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu>

4. Methoden

4.1. Zellbiologische Methoden

4.1.1. Kultur und Passage von Zelllinien

Die Tumorzellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ in folgendem Medium kultiviert:

RPMI 1640 Medium

10% FCS (Fetal Calf Serum)

2 mM L-Glutamin

100 µg/ ml Penicillin/ Streptomycin

Alle fünf bis sechs Tage wurden die Zellen passagiert und 1:10 in frisches Medium neu eingesät. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS konnten adhärenente Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin/ EDTA-Lösung und fünfminütiger Inkubation im Brutschrank vom Flaschenboden gelöst werden. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen in 9 ml Medium mit FCS aufgenommen und abzentrifugiert (300 x g, 8 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen 1x PBS resuspendiert und neu ausgesät.

Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mithilfe des MycoAlert® Mycoplasma Detection-Assay (Cambrex, Rockland, USA) getestet, um eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen. Verwendet wurden nur Mykoplasmen-negative Zellen.

4.1.2. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest. Mithilfe der Trypanblau-Lösung lassen sich lebende und tote Zellen unterscheiden, da tote Zellen aufgrund ihrer porösen Zellmembran Trypanblau einlagern und somit im Lichtmikroskop blau erscheinen, während lebende Zellen keine Farbänderung zeigen. Die Zellzahl wurde nach Auszählen mehrerer Großquadrate der Zählkammer im Phasenkontrastmikroskop nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = Z \cdot V \cdot 10^4$$

Z = Mittelwert der ungefärbten oder gefärbten Zellen pro Großquadrat

V = Verdünnungsfaktor der eingesetzten Lösung

4.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte in Kryoröhrchen. Dazu wurden 160 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) und 640 µl FCS (Fetal Calf Serum) vorgelegt und $2-3 \times 10^6$ Zellen in 800 µl Kulturmedium zugegeben. Um eine langsame Temperaturenniedrigung zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen in einem Isopropanol-gefüllten Kryobehälter über Nacht auf -80 °C aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zelllinien in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurde Medium in der Kulturflasche auf eine Temperatur von 37 °C gebracht. Der gesamte Inhalt des Kryoröhrchens wurde mit 10 ml RPMI-Medium in ein Falconröhrchen gegeben und zentrifugiert (1300 rpm, 7 min, 4 °C), um DMSO weitgehend zu verdünnen. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 1x PBS aufgenommen und in die Zellkulturflasche überführt. Vor Ansatz eines Experiments mussten die Zellen zumindest einmal passagiert werden, um noch vorhandene Rückstände an DMSO aus der Kultur zu entfernen.

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Anzucht und Kultivierung von Bakterien

Medien und Agar-Platten zur Anzucht und Kultur von Bakterien wurden folgendermaßen hergestellt:

LB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl

Mit H_2O ad 1000 ml auffüllen, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren. Lösung im Wasserbad auf ca. 50 °C abkühlen lassen, bevor Antibiotika zugegeben werden.

LB-Agar	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	15 g	Agar

Mit H_2O ad 1000 ml auffüllen und autoklavieren. Lösung im Wasserbad auf ca. 50 °C abkühlen lassen, bevor Antibiotika zugegeben werden. Anschließend in sterile Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern.

Zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurden diese auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien gepickt,

in LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler kultiviert. Zur Selektion wurde dem Medium und den Agar-Platten Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ ml zugefügt.

4.2.2. Transformation von *E. coli*

Um Plasmide zur Vermehrung in *E. coli* einzuschleusen, wurde eine Transformation durch Hitzeschock durchgeführt. Es wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, 5 µl Plasmid-DNA (1-25 ng) zugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch ein Wasserbad bei einer Temperatur von 42 °C für 90 s. Anschließend wurden die Zellen sofort für 60 s auf Eis überführt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (ohne Antibiotikum) wurde zur Ausbildung der Resistenz für 90 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 50-150 µl des Transfektionsansatzes wurden ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCL
	15 g	Agar

Mit H₂O ad 1000 ml auffüllen und autoklavieren. Lösung abkühlen lassen. Danach zugeben:

10 ml	MgCl ₂ (1 M) (steril filtriert)
10 ml	MgSO ₄ (1 M) (steril filtriert)
10 ml	Glukose (1 M) (steril filtriert)

4.2.3. Glycerin-Stock

Bakterienstämme und Klone wurden als Glycerin-Stocks gelagert. Dazu wurden 250 µl Bakteriensuspension und 750 µl LB Glycerin (40% Medium + 60% Glycerin) vermischt, über Nacht bei -20 °C und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.4. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli*-Übernachtskulturen erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid Quick Pure-Kit von Macherey-Nagel nach beigelegtem Protokoll. Größere Mengen Plasmid-DNA für Transfektionsexperimente wurden mit Hilfe des endotoxin-free Qiagen Plasmid Midi-Kit aufgereinigt. Die Konzentration der DNA wurde Nanodrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

4.2.5. Restriktionsverdau

Im Rahmen der Klonierung von Promotorfragmenten wurden Restriktionsverdaue durchgeführt, um die unterschiedlichen Längenfragmente des Promotors aus dem ursprünglichen Vektor pTOPOMYCprom zu erhalten. Testverdaue wurden für 1-2 Stunden bei 37 °C in einem Volumen von 10 µl angefertigt; präparative Verdaue in einem Gesamtvolumen von 25 µl und 2-3 Stunden bei 37 °C.

	Testverdau	Präparativer Verdau
DNA-Konzentration	700 ng	bis 6 µg
Enzym	0,5 µl	1 µl
10x Puffer	1 µl	2,5 µl
BSA (falls nötig, 1:10)	1 µl	2,5 µl
H ₂ O	Ad 10 µl	Ad 25 µl

4.2.6. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde benutzt, um DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzureinigen, aufzutrennen und für weitere Versuche verfügbar zu machen. Dazu wurde die benötigte Menge Agarose (1%) zu einem entsprechenden Volumen an TAE-Puffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nachdem die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (10 mg/ ml) zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Gelelektrophoresekammer überführt und vollständig mit TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden 4:1 mit einem 5x DNA Gelladepuffer gemischt und in die entsprechenden Kammern pipettiert. Bei jedem Agarosegel wurde ein 1 kb plus DNA Standard (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) als Vergleich benutzt. Abhängig von der Fragmentgröße wurde die Elektrophorese bei ca. 120 Volt für etwa 20-45 min durchgeführt.

Benötigte Puffer und Lösungen

50x TAE-Puffer	252,3 g Tris
	20,5 g NaOAc/ HOAc pH 7,8
	18,5 g EDTA
	mit H ₂ O ad 1000 ml
0,5 M EDTA-Lösung	18,6 g EDTA/ NaOH pH 8,0
	mit H ₂ O ad 100 ml

5x DNA Loading-Dye 500 µl Tris/ HCl pH 7,8
 500 µl 20% SDS
 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
 4 ml Glycerin
 10 mg Bromphenolblau
 mit H₂O ad 10 ml, Lagerung bei 4 °C

4.2.7. Aufreinigung von DNA per Gelextraktion

Die DNA wurde in einem Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgereinigt und nach Fragmentgröße aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden unter schwachem UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach beiliegendem Protokoll aufgereinigt.

4.2.8. Ligation

Um die geschnittenen und gereinigten DNA-Fragmente wieder zu verbinden und replikationsfähige Vektoren herzustellen, wurde eine Ligation über Nacht bei 16 °C nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Vektor	0,5 µl
Insert	0,5 µl
Puffer (10x)	1 µl
Ligase	0,5 µl
H ₂ O	Ad 10 µl

Die Plasmide wurden von Geneart (Regensburg, Deutschland) mit vektorspezifischen Primern sequenziert.

4.2.9. Klonierung der Reporterkonstrukte zur Analyse der Promotoraktivität von *MYC*

Im Rahmen der Arbeit sollte die Aktivität von Promotorkonstrukten von *MYC* getestet werden. Das Proto-Onkogen *MYC* ist in drei Exons gegliedert. Es besitzt mehrere Promotoren, wobei die

Transkription vorwiegend von P2 aus startet. Regulatorische Domänen befinden sich in der 5' upstream-Region, der 5' und 3' UTR und im Intron I (Facchini, et al., 1998).

Hier wurde die Region upstream von Exon 1 zur Klonierung von Reporterkonstrukten ausgewählt (Abbildung 9). Der gewählte Bereich von ca. 2700 bp wurde von Lucia Schwarzfischer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Rehli (Innere Medizin III, UKR) von genomischer DNA amplifiziert und in einen pCR2.1-TOPO –Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert (pTOPOMYCprom).

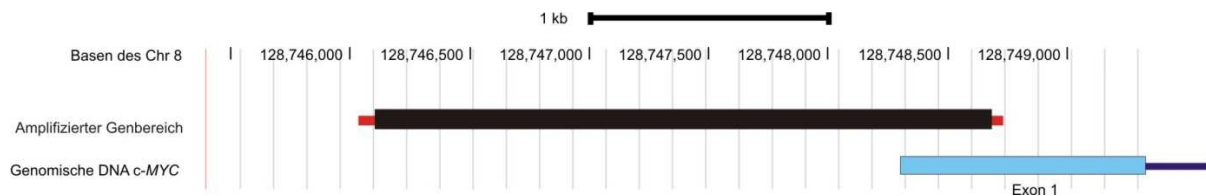


Abbildung 9: Promotorregion des Proto-Onkogens *MYC*

In blau ist das erste Exon der genomischen DNA von *MYC* dargestellt. Die oben gezeigte Region upstream von Exon 1 (schwarz) wurde für die weiteren Experimente ausgewählt und von genomischer DNA amplifiziert.

Um die Konstrukte im Luziferase-Assay einsetzen zu können, mussten diese zuerst in die Vektoren pGL4.10 und pGL4.11 (Promega, Madison, USA) kloniert werden. Die Promotorregion von Interesse wird dabei vor das im Vektor enthaltene Luziferase-Gen gestellt, dessen Expression anschließend zur Bestimmung der Promotoraktivität genutzt wurde.

Um die durch NSAIDs beeinflusste Region weiter einzugrenzen, wurden zwei der drei verschieden langen Konstrukte von ca. 2700 bp, 1400 bp und 700 bp direkt aus dem pTOPOMYCprom-Vektor in die „multiple cloning site“ (MCS) der beiden pGL4-Vektoren (pGL4.10 und pGL4.11) umklontiert. Das dritte Konstrukt von 1400 bp wurde ausgehend von den Vektoren pGL4.10 bzw. pGL4.11 erstellt.

Für die Erstellung des 2700bp-Konstruktes wurde hierzu das Promotorfragment mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NheI* und *HindIII* umklontiert. Das 700bp-Konstrukt wurde mit den Enzymen *PvuII* und *HindIII* ausgeschnitten. Eingelegt wurde das gewünschte Fragment über die Restriktionsenzyme *EcoRV* und *HindIII*. Dies war möglich, da sowohl *PvuII*, als auch *EcoRV* „blunt ends“ erzeugen und somit kein komplementärer Überhang vorhanden sein muss.

Die Fragmentgrößen wurden nach Restriktionsverdau in der Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Aufreinigung erfolgte durch das Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland). Die anschließende Ligation der entsprechenden Fragmente wurde über Nacht durchgeführt. Um die neuen Konstrukte zu amplifizieren, wurde der Ligationsansatz in DH10beta-Zellen transformiert. Nach Inkubation in LB_{Amp}-Medium konnten die Vektoren pGL4.10-2700, pGL4.10-700, pGL4.11-2700 und pGL4.11-700 isoliert und ihre Konzentration bestimmt werden.

Um das letzte Konstrukt mit ca. 1400 bp herzustellen, wurden die Vektoren pGL4.10-2700 bzw. pGL4.11-2700 mit der Restriktionsendonuklease KpnI verdaut. Dabei fiel ein Fragment von ca. 1300 bp aus dem Vektor, da das Enzym zwei Schnittstellen im Vektor besitzt, wobei eine in der MCS und die zweite im eingefügten Genfragment liegt. Anschließend wurden die Ausgangsvektoren religiert und als pGL4.10-1400 und pGL4.11-1400 isoliert.

Die Orientierung und Richtigkeit der Basenabfolge wurde in allen Konstrukten mittels Sequenzierung überprüft. Dabei konnten einzelne Basenaustausche festgestellt werden, die wegen ihrer geringen Anzahl keine Auswirkung auf eine eventuelle Beeinflussung durch NSAIDs haben sollten und somit akzeptiert wurden.

Durch die Klonierung wurden die Promotorkonstrukte pGL4.10-2700, pGL4.10-1400 und pGL4.10-700 sowie pGL4.11-2700, pGL4.11-1400 und pGL4.11-700 erhalten, deren Aktivität nach transienter Transfektion im Luziferasetest analysiert wurde (Abbildung 10).

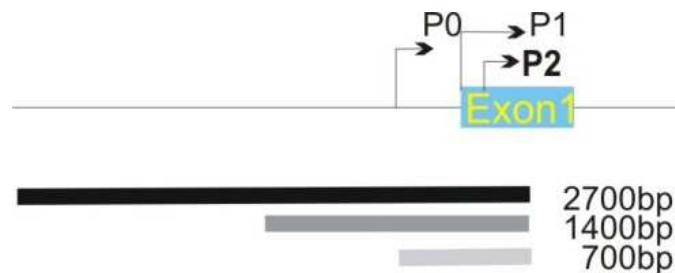


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte

In der Abbildung sind der Beginn des *MYC*-Gens mit seinem ersten Exon, einige der Promotoren, sowie die upstream-Region dargestellt. Darunter finden sich schematisch die Bereiche der Basenpaare für die Konstrukte pGL4.10-2700, pGL4.10-1400 und pGL4.10-700 sowie pGL4.11-2700, pGL4.11-1400 und pGL4.11-700 dargestellt.

4.2.10. Transiente Transfektion

Zur Vorbereitung der transienten Transfektion wurden die Zellen einen Tag vor Transfektion ohne Antibiotika in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ / 2 ml Medium pro Transfektionsansatz in 6-Well-Platten in Replikaten ausgesät. Am folgenden Tag wurden für die Transfektion folgende Ansätze vorbereitet:

- Lipofektamin-Ansatz: Je Transfektionsansatz wurde 250 μ l OptiMEM (serumfreies Medium) mit 10 μ l Lipofectamine™ 2000 gemischt und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
- Plasmid-Ansatz: Je Transfektionsansatz wurde 250 μ l OptiMEM (serumfreies Medium) mit 60 ng Renilla-Plasmid und 1,5 μ g Plasmid-DNA gemischt.

Anschließend wurden der Lipofektamin- und Plasmid-Ansatz gemischt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit 2 ml

Serum- und Antibiotika-freiem RPMI-Medium überschichtet. Im Anschluss wurde das Gemisch aus Lipofektamin- und Plasmid-Ansatz langsam auf die Zellen geträufelt. Nach fünfstündiger Inkubationszeit wurden je Ansatz 250 µl FCS und entsprechend der Experimentvorgaben Testsubstanzen wie NSAIDs bzw. Kontrollmedium zugegeben. Nach 12- bis 24-stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Luziferasemessung.

4.2.11. Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die Luziferaseaktivität wurde mit Hilfe des Dual Luciferase Reporter Assay Systems (Promega, Madison, USA) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen 12-24 h nach der Transfektion zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl Lysepuffer bei Raumtemperatur lysiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers gelöst, in ein Eppendorfröhrchen überführt und zentrifugiert (13000 rpm, 3 min, 4 °C). Die Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität wurde im Überstand am Sirius Photometer gemessen. Dazu wurden zunächst 20 µl des Überstandes und 100 µl Substrat vermischt, wodurch die Aktivität der Firefly-Luziferase bestimmt werden konnte. Um diese Reaktion zu beenden, wurden 100 µl Stop & Glow-Lösung zugegeben und anschließend die Aktivität der Renilla-Luziferase gemessen. Die Firefly-Luziferaseaktivität der einzelnen Transfektionen konnte auf diese Weise mit Hilfe der Renilla-Luziferaseaktivität normalisiert werden.

4.3. Proteinbiochemische Methoden

Expressionsanalysen auf Proteinebene wurden anhand von SDS-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) in Kombination mit Western-Blot-Analysen durchgeführt. Bei der SDS-PAGE wird die Eigenschaft von Proteinen genutzt, Sodiumdodecylsulfat (SDS) zu binden. Hierdurch werden negativ geladene SDS-Protein-Komplexe gebildet, die sich im Gel auftrennen lassen, wobei sich die Ladung proportional zur Masse verhält. Außerdem führt SDS in Kombination mit β -Mercaptoethanol zur Denaturierung von Proteinen, wodurch Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie Tertiär- und Quartärstrukturen aufgebrochen werden. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden im Western-Blot elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, auf der Proteine durch spezifische Antikörper durch Farbreaktionen nachgewiesen werden können.

4.3.1. Proteinlysate für Western-Blot-Analysen

Zur Extraktion des Gesamtproteins wurden Zellen in 6-Well-Platten zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit 100 µl RIPA-Puffer pro 5×10^6 Zellen überschichtet. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Platten geschabt und mit einer Pipette in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einminütigem Vortexen wurden die Proben für 20 min bei -20 °C inkubiert und anschließend nochmals 1 min gevortext. Hierauf folgte eine Zentrifugation (15 min, 13000 rpm) und die Aliquotierung der Überstände. Diese wurden zur Proteinbestimmung verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Die Proteinbestimmung wurde mittels DC Protein Assay von Biorad (München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Test basiert auf dem Lowry-Test, bei dem Protein mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bildet (Biuret-Reaktion). Zur Konzentrationsbestimmung diente eine interne Standardkurve bekannter Konzentrationen von BSA. Die Messung erfolgte bei 650 nm.

4.3.2. SDS-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinlysate wurde das diskontinuierliche System von Laemmli mit Trenngel und Sammelgel verwendet. Entsprechend des Molekulargewichts der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden 12-prozentige SDS-Gele angefertigt. Zum Gießen des Trenngels wurde Untergel-Stammlösung mit Ammoniumpersulfat-Lösung (APS, 5 µl/ 1 ml Stammlösung) und Tetramethylethyldiamin (TEMED, 1 µl/ 1 ml Stammlösung) als Polymerisationskatalysator vermischt und sofort in die Gelkammern gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min Polymerisationszeit wurde der Isopropanol abgegossen und das Sammelgel aus Obergel-Stammlösung, APS und TEMED zugegeben und der Kamm eingesetzt.

Nach erneuter Polymerisation wurden die Gele in die Kammern gesetzt und vollständig mit 1x Laemmli-Puffer überschichtet. Entsprechende Mengen der Proteinlysate wurden mit 2x SDS-Probenpuffer vermischt und 7 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde eine Geltasche mit 5 µl Biorad Kaleidoskop Marker beladen. Für das Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Spannung von 60-90 V angelegt, die im Trenngel auf 120-140 V erhöht wurde.

	Trenngel	Sammelgel
Trenngel-Stammlösung	10 ml	-
Sammelgel-Stammlösung	-	5 ml
TEMED	10 μ l	5 μ l
Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) 10%	50 μ l	40 μ l

Benötigte Puffer und Lösungen

Acrylamid (AA)-Stammlösung	Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trenngel-Puffer	90,83 g Tris/ HCl, pH 8,8 mit H ₂ O ad 500 ml
Sammelgel-Puffer	30 g Tris/ HCl, pH 6,8 mit H ₂ O ad 500 ml
SDS-Stammlösung	10 g SDS mit H ₂ O ad 100 ml
Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)	100 mg Ammoniumpersulfat mit H ₂ O ad 1 ml, im Kühlschrank max. 5 Tage haltbar
5x Laemmli-Elektrodenpuffer	15 g Tris 216 g Glycin 15 g SDS mit H ₂ O ad 3000 ml
2x SDS-Probenpuffer	10 ml Glycerin 5 ml Tris-Puffer 2 g SDS 5 ml β -Mercaptoethanol 10 mg Bromphenolblau mit H ₂ O ad 50 ml
1 M Tris-Puffer	13 g Tris/ HCl, pH 6,8 mit H ₂ O ad 100 ml

Stammlösungen:

	Trenngel	Sammelgel
AA Endkonzentration	12%	5%
Sammelgel-Puffer	-	25 ml
Trenngel-Puffer	25 ml	-
SDS (10%)	1 ml	1 ml
AA-Stammlösung (30%)	40 ml	16,65 ml
H ₂ O	Ad 100 ml	

4.3.3. Western-Blot

Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) geblottet. Dazu wurde eine Halbtrockenzelle von Biometra (Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Zu Beginn wurden je drei Filterpapiere (Whatman 3MM) mit den jeweiligen Anodenpuffern A, B und C getränkt. Die PVDF-Membran wurde durch kurzes Schwenken in Isopropanol aktiviert und anschließend in Anodenpuffer B geschwenkt. Beim Aufbau der Blot-Kammer wurde das SDS-Gel zwischen Filterpapier und PDVF-Membran gelegt. Der Western-Blot wurde über 60 min mit ca. 0,8 mA/cm² durchgeführt. Im Anschluss wurden die noch vorhandenen Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran durch einstündiges Schwenken in fünfprozentiger Magermilchlösung abgesättigt. Die Immunfärbung erfolgte durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern (1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C). Mit Hilfe des ECL-Detektions-Kits (Buckinghamshire, Großbritannien) wurden die Bindestellen sichtbar gemacht. Alternativ wurde selbst hergestelltes ECL verwendet (Haan, et al., 2007), wobei 5 µl des ECL-Mixes zusammen mit 1,5 µl 30% H₂O₂ auf die Blotmembran gegeben wurden. Zwischen den Färbeschritten mit Antikörpern und der Detektion mittels ECL wurde 3 x 15 min mit TBST-Lösung gewaschen. Zum Strippen einer Blotmembran, um sie mit einem weiteren Antikörper zu behandeln, erfolgte zunächst ein zweimaliges Schwenken in TBST für 15 min. Nach einer sich anschließenden Inkubation von 15 min in Strip-Lösung wurde erneut zweimal 15 min in TBST gewaschen. Nun konnte erneut mit der Blockierung und Antikörperinkubation begonnen werden. Zur Quantifizierung von Proteinen wurde als interne Referenz ein Antikörper gegen β-Aktin eingesetzt.

Benötigte Puffer und Lösungen

Anodenpuffer A 36,3 g Tris/ HCl, pH 10,4
 200 ml Methanol
 mit H₂O ad 1000 ml

Anodenpuffer B	3,03 g Tris/ HCl, pH 10,4 200 ml Methanol mit H ₂ O ad 1000 ml
Anodenpuffer C	5,2 g ε-Amino-n-Caprone, pH 7,6 200 ml Methanol mit H ₂ O ad 1000 ml
Block-Lösung	5% Magermilchpulver in H ₂ O, filtriert, im Kühlschrank max. 3 Tage haltbar
2x TBS-Lösung	9,16 g Tris/HCl 35,1 g NaCl mit H ₂ O ad 2000 ml
TBST-Lösung	1 ml Tween-20 auf 1000 ml TBS-Lösung
ECL-Mix	2 ml Luminollösung (250 mM in H ₂ O) 0,89 ml p-Coumarin-Säure (90 mM in DMSO) 20 ml Tris/ HCl, 1M, pH 8,5 mit H ₂ O ad 200ml

4.4. Durchflusszytometrische Methoden

4.4.1. Intrazelluläre Messung der Expression von MYC

Zur Bestimmung von MYC mittels intrazellulärer FACS-Färbung wurden je Ansatz $0,5 \times 10^6$ Zellen auf FACS-Röhrchen verteilt und zweimal mit 400 μ l kaltem FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 6 min, 4°C, 1400 rpm). Anschließend wurden die Zellen mit 400 μ l 0,25% PFA/ PBS für 10 min bei 4 °C fixiert und erneut zweimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen zweimal mit je 250 μ l Permeabilisierungslösung aufgeschlossen und anschließend wiederum jeweils für 6 Minuten, 4 °C, 1400 rpm zentrifugiert. Die Färbung selbst erfolgte mit 1 μ g direkt fluoreszenzmarkiertem Antikörper bzw. Isotypenkontroll-Antikörper für 45 min im Dunklen. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde mit Permeabilisierungslösung und zweimal mit 400 μ l 1x PBS gewaschen. Die abschließende Fixierung der Zellen wurde mit 400 μ l 1% PFA/ PBS durchgeführt. Die Messung erfolgte am BD FACS Calibur.

4.4.2. Bestimmung von Apoptose

Am Vortag wurden 1×10^6 Zellen/ 2 ml in 6-Well-Platten mit den entsprechenden Konzentrationen an NSAIDs ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet (1300 rpm, 7 min, 4 °C) und zweimal mit je 2 ml 1x PBS gewaschen (1300 rpm, 7 min, 4 °C). Jeder Ansatz wurde auf vier Röhrchen mit $0,25 \times 10^6$ Zellen aufgeteilt und diese jeweils zweimal mit 400 μ l 1x PBS gewaschen (1600 rpm, 4 min, 4 °C). Nach einem erneuten Waschschrift mit Annexin-Puffer wurden die Zellen mit folgenden Substanzen für 20 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert:

Röhrchen	Färbung
1	-
2	Annexin V-FITC 5 μ l
3	7-AAD 20 μ l
4	Annexin V-FITC + 7-AAD

Die Analyse erfolgte am BD FACS Calibur.

Benötigte Puffer und Lösungen für die durchflusszytometrischen Methoden

FACS-Puffer	5 ml Immunoglobulin IgG (50 mg/ ml) 5 ml Natriumazid (10%) PBS ad 500 ml
Paraformaldehyd (PFA)	1 g (1%) Paraformaldehyd PBS ad 500 ml
Permeabilisierungslösung	1x PBS 0,1% HSA 0,1% Saponin
Annexin-Binding-Puffer	1 ml 9 ml H ₂ O

5. Ergebnisse

Vorausgegangene Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten einen Einfluss nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAIDs, „non steroidal anti-inflammatory drugs“) auf Tumorzellen. Dabei wurde festgestellt, dass Diclofenac sowohl bei der Melanomzelllinie Melm als auch bei der Histozytomzelllinie U937 in den Konzentrationen von 0,4 mM und 0,8 mM die Proliferation signifikant hemmt. Im Gegensatz dazu trat bei der Zugabe von Acetylsalicylsäure (ASS) keine Hemmung der Proliferation in den getesteten Konzentrationen auf. Des Weiteren war die Akkumulation von Laktat, dem Endprodukt der Glykolyse, nach Diclofenac-Inkubation signifikant gesenkt (Gottfried, et al., 2013).

Da dem Proto-Onkogen *MYC* eine zentrale Stellung im Tumorstoffwechsel, insbesondere dem Glukose- und Glutaminstoffwechsel zugesprochen wird (Dang, 1999), sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Diclofenac sowie weiterer NSAIDs auf *MYC* untersucht werden.

5.1. Regulation der *MYC*-Expression durch NSAIDs auf Protein-Ebene

Um den Effekt von Diclofenac auf *MYC* auf Protein-Ebene zu beurteilen, wurde die Expression von *MYC* mittels Western-Blot untersucht. Dabei setzte man neben Diclofenac und ASS auch das ASS-Derivat Diflunisal ein. Um verschiedene Tumorentitäten abzudecken, wurden neben den zuvor eingesetzten Zelllinien Melm (Melanom) und U937 (Histozytom) die Prostatakarzinomzelllinie PC3 und die T-Zelleukämiezelllinie Jurkat verwendet.

5.1.1. Effekt von NSAIDs auf die Expression von *MYC* in der Melanomzelllinie Melm

Für die Western-Blot-Proben wurden je $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Well der adhärennten Melanomzelllinie Melm in 6-Well-Platten für 24 h bei 37 °C in An- und Abwesenheit von Diclofenac, ASS, Diflunisal bzw. Arginin als Lösungsmittelkontrolle für Diflunisal inkubiert. Nach Lyse der Zellen und Proteinisolierung wurde dessen Konzentration mittels Lowry-Testung bestimmt. Zur Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese und dem anschließenden Western-Blotting wurden 15-20 µg Protein pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Es wurde festgestellt, dass Diclofenac und Diflunisal die *MYC* Proteinexpression deutlich hemmen (Abbildung 11). Bei Diclofenac zeigte sich ein leichter Effekt bei 0,4 mM und ein deutlicher Effekt bei 0,8 mM; Diflunisal wies bereits ab 0,4 mM eine deutlich verminderte Expression auf, die in höheren Konzentrationen verstärkt wurde. Hingegen hatte ASS in allen getesteten Konzentrationen keinen

Einfluss auf die Proteinexpression von MYC. In einzelnen Experimenten trat eine zweite Bande im Western-Blot auf, die möglicherweise auf unterschiedliche Glykosylierung oder das Ablesen von unterschiedlichen Promotoren zurückzuführen ist.

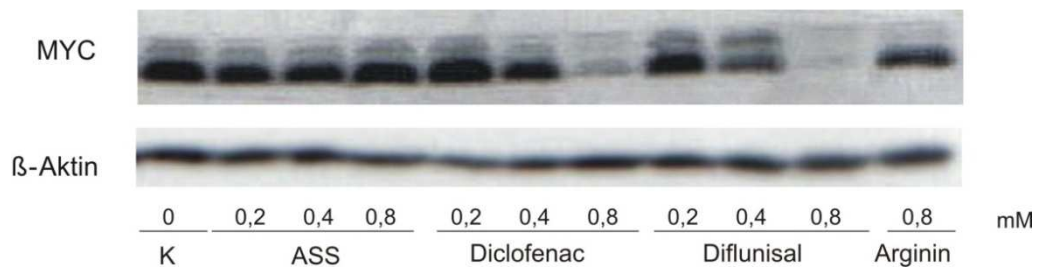


Abbildung 11: Regulation von MYC auf Proteinebene durch NSAIDs in Mellm

Mellm Zellen wurden zu je $2,5 \times 10^6$ pro Well in 6-Well-Platten für 24 h in An- und Abwesenheit von ASS, Diclofenac, Diflunisal und Kontrollmedien (K) inkubiert. Nach Proteinisolierung wurden 15-20 μg Protein pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Western-Blot-Analysen wurde die Expression von MYC in der Melanomzelllinie Mellm getestet. 0,8 mM Arginin diente als Lösungsmittelkontrolle für die Ansätze mit Diflunisal, da diese in Arginin gelöst waren. β -Aktin diente als Beladungskontrolle im Western-Blot.

Um den Effekt von Diclofenac auf die MYC-Expression genauer zu untersuchen, wurde eine Kinetik erstellt. Hierbei wurde die Expression nach 1h, 2h, 4h und 24h im Western-Blot bestimmt (Abbildung 12). Bereits nach 1 h zeigte sich bei 0,4 mM Diclofenac eine leicht verminderte Expression, die zu allen Zeitpunkten bei 0,8 mM sehr deutlich war.

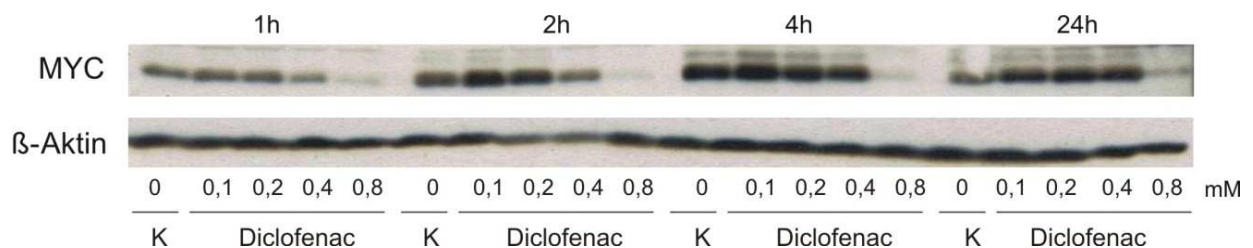


Abbildung 12: Kinetik von MYC unter dem Einfluss von Diclofenac in Mellm

Mellm wurden zu je $2,5 \times 10^6$ pro Well in 6-Well-Platten für 1h, 2h, 4h und 24h in An- und Abwesenheit (Kontrolle K) von Diclofenac inkubiert. Nach Proteinisolierung wurde die Expression von MYC mittels Western-Blot-Analysen untersucht. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

MYC gilt als zentraler Transkriptionsfaktor bei der Regulation des Glukose- und Glutaminmetabolismus (Dang, et al., 2009). Um zu kontrollieren, ob Diclofenac auch einen Effekt auf andere Transkriptionsfaktoren hat, wurde die Expression von STAT3 untersucht, welcher eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielt (Zhuang, et al., 2007; Wang, et al., 2012). Wie der

Western-Blot zeigt, wurde die Expression von STAT3 durch Diclofenac nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung 13).

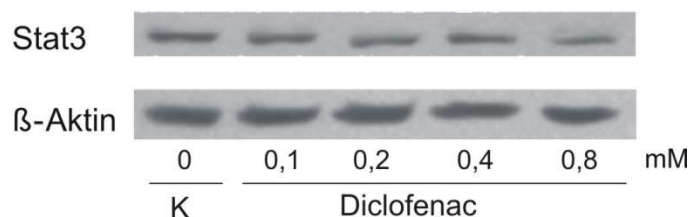


Abbildung 13: STAT3 Expression unter dem Einfluss von Diclofenac in Mellm

$2,5 \times 10^6$ Mellm wurden in 6-Well-Platten für 24 h in An- und Abwesenheit (Kontrolle K) von Diclofenac inkubiert. Nach Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung wurden 15-20 μg Protein pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Western-Blot-Analysen mittels anti-STAT3 Antikörper wurde die Expression untersucht. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

5.1.2. Effekt von NSAIDs auf die Expression von MYC in der Prostatakarzinomzelllinie PC3

Um den Effekt von Diclofenac in weiteren adhären Zellen zu bestätigen, wurde die MYC-Expression nach 24 h in der Prostatakarzinomlinie PC3 untersucht. Auch in PC3 zeigte sich eine Hemmung der Proteinexpression von MYC ab 0,4 mM. Bei Diflunisal erkannte man bereits ab 0,1 mM einen deutlichen Effekt (Abbildung 14).

Vereinzelt zeigte sich eine zweite Bande im Western-Blot. Als Ursache ist eine unterschiedliche Glykosylierung oder das Ablesen von unterschiedlichen Promotoren denkbar.

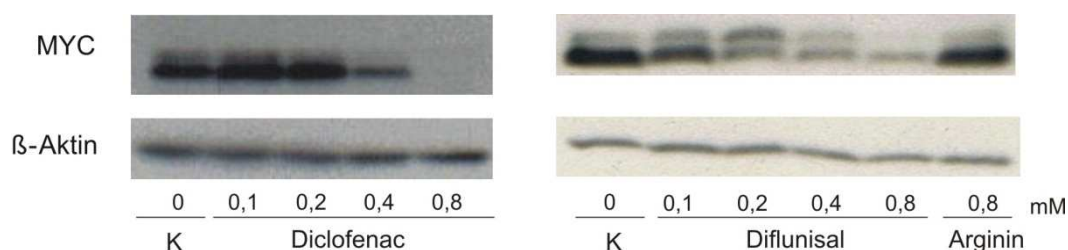


Abbildung 14: Regulation von MYC auf Proteinebene durch NSAIDs in PC3

$2,5 \times 10^6$ PC3 Zellen pro Well wurden in 6-Well-Platten für 24 h mit und ohne Diclofenac bzw. Diflunisal inkubiert. 15-20 μg Protein pro Spur wurden nach Proteinisolierung auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Western-Blot-Analysen wurde die Expression von MYC in PC3 getestet. K stellte eine Kontrolle unbehandelter Zellen dar. 0,8 mM Arginin diente als Kontrolle für die Diflunisal-Ansätze, da diese Substanz in Arginin gelöst wurde. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

5.1.3. Effekt von NSAIDs auf die Expression von MYC in der Histozytomzelllinie U937

Neben adhärennten Zelllinien wurden auch Suspensionszelllinien betrachtet. Zunächst wurde die Proteinexpression von MYC in der Histozytomzelllinie U937 unter dem Einfluss von NSAIDs nach 24 h beobachtet.

Bei dieser Zelllinie zeigte sich bereits bei 0,2 mM Diclofenac eine deutliche Hemmung der Proteinexpression von MYC. Bei Diflunisal war ab 0,4 mM eine verminderte Expression zu erkennen (Abbildung 15). In den Einzelerperimenten war zum Teil unterschiedlich stark eine zweite Bande vorhanden, deren Auftreten möglicherweise auf unterschiedliche Glykosylierung oder unterschiedlichen Einsatz von Promotoren zurückzuführen ist.

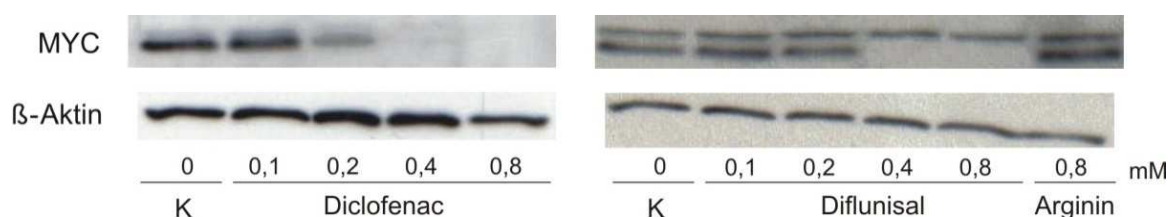


Abbildung 15: Regulation von MYC auf Proteinebene durch NSAIDs in U937

In Gegenwart und Abwesenheit (Kontrolle K) von Diclofenac bzw. Diflunisal wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen/Well in 6-Well-Platten für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Protein isoliert, dessen Konzentration bestimmt und 15-20 μg pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Western-Blot-Analysen wurde die Expression von MYC in U937 getestet. 0,8 mM Arginin diente als Kontrolle für die Diflunisal-Ansätze, da dieses in Arginin gelöst worden war. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Auch für die Zelllinie U937 wurde die MYC-Expression im Zeitverlauf analysiert. Wie in der Abbildung 16 zu sehen ist, wurde auch in der Histozytomzelllinie U937 bereits nach einer Stunde bei 0,4 mM Diclofenac eine deutliche Hemmung der Proteinexpression festgestellt.

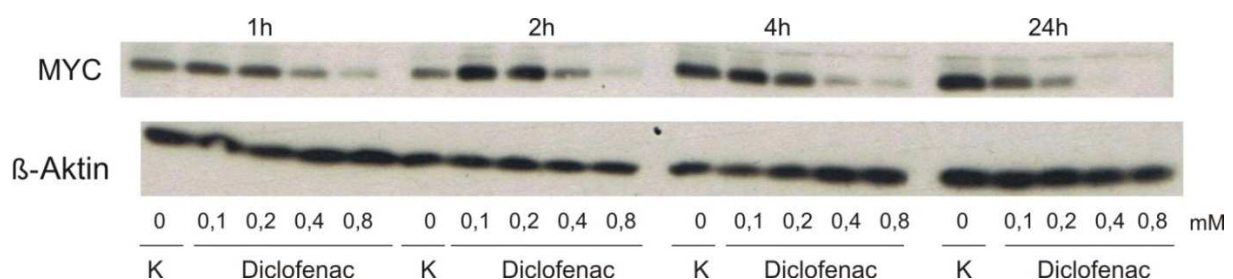


Abbildung 16: Kinetik von MYC unter dem Einfluss Diclofenac in U937

Je $2,5 \times 10^6$ U937 Zellen wurden in 6-Well-Platten für 1h, 2h, 4h oder 24h in An- und Abwesenheit (Kontrolle K) von Diclofenac inkubiert. Nach Proteinisolierung wurden 15-20 μg Protein pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend die Expression von MYC im Western-Blot getestet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Im Folgenden wurde in der Zelllinie U937 der Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf weitere Transkriptionsfaktoren wie STAT3 betrachtet. Hierzu wurde die Expression von STAT3 im Western-Blot nach 24 h ermittelt. Es konnte festgestellt werden, dass Diclofenac und Diflunisal die Proteinexpression von STAT3 nicht inhibieren (Abbildung 17).

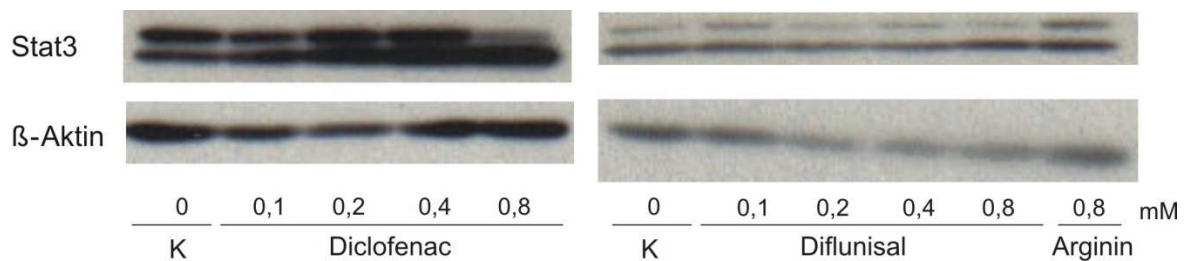


Abbildung 17: Reaktion von STAT3 auf Proteinebene durch NSAIDs in U937

Nach Inkubation der Zellen zu je $2,5 \times 10^6$ pro Well in 6-Well-Platten für 24 h in An- und Abwesenheit (Kontrolle K) von Diclofenac bzw. Diflunisal wurde das Protein isoliert und anschließend $15-20 \mu\text{g}$ Protein pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Western-Blot-Analysen wurde die Expression von STAT3 getestet. Mit 0,8 mM Arginin behandelte Zellen wurden als weitere Kontrolle aufgetragen, um Lösungsmittelleffekte in den Diflunisal-Ansätzen auszuschließen, da diese Substanz in Arginin gelöst vorlag. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

5.1.4. Effekt von NSAIDs auf die Expression von MYC in den Jurkat Leukämiezellen

Als zweite Zelllinie nicht-solider Tumore wurde die Leukämiezelllinie Jurkat unter dem Einfluss von Diclofenac untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass ab einer Konzentration von 0,4 mM Diclofenac eine deutliche Hemmung der Proteinexpression auftrat (Abbildung 18). Experimente mit Diflunisal wurden nicht durchgeführt.

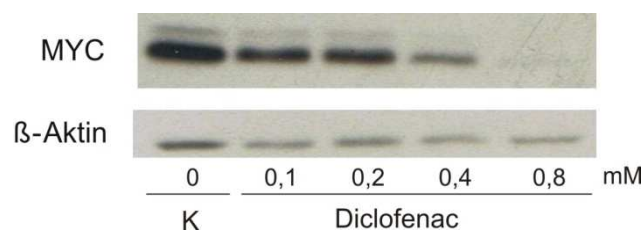


Abbildung 18: Regulation von MYC auf Proteinebene durch Diclofenac in Jurkat

Die Zellen wurden zu je $2,5 \times 10^6$ pro Well in 6-Well-Platten für 24 h in An- und Abwesenheit (Kontrolle K) von Diclofenac inkubiert. Das isolierte Protein wurde mit $15-20 \mu\text{g}$ pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Western-Blot-Analysen wurde die Expression von MYC in Jurkat getestet. 0,8 mM Arginin diente als Kontrolle für die in Arginin gelösten Diflunisal-Ansätze. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

Wie die Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 1 zeigt, konnte sowohl bei Diclofenac als auch bei Diflunisal eine Hemmung der Proteinexpression im Western-Blot festgestellt werden, wohingegen sich kein Effekt bei Inkubation mit ASS zeigte.

	Mellm	PC3	U937	Jurkat
Diclofenac	↓ (0,4)	↓ (0,4)	↓ (0,2)	↓ (0,1)
Diflunisal	↓ (0,4)	↓ (0,1)	↓ (0,4)	n.d.
ASS	-	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Proteinexpression von MYC in Anwesenheit von Diclofenac, Diflunisal und ASS

Die Melanomzelllinie Mellm, die Prostatakarzinomzelllinie PC3, die Histiocytozelllinie U937 und die Leukämiezelllinie Jurkat wurden bezüglich ihrer MYC-Expression nach NSAID-Zugabe in Western-Blot-Analysen untersucht. Die Zahlen in Klammern geben die Konzentration in mM an, ab der eine Hemmung zu erkennen ist. n.d. = nicht durchgeführt

5.1.5. Effekt von α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure auf die Expression von MYC in der Melanomzelllinie Mellm

Wie die vorausgegangenen Experimente zeigen, wurde die Proteinexpression von MYC durch die NSAIDs Diclofenac und Diflunisal deutlich gehemmt. Daneben war aus Vorexperimenten bekannt, dass Diclofenac die Akkumulation von Laktat im Überstand vermindert. Nachdem beschrieben ist, dass NSAIDs den Transport von Laktat inhibieren (Tamai, et al., 1995; Emoto, et al., 2002), postulierten wir, dass der Effekt von Diclofenac über eine Blockade von Laktat-Transportern (Monocarboxylat-Transporter, MCT) funktionieren könnte. In Analysen unserer Arbeitsgruppe konnte auch gezeigt werden, dass ein spezifischer Inhibitor dieses Transporters, α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, ebenso eine verminderte Proliferation und eine reduzierte Laktatsekretion von Tumorzellen verursacht.

Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine alleinige Blockade des Transporters auch eine veränderte MYC-Expression hervorruft. Zu diesem Zweck wurden Mellm Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und in Gegenwart und Abwesenheit von α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CINN) für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die MYC-Expression im Western-Blot untersucht. Es zeigte sich, dass die MYC-Expression nach 24 h Inkubation mit α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure nicht verringert ist (Abbildung 19).

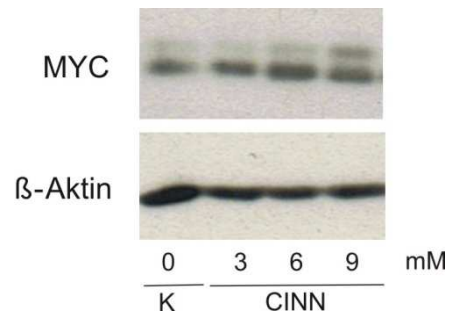


Abbildung 19: Regulation von MYC auf Proteinebene durch α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CINN) in der Melanomzelllinie Melm

Die Zelllinie Melm wurde zu je $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Well in 6-Well-Platten für 24 h in An- und Abwesenheit (Kontrolle K) von α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CINN) inkubiert. Nach Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung wurden 15-20 μ g Protein pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels anti-MYC Antikörper die Expression von MYC nachgewiesen. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

5.2. Analyse von MYC mittels Durchflusszytometrie

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von Diclofenac auf die Expression von MYC mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit zuerst ein Protokoll zur intrazellulären Färbung von MYC in den Zelllinien Mellm und U937 etabliert. Zu diesem Zweck war es nötig, mehrere Färbeprotokolle mit verschiedenen anti-MYC Antikörpern im Vergleich zu den entsprechenden Isotyp-Antikörpern zu testen. Je Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen der Tumorzelllinien Mellm und U937 eingesetzt. Da MYC an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist, wurden zur Kontrolle humane, frisch isolierte Monozyten als Beispiel für nicht-proliferierende Zellen eingesetzt. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen mit PFA/ PBS fixiert und mittels Saponin permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit $1 \mu\text{g}$ direkt fluoreszenzmarkiertem anti-MYC Antikörper bzw. Isotypenkontroll-Antikörper. Abschließend wurden die Proben mit 1% PFA/ PBS fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Das beste Färberegebnis zeigte sich mit dem direkt konjugierten Alexa-Fluor Antikörper Klon 9E10 (Santa Cruz) und entsprechender Isotyp-Kontrolle (Abbildung 20).

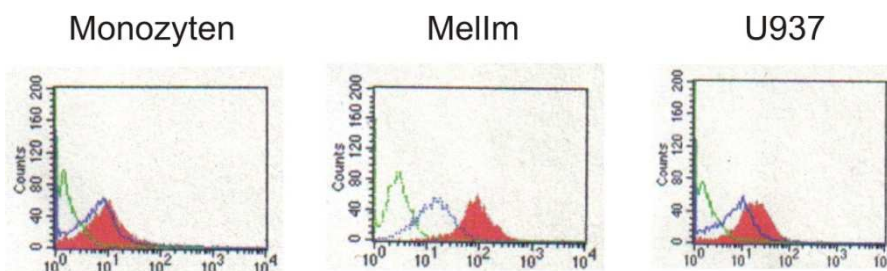


Abbildung 20: Intrazelluläre Färbung von MYC in Mellm, U937 und Monozyten

Jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen (frisch isolierte humane Monozyten, Melanomzelllinie Mellm, Histiocytomzelllinie U937) wurden nach zweimaligem Waschen mit PFA/ PBS fixiert und mittels 0,1% Saponin permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit $1 \mu\text{g}$ direkt fluoreszenzmarkiertem anti-MYC Antikörper (Klon 9E10) beziehungsweise der Isotypkontrolle (IgG1). Die abschließende Fixierung wurde mit 1% PFA/ PBS erreicht. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch am FACS analysiert. Dargestellt sind Histogramme eines repräsentativen Experiments. Grün: Kontrollfärbung ohne Erstantikörper, blau: Isotyp-Kontroll-Färbung, rot: anti-MYC Antikörper-Färbung (Klon 9E10).

Die Diagramme zeigten eine deutliche intrazelluläre Färbung für MYC bei der Melanomzelllinie Mellm, eine schwächere Färbung für die Histiocytomzelllinie U937, und keine Färbung für Monozyten. Somit ließ sich MYC in proliferierenden Zellen intrazellulär mittels Immunfluoreszenz nachweisen. Für nicht-proliferierende Monozyten zeigte sich keine Färbung, was im Einklang damit steht, dass MYC wesentlich an der Regulation von Proliferation beteiligt ist.

In zukünftigen Experimenten ist zu prüfen, ob sich nach Inkubation mit NSAIDs eine Veränderung der Expression mittels Durchflusszytometrie nachweisen lässt.

5.3. Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Promotoraktivität von *MYC*

In den bisherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Diclofenac und Diflunisal die Expression von *MYC* auf Proteinebene reduzieren. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Regulation von *MYC* auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Erste Pilotexperimente der Arbeitsgruppe deuteten an, dass die mRNA Expression von *MYC* durch zwei- und achtstündige Inkubation mit Diclofenac reduziert wird, wohingegen Diflunisal keinen deutlichen Effekt zeigte.

Im Rahmen der Arbeit sollte deshalb der Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Promotoraktivität von *MYC* untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Reporterkonstrukte kloniert, die anschließend im Reporterassay untersucht wurden.

5.3.1. Reporterkonstrukte zur Analyse der Promotoraktivität von *MYC*

Das Proto-Onkogen *MYC* ist in drei Exons gegliedert. Es besitzt mehrere Promotoren, wobei die Transkription vorwiegend von P2 aus startet. Regulatorische Domänen befinden sich in der 5' upstream-Region, der 5' und 3' UTR und im Intron I (Facchini, et al., 1998). Im Rahmen der Arbeit wurde die Region upstream von Exon 1 zur Klonierung von Reporterkonstrukten ausgewählt (4.2.9). Durch die Klonierung wurden die Promotorkonstrukte pGL4.10-2700, pGL4.10-1400 und pGL4.10-700 sowie pGL4.11-2700, pGL4.11-1400 und pGL4.11-700 erhalten (Abbildung 10). Anschließend wurden die Konstrukte in die Zelllinie Mellm mittels Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transient transfiziert. Die Methode basiert auf einer Komplexbildung der zu transfizierenden DNA mit kationischen Lipiden. Dieser DNA-Liposomen-Komplex wurde im zweiten Schritt zu den Tumorzellen gegeben und nach Fusion mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen. Nach Inkubation mit und ohne Testsubstanzen (Diclofenac und Diflunisal) wurde die Luziferaseaktivität mittels Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, USA) bestimmt (Abbildung 21).

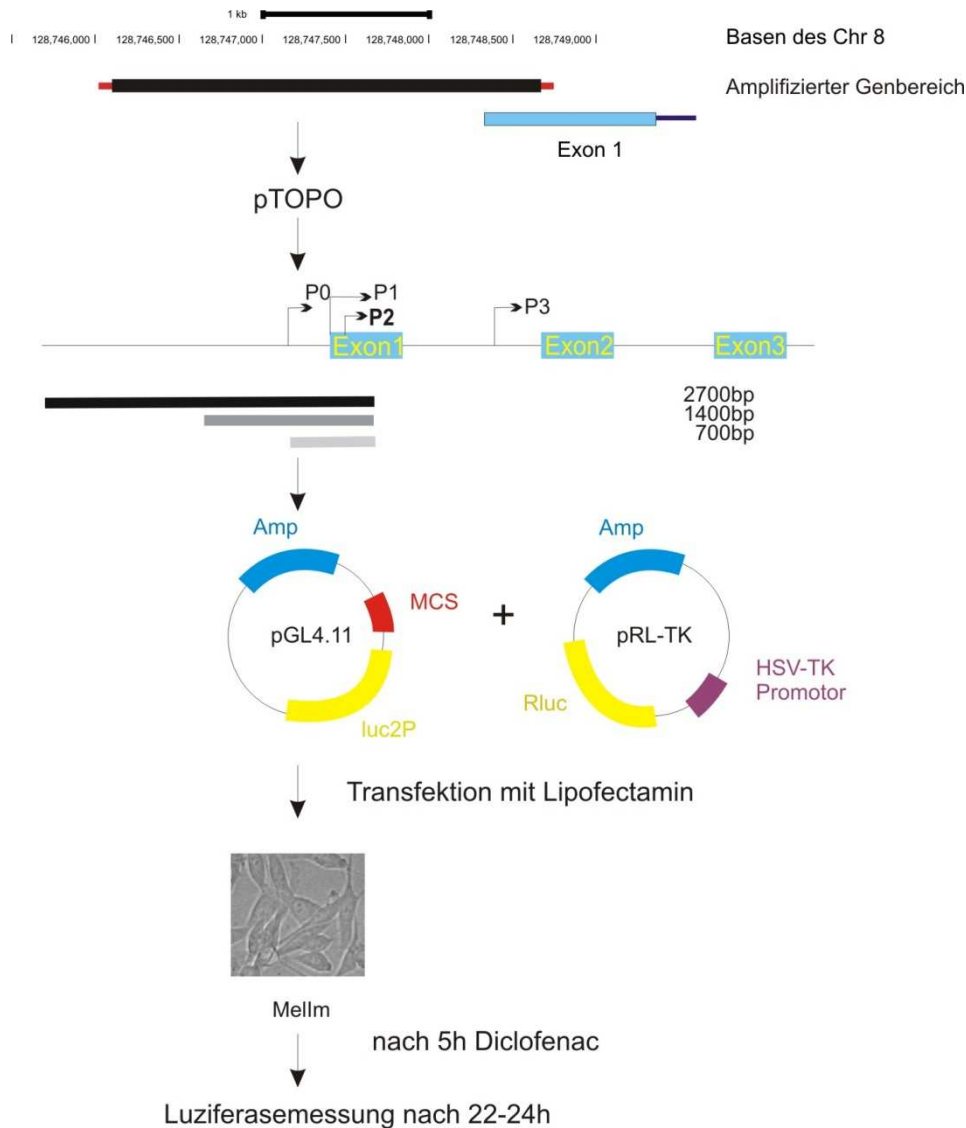


Abbildung 21: Aufbau des Promotortests

Das gewünschte DNA-Fragment der Promotorregion von *MYC* wurde ausgehend von genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor pTOPO kloniert. Drei unterschiedlich lange Promotorfragmente wurden erstellt, die jeweils sowohl in den Vektor pGL4.10 (Promega, Madison, USA) oder, wie hier dargestellt, in den Vektor pGL4.11 (Promega, Madison, USA) eingefügt wurden. Zusammen mit dem Referenzvektor pRL-TK erfolgte die transiente Transfektion mit Hilfe von Lipofektamin in die Melanomzelllinie Mellm. Nach fünf Stunden wurde Diclofenac bzw. Diflunisal in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach insgesamt 22-24 h erfolgte die Luziferasemessung.

5.3.1.1. Einfluss von Diclofenac auf die Aktivität verschieden langer Promotorkonstrukte

Um den Einfluss von Diclofenac beziehungsweise Diflunisal auf den Regulationsbereich von *MYC* in humanen Zelllinien zu untersuchen, wurden die hergestellten Plasmide mit Hilfe von Lipofektion in die Melanomzelllinie Mellm transfiziert. Zu diesem Zweck wurden $0,5 \times 10^6$ Mellm in 6-Well-Platten ausgesät, die am Folgetag mit den in Liposomen eingeschlossenen Plasmiden versetzt wurden. Nach

etwa fünfständiger Inkubationszeit wurde Diclofenac zugegeben und die Zellen in Antibiotika-freiem Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der Promotoren nach 12 beziehungsweise 24 h mit Hilfe des Dual Luciferase Reporter Assay Systems (Promega, Madison, USA) bestimmt.

Wie Abbildung 22 zeigt, hemmten 0,4 mM Diclofenac die Aktivität des längsten und des kürzesten Promotorfragments signifikant. Die Aktivität des Konstrukts mit der Regulatorregion von ca. 1400 bp wurde durch die Zugabe von Diclofenac ebenfalls gehemmt, jedoch nicht signifikant. Da die Vitalität der Zellen bei 0,8 mM Diclofenac stark reduziert war, wurden nur Diclofenac-Konzentrationen bis 0,4 mM verwendet.

Neben Experimenten nach 24 h Inkubation wurden auch Experimente nach 12 h durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Transkription bei 0,4 mM Diclofenac auch hier deutlich bis auf ca. 50% gehemmt wurde (Daten nicht gezeigt).

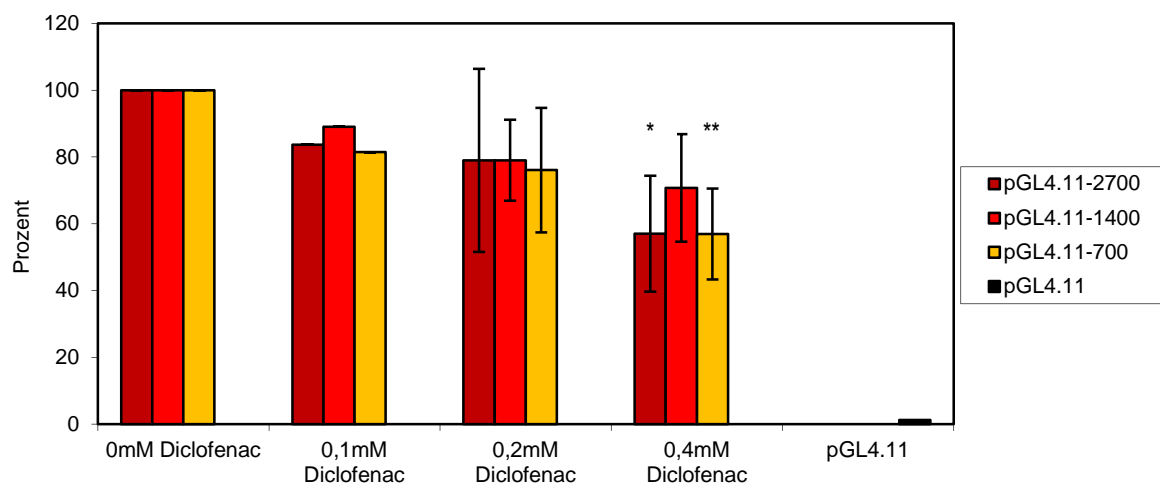


Abbildung 22: Einfluss von Diclofenac auf die Aktivität verschiedener Promotorkonstrukte im Luziferaseassay

Je $0,5 \times 10^6$ Mclm Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Die Transfektion der Plasmide (pGL4.11-2700, pGL4.11-1400 und pGL4.11-700) erfolgte am folgenden Tag mit Hilfe von Lipofectamin. Nach 24-stündiger Inkubation in An- und Abwesenheit von Diclofenac wurde die Aktivität der Promotorkonstrukte im Luziferaseassay untersucht. Als Negativkontrolle diente ein leerer Vektor pGL4.11. Die Normalisierung der Werte erfolgte mit Hilfe eines Vektors, der statt des Luziferasegens ein Renilla-Gen trägt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten (Ausnahme: 0,1 mM Diclofenac: n=2). Students-T-Test: * $p < 0,005$; ** $p < 0,1$

Nachdem somit gezeigt wurde, dass Diclofenac die Reporteraktivität in der Melanomzelllinie Mellm signifikant beeinflusst und somit einen Effekt auf transkriptioneller Ebene ausübt, sollte auch untersucht werden, ob Diflunisal einen ähnlichen Effekt hat. In einem ersten Pilotexperiment zeigte Diflunisal keinen Einfluss auf die Promotoraktivität (Abbildung 23). Inwieweit sich dieses erste Pilotexperiment bestätigen lässt, muss in nachfolgenden Experimenten überprüft werden. Eine unterschiedliche Reaktion würde auf einen unterschiedlichen Regulationsweg von Diclofenac und Diflunisal hinweisen.

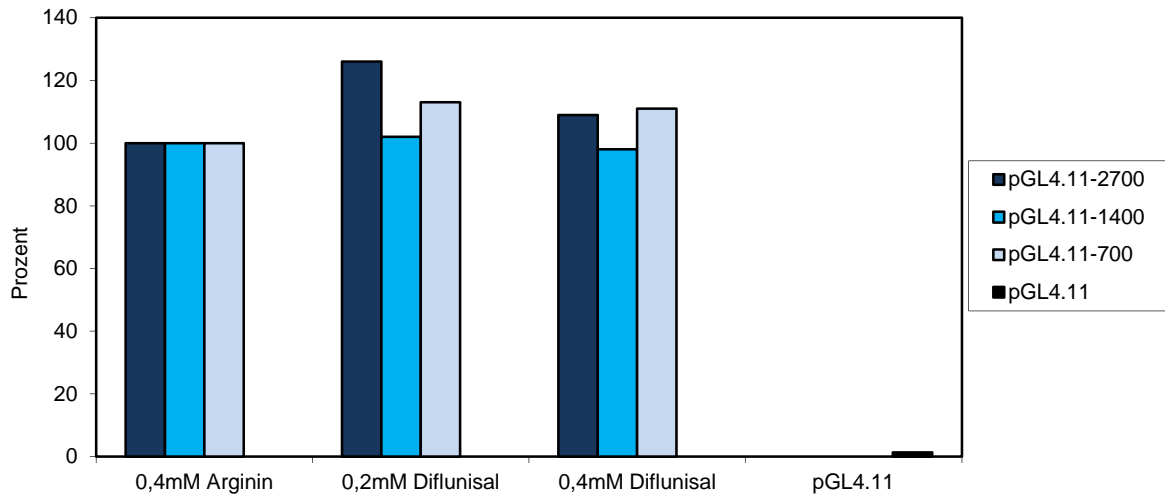


Abbildung 23: Fehlender Einfluss von Diflunisal auf die Aktivität verschiedener Promotorkonstrukte im Luziferaseassay

Je $0,5 \times 10^6$ Zellen der Melanomzelllinie Mellm wurden in 6-Well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden (pGL4.11-2700, pGL4.11-1400 und pGL4.11-700) mittels Lipofectamin transfiziert. Nach Inkubation für 24 h in An- und Abwesenheit von Diflunisal wurde die Promotoraktivität im Luziferaseassay quantifiziert. Der Vektor pGL4.11 diente als Negativkontrolle und die Normalisierung der Werte erfolgte mit Hilfe eines Renilla-Vektors. Die Abbildung zeigt ein Pilotexperiment. Arginin diente als Lösungsmittelkontrolle für die darin gelösten Diflunisal-Ansätze.

5.4. Apoptoseinduktion durch nicht-steroidale Antirheumatika (NSAIDs)

Neben Zellproliferation und Metabolismus reguliert MYC auch die Induktion von Apoptose (Thompson, 1998). Da Diclofenac und Diflunisal, wie oben gezeigt, die Expression von MYC hemmen, sollte untersucht werden, ob auch die Apoptoseinduktion in Tumorzellen durch diese Substanzen beeinflusst wird.

Hierzu wurden Mellm (Melanom) und U937 (Histiozytom) nach Inkubation mit Diclofenac und Diflunisal mittels 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)/ Annexin V-FITC-Färbung analysiert. Annexin V erkennt das Phospholipid Phosphatidylserin (PS), das im Zuge des Verlustes der Membranasymmetrie bei der Apoptose bereits sehr früh von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran transportiert wird. Alleinige Annexin V-FITC-Färbung kennzeichnet somit früh-apoptotische Zellen. 7-AAD hingegen interkaliert in die DNA zwischen Cytosin und Guanin und kennzeichnet somit bei gleichzeitiger Färbung mit Annexin V-FITC spät-apoptotische Zellen. Zudem lässt sich Nekrose von Apoptose unterscheiden, da nekrotische Zellen nur eine Färbung mit 7-AAD zeigen. Vitale Zellen bleiben ungefärbt. Die abschließende Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS).

5.4.1. Veränderung der Apoptose in der Melanomzelllinie Mellm durch NSAIDs

Zur Durchführung des Apoptoseassays wurden je 1×10^6 Zellen in 6-Well-Platten in An- und Abwesenheit von Diclofenac beziehungsweise Diflunisal ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach Ernten und Waschen der Zellen wurden diese mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) markiert. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde der Prozentsatz vitaler, apoptotischer, spät-apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Aus Gründen der Übersicht werden in den Diagrammen nur jeweils die doppelt positiven, d.h. spät-apoptotischen Zellen den vitalen Zellen gegenübergestellt.

Für Mellm fanden wir lediglich eine leichte Steigerung der Apoptoserate mit einer schwachen Verringerung der Vitalität der Zellen (Abbildung 24). In darüber hinausgehenden Experimenten der Arbeitsgruppe wurde die leichte Abnahme der Vitalität bestätigt und eine Signifikanz des Ergebnisses gezeigt (Gottfried, et al., 2013). Nachdem bis 0,4 mM Diclofenac keine Abnahme der Vitalität festzustellen war, hängt der zuvor beschriebene Rückgang der MYC-Expression nicht mit einer Abnahme der Vitalität zusammen.

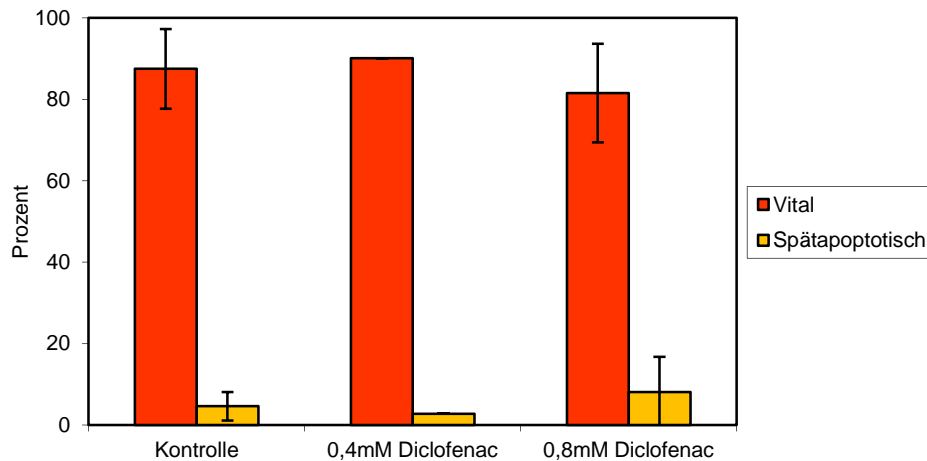


Abbildung 24: Einfluss von Diclofenac auf die Vitalität der Melanomzelllinie Mellm

Je 1×10^6 Zellen der Melanomzelllinie Mellm wurden in 6-Well-Platten in An- und Abwesenheit von Diclofenac in unterschiedlichen Konzentrationen für 24 h inkubiert. Die geernteten Zellen wurden mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) markiert und durchflusszytometrisch ausgewertet. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus zwei (0,4 mM) bzw. drei (0,8 mM) Experimenten.

Wie Abbildung 25 zeigt, beeinflusste auch Diflunisal die Vitalität der adhären Zelllinie Mellm nicht signifikant. Die Kontrolle mit 0,8 mM Arginin zeigte dabei im Vergleich zur Mediumkontrolle keinen signifikanten Unterschied.

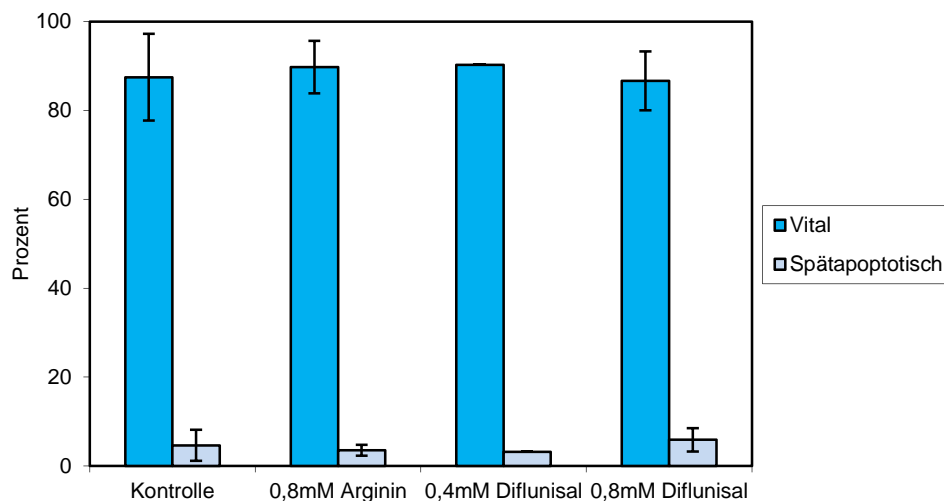


Abbildung 25: Einfluss von Diflunisal auf die Vitalität der Melanomzelllinie Mellm

Je Ansatz wurden je 1×10^6 Zellen der Melanomzelllinie Mellm in 6-Well-Platten in An- und Abwesenheit von Diflunisal ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach verschiedenen Waschschrinen mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) markiert. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Als Kontrolle diente eine Probe mit 0,8 mM Arginin, da Diflunisal in Arginin gelöst war. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus zwei (0,4 mM) bzw. drei (0,8 mM) Experimenten.

Die Inkubation mit nur einem NSAID zeigte keine signifikante Veränderung der Apoptoserate. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Kombination von Diclofenac und Diflunisal einen stärkeren Effekt als die Einzelsubstanzen hat. Wie die Experimente zeigen, fand sich bei der Kombination von 0,4 mM Diclofenac und 0,4 mM Diflunisal keine deutliche Verstärkung des Zelltods, wohingegen sich bei der Kombination von 0,8 mM Diclofenac und 0,8 mM Diflunisal die Zellvitalität auf etwa 50% reduzierte (Abbildung 26). Inwieweit eine längere Inkubation der Zellen mit den Einzelsubstanzen zu einer verstärkten Apoptose führt, ist noch zu untersuchen.

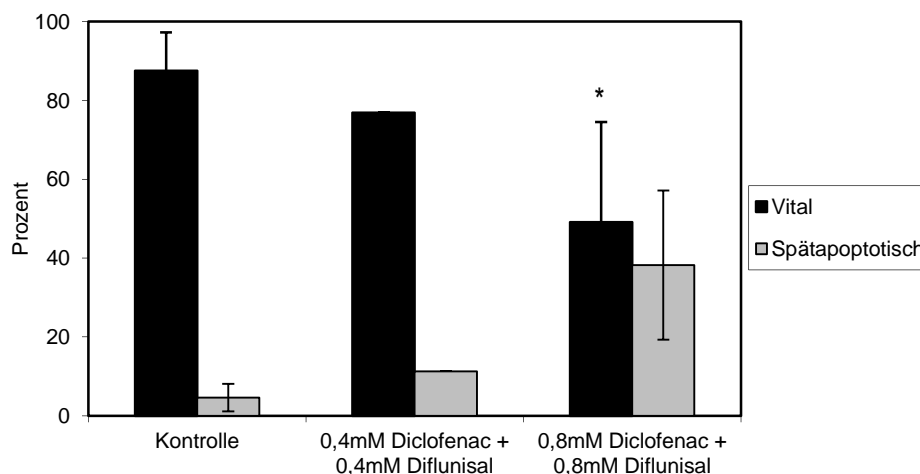


Abbildung 26: Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Vitalität der Melanomzelllinie Mellm

Nach Inkubation von je 1×10^6 Zellen/ Well der Melanomzelllinie Mellm in 6-Well-Platten in An- und Abwesenheit der NSAIDs für 24 h wurden die Zellen geerntet. Anschließend erfolgte nach verschiedenen Waschschritten die Färbung mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD). Die Auswertung wurde durchflusszytometrisch durchgeführt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus zwei (0,4 mM) bzw. drei (0,8 mM) Experimenten. Students-T-Test: * $p < 0,05$

5.4.2. Veränderung der Apoptose in der Histozytomzelllinie U937 durch NSAIDs

Als nächstes wurde die Vitalität der nicht-adhären Histozytomzelllinie U937 nach Inkubation mit NSAIDs in vergleichbarer Weise untersucht. Abbildung 27 zeigt repräsentative FACS-Diagramme für 0,1 mM und 0,8 mM Diclofenac sowie 0,1 mM und 0,8 mM Diflunisal und deren Kombinationen. Hierbei ließ sich sowohl bei Diclofenac als auch bei Diflunisal mit steigenden Konzentrationen eine deutliche Abnahme vitaler Zellen feststellen. Im Kontrollansatz zeigten sich 75% vitale Zellen, bei Inkubation mit 0,1 mM Diclofenac noch 68% lebende Zellen, was sich auf nur noch 12% nach Inkubation mit 0,8 mM Diclofenac reduzierte. Unter 0,1 mM Diflunisal fanden sich 81% vitale Zellen gegenüber 6% bei Inkubation mit 0,8 mM Diflunisal. In der Kombination von 0,1 mM Diclofenac und 0,1 mM Diflunisal war

nur eine geringe Abnahme vitaler Zellen festzustellen, wohingegen sich bei der Kombination von 0,8 mM Diclofenac mit 0,8 mM Diflunisal nur noch 2% vitale Zellen detektieren ließen (Abbildung 27).

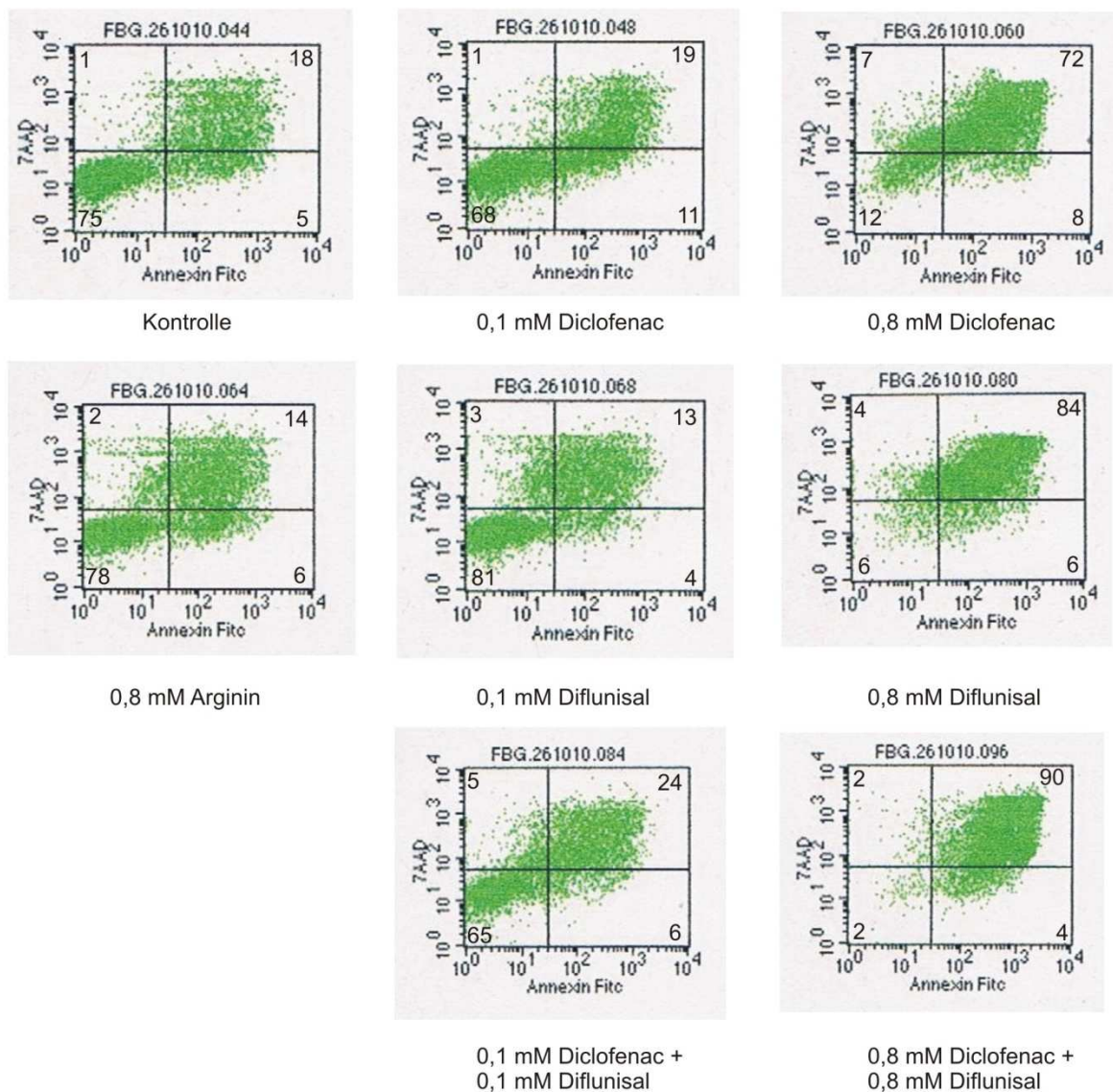


Abbildung 27: Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Histozytomzelllinie U937

Je 1×10^6 U937 Zellen wurden in 6-Well-Platten in An- und Abwesenheit von Diclofenac bzw. Diflunisal ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach Ernten und Waschen der Zellen wurden diese mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen in den Eckpunkten der Diagramme geben die jeweilige Prozentzahl der vitalen, apoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen an.

In Zusammenfassung der drei durchgeführten Experimente zeigte sich für die Zelllinie U937 ein deutlicher Effekt bei höheren Konzentrationen an Diclofenac. Während bis zu Konzentrationen von 0,4 mM kein signifikanter Anstieg an apoptotischen Zellen zu beobachten war, drehte sich das Verhältnis von vitalen und apoptotischen Zellen bei 0,8 mM Diclofenac im Vergleich zu unbehandelten Zellen um und 70% der Zellen waren apoptotisch (Abbildung 28). Somit ist die Apoptoserate in dieser Zelllinie gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigert ($p < 0,01$).

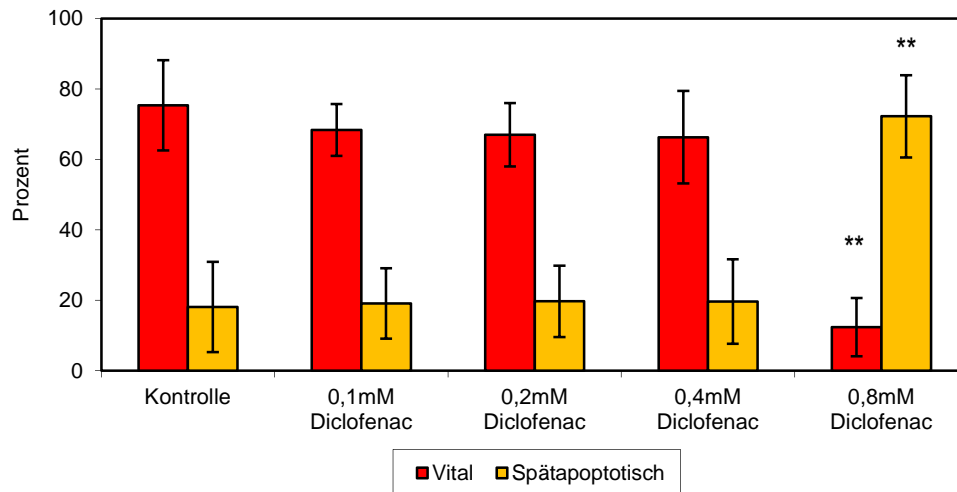


Abbildung 28: Einfluss von Diclofenac auf die Vitalität der Histozytomzelllinie U937

In Gegenwart und Abwesenheit von Diclofenac in verschiedenen Konzentrationen wurden je 1×10^6 U937 Zellen/Well in 6-Well-Platten inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei Experimenten. Student-T-Test: ** $p < 0,01$

Um den Effekt von Diflunisal mit dem von Diclofenac zu vergleichen, wurden für U937 ebenso Apoptoseassays mit verschiedenen Konzentrationen an Diflunisal durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass durch 0,8 mM Diflunisal über 80% der Zellen in Apoptose gehen ($p < 0,01$). 0,4 mM Diflunisal zeigten im Gegensatz zur Behandlung mit Diclofenac einen Anstieg apoptotischer Zellen auf etwa 37% (Abbildung 29). Die Kontrolle mit 0,8 mM Arginin zeigte dabei im Vergleich zur Mediumkontrolle keinen signifikanten Unterschied.

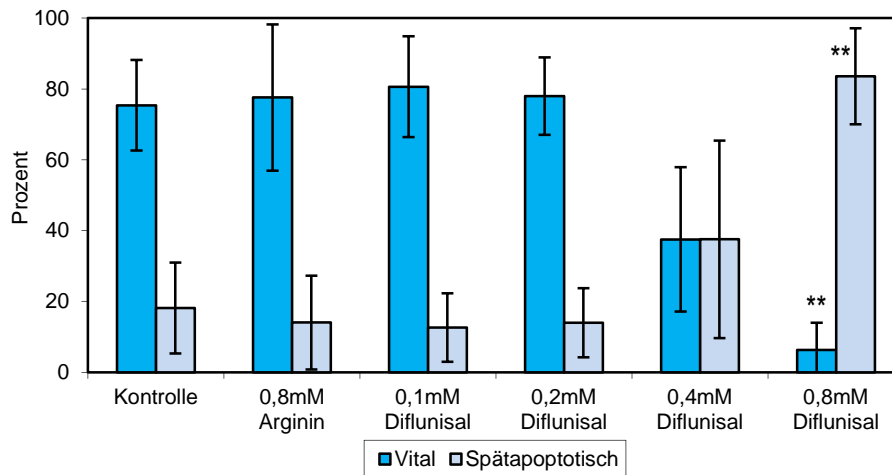


Abbildung 29: Einfluss von Diflunisal auf die Vitalität der Histozytomzelllinie U937

Es wurden je 1×10^6 U937 Zellen/ Well in 6-Well-Platten in An- und Abwesenheit von Diflunisal in verschiedenen Konzentrationen ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach Ernten der Zellen wurden diese mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) markiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Als Lösungsmittelkontrolle für Diflunisal dienten mit Arginin behandelte Zellen. Es sind Mittelwerte aus drei Experimenten gezeigt. Student-T-Test: ** $p < 0,01$

Ein noch deutlicherer Effekt auf die Induktion von Apoptose fand sich bei Kombination beider NSAIDs in der Zelllinie U937. Nach Kombination von 0,8 mM Diclofenac und 0,8 mM Diflunisal wurden 90% apoptotische Zellen detektiert ($p \leq 0,001$). Ähnlich wie bei Diflunisal alleine war die erste deutliche Veränderung bei Konzentrationen von 0,4 mM zu erkennen (Abbildung 30). In weiterführenden Experimenten außerhalb der Arbeit sollte in Kinetik-Analysen untersucht werden, ob längere Inkubationszeiten mit niedrigeren Substanzkonzentrationen bereits Effekte zeigen.

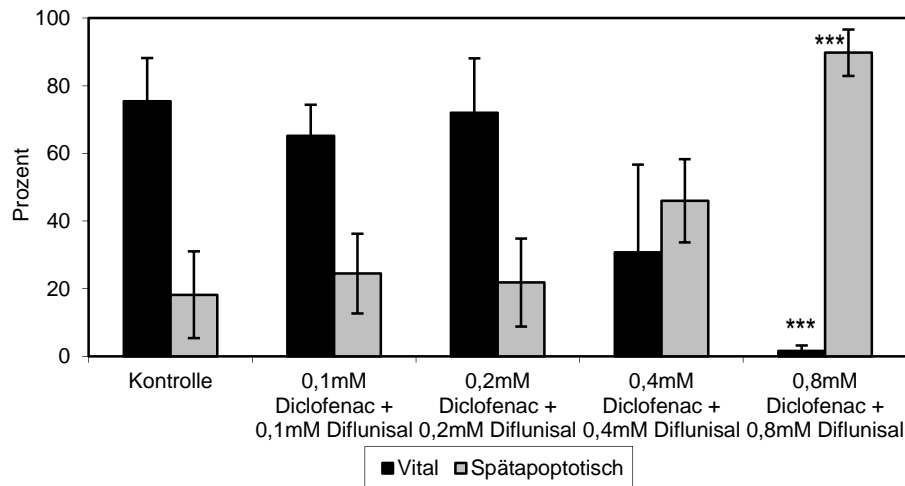


Abbildung 30: Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf die Vitalität der Histozytomzelllinie U937

Nach Aussäen von je 1×10^6 Zellen pro Well in 6-Well-Platten in An- und Abwesenheit von NSAIDs wurden diese für 24 h inkubiert. Nach Ernten und Waschen der Zellen wurden sie mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei Experimenten. Student-T-Test: *** $p \leq 0,001$

Abschließend sind im Vergleich die vitalen Zellen der Zelllinie U937 bei der Behandlung mit 0,4 mM Diclofenac, 0,4 mM Diflunisal und deren Kombination (0,4 mM Diclofenac + 0,4 mM Diflunisal) beziehungsweise 0,8 mM Diclofenac, 0,8 mM Diflunisal und 0,8 mM Diclofenac + 0,8 mM Diflunisal dargestellt. Es zeigt sich, dass die Kombination der beiden NSAIDs die Apoptoserate gegenüber den Einzelsubstanzen steigert, jedoch nicht signifikant.

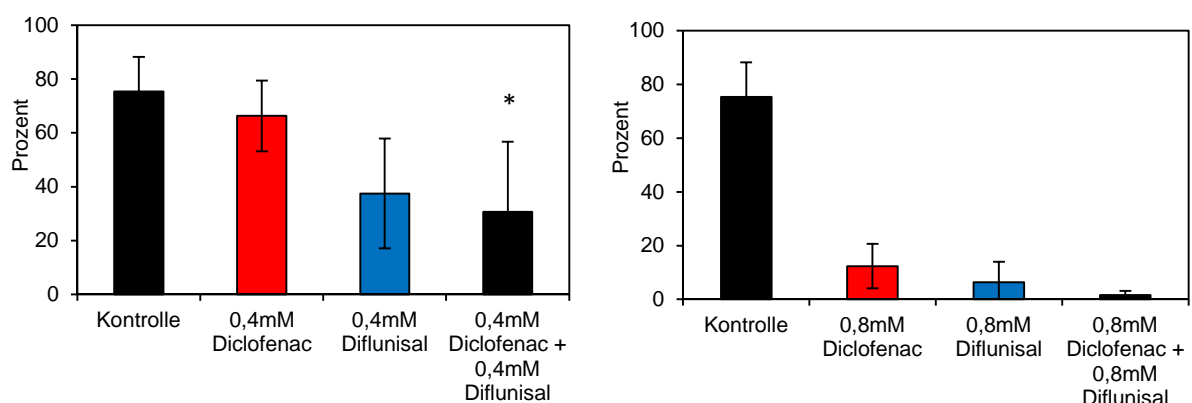


Abbildung 31: Vergleich der Einzel- und Kombinationsanwendung von Diclofenac und Diflunisal auf die Vitalität der Histozytomzelllinie U937

1×10^6 Zellen wurden pro Well in 6-Well-Platten in An- und Abwesenheit von NSAIDs ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach Färbung mit Annexin V-FITC und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei Experimenten. Student-T-Test: * $p < 0,06$ (zu 0,4 mM Diclofenac)

6. Diskussion

Ein veränderter Zellmetabolismus ist eines der wesentlichen Charakteristika neoplastischer Zellen und trägt zu Proliferation und Progression von Tumoren bei (Hanahan, et al., 2011). Otto Warburg hatte bereits im letzten Jahrhundert beobachtet, dass Tumorzellen auch in Gegenwart von Sauerstoff vermehrt Glukose aufnehmen und Laktat produzieren (Warburg, 1956). Des Weiteren ist gezeigt, dass hohe Laktatkonzentrationen im Tumor mit Malignität assoziiert sind (Walenta, et al., 2000). Die aerobe Glykolyse unterstützt die Proliferation und das Wachstum von Tumorzellen, da die Zellen hiermit ihren verstärkten Bedarf von Makromolekülen besser decken können (Dang CV, 1999; Vander Heiden, et al., 2009). Die metabolischen Veränderungen in Tumorzellen sind mit der Stabilisierung von HIF (Hypoxie-induzierter-Faktor) (Jaakkola, et al., 2001), einem Verlust von p53 (Matoba, et al., 2006) oder mit der Regulation von Zielgenen von p53 (Zhang, et al., 2011) assoziiert. Aus diesem Grund wird derzeit intensiv die anti-tumorale Wirkung von Substanzen untersucht, die zentrale Regulationspunkte der Stoffwechselwege inhibieren (Tennant, et al., 2010).

Auch das Onkogen *MYC*, das eine entscheidende Rolle bei Proliferation, Zellzyklus, Apoptose und Differenzierung spielt, ist in etwa 30% aller Tumore dereguliert (Vita, et al., 2006). *MYC* gilt neben dem Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) als zentraler Regulator des Tumorstoffwechsels und führt zur Steigerung der Expression Glykolyse-relevanter Enzyme (Dang, et al., 2008). *MYC* wird schon länger als interessante Zielstruktur einer Therapie diskutiert (Hermeking, 2003; Dang, 2012; Gabay, et al., 2014). So wurde bereits vor einigen Jahren gezeigt, dass die Inaktivierung von *MYC* im Mausmodell zur Apoptose von Tumorzellen führt (Jain, et al., 2002). Ebenso wurde in verschiedenen Systemen dargestellt, dass die Suppression von *MYC* über Induktion von Seneszenz, Apoptose oder Differenzierung zur Tumorregression führt (Li, et al., 2014). Die Transkription von *MYC* kann durch Triple-Helix-bildende Oligonukleotide inhibiert werden, die in der Nähe der Promotorregion binden und die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren verhindern. Dies ist für die Region um den Hauptpromotor P2 in humanen Leukämiezellen gezeigt (McGuffie, et al., 2000). Den Nachweis, dass *MYC* als Zielstruktur geeignet ist, konnten auch Savino und Soucek mit Hilfe des Inhibitors OmoMYC liefern (Savino, et al., 2011). Bei OmoMYC handelt es sich um eine dominant negative Form von *MYC*, die Protein-Interaktionen von *MYC* mit MAX und Miz-1 blockiert, die Bindung von *MYC* an E-Boxen in Promotoren von Zielgen-Promotoren verhindert und zur Regression etablierter Tumore führt. Allerdings wurde die Substanz bisher nur im Mausmodell eingesetzt. Für den klinischen Einsatz sind nur wenige auf *MYC* zielende Substanzen zugelassen, so etwa Glukokortikoide wie Dexamethason, die allerdings

mit starken Nebenwirkungen assoziiert sind (Schmidt, et al., 2004). Aus diesem Grund ist es interessant, klinisch einsetzbare Inhibitoren von MYC zu bestimmen.

6.1. Regulation von MYC durch NSAIDs

Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAIDs) werden weltweit zur Schmerztherapie eingesetzt (Steinmeyer, 2000). Wie epidemiologische Studien zeigen, reduzieren NSAIDs auch das Risiko für Krebserkrankungen; wobei jedoch klinisch randomisierte Studien hierzu fehlen (Elwood, et al., 2009; Liggett, et al., 2014).

In verschiedenen Untersuchungen wurden bereits Effekte von NSAIDs auf Proliferation und Apoptose von Tumorzellen gezeigt, die allerdings bisher meist auf die Inhibition der Cyclooxygenasen (COX) und die Hemmung der Entzündung zurückgeführt wurden (Warner, et al., 2004). Vereinzelt wurden Proliferationsinhibition und Apoptose-Induktion durch NSAIDs auch als COX-unabhängiger Effekt beschrieben (Hanif, et al., 1996; Zhou, et al., 2010). Schon länger ist auch bekannt, dass NSAIDs die mitochondriale Aktivität der Zellen beeinflussen (Moreno-Sánchez, et al., 1999) und den Laktattransport von Zellen inhibieren können (Emoto, et al., 2002). Passend hierzu zeigen die Arbeiten unserer Gruppe, dass Diclofenac die Proliferation und extrazelluläre Laktatakkumulation von Tumorzellen hemmt (Gottfried, et al., 2013). Nachdem MYC als zentraler Regulator des Glukose- und Glutaminstoffwechsels gilt (Dang, et al., 2009), sollten im Rahmen der Arbeit Proteinexpression und Promotoraktivität von MYC sowie Apoptoseinduktion unter dem Einfluss von Diclofenac und dem ASS-Derivat Diflunisal betrachtet werden.

Die Western-Blot-Analysen zeigten eine starke Reduktion der Expression von MYC unter Diclofenac und Diflunisal in verschiedenen Zelllinien, so für die Melanomzelllinie Mellm, die Prostatakarzinomzelllinie PC3, die Histiozytomzelllinie U937 und die Leukämiezelllinie Jurkat. Am sensibelsten reagierte die Leukämiezelllinie Jurkat, bei der die Hemmung der MYC-Expression bereits bei 0,1 mM Diclofenac feststellbar war. Auch Diflunisal bewirkte eine Reduktion der Expression von MYC, wobei sich bei der Prostatazelllinie PC3 schon bei 0,1 mM Diflunisal eine leichte Hemmung beobachten ließ. Als Kontrollsubstanz wurde in verschiedenen Ansätzen das NSAID Acetylsalicylsäure (ASS) mitgeführt. Bei Aspirin-Konzentrationen bis 0,8 mM in der Melanomzelllinie Mellm war kein Effekt auf die MYC-Expression festzustellen, wenn auch höhere Konzentrationen noch zu testen sind. Shachaf et al. konnten im Lymphomen-Mausmodell zeigen, dass ein Schwellenwert der MYC-Expression für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums wichtig ist (Shachaf, et al., 2008). Inwieweit

die in der Arbeitsgruppe festgestellte Proliferationsinhibition durch Diclofenac und Diflunisal hiermit zusammenhängt, bleibt zu untersuchen.

Um auszuschließen, dass die Substanzen einen globalen Rückgang von Transkriptionsfaktoren bewirken, wurde STAT3 betrachtet. STAT3 spielt als Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren (Wang, et al., 2012). Wie die Western-Blot-Analyse zeigte, wird die Expression von STAT3 durch Diclofenac jedoch nicht beeinflusst (Abbildung 13), sodass nicht von einem globalen Effekt von Diclofenac auf Transkriptionsfaktoren auszugehen ist, sondern ein MYC-spezifischer Effekt postuliert werden kann. Im Rahmen der Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass Diclofenac in einer Zelllinie mit induzierbarer MYC-Expression die Proliferation und Laktatsekretion MYC-abhängig reduziert (Gottfried, et al., 2013).

Im Folgenden wurde der Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf transkriptioneller Ebene in Reporterassays betrachtet. Durch Klonierung wurden zuerst mehrere Reporterkonstrukte des *MYC*-Gens hergestellt, deren Aktivität in An- und Abwesenheit von Diclofenac und Diflunisal im Luziferase-Promotorassay untersucht wurde. Die Aktivität aller Konstrukte wurde durch Zugabe steigender Konzentrationen von Diclofenac zunehmend gehemmt. Um die relevante Region im *MYC* Promotor weiter einzugrenzen, wurden Konstrukte mit unterschiedlich großen upstream-Bereichen des Promotors (ca. 700, 1400 und 2700 bp) verglichen. Hierbei zeigte sich allerdings kein Unterschied in der Inhibition durch Diclofenac, woraus zu folgern ist, dass bereits das kleinste Fragment von 700 bp alle relevanten Regionen für eine transkriptionelle Regulation enthält. Bei einem Pilotexperiment unter Zugabe von Diflunisal zeigte sich keine Inhibition der Promotoraktivität der verschiedenen Konstrukte. Sollte sich dieser Befund bestätigen, würde dies darauf hinweisen, dass Diflunisal über einen anderen Mechanismus als Diclofenac zur Reduktion der gezeigten MYC-Expression führt.

6.2. Apoptoseinduktion durch Diclofenac und Diflunisal

Schon länger ist bekannt, dass Diclofenac die Proliferation von Tumorzellen auch in COX-unabhängiger Weise blockiert (Hanif, et al., 1996; Zhou, et al., 2010) und mit Apoptose einhergehen kann, wie für Pankreaskarzinom-, Neuroblastom- und Ovarialkarzinomzellen beschrieben wurde (Mayorek, et al., 2010; Cecere, et al., 2010; Valle, et al., 2013). Nachdem in unserer und anderen Arbeitsgruppen in verschiedenen Mausmodellen eine Reduktion des Tumorwachstums durch Diclofenac gefunden wurde, (Hoferová, et al., 2002; Johnsen, et al., 2004; Mayorek, et al., 2010; Gottfried, et al., 2013), sollte

untersucht werden, ob die MYC-Reduktion durch Diclofenac in den untersuchten Zelllinien auch mit einem Einfluss auf die Zellvitalität und Apoptose-Induktion einhergeht.

Hierbei zeigte die Histiocytomzelllinie U937 größere Sensibilität für Diclofenac und Diflunisal als die Melanomzelllinie Mellm. Während bei der Melanomzelllinie nur bei der Kombination von Diclofenac und Diflunisal Apoptose induziert wurde, zeigte sich bei U937 auch mit den Einzel-Substanzen Apoptose. Inwieweit sich der Effekt bei längerer Inkubation verstärkt, bleibt zu untersuchen. Anzumerken ist, dass Serumkonzentrationen von 0,4 und 0,8 mM Diclofenac in der gängigen klinischen Anwendung nicht erreichbar sind. Allerdings könnte eine Anreicherung im Gewebe lokal zu einer stark erhöhten Konzentration führen, was noch zu testen ist. Außerdem werden bei Diflunisal höhere Spiegel erreicht (bis zu 0,8 mM). Dass sich stärkere Apoptose bei Kombination beider Substanzen erreichen lässt, spricht für einen Einsatz als Kombinationstherapie.

Nachdem die Suppression der MYC-Expression jeweils bereits bei niedrigerer Konzentration als die Apoptoseinduktion festgestellt wurde, ist auf unabhängige Mechanismen zu schließen. In der Literatur finden sich mehrere Beispiele für eine MYC Repression mit und ohne Apoptoseinduktion (McCormack, et al., 1984; Eastman-Reks, et al., 1986; Askew, et al., 1991; Evan, et al., 1992; Askew, et al., 1993; Fischer, et al., 1994; Wood, et al., 1994; Thompson, et al., 1995; Russo, et al., 2003; Hoffman, et al., 2008). Außerdem ist im transgenen Mausmodell gezeigt, dass die Inaktivierung von MYC zur Differenzierung und zum Rückgang eines T-Zell-Lymphoms führte (Felsher, 2010). Ob Diclofenac und Diflunisal in den Zellen zur Differenzierung führen, sollte über die Arbeit hinaus untersucht werden.

Nachdem die Kombination von Diclofenac und Diflunisal zu einer wesentlich verstärkten Apoptose führte, was möglicherweise auf unterschiedliche Mechanismen der beiden Substanzen zurückzuführen ist, ist zu fragen, ob die Kombination mit anderen Substanzen eine weitere Verbesserung des Effekts ermöglicht. Hierbei wäre auch interessant zu untersuchen, ob die Wirkung bei Kombination von Diclofenac und Diflunisal mit anderen in den Glukosestoffwechsel eingreifenden Substanzen verstärkt wird. Frühere Experimente aus der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass durch die Kombination von Pioglitazon mit 2-Deoxyglukose - einer Substanz, die die Zellen in die Glykolyse treibt mit einer Substanz, die die Glykolyse inhibiert - das Tumorzellwachstum deutlich stärker verringert wird, als mit den Einzelsubstanzen (Gottfried, et al., 2011).

Die Ergebnisse zur Verringerung der MYC-Expression, Inhibition der Tumorzellproliferation und Induktion von Apoptose durch Diclofenac und Diflunisal zeigen, dass es sich bei diesen Substanzen um interessante Medikamente zur Unterstützung einer Tumortherapie handelt und eine Kombination mit anderen Substanzen wertvolle Ansätze bietet. Die Experimente wurden bisher an Zelllinien

durchgeführt, sodass eine Bestätigung in Primärzellen noch aussteht. Allerdings konnte im Maus-Melanom-Modell mit Diclofenac bereits eine eindeutige Hemmung des Tumorwachstums nachgewiesen werden (Gottfried, et al., 2013).

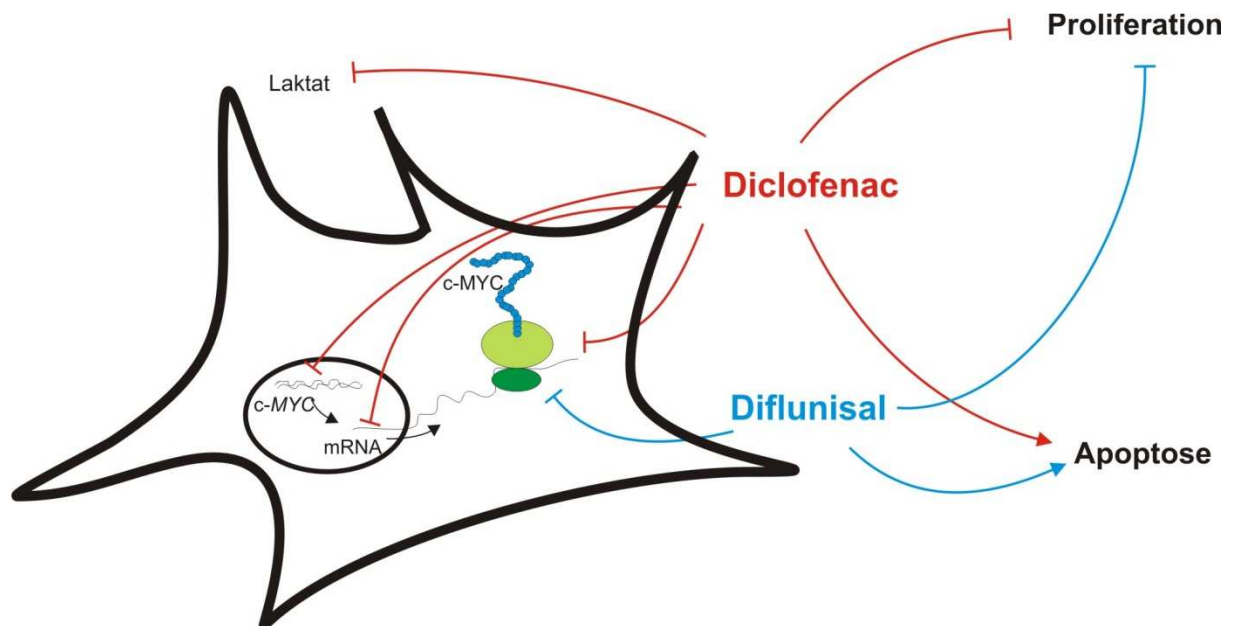


Abbildung 32: Einfluss von Diclofenac und Diflunisal auf verschiedene Tumorzelllinien

Das NSAID Diclofenac beeinflusst Promotoraktivität, mRNA- und Protein-Expression von MYC. Diflunisal beeinflusst MYC nur auf Proteinebene. Zusätzlich hemmt Diclofenac die Laktatakkumulation im Medium; Diflunisal hingegen nicht. Diclofenac und Diflunisal induzieren Apoptose und hemmen die Proliferation in Abhängigkeit der gewählten Zelllinie.

Abschließend ist eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Einflussebenen durch die beiden NSAIDs Diclofenac und Diflunisal dargestellt (Abbildung 32).

7. Zusammenfassung

Ein veränderter Zellmetabolismus ist wesentliches Charakteristikum von Tumorzellen und trägt zu Proliferation und Progression bei. Das in etwa 30% aller Tumore dysregulierte Onkogen *MYC* gilt als einer der zentralen Regulatoren des Glukose- und Glutamin-Stoffwechsels. Die Deregulation dieser metabolischen Wege stellt somit eine vielversprechende Zielstruktur für die Tumorthherapie dar.

Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAIDs) werden schon seit längerem mit anti-tumoraler Aktivität in Zusammenhang gebracht, wobei bisher COX-spezifische Effekte als Ursache gezeigt wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von *MYC* durch die NSAIDs Diclofenac und Diflunisal im Vergleich zu Acetylsalicylsäure analysiert.

Dabei wurde zunächst die Proteinexpression von *MYC* in einer Melanomzelllinie (Mellm), einer Prostatakarzinomzelllinie (PC3), einer Histiocytomzelllinie (U937) und einer Leukämiezelllinie (Jurkat) mit Hilfe von Western-Blot untersucht. Hierbei konnte sowohl bei steigenden Diclofenac- als auch bei steigenden Diflunisalkonzentrationen eine Hemmung der Proteinexpression von *MYC* in allen Zelllinien festgestellt werden. Eine Behandlung der Zellen mit Acetylsalicylsäure (ASS) zeigte dies jedoch nicht. Die Effekte auf Proteinebene sollten anschließend auch durch intrazelluläre Färbung von *MYC* mit Hilfe von direkt fluoreszenz-markierten Antikörpern untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Färbeprotokoll mit verschiedenen anti-*MYC* Antikörpern in Mellm und U937 etabliert. Dabei konnte in beiden Zelllinien *MYC* mittels intrazellulärer Färbung nachgewiesen werden. Als Vergleich wurden nicht-proliferierende Monozyten verwendet, die keine *MYC*-Expression zeigten. In weiteren Experimenten ist zu untersuchen, ob nach Behandlung mit NSAIDs immunzytochemisch eine veränderte Expression nachgewiesen werden kann.

Nachdem auf Proteinebene eine Hemmung der Expression von *MYC* festgestellt werden konnte, wurde auch die Regulation auf transkriptioneller Ebene untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Reporterkonstrukte kloniert, die unterschiedlich lange Bereiche um den Hauptpromotor von *MYC* enthielten. Nach Transfektion in die Zelllinie Mellm und Inkubation in An- und Abwesenheit von Diclofenac und Diflunisal wurde die Promotoraktivität mittels Luziferase-Assays getestet. Diclofenac supprimierte die Transkription signifikant, während Diflunisal keinen Einfluss zeigte. Die drei unterschiedlich großen Promotorregionen ließen keinen signifikanten Unterschied erkennen.

Da *MYC* entscheidend die Regulation von Proliferation und Apoptose beeinflusst, wurde des Weiteren analysiert, inwieweit Diclofenac und Diflunisal Apoptose in den untersuchten Zelllinien auslösen. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen wurde die Vitalität von Mellm und U937 nach Behandlung mit Diclofenac und Diflunisal getestet. Es konnte gezeigt werden, dass sich Diclofenac und Diflunisal bei

den behandelten Zelllinien unterschiedlich verhalten. Während bei Mellm nur durch die Kombination beider NSAIDs in den höchsten Konzentrationen wesentlich Apoptose induziert werden konnte, verringerten in U937 bereits die einzelnen NSAIDs in den höchsten Konzentrationen signifikant die Vitalität der Zellen. Die Kombination von Diclofenac und Diflunisal führte in beiden Zelllinien zur deutlich verstärkten Apoptose.

Die dargestellten Arbeiten deuten an, dass Diclofenac und Diflunisal das Onkogen *MYC* auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Während Diclofenac auf transkriptioneller Ebene und Proteinebene agiert, erreicht Diflunisal nur eine deutliche Hemmung der Proteinexpression. Die Tatsache, dass ASS keinen Effekt zeigt, lässt außerdem annehmen, dass es sich hierbei um Substanz-spezifische und COX-unabhängige Regulationsmechanismen handelt.

Insgesamt stellt die Beeinflussung von *MYC* durch NSAIDs einen vielversprechenden Ansatz für eine spezifische Tumorthherapie dar, sodass Diclofenac als interessante Substanz zur Unterstützung einer Tumorthherapie anzusehen ist.

8. Summary

Regulation and function of the onco-gene MYC by the non-steroidal anti-inflammatory drugs Diclofenac and Diflunisal

A metabolic switch is one of the main characteristics of cancer cells and contributes to their proliferation and progression. The onco-gene MYC - one of the major regulators of glucose and glutamine metabolism – is in ~ 30% of human cancers deregulated. It therefore represents a very promising target for cancer therapy.

For nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) anti-tumoral effects are discussed for some time. So far mainly COX-dependent mechanisms are shown. This paper analyses the regulation of MYC by two NSAIDs – Diclofenac and Diflunisal - in comparison to ASS.

First the protein expression of MYC was analyzed by western blotting in a human melanoma cell line (Mellm), a prostate carcinoma cell line (PC3), a human histiocytic lymphoma cell line (U937) and a T-cell leukemia cell line (Jurkat). The protein expression of MYC was inhibited by increasing concentrations of Diclofenac and Diflunisal in all cell lines. In contrast ASS showed no effect. A further method for analyzing effects on protein level is an intracellular staining by fluorescence-tagged antibodies. First a staining protocol had to be established for Mellm and U937. For both cell lines a positive staining could be observed whereas in non-proliferating monocytes without MYC expression no reaction appeared. The influence of NSAIDs on the expression remains to be investigated in further experiments.

Another point of interest was the transcriptional regulation by NSAIDs. Different constructs of variable length upstream the transcription start site were cloned and transfected into Mellm. The promotor activity was tested using the Dual-Luciferase-Reporter Assay System in presence and absence of Diclofenac and Diflunisal. Diclofenac significantly suppressed the promotor activity whereas Diflunisal showed no effect. There was no significant difference for the different lengths.

Furthermore MYC regulates proliferation and apoptosis. We therefore analyzed the influence of Diclofenac and Diflunisal on apoptosis by evaluating the vitality of Mellm and U937 cells after treatment by flow cytometric analyses (FACS). A different reaction for the two cell lines could be observed. Only the combination of both NSAIDs in the highest concentrations induced apoptosis in Mellm. For U937 also the single use of Diclofenac or Diflunisal in the highest concentration induced apoptosis significantly. The combination of both NSAIDs always showed a greater effect than the singular use.

This work shows an influence of Diclofenac and Diflunisal on the onco-gen MYC on different levels. Diclofenac suppresses the transcription and the protein expression whereas Diflunisal only affects the protein expression. The fact that ASS has no effect proposes a COX-independent mechanism.

In conclusion, MYC represents a very attractive target for specific cancer therapy and Diclofenac might be a promising anti-cancer drug supporting established therapies.

9. Literaturverzeichnis

- Amati, B, Alevizopoulos, K und Vlach, J. 1998.** MYC and the cell cycle. *Front Biosci.* 3. 1998, S. 250-68.
- Amati, B, et al. 1993.** The c-MYC protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J* 12(13). 1993, S. 5083-7.
- Arabi, A, et al. 2005.** c-MYC associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 7. 2005, S. 303-310.
- Askew, DS, et al. 1991.** Constitutive c-MYC expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6. 1991, S. 1915-22.
- Askew, DS, Ihle, JN und Cleveland, JL. 1993.** Activation of apoptosis associated with enforced MYC expression in myeloid progenitor cells is dominant to the suppression of apoptosis by interleukin-3 or erythropoietin. *Blood* 82(7). 1993, S. 2079-87.
- Ausserlechner, MJ, et al. 2004.** Cyclin D3 and c-MYC control glucocorticoid-induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Differ.* 11(2). 2004, S. 165-74.
- Bello-Fernandez, C, Packham, G und Cleveland, JL. 1993.** The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(16). 1993, S. 7804-8.
- Blackwood, EM und Eisenman, RN. 1991.** Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with MYC. *Science* 251(4998). 1991, S. 1211-7.
- Bode, BO, et al. 2002.** Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human heptoma and liver-derived cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283. 2002, S. 1062-1073.
- Bonnet, S, et al. 2007.** A mitochondria- K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11. 2007, S. 37-51.
- Buselmaier, W und Tariverdian, G. 2007.** *Humangenetik* 4. Auflage. s.l. : Springer Medizin Verlag, 2007.
- Cay, O, et al. 1992.** Inhibitory effect of 2-deoxy-D-glucose on liver tumor growth in rats. *Cancer Res.* 52. 1992, S. 5794-5796.
- Cecere, F, et al. 2010.** Diclofenac-Induced Apoptosis in the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: Possible Involvement of the Mitochondrial Superoxide Dismutase. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* ID 801726. 2010.
- Choy, H und Milas, L. 2003.** Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst* 95. 2003, S. 1440-1452.

- Cohen, DE und Prochownik, EV. 2006.** A Functional Hierarchy for c-Myc Target Genes? *Cell Cycle* 5:4. 2006, S. 392-393.
- Cornwall, GA, et al. 2001.** B-MYC, a proximal caput epididymal protein, is dependent on adrogenes and testicular factors for expression. *Biol Reprod.* 64(6). 2001, S. 1600-7.
- Coussens, LM und Werb, Z. 2002.** Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917). 2002, S. 860-7.
- Dalla-Favera, R, et al. 1982.** Human c-MYC onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(24). 1982, S. 7824-7.
- Dang CV, Semenza GL. 1999.** Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 24(2). 1999, S. 68-72.
- Dang, CV. 1999.** c-MYC Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Molecular and Cellular Biology.* 1999, S. 1-11.
- . 2012. MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149(1). 2012, S. 22-35.
- Dang, CV, et al. 2006.** The c-MYC target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16. 2006, S. 253-264.
- Dang, CV, et al. 2008.** The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8. 2008, S. 51-56.
- Dang, CV, Le, A und Gao, P. 2009.** MYC-induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities. *Clin. Cancer Res* 15(21). 2009, S. 6479-83.
- DeBerardinis, RJ, et al. 2008.** Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development* 18. 2008, S. 1-8.
- Dellas, Claudia. 2006.** *Crashkurs Pharmakologie.* München : Elsevier, Urban & Fischer, 2006.
- Denker, D, Winzer, KJ und Hauptmann, S. 2004.** Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 4. 2004, S. 428-433.
- Denkert, C, et al. 2006.** Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer: association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Mod.Pathol* 19. 2006, S. 1261-1269.
- Dwarakanath, B und Jain, V. 2009.** Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose for improving cancer therapy. *Future Oncol.* 5(5). 2009, S. 581-5.
- Eastman-Reks, SB und Vedeckis, WV. 1986.** Glucocorticoid inhibition of c-MYC, c-myb, and c-Ki-ras expression in a mouse lymphoma cell line. *Cancer Res.* 46(5). 1986, S. 2457-62.
- Ehlert, JE und Kubbutat, MHG. 2001.** Apoptosis and Its Relevance in Cancer Therapy. *Onkologie* 24. 2001, S. 433-440.
- Eiler, M und Eisenmann, RN. 2008.** MYC's broad reach. *Genes Dev* 22. 2008, S. 2755-66.
- Eischen, CM, et al. 2001.** Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 21. 2001, S. 5063-5070.
- Elwood, PC, et al. 2009.** Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet* 373(9671). 2009, S. 1301-9.

- Emoto, A, et al. 2002.** H(+)-linked transport of salicylic acid, an NSAID, in the human trophoblast cell line BeWo. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282(5). 2002, S. C1064-C1075.
- Evan, GI, et al. 1992.** Induction of apoptosis in fibroblasts by c-MYC protein. *Cell* 69 (1). 1992, S. 119-28.
- Facchini, LM und Penn, LZ. 1998.** The molecular role of MYC in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.*12(9). 1998, S. 633-51.
- Felsher, DW. 2010.** MYC Inactivation Elicits Oncogene Addiction through Both Tumor Cell-Intrinsic and Host-Dependent Mechanisms. *Genes Cancer* 1(6). 2010, S. 597-604.
- Fischer, G, et al. 1994.** Lymphoma models for B cell activation and tolerance. X. Anti- μ -mediated growth arrest and apoptosis of murine B cell lymphomas is prevented by the stabilization of myc. *M Exp Med.* 179(1). 1994, S. 221-8.
- Fuhrmann, G, et al. 1999.** The MYC dualism in growth and death. *Mutat Res.* 437(3). 1999, S. 205-17.
- Gabay, M, Li, Y und Felsher, DW. 2014.** MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2;4(6). 2014.
- Gatenby, RA und Gillies, RJ. 2004.** Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat.Rev.Cancer* 4. 2004, S. 891-899.
- Gillett, CE und Barnes, DM. 1998.** Demystified Cell Cycle. *Molecular Pathology* 51(6). 1998, S. 310-6.
- Gomez-Roman, N, et al. 2006.** Activation by c-Myc of transcription by RNA polymerases I, II and III. *Biochem Soc Symp* 73. 2006, S. 141-54.
- Gomez-Roman, N, et al. 2003.** Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-MYC. *Nature* 421. 2003, S. 290-294.
- Gottfried, E, et al. 2013.** New aspects of an old drug--diclofenac targets MYC and glucose metabolism in tumor cells. *PLoS One* 8(7). 2013.
- Gottfried, E, et al. 2011.** Pioglitazone modulates tumor cell metabolism and proliferation in multicellular tumor spheroids. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67(1). 2011, S. 117-26.
- Grandori, C, et al. 2005.** c-Mc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by TNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 7. 2005, S. 311-8.
- Haan, C und Behrmann, I. 2007.** A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *Journal of Immunological Methods* 318. 2007, S. 11-19.
- Hanahan, D und Weinberg, RA. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5). 2011, S. 646-74.
- . 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1). 2000, S. 57-70.

- Hanif, R, et al. 1996.** Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 52. 1996, S. 237-245.
- Harrington, EA, et al. 1994.** c-MYC-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 13(14). 1994, S. 3286-95.
- Hermeking, H. 2003.** The MYC Oncogene as a Cancer Drug Target. *Current Cancer Drug Targets* 3. 2003, S. 163-175.
- Hoferová, Z, et al. 2002.** The effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs ibuprofen, flurbiprofen, and diclofenac on in vitro and in vivo growth of mouse fibrosarcoma. *Cancer Invest.* 20(4). 2002, S. 490-8.
- Hoffman, B und Liebermann, DA. 2008.** Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 27(50). 2008, S. 6462-72.
- Jaakkola, P, et al. 2001.** Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292(5516). 2001, S. 468-72.
- Jain, M, et al. 2002.** Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297. 2002, S. 102-104.
- Johnsen, JI, et al. 2004.** Cyclooxygenase-2 is expressed in neuroblastoma, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis and inhibit tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 64(20). 2004, S. 7210-7215.
- Keath, EJ, Caimi, PG und Cole, MD. 1984.** Fibroblast lines expressing activated c-MYC oncogenes are tumorigenic in nude mice and syngeneic animals. *Cell* 39. 1984, S. 330-348.
- Landau, BR, et al. 1958.** Certain metabolic and pharmacologic effects in cancer patients given infusions of 2-deoxy-D-glucose. *J. Natl Cancer Inst.* 21. 1958, S. 485-494.
- Larsson, LG und Henriksson, MA. 2010.** The Yin and Yang functions of the MYC oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Exp Cell Res.* 316(8). 2010, S. 1429-37.
- Laurenti, E, Wilson, A und Trumpp, A. 2009.** MYC's other life: stem cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol.* 21(6). 2009, S. 844-54.
- Le, A, et al. 2010.** Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107. 2010, S. 2037-2042.
- Levine, AJ und Puzio-Kuter, AM. 2010.** The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science* 330(6009). 2010, S. 1340-4.
- Li, Y, Casey, SC und Felsher, DW. 2014.** Inactivation of MYC reverses tumorigenesis. *J Intern Med.* 2014.
- Liggett, JL, et al. 2014.** Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase-independent targets. *Cancer Lett.* 346(2). 2014, S. 217-24.

- Linder-Horowitz, M, Know, WE und Morris, HP. 1969.** Glutaminase activities and growth rates of rat hepatomas. *Cancer Res.* 29. 1969, S. 1195-1199.
- Lodish, H, et al. 2001.** *Molekulare Zellbiologie.* s.l. : Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage, 2001.
- Lotterman, CD, Kent, OA und Mendell, JT. 2008.** Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle* 7. 2008, S. 2493-2499.
- Lüscher, B. 2001.** Function and regulation of the transcription factors of the MYC/Max/Mad network. *Gene* 277(1-2). 2001, S. 1-14.
- Lundholm, K, et al. 1994.** Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors. *Cancer Res* 54. 1994, S. 5602-5606.
- Maschek, G, et al. 2004.** 2-deoxy-D.glucose increases the efficacy of adriaMYCin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res.* 64(1). 2004, S. 31-4.
- Mateyak, MK, et al. 1997.** Phenotypes of c-MYC-deficient rat fibroblastes isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ.* 8. 1997, S. 1039-1048.
- Mathupala, SP, Parajuli, P und Sloan, AE. 2004.** Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an in vitro study. *Neurosurgery* 55. 2004, S. 1410-1419.
- Matoba, S, et al. 2006.** p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312(5780). 2006, S. 1650-3.
- Mayorek, N, Naftali-Shani, N und Grunewald, M. 2010.** Diclofenac Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer by Modulation of VEGF Levels and Arginase Activity. *PLoS ONE* 5(9). 2010.
- Mazurek, S und Eigenbrodt, E. 2003.** The tumor metabolome. *Anticancer Res.*23. 2003, S. 1149-1154.
- McCormack, JE, et al. 1984.** Specific regulation of c-MYC oncogene expression in a murine B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81. 1984, S. 5546-50.
- McGuffie, EM, et al. 2000.** Antigenic and Antiproliferative Effects of a c-MYC-Targeting Phosphorothioate Triple Helix-Forming Oligonucleotide in Human Leukemia Cells. *Cancer Res.* 60. 2000, S. 3790-3799.
- Moreno-Sánchez, R, et al. 1999.** Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. *Biochem Pharmacol.* 57(7). 1999, S. 743-52.
- Nesbit, C, Tersak, JM und Prochownik, EV. 1999.** MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18. 1999, S. 3004-16.
- Pelengrais, S, Khan, M und Evan, G. 2002.** c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer.* 2(10). 2002, S. 764-76.

- Russo, P, et al. 2003.** c-myc down-regulation induces apoptosis in human cancer cell lines exposed to RPR-115135 (C31H29NO4), a non-peptidomimetic farnesyltransferase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 304(1). 2003, S. 37-47.
- Savino, M, et al. 2011.** The action mechanism of the Myc inhibitor termed Omomyc may give clues on how to target Myc for cancer therapy. *PLoS One*. 6(7). 2011.
- Schlosser, I, et al. 2003.** A role for c-MYC in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* 31. 2003, S. 6148-56.
- Schmidt, S, et al. 2004.** Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ*. Jul 2004, S. S45-55.
- Schreinemacher, D und Everson, M & RB. 1994.** Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology* 5. 1994, S. 138-146.
- Schuhmacher, M, et al. 1999.** Control of cell growth by c-MYC in the absence of cell division. *Curr Biol*. 9(21). 1999, S. 1255-8.
- Semenza, GL. 2003.** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(10). 2003, S. 721-32.
- Shachaf, CM, et al. 2008.** Genomic and proteomic analysis reveals a threshold level of MYC required for tumor maintenance. *Cancer Res*. 68(13). 2008, S. 5132-42.
- Sheinets, D und Bishop, JM. 1979.** DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol* 31. 1979, S. 514-521.
- Sheiness, D, Fanshier, L und Bishop, JM. 1978.** Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J virol* 28 (2). 1978, S. 600-10.
- Shen, H, et al. 1998.** Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58. 1998, S. 362-366.
- Shi, Y, et al. 1992.** Role for c-MYC in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257(5067). 1992, S. 212-4.
- Shim, H, et al. 1997.** c-MYC transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94. 1997, S. 6658-6663.
- Singh, D, et al. 2005.** Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol*. 181(8). 2005, S. 507-14.
- Steinmeyer, J. 2000.** Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res*. 2(5). 2000, S. 379-85.
- Sugiyama, A, et al. 1989.** Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(23). 1989, S. 9144-9148.

- Tamai, I, et al. 1995.** Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214. 1995, S. 482-489.
- Tennant, DA, Durán, RV und Gottlieb, E. 2010.** Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10(4). 2010, S. 267-77.
- Thompson, EB. 1998.** The many roles of c-MYC in apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60. 1998, S. 575-600.
- Thompson, EB, et al. 1995.** Glucocorticoid antagonist RU486 reverses agonist-induced apoptosis and c-MYC repression in human leukemic CEM-C7 cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 761. 1995, S. 261-77.
- Trevor, AJ, Katzung, BG und Masters, SB. 2008.** *Pharmacology Examination & Board Review.* s.l. : Mc Graw Hill Medical, 2008.
- Uyttenhove, D, et al. 2003.** Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine-2,3-dioxygenase. *NatMed.* 9. 2003, S. 1269-1274.
- Valle, BL, et al. 2013.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells. *PLoS One* 8(4). 2013.
- Vander Heiden, MG, Cantley, LC und Thompson, CB. 2009.** Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324(5930). 2009, S. 1029-33.
- Vennstrom, B, et al. 1982.** Isolation and characterization of c-MYC, a cellular homolog of the oncogen (v-MYC) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol.* 42(3). 1982, S. 773-9.
- Vermeulen, K, van Bockstaele, DR und Berneman, ZN. 2005.** Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology Volume 84, Issue 10.* 2005, S. 627-639.
- Vita, M und Henriksson, M. 2006.** The MYC oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in Cancer Biology* 16. 2006, S. 318-330.
- Walenta, S, et al. 2000.** High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60. 2000, S. 916-21.
- Wang, X, et al. 2012.** STAT3 inhibition, a novel approach to enhancing targeted therapy in human cancers. *Int J Oncol.* 41(4). 2012, S. 1181-91.
- Warburg, O. 1956.** On the origin of cancer cells. *Science* 123. 1956, S. 309-314.
- Warner, TD und Mitchell, JA. 2004.** Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* 18(7). 2004, S. 790-804.
- Wise, DR, et al. 2008.** MYC regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamin addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105. 2008, S. 18782-18787.
- Wood, AC, et al. 1994.** Changes in c-MYC expression and the kinetics of dexamethasone-induced programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukaemia cells. *Br. J. Cancer* 69. 1994, S. 663-69.

- Yuneva, M, et al. 2007.** Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 178. 2007, S. 93-105.
- Zhang, C, et al. 2011.** Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(39). 2011, S. 16259-64.
- Zhou, H, et al. 2010.** NSAID sulindac and its analog bind RXRalpha and inhibit RXRalpha-dependent AKT signaling. *Cancer Cell* 17. 2010, S. 560-573.
- Zhuang, L, et al. 2007.** Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod. Pathol.* 20. 2007, S. 416-426.
- Zindy, F, et al. 1998.** MYC signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 12. 1998, S. 2424-2433.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift