

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. F. HOFSTÄDTER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



**Die Rolle von CYLD als Inhibitor des NF- κ B Signalweges in der
Entstehung von kolorektalem Karzinom, hepatozellulärem Karzinom und
malignem Melanom**

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Ursula Bumes

2008

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff

2. Berichterstatter:

PD Dr. Claus Hellerbrand

Tag der mündlichen Prüfung:

27.02.2009

Diese Arbeit entstand unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff am Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät der Universität Regensburg.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. F. Hofstädter für die Möglichkeit diese Dissertation in einem Labor des Instituts für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg durchzuführen.

Herrn Fässler vom MPI Martinsried, der das CYLD-Plasmid zur Verfügung stellte.

Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff für die ausgezeichnete und herzliche Betreuung dieser Dissertation und für Motivation und Hilfe in Krisen.

Frau Dr. Ina Poser für die geduldige Einarbeitung in Methoden und die Unterstützung bei vielen Problemen.

Frau Dr. Silke Kuphal für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils und dem Abfassen dieser Arbeit.

Frau Sybilla Lodermeier im Besonderen für die ausgezeichnete Erstellung der verwendeten RNA.

Allen Mitarbeitern der AG Bosserhoff, die mich herzlich aufgenommen haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	S. 11
1.1	Die untersuchten Tumorentitäten	S. 12
1.1.1	Das kolorektale Karzinom	S. 12
1.1.2	Das hepatozelluläre Karzinom	S. 15
1.1.3	Das maligne Melanom	S. 16
1.2	CYLD	S. 19
1.2.1	Das Protein CYLD	S. 19
1.2.2	Die Funktion von CYLD	S. 20
1.2.2.1	Der NF- κ B Signalweg und CYLD	S. 21
1.2.2.1.1	Der klassische NF- κ B Signalweg	S. 22
1.2.2.1.2	Die Regulation von CYLD im klassischen NF- κ B Signalweg	S. 24
1.2.2.1.3	Der alternative NF- κ B Signalweg	S. 25
1.2.2.1.4	NF- κ B Aktivierung in Keratinozyten	S. 26
1.2.2.2	CYLD in anderen Signalwegen	S. 27
1.2.2.2.1	CYLD im JNK-Signalweg	S. 27
1.2.2.2.2	CYLD und der Kalziumkanal TRPA	S. 28
1.2.2.2.3	CYLD und BAF 57	S. 28
1.2.3	Krankheiten, die mit CYLD assoziiert sind	S. 29
2	Materialien und Methoden	S. 31
2.1	Materialien	S. 31
2.1.1	Allgemeine Materialien	S. 31
2.1.2	Geräte	S. 33
2.1.3	Organismen	S. 35
2.1.4	Säugerzelllinien	S. 35
2.1.5	Vektoren	S. 38
2.1.6	Oligonukleotide	S. 40
2.2	Medien, Antibiotika und Puffer	S. 41

2.2.1	Medien zur Anzucht von <i>E.coli</i> und Säugerzellkulturen	S. 41
2.2.2	Antibiotika	S. 41
2.2.3	Puffer und Lösungen	S. 41
2.3	Arbeiten mit <i>Eschecheria coli</i>	S. 43
2.3.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	S. 43
2.3.2	Transformation von <i>E.coli</i>	S. 43
2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA	S. 44
2.4	Molekularbiologische Methoden	S. 45
2.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	S. 45
2.4.2	Gelelektrophorese von DNA	S. 45
2.4.3	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	S. 46
2.4.4	Isolierung und Reinigung von PCR-Produkten (PEG-Fällung)	S. 47
2.4.5	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	S. 47
2.4.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	S. 47
2.4.7	RT-PCR	S. 49
2.4.8	Quantitative Echtzeit PCR	S. 50
2.4.9	Sequenzierung	S. 51
2.4.10	RNA-Isolation aus Säugerzellen	S. 52
2.5	Zellkulturmethoden	S. 53
2.5.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	S. 53
2.5.2	Luciferase-Reportergenassay	S. 53
3	Ergebnisse	S. 55
3.1	NF- κ B Aktivität in Tumorzellen	S. 55
3.2	Etablierung von PCR und quantitativer Echtzeit PCR zur Analyse von CYLD	S. 56
3.3	Vergleich der CYLD-Expression auf mRNA-Ebene	S. 57
3.3.1	Normalzellen	S. 57
3.3.2	Normalgewebereihe	S. 58

3.3.3	Kolon und kolorektales Karzinom	S. 59
3.3.4	Hepatozyten und hepatozelluläres Karzinom	S. 61
3.3.5	Melanozyten und Melanom	S. 66
3.4	Regulation der NF- κ B Aktivität von Tumorzellen durch CYLD	S. 68
3.4.1	Kontrolle der Transfektion mit dem CYLD-Plasmid auf RNA-Ebene	S. 68
3.4.2	HCT116	S. 69
3.4.3	HepG2	S. 71
3.4.4	Mel Im	S. 72
4	Diskussion	S. 73
4.1	CYLD im Normalgewebe	S. 74
4.2	CYLD im Tumorgewebe	S. 75
4.2.1	Die dosisabhängige Hemmung der NF- κ B Aktivität durch CYLD	S. 76
4.2.2	Die Regulation von CYLD in Abhängigkeit von NF- κ B	S. 77
4.3	Ausblick	S. 78
5	Zusammenfassung	S. 81
6	Abbildungsverzeichnis	S. 83
7	Abkürzungsverzeichnis	S. 85
8	Literatur	S. 91
9	Lebenslauf	S.101

1. Einleitung

Seit Jahren nehmen in Deutschland Tumorerkrankungen nach Herz- und Kreislauferkrankungen Platz 2 in der Todesursachenstatistik ein (Böcker et al., 2001, S.163). Im Jahr 1997 wurden 27% der Todesfälle bei Männern und 22,2% bei Frauen durch eine Krebserkrankung verursacht (Hiddemann W. et al., 2004, S.52). Die Aufklärung der Mechanismen der molekularen Onkogenese gehört infolgedessen zu den Schwerpunkten moderner Forschung.

Unter einem Tumor versteht man eine „abnorme Gewebemasse, die durch Vermehrung von körpereigenen entarteten Zellen entsteht“ (Böcker et al., 2001, S.164). Es wird zwischen benignen und malignen Tumoren unterschieden. Letztere zeichnen sich durch invasives Wachstum, viele Zelltypen, unreifes Gewebe und Metastasierung aus (Böcker et al., 2001, S.164f).

Die Herkunft des Gewebes ermöglicht außerdem eine Klassifizierung nach Phänotypen. Dabei wird eine Unterscheidung in epitheliale und mesenchymale Tumoren, Keimzelltumoren und Tumoren des embryonalen Gewebes getroffen. Während epitheliale Tumore ihren Ursprung in Ekto- und Entoderm haben, stammen mesenchymale Tumore vom Mesoderm ab. Teratome entwickeln sich aus pluripotenten Keimzellen und enthalten daher Bestandteile aller drei Keimanlagen. Infolge einer Fehldifferenzierung während der Organentwicklung kann es zu embryonalen Tumoren kommen. Eine Sonderform sind neuroendokrine Tumore, die meist dem epithelialen Phänotyp angehören und von endokrinen Zellen verschiedener Organe abstammen. Neuroektodermale Tumore stammen von Gliazellen oder Melanozyten ab und zeigen daher entweder einen glialen oder mesenchymalen Phänotyp (nach Böcker et al., 2001, S.193f).

Die monoklonale Entwicklungstheorie geht davon aus, dass der Ursprung eines Tumors in der Transformation einer einzigen Zelle liegt, deren Proliferation zusammen mit weiteren genetischen Veränderungen schrittweise zum malignen Typus führt. Dazu tragen insbesondere Mutationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen, und Caretakergenen bei. Durch eine Aktivierung von Protoonkogenen wird das Wachstum der Zelle gefördert, während durch einen Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgenes die Hemmung der Proliferation eingeschränkt wird. Caretakergene sind für Reparatur der DNA und Schutz vor Mutationen zuständig, so dass ihr Verlust zu einer erhöhten Mutationsrate führt (Vogelstein B. et al., 2004). Eine wichtige Rolle für Proliferation und Metastasierung eines Tumors spielt auch die Umgebung. Zum metabolischen Microenvironment des Tumors zählen die

Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, der pH inner- und außerhalb der Tumorzellen und der transvaskuläre und interstitielle Transport (Molls M. et al., 1998, S.2).

1.1 Die untersuchten Tumorentitäten

Diese Dissertation befasst sich mit der Rolle des Proteins CYLD (=cylindromatosis gene) in drei ausgewählten Tumorentitäten. Das kolorektale Karzinom nimmt seinen Ursprung ebenso wie das hepatozelluläre Karzinom aus dem Entoderm. Beide Tumorentitäten zählen demzufolge zu den epithelialen Tumoren. Das maligne Melanom hingegen leitet sich von der Neuralleiste ab und ist damit ein neuroektodermaler Tumor.

1.1.1 Das kolorektale Karzinom

Im Jahr 2000 befanden sich Tumore des Darms an zweiter Stelle der Krebsneuerkrankungen in Deutschland. 16,3% der malignen Neubildungen bei Männern und 17,6% bei Frauen waren in Kolon, Sigmoid oder Anus lokalisiert. Tumore des Darms stellten mit 12,5% bei Männern und 15,3% bei Frauen zudem die zweithäufigste Ursache aller Krebssterbefälle dar (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004, S.10).

Histologisch wird das kolorektale Karzinom in Adenokarzinom, das in 85-90% aller Fälle auftritt, muzinöses Adenokarzinom (10%) und Siegelringzellkarzinom (1%) unterteilt. Seltener findet sich das Plattenepithelkarzinom, adenosquamöses, kleinzelliges oder undifferenziertes Karzinom (Hiddemann W. et al., 2004, S.881).

Ein Großteil der kolorektalen Karzinome ist im Enddarm lokalisiert: 50% der Tumore haben ihren Ursprung im Rektum und 20% im Kolon sigmoideum. Das Kolon descendens ist in nur 7% und das Kolon transversum in 8% der Fälle betroffen, während das Kolon ascendens in 15% Sitz des kolorektalen Karzinoms ist. Dieses Phänomen wird als „shift to the right“ bezeichnet (Hiddemann W. et al., 2004, S.881f).

Etwa 15% der kolorektalen Karzinome besitzen aufgrund einer Keimbahnmutation eine hereditäre Komponente. Häufig treten die Familiäre Adenomatosis Coli, bei der eine Mutation des APC-Gens (=Adenomatosis Polyposis Coli Gene) vorliegt, und das hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom auf, das durch einen Defekt von Mismatch-Reparaturgenen gekennzeichnet ist (Czerwenka K. et al., 2003, S.181).

Die Entstehung des sporadischen kolorektalen Karzinoms erfolgt nach dem Prinzip der Adenom-Karzinom-Sequenz. Aus einem Adenom kann sich im Verlauf von Jahren durch Akkumulation schrittweise stattfindender Mutationen von mindestens fünf Genen ein Karzinom entwickeln (Hiddemann W. et al., 2004, S. 882). Die Größe eines Polypen korreliert eindeutig mit der Wahrscheinlichkeit, dass bereits ein Karzinom besteht. Während bei einer Größe von 1 bis 2 cm nur in 5,7 bis 9,5% der Fälle ein Karzinom vorliegt, beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass sich histologisch ein Karzinom zeigt, bei einem Polypen größer 4 cm 62,5 bis 78% (Hiddemann W. et al., 2004, S.881).

Im Jahr 1990 haben Fearan und Vogelstein das Modell der molekularen Onkogenese des kolorektalen Karzinoms durch eine Abfolge verschiedener genetischer Mutationen entwickelt (Arends J.W., 2000). Schon damals war die Beteiligung der Proteine APC, k-Ras (=Kirsten-Sarcoma Virus), DCC (=Deleted in Colorectal Cancer) und p53 (=Protein 53) bekannt. Wie Abbildung 1-1 zeigt, sind seither weitere Komponenten und Zusammenhänge im gatekeeper pathway gefunden worden. Häufig liegt bereits vor Auftreten eines Adenoms eine Mutation des k-Ras Onkogens vor, die zwar alleine noch kein gesteigertes Zellwachstum auslöst, jedoch im Verbund mit weiteren Mutationen die Onkogenese fördern kann. K-Ras nimmt Einfluss auf verschiedene onkogenetisch bedeutsame Proteine wie p19^{arf} (=Protein 14, alternative reading frame), p27^{kip1} (= CDKN1B = cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), cyclin D1, SMAD2-4 (=Mothers against Depentaplegic Drosophila) und c-myc (=Myc =Myelocystomatosis Virus Homologue Protein). Der Beginn der Karzinogenese wird durch eine Störung des WNT-Signalweges (=Wingless-Type MMTV Integration Site Family) verursacht. Häufig ist das „Gatekeeper“-Molekül APC betroffen, aber auch Mutationen in β -Catenin oder Conductin können zu einer vermehrten Transkription des Onkogens c-myc führen. Durch eine Mutation im TGF β -Signalweg (=transforming growth factor-beta), der den Zellzyklus und auch c-myc hemmt und zur zellulären Differenzierung führt, wird die Entwicklung eines kleinen zu einem größeren Adenom gefördert. Eine Mutation des Proteins SMAD-4 (=DPC4 = Deleted in Pancreatic Cancer), welche zu einer verstärkten Hemmung von TGF β führt, kann beispielsweise in 6-30% aller kolorektalen Karzinome gefunden werden. Eine p53 Mutation bildet dann die Grundlage für eine Anhäufung verschiedener weiterer genetischer Veränderungen, die zur Genominstabilität führen und den Übergang in ein Karzinom ermöglichen (nach Arends J.W., 2000). Weitere Moleküle wie DCC, MCC (=mutated in colon cancer) und Nm32 (=Not in Metastasis) und Störungen in Regulationsmechanismen, wie etwa der DNA-Methylierung, können auch an der Onkogenese des kolorektalen Karzinoms beteiligt sein (Hiddemann W. et al., 2004, S.882f).

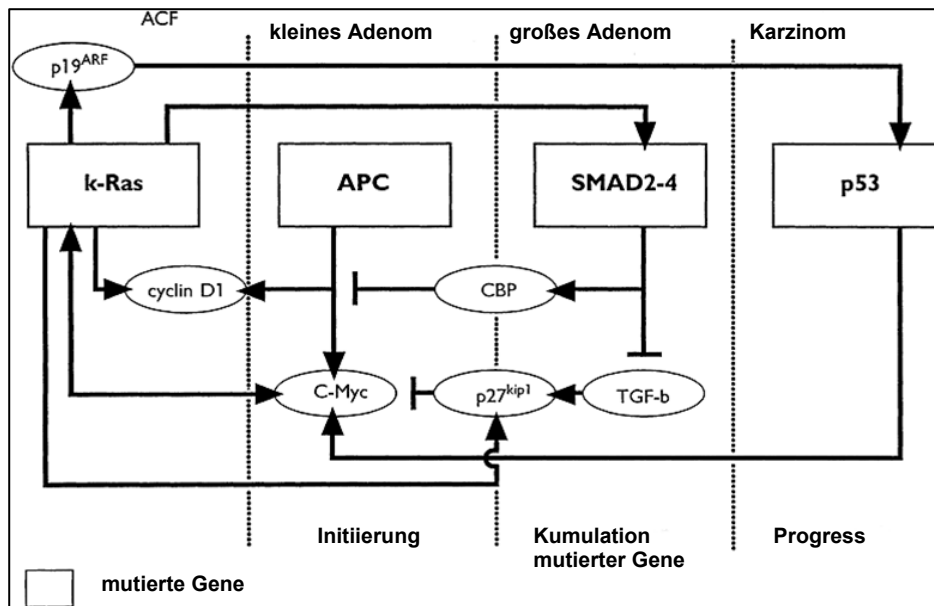


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Adenom-Karzinom Sequenz des kolorektalen Karzinoms (nach Arends J. W., 2000, S.414)

Neben dem „gatekeeper pathway“ ist ein „caretaker pathway“ bekannt, der alternativ zum kolorektalen Karzinom führen kann. Dabei stehen Mutationen von „mismatch-repair“-Genen, wie beispielsweise msh_2 (=MutS Human Homolog 2), mlh_1 (=Mut L (E.coli) Human Homolog 1), pms_2 (=Postmeiotic Segregation Increased), pms_1 , msh_3 und msh_6 , im Vordergrund. Da diese Gene Basenfehlpaarungen bei der Replikation beheben, hat ihr Ausfall eine erhöhte Wahrscheinlichkeit neuer Mutationen zur Folge (Hiddemann W. et al., 2004, S.883f).

„Gatekeeper“ und „caretaker pathway“ sind jedoch nicht zwei isolierte Wege zum kolorektalen Karzinom, sondern weisen Überschneidungsbereiche auf. Andere Möglichkeiten der Onkogenese des kolorektalen Karzinoms sind in Ansätzen bekannt und werden weiter untersucht. Dabei werden immer wieder neue Mutationen gefunden, die auch an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms beteiligt sind.

1.1.2 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom, ein maligner Tumor mit hepatozellulärer Differenzierung, macht etwa 90% aller primären Leberkarzinome aus (Böcker et al., S.736). Während in Europa und der USA die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms 1-3 Fälle/100000 Einwohner und Jahr beträgt, findet man in Afrika und Südostasien 50-150 Fälle/100000 Einwohner und Jahr. Damit ist das hepatozelluläre Karzinom mit mehr als 1 Million Erkrankungsfälle pro Jahr weltweit die fünfthäufigste maligne Neubildung, zugleich aber die dritthäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen (Czerwenka K. et al., 2003, S.277, Block T. M. et al., 2003).

Verschiedene Faktoren, die zu einer chronischen Leberschädigung führen, beeinflussen die Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms. In etwa 53% der Fälle ist das Hepatitis B Virus und in 25% das Hepatitis C Virus an der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms beteiligt (Block T. M. et al., 2003). In 22% spielen andere Faktoren wie Aflatoxin, alkoholtoxische Leberschädigung oder Stoffwechselerkrankungen eine Rolle in der Karzinogenese.

Eine chronische Leberschädigung ist häufig Folge einer chronischen Virushepatitis, die in 5-10% der HBV (= Hepatitis-B-Virus) und 50-80% der HCV (= Hepatitis-C-Virus) Infektionen entsteht (Böcker et al., S.708). Da in Afrika und Südostasien bis zu 15% der Bevölkerung HBV Carrier sind im Vergleich zu 0,1-0,5% in Mittel- und Nordeuropa, tritt das hepatozelluläre Karzinom dort besonders häufig auf (Böcker et al., 2001, S.711, 736). Eine chronische Infektion mit HBV erhöht das Risiko eines hepatozellulären Karzinoms um das 400fache gegenüber einem gesunden Kollektiv (Böcker et al., 2001, S.734f). Beim Hepatitis-B-Virus wurden außer der chronischen Leberschädigung weitere Mechanismen beobachtet, welche zur Onkogenese des hepatozellulären Karzinoms beitragen können. Sehr häufig findet eine ungezielte Integration von HBV DNA in das zelluläre Genom statt, wodurch eine erhöhte genomische Instabilität verursacht wird (Czerwenka K. et al., 2003, S.278). Das HBV Protein HBx fungiert außerdem als Transkriptionsfaktor für verschiedene intrazelluläre Proteine, wie NF- κ B und andere zelluläre Wachstumsfaktoren, die am Prozess der Onkogenese beteiligt sein können (Waris G. et al., 2003). Beim HCV scheinen sowohl virale Genprodukte als auch ein verstärkter Turnover der infizierten Hepatozyten an der Karzinogenese beteiligt zu sein. Das HCV core protein verursacht einen erhöhten NF- κ B Level in infizierten Zellen (Block T. M. et al., 2003). Sowohl HBV als auch HCV können oxidativen Stress in der Zelle auslösen und damit eine Veränderung der intrazellulären Signalwege bewirken (Waris G. et al., 2003).

In den Industriestaaten entstehen 95% der hepatozellulären Karzinome in einer zirrhotischen Leber. Bei Vorliegen einer Leberzirrhose besteht eine jährliche Wahrscheinlichkeit von 3-5% ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln (Hiddemann W. et al., 2004, S.942). Die Leberzirrhose ist häufig alkoholtoxisch bedingt, kann aber auch im Rahmen von Stoffwechselerkrankungen, wie etwa Hämochromatose oder α_1 -Antitrypsin Mangel, auftreten (Hiddemann W. et al., 2004, S.943).

Ein Metabolit des Mykotoxin Aflatoxin B₁ hat mutagenes Potential und kann zu einer p53-Hot-spot-Mutation führen, die besonders häufig bei hepatozellulären Karzinomen in Ostasien und Subsahara-Afrika beobachtet wird. Charakteristisch für diese Gebiete ist nicht nur die Durchseuchung mit HBV, sondern auch eine hohe Kontamination der Nahrungsmittel mit Aflatoxin B₁ (Hiddemann W. et al., 2004, S.943).

1.1.3 Das maligne Melanom

Im Jahr 2000 wurden knapp 2% aller bösartigen Neubildungen und 1% aller Krebstodesfälle in Deutschland durch das maligne Melanom verursacht. Damit haben sich die Erkrankungsfälle in Deutschland seit den 70er Jahren fast vervierfacht (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004, S.44). Dieser Trend wird weltweit beobachtet. Die Inzidenz des malignen Melanoms verdoppelt sich in der weißen Bevölkerung seit Beginn des 19. Jahrhunderts alle 12-15 Jahre (Hiddemann W. et al., 2004, S.1554). Es konnte gezeigt werden, dass eine intermittierende Belastung mit hoher Sonnenexposition, wie etwa bei Urlaubsreisen in südliche Regionen, mit einer erhöhten Melanominzidenz assoziiert ist. Auch die Zahl der Sonnenbrände unabhängig vom Lebensalter führt zu einer Zunahme der Melanominzidenz. Hingegen scheint eine regelmäßige Belastung im Rahmen der Berufstätigkeit eher zu einer Abnahme der Inzidenz des malignen Melanoms zu führen. Eventuell führt die regelmäßige Sonnenexposition zu einer Schutzreaktion der Haut (Elwood J. M., et al., 1997). Neben dem Hauttypus spielt auch die geographische Position eine Rolle bei der Melanominzidenz. In Australien, einem Kontinent mit hoher UV-Belastung, treten 43 maligne Melanome je 100000 Einwohner auf, während 10-20 Fälle in gemäßigten Breiten und bei weißer Bevölkerung üblich sind (Hiddemann W. et al., 2004, S.1554). In Punta Arenas, Chile, konnte im Zeitraum von 1993-2000 ein Anstieg der Inzidenz des malignen Melanoms um 66% gegenüber den Jahren 1987-1993 beobachtet werden. In diesem Zeitraum stieg die jährliche Zahl der Tage, an denen das

antarktische Ozonloch die Stadt umfasste, und in Korrelation damit die UV-B Strahlung an. Dies führte zu vermehrt auftretenden Sonnenbränden an den exponierten Tagen, denen mit einer zeitlichen Latenz eine erhöhte Inzidenz von Hauttumoren, insbesondere dem malignem Melanom, folgte (Abarca J.F. et al., 2002).

Ursprung des Melanoms sind Melanozyten, die überwiegend zwischen Keratinozyten entlang der Basalmembran im Stratum basale der Epidermis lokalisiert sind. Hauptaufgabe der Melanozyten ist die Produktion des Pigments Melanin, das von den umgebenden Keratinozyten aufgenommen wird und diese vor Schädigungen durch Sonnenlicht schützt (Junqueira L. et al., 2002, S.316). Die Melanozytenzahl ist unabhängig von Geschlecht und Rasse bei allen Menschen gleich; in der Hüftregion sind beispielsweise 1000 Melanozyten je mm^2 untergebracht (Junqueira L. et al., 2002, S.316).

Mehr als 90% der Melanome entwickeln sich primär auf der Haut; es werden jedoch auch Tumore im Bereich der Dermis, der Schleimhäute, der Leptomeningen, der Uvea und der Retina des Auges sowie der Cochlea und des vestibulären Labyrinths des Innenohres gefunden (Garbe C. et al., 1997, S.247). In etwa 60 Prozent entsteht das Melanom der Epidermis auf der Basis eines Nävuszellnävus; jeweils zu 20 Prozent bildet ein Lentigo maligna oder unveränderte Haut die Grundlage (Bühling K.J. et al., 2000, S.242). Meist beginnt der Tumor in horizontale Richtung zu wachsen und breitet sich dann in einem zweiten Schritt in die Vertikale aus. Frühzeitig werden Satellitenmetastasen in der Umgebung und später auch Fernmetastasen gebildet.

Mit über der Hälfte der Fälle stellt das superfiziell spreitende Melanom (=SSM) den häufigsten Subtyp dar, der in einem medianen Alter von 51 Jahren am frühesten von allen Unterformen auftritt. Das SSM ist eine makulöse Pigmentläsion, die teilweise exzentrische papulöse Anteile aufweisen kann und charakteristischerweise verschiedene Farbtöne in der Läsion enthält. Die endgültige Diagnosestellung erfolgt wie bei allen Melanomen histologisch. Unter anderem können Nestbildungen, Durchwanderung der Epidermis und eine unscharfe seitliche Begrenzung beobachtet werden (Garbe C. et al., 1997, S.251f).

Das noduläre Melanom (=NM), das 21,4% aller Melanome ausmacht, ist durch ein primär vertikales Wachstum gekennzeichnet. Frühzeitig bildet sich eine Papel, die im weiteren Verlauf in ein Knötchen übergeht. Histologisch können in der scharf begrenzten Tumorfornation kaum Nester und Einzelzellen unterschieden werden. Im Gegensatz zum SSM zeigt das noduläre Melanom keine oder nur eine geringe seitliche intraepidermale Ausbreitung (Garbe C. et al., 1997, S.252f).

Auf der Basis einer Lentigo maligna bildet sich der Subtyp des Lentigo-maligna-Melanoms

(LMM), das sich sehr langsam entwickelt und dessen Diagnose durchschnittlich in einem Alter von 68 Jahren gestellt wird. In 70% sind Kopf und Gesicht betroffen, sonst meist die Extremitäten. Histologisch findet sich wie bei der Lentigo maligna eine atrophische Epidermis und eine solare Elastose im Bereich der oberen Dermis. Charakteristisch für das LMM ist unter anderem die melanozytäre Hyperproliferation an den seitlichen Rändern der Läsion (Garbe C. et al., 1997, S.254f).

Das akrolentiginöse Melanom (ALM) entwickelt sich vorwiegend auf Fußsohlen und Handinnenflächen, kann aber auch an den seitlichen Partien oder subungual auftreten. Während das ALM der häufigste Subtyp in Asien und Afrika ist, wird es in Deutschland nur in 4% aller Melanome diagnostiziert. Die klinische Erscheinungsform ähnelt dem SSM, histologisch zeigen sich ähnliche Merkmale wie beim LMM, etwa das lentiginöse Wachstumsmuster am seitlichen Rand (Garbe C. et al., 1997, S.255f).

Außer diesen vier Typen sind verschiedene seltenere Sonderformen bekannt: das Melanom auf großem kongenitalen Nävus, das desmoplastische Melanom, der maligne blaue Nävus und das Ballonzellmelanom. Unter einem primär okkulten Melanom versteht man ein Malignom, bei dem Metastasen, jedoch nicht der Primärtumor gefunden werden. Amelanotische Formen können in unterschiedlicher Häufigkeit bei allen Subtypen des Melanoms beobachtet werden und erschweren die Diagnosestellung (Garbe C. et al., 1997, S. 256f).

In 6-12% aller Melanomfälle liegt eine genetische Disposition vor (Hiddemann W. et al., 2004, S.1558). Es konnten mehrere Melanomsuszeptibilitätsgene (p16, p15, p14^{arf}, CDK-4 = Cyclin-Dependent Kinase 4) identifiziert werden, die zur Entwicklung des malignen Melanoms prädisponieren (Czerwenka K. et al., 2003, S.277). Bei sporadischen Melanomen konnten in unterschiedlicher Häufigkeit Funktionsverluste von Tumorsuppressorgenen, zum Beispiel RB (= Retinoblastom), p53 und pten/mmac1 (=Phosphatase and Tensin Homolog Delectin Chromosome Ten), und Überaktivierungen von Onkogenen, wie etwa der ras-Onkogenfamilie (=Rat Sarcoma Virus), gefunden werden (Hiddemann W. et al., 2004, S.1562).

1.2 CYLD

Vergleichende Studien an sporadisch aufgetretenen Fällen des Zylindroms und Familien mit der erblichen Variante des Zylindroms führten zur Identifikation des Tumorsuppressorgenes CYLD (= cylindromatosis gene). Unter einem Tumorsuppressorgen versteht man ein „Gen mit rezessivem Verhalten, das an der Hemmung der Zellproliferation beteiligt ist“ (Böcker et al., 2001, S.1130). Im Rahmen der Onkogenese ist ein Funktionsausfall beider Allele notwendig. Bei familiären Tumorerkrankungen liegt bereits eine Keimbahnmutation vor, so dass eine somatische Mutation im zweiten Allel zur Tumorentstehung führen kann.

Ein Ausfall des von CYLD kodierten Proteins wurde seither nicht nur beim Zylindrom, sondern auch bei einigen anderen benignen Adnextumoren nachgewiesen. Es stellt sich die Frage, ob CYLD möglicherweise auch eine Rolle bei der Onkogenese in anderen Organsystemen spielt.

1.2.1 Das Protein CYLD

Das Protein CYLD, bestehend aus 956 Aminosäuren, ist auf Chromosom 16q12-13 kodiert. Es fällt auf, dass die ersten drei von insgesamt zwanzig Exons nicht translatiert werden und außerdem bei Exon 3 und 7 die Möglichkeit zum alternativen Spleißing besteht (Bignell G.R. et al., 2000).

Mittlerweile ist eine Funktionszuordnung mehrerer Abschnitte von CYLD gelungen, die in Abbildung 1-2 dargestellt werden. Es konnten zwei prolinreiche Sequenzen und drei CAP-GLY (= C-terminal glycine-rich cytoskeleton associated protein) Domänen nachgewiesen werden, die eine Anheftung des Proteins an das Zytoskelett der Zelle ermöglichen (Bignell G.R. et al., 2000). Die ersten beiden CAP-GLY Domänen befinden sich im Bereich der AS (=Aminosäuren) 127-203 und 232-285. Für die Lokalisation der dritten Domäne finden sich unterschiedliche Angaben in der Literatur: AS 472-540 (Bignell G.R. et al., 2000) und 473-548 (Saito K. et al., 2004). Strukturanalysen zeigen, dass die dritte CAP-GLY Domäne ein Teil der Bindungsstelle mit NEMO (= NF- κ B essential modulator) ist. Eine der beiden prolinreichen Strukturen von NEMO ist mit dem Aminosäurebereich 470 bis 684 von CYLD assoziiert (Saito K. et al., 2004). CYLD bietet mindestens zwei weitere Bindungsstellen für Proteine des NF- κ B (= nuclear factor kappa b) Signalweges: TRIP (= TRAF interacting protein) interagiert mit CYLD im Bereich der Aminosäuren 106-593 (Regamey A. et al.,

2003) und TRAF2 (= tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) bindet bei 394-470 (Kovalenko A. et al., 2003). Die letzten 365 Aminosäuren des C-Terminus verschlüsseln die essentielle Deubiquinationsfunktion des Enzyms, UCH type 2 (=ubiquitin C-terminal hydrolase) (Brummelkamp T.R. et al., 2003). Diese Domäne enthält cystidin- und histidinreiche Sequenzen, die typisch für die Familie der Deubiquinationsenzyme sind. CYLD gehört zum Subtyp der Ubiquitin spezifischen Proteasen und kann insbesondere Lysin 63 verknüpfte Polyubiquitinketten spalten (Kovalenko A. et al., 2003).

Zudem konnte eine serinreiche Sequenz zwischen den Aminosäuren 420 bis 446 nachgewiesen werden, die eine Phosphorylierung von CYLD ermöglicht und damit an der Regulation der Deubiquinationsfunktion des Tumorsuppressorgenes beteiligt ist (Reiley W. et al., 2005).

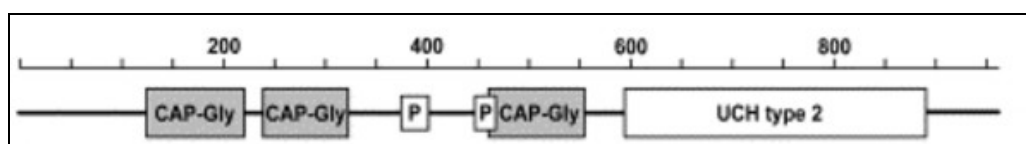


Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau des CYLD Gens (modifizierte Abbildung aus Saito K. et al., 2004); CYLD enthält drei CAP-Gly Domänen, zwei prolinreiche Sequenzen (mit P bezeichnet) und eine Deubiquinationsdomäne vom Typ 2 am carboxalen Ende (UCH type 2).

1.2.2 Die Funktion von CYLD

CYLD ist ein Tumorsuppressorgen, das in vielen zellulären Signalwegen eine wichtige regulatorische Funktion inne hat. Als erstes wurde die inhibitorische Rolle von CYLD im NF- κ B Signalweg beschrieben (Brummelkamp T. R., et al., 2003; Trompouki E., et al., 2003). Da in dieser Dissertation der Einfluss von CYLD auf die NF- κ B Aktivität in Tumorzellen untersucht wird, folgt eine ausführliche Darstellung des NF- κ B Signalwegs und dessen Interaktion mit CYLD. Des Weiteren wird der Einfluss von CYLD auf den JNK-Signalweg (=c-Jun NH₂-terminal kinase), den Calciumkanal TRPA1 (=transient receptor potential cation channel subfamily A member 1) und das Protein BAF 57 (=SMARCE1 =SWI/SNF related matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1) beschrieben.

Ferner wurde zwischenzeitlich eine CYLD-Splice-Variante: CYLD^{ex7/8} entdeckt, die in Mäusen zu einer Akkumulation reifer B-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen führt (Hövelmeyer N. et al., 2007). CYLD spielt also auch in der Immunregulation des Organismus eine wichtige Rolle.

1.2.2.1 Der NF- κ B Signalweg und CYLD

Dem NF- κ B Signalweg kommt in vielen zellulären Prozessen eine Schlüsselfunktion zu. Er ist beteiligt an Entzündungsgeschehen, bei der Immunantwort des Körpers und der Onkogenese (Kovalenko A. et al., 2003). NF- κ B fördert die Onkogenese doppelt: einerseits findet eine vermehrte Expression proliferativer Proteine statt, andererseits wird die Transkription antiapoptotischer Gene angekurbelt (Lin A. et al., 2003). Während in physiologischen Zellen im Normalfall keine NF- κ B Aktivierung nachgewiesen werden kann, wird eine Erhöhung bei einer Vielzahl von Tumoren wie etwa Mamma-Ca, Prostata-Ca, Kolorektales Ca, Ovarial-Ca und einigen Lymphomen und Leukämien beobachtet (Aggarwal B.B., 2004, Lin A., et al., 2003). So wurde bei einigen Melanomzelllinien eine NF- κ B Aktivität gemessen, die die normaler Melanozyten um mehr als den Faktor Tausend übertrifft (Kuphal S. et al., 2004). Chronische Hepatitis B und C, Karzinogene wie PB (Phenobarbital), Wachstumsfaktoren, insbesondere TGF α (=transforming growth factor α) und TGF- β 1, sowie Entzündungsgeschehen bewirken eine NF- κ B Aktivierung und tragen damit zur Entstehung des hepatozellulären Karzinoms bei (Arsura M. et al., 2005, Diao J. et al., 2001). Interessanterweise ist ein erhöhter AFP-Spiegel (α -Fetoprotein), ein Molekül, das physiologisch in embryonalen Hepatozyten gebildet wird und dessen Ansteigen im adulten Körper als Marker für ein HCC gilt, mit einer erhöhten NF- κ B Aktivität assoziiert (Arsura M. et al., 2005). Bei acht von zehn untersuchten humanen kolorektalen Tumoren wurde auch eine deutlich erhöhte Anzahl von NF- κ B Bindungen gegenüber normaler kolorektaler Schleimhaut festgestellt (Lind D. S. et al., 2001).

Inzwischen sind mindestens drei Signalwege bekannt (siehe Abbildung 1-3), die zur Aktivierung von NF- κ B führen können. Im klassischen Signalweg und bei der Aktivierung in Keratinozyten nimmt CYLD eine inhibitorische Rolle ein. Hingegen scheint im alternativen Zytokin-vermittelten Signalweg kein Einfluss von CYLD zu bestehen (Ikeda F., et al., 2006).

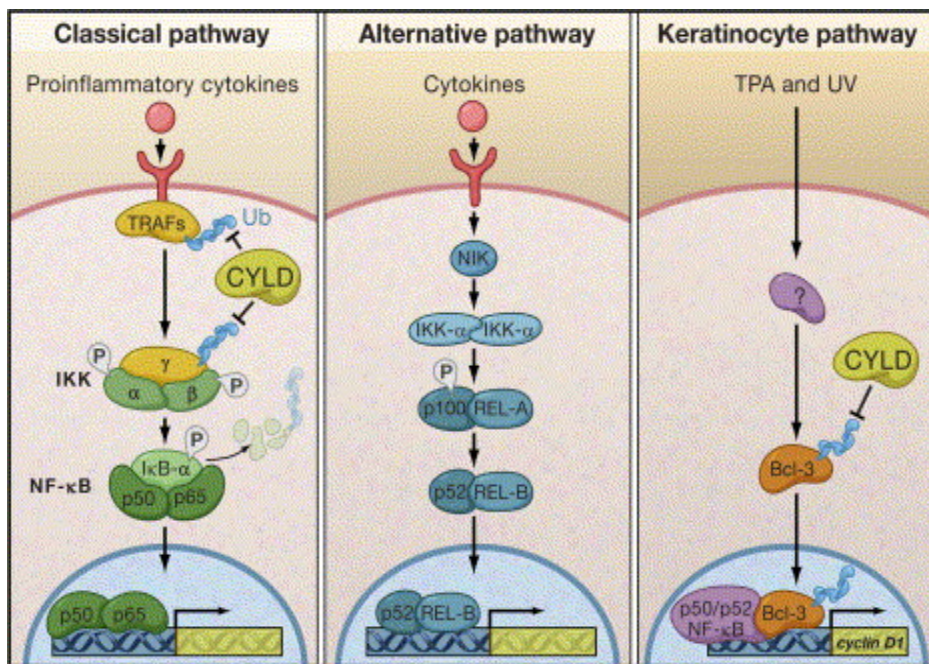


Abbildung 1-3: CYLD vermittelte Regulation des NF-κB Signalweges (Abbildung aus Ikeda F. et al., 2006)

1.2.2.1.1 Der klassische NF-κB Signalweg

Wie aus Abbildung 1-4 ersichtlich, beginnt der Signalweg mit der Bindung eines Liganden, beispielsweise TNF-α (= tumour-necrosis factor α), an den TNF-Rezeptor (Abb. 1-4, a). Eine Aktivierung von NF-κB kann aber auch über eine Rezeptorbindung von IL-1 (= Interleukin 1), LPS (=Lipopolysaccharid), CD40L (=CD40-Ligand) oder anderen Liganden erfolgen (Karin M. et al., 2002). Das daraufhin gebildete Rezeptortrimer aus TNF-Rezeptoren rekrutiert intrazellulär ein TRADD Protein (= tumour necrosis factor receptor 1-associated death domain protein), an welches RIP (= receptor interacting protein) und TRAFs binden können (Abb. 1-4, b). TRAF2 wird, falls das Protein durch cIAP (= cellular inhibitor of apoptosis) mit einer Lysin 48 verknüpften Ubiquitinkette markiert ist, abgebaut (Abb. 1-4, c). In diesem Fall wird die Signalkaskade unterbrochen; ohne Ubiquitinmarkierung des Proteins TRAF2 schreitet der Prozess der NF-κB Aktivierung ungehindert fort. TRAF2 ist mithilfe eines Komplexes aus Ubc13 (= ubiquitin-conjugating enzyme) und MMS2 (=UBE2V2 = ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2) imstande, sich selbst eine Lysin 63 verknüpfte Ubiquitinkette anzuhängen (Abb. 1-4, d). Das so modifizierte Molekül ermöglicht die Rekrutierung der IKK-Kinase (Abb. 1-4, e), die wiederum durch Phosphorylierung IKK (IκB-

Kinase) aktiviert (Abb. 1-4, f) (Wilkinson K.D., 2003). Dieses Enzym besteht aus IKK- α , IKK- β und IKK- γ , auch NEMO genannt. Während IKK- γ das regulatorische Element des Komplexes ist, dienen IKK- α und IKK- β als Katalysatoren. Für das Fortschreiten des bekannten NF- κ B Signalweges ist die Anwesenheit von IKK- α nicht erforderlich (Karin M. et al., 2002). Die aktivierte IKK führt durch eine weitere Phosphorylierung zum Abbau von I κ B (=Inhibitor κ B) (Abb. 1-4, g). Der bis dato von I κ B gebundene Transkriptionsfaktor NF- κ B wird nun freigesetzt (Wilkinson K.D., 2003). Unter der Bezeichnung NF- κ B versteht man verschiedene Proteindimere, deren Bausteine aus der Familie der REL (=reticuloendotheliosis) Proteine stammen. RELA, auch p65 genannt, RELB und c-REL bleiben unverändert, während NF- κ B₁ (p105) und NF- κ B₂ (p100) durch einen proteolytischen Prozess aktiviert werden müssen (Karin M. et al., 2002). IKK- β ist insbesondere an der Freisetzung der Dimere RELA/p50 und c-REL/p50 beteiligt. Das freie NF- κ B Dimer wird in den Zellkern transportiert und führt zur Transkription verschiedener Gene aus den Bereichen der Immunregulation, Entzündung, Apoptosehemmung, Zellproliferation und negativer Feedbackregulation der NF- κ B Aktivität (Karin M. et al., 2002).

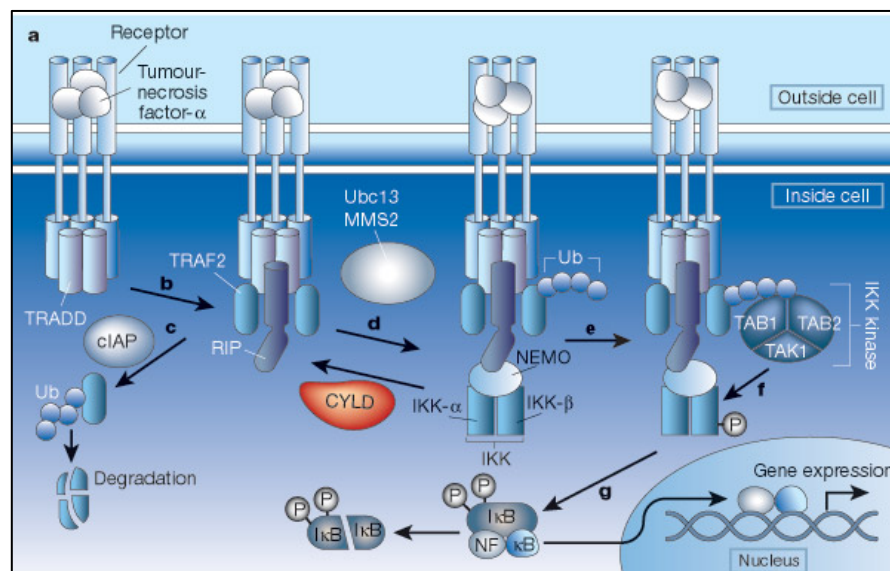


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des NF- κ B Signalwegs (Abbildung aus Wilkinson K.D., 2003)

CYLD greift hemmend in den klassischen NF- κ B Signalweg ein und verhindert eine übermäßige Aktivierung von NF- κ B. Als Deubiquitinationsenzym vom Typ b kann CYLD die

Lysin-63-verknüpfte Ubiquitinkette von TRAF2 entfernen und damit die Signalkette unterbrechen (Abb. 1-4, d) (Reiley W. et al., 2005). In geringerem Maße betrifft dies auch TRAF6, einen weiteren Bestandteil des TRAF-Komplexes (Trompouki E. et al., 2003). Seiner Funktion kann CYLD allerdings nur nachkommen, wenn es gleichzeitig mit anderen Proteinen verbunden ist. Außer der Interaktion mit TRAF2 ist eventuell auch eine Verbindung zu NEMO und TRIP (=TRAF interaktives Protein) erforderlich (Regamey A. et al., 2003).

CYLD verhindert durch die Hemmung des NF- κ B Signalweges einen pathologischen Apoptoseschutz der Zelle. Damit ist CYLD ein Tumorsuppressorgen, dessen Ausfall zur Onkogenese führen kann.

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen wurde auch beobachtet, dass die TNF- α abhängige Aktivierung von NF- κ B nur in geringem Maße durch CYLD hemmbar ist (Reiley W. et al., 2004). Ein möglicher Erklärungsversuch hierfür könnte sein, dass TNF- α NF- κ B weniger über TRAF2, sondern vorwiegend über TRAF5 aktiviert. Dieses Mitglied der TRAF Familie wird vermutlich nicht von CYLD, sondern von A20 (=TNFAIP3 =tumor necrosis factor, alpha induced protein 3) reguliert (Reiley W. et al., 2004).

1.2.2.1.2 Die Regulation von CYLD im klassischen NF- κ B Signalweg

Aus Abbildung 1-5 ist ersichtlich, dass die Regulation von CYLD an die NF- κ B Aktivierung gekoppelt ist. Unterschiedliche Initiatoren des NF- κ B Signalweges, wie etwa TNF- α , IL-1 β und NTHi (= nontypeable *Hämphilus influenzae*), führen gleichzeitig zu einer gesteigerten CYLD-Expression. Damit wird verhindert, dass der NF- κ B Signalweg eine unverhältnismäßige Zellreaktion auslöst. Die Anwesenheit des IKK-Komplexes und p65 sind Voraussetzung für die positive Regulation von CYLD. Bei Zytokinen, wie etwa TNF- α , ist TRAF 2, und bei Induktion mittels bakterieller Antigene ist TRAF 6 in den Regulationsmechanismus eingebunden (Jono H. et al., 2004). Da in einer genomischen Sequenzanalyse in der Promoterregion des Gens CYLD eine NF- κ B Bindungsstelle gefunden wurde, induziert vermutlich NF- κ B eine gesteigerte CYLD Transkription (Jono H. et al., 2004).

Es konnte zudem gezeigt werden, wie die Deubiquitinationsfunktion von CYLD auf molekularer Ebene reversibel reguliert wird. In einer serinreichen Sequenz (AS 420-446) kann eine Phosphorylierung des Proteins CYLD erfolgen, die vermutlich mit einem reversiblen Verlust der Deubiquitinationsfunktion verbunden ist. Die phosphorylierte Form

von CYLD kann die TRAF2-Ubiquitinierung nicht umkehren und somit auch nicht den NF- κ B Signalweg hemmen. Gleichfalls kann das phosphorylierte CYLD auch nicht inhibitorisch auf den JNK-Signalweg einwirken (siehe 1.2.2.2.1). Die Phosphorylierung von CYLD erfolgt nur in Anwesenheit von IKK γ , einer bekannten Serinkinase (Reiley et al., 2005).

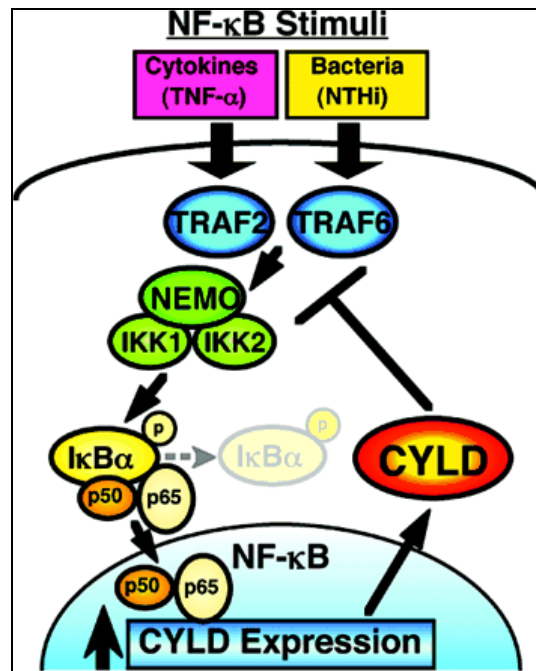


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der CYLD-Regulation (Abbildung aus Jono H. et al., 2004)

1.2.2.1.3 Der alternative NF- κ B Signalweg

Einen weiteren Weg der NF- κ B Aktivierung, der in lymphatischen Geweben gefunden wurde, zeigt der mittlere Teil der Abbildung 1-3 (Pomerantz J. et al., 2002). Die Liganden BAFF (= B cell activating factor), CD40L und LT β (= lymphotoxin β) können nicht nur den in 1.2.2.1.1 beschriebenen klassischen NF- κ B Signalweg in Gang setzen, sondern auch NIK (= NF- κ B inducing kinase) und IKK α aktivieren (Pomerantz J. et al., 2002). Diese beiden Kinasen verwandeln mithilfe eines proteolytischen Prozesses NF- κ B $_2$, das mit RELB ein Dimer im Zytoplasma bildet, in p52. Das neue Dimer p52/RELB kann in den Zellkern gelangen und dort die Transkription von Genen induzieren (Karin M. et al., 2002).

1.2.2.1.4 NF- κ B Aktivierung in Keratinozyten

In Keratinozyten hat CYLD auf mindestens zwei Signalwege, wie in Abbildung 1-6 dargestellt, einen inhibitorischen Einfluß. Einerseits hemmt CYLD wie bereits beschrieben (siehe 1.2.2.1.1) durch Bindung an den TRAF-Komplex die NF- κ B Aktivierung, welche durch TNF- α ausgelöst wird. Damit kommt es zu einer Inhibition von Entzündungsgeschehen und Überleben der Zelle.

Andererseits wirkt CYLD durch Hemmung des Proteins Bcl-3 (= B-Cell CLL/lymphoma 3) inhibitorisch auf Proliferation und Zellzyklus ein. Das Protein Bcl-3, erstmals bei einer Untergruppe des B-Zell-Lymphoms beschrieben, ist in der Lage die NF- κ B Einheiten, p50 und p52 zu aktivieren und damit die Transkription beispielsweise des Cyclin D1 Gens zu initiieren, das Zellproliferation und Onkogenese fördert. Voraussetzung dafür ist, dass sich Bcl-3 im Nukleus befindet. CYLD kann im Zytoplasma der Zelle Lysin-63-verknüpfte Ubiquitinketten von Bcl-3 lösen und damit die Translokation des Proteins in den Zellkern verhindern. Auf diese Weise inhibiert CYLD die Zellproliferation. (Ikeda F. et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Keratinozyten mit TPA (=12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate) oder UV-B Bestrahlung nicht nur zu einer perinukleären Translokation von Bcl-3, sondern auch von CYLD führt. CYLD kann also das Protein Bcl-3 vor dem Zellkern abfangen und dessen vermehrte Translokation in den Zellkern und damit die gesteigerte Aktivierung von p50 und p52 hemmen. Damit ist gewährleistet, dass unter physiologischen Bedingungen trotz schädlicher Einflüsse keine überschießende Zellproliferation beziehungsweise Onkogenese stattfinden kann. In Knock-out Mäusen, die CYLD nicht produzieren können, wurden hingegen durch die Behandlung mit DMBA (=7,12-dimethylbenzanthracene) und TPA multiple Hauttumore hervorgerufen (Massoumi R. et al., 2006). Dabei handelt es sich ausschließlich um gutartige Tumore, die histologisch durch eine Plattenepithelhyperplasie gekennzeichnet sind.

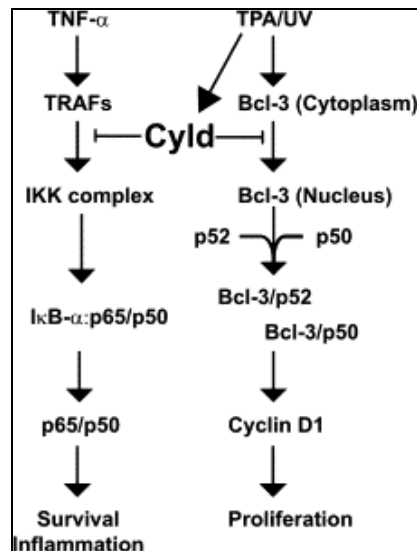


Abbildung 1-6: Regulation des TNF- α oder TPA/UV induzierten NF- κ B Signalweges in Keratinozyten durch CYLD (Abbildung aus Massoumi R., et al., 2006, S.674).

1.2.2.2 CYLD in anderen Signalwegen

1.2.2.2.1 CYLD im JNK-Signalweg

Das Deubiquitinationsenzym CYLD hat nicht nur auf den NF- κ B Signalweg eine inhibitorische Wirkung, sondern ist auch an der Regulation anderer Signalkaskaden beteiligt. Es konnte ein Einfluss von CYLD auf die Aktivierung von JNK in der 293 Zelllinie (aus humaner embryonaler Niere) und der HeLa Zelllinie (aus humanem Zervixkarzinom) nachgewiesen werden (Reiley W. et al., 2004). JNK gehört zur Familie der MAPK (=mitogen-activated protein kinase) und ist ähnlich wie NF- κ B an der Regulation von Immunantwort, Entzündungsgeschehen, Zellwachstum und Apoptose beteiligt (Reiley W. et al., 2004, S.55161). Für einige Tumormodelle ist eine gesteigerte Aktivität des JNK Signalweges bekannt. Dieser kann durch Stresssignale über das Enzym MKK4 (=mitogen-activated protein kinase kinase) oder durch Entzündungsmediatoren über MKK7 initiiert werden (Reiley W. et al., 2004, S.55161). CYLD kann die Aktivierung von MKK7, jedoch nicht von MKK4, inhibieren und so den JNK Signalweg, der durch Entzündungsmediatoren, wie etwa TNF α , LPS und IL-1 β , ausgelöst wird, hemmen (Reiley W. et al., 2004). Dabei sind unterschiedliche TRAF Enzyme beteiligt, die auch im NF- κ B Signalweg eine Rolle spielen. Während die Rezeptorbindung von TNF α zu einer Aktivierung von TRAF2 führt, initiieren

IL-1 β und LPS den JNK Signalweg über die Aktivierung von TRAF6 (Reiley W. et al., 2004). Für CYLD konnte ein inhibitorischer Einfluss auf beide Mitglieder der TRAF Familie nachgewiesen werden (Trompouki E. et al., 2003).

1.2.2.2.2 CYLD und der Kalziumkanal TRPA1

Bei TRPA1 handelt es sich um einen Kalziumkanal, der bislang in Neuronen und Lungenfibroblasten nachgewiesen werden konnte und auf physikalische Stimuli, wie beispielsweise Kälte, und chemische Reize, wie etwa Cannabinoide, reagiert. In einigen Tumorzellen wurden veränderte Kalziumkanäle gefunden. Zumindest unter der Bedingung der Überexpression kann CYLD eine Verbindung mit TRPA1 eingehen und mithilfe seiner Deubiquitinationsfunktion Einfluss auf die Aktivität des Kalziumkanals nehmen. Dies könnte ein weiterer Weg sein, über den CYLD inhibitorisch auf die Onkogenese einwirkt (Stokes A. et al., 2006).

1.2.2.2.3 CYLD und BAF 57

Das Protein BAF 57 induziert Zellzyklusarrest und Zelltod. In der BT 549 Zelllinie, die aus einem duktalem Mammakarzinom stammt, konnte ein Mangel an BAF 57 nachgewiesen werden. Die Wirkung von BAF 57 wird über die Transkription verschiedener proapoptotischer Gene vermittelt. Dazu zählt auch CYLD, das in der BT 549 Zelllinie deutlich herabreguliert ist. Das Protein CYLD wird also auch im Rahmen verschiedener anderer Signalwege reguliert und steht damit mit der Onkogenese, zum Beispiel des duktalem Mammakarzinoms, in Verbindung (Wang L. et al., 2005).

1.2.3 Krankheiten, die mit CYLD assoziiert sind

Ursprünglich wurde das Gen CYLD bei Untersuchungen zum Krankheitsbild des Zylindroms entdeckt (Bignell G.R. et al., 2000). Das Zylindrom ist ein Adnextumor, der vorwiegend an der Haut von Kopf und Hals auftritt. Es handelt sich um einen Tumor der Haarfollikelzellen, der genaue Ursprung ist unklar. Entweder könnten pluripotente epitheliale Haarfollikelstammzellen mit der Fähigkeit zur Differenzierung in follikuläre Zellen, apokrine Zellen und Talgdrüsenzellen der Ausgangspunkt des Zylindroms sein oder bestimmte epitheliale Vorläuferzellen, die sich selektiv zu ekkrinen Drüsen entwickeln (Massoumi R., et al., 2006).

Es treten immer wieder sporadische Fälle des Zylindroms auf. In zehn Prozent der Fälle liegt die familiäre Variante vor, die autosomal dominant vererbt wird und mit einem defekten Allel des Gens CYLD einhergeht (Funk J.O., 2004). Durch eine zweite somatische Mutation kann ein benigner Tumor entstehen, der in seltenen Fällen auch maligne entartet. Wenn die gesamte Kopfhaut überwuchert wird, bietet sich das Bild eines sogenannten Turbantumors.

Inzwischen konnte auch bei verwandten Krankheitsbildern ein Verlust von CYLD als Ursache der Tumorgenese nachgewiesen werden. Beim Epithelioma adenoides cysticum Brooke, alias Brooke-Spiegler-Syndrom, treten neben Zylindromen auch Trichoepitheliome und Spiroadenome auf (Hu G. et al., 2003). Dies kann daraus erklärt werden, dass die genannten Adnextumore einer gemeinsamen epithelialen Keimanlage entspringen. Fälle von multiplen familiären Trichoepitheliomen konnten bereits ebenfalls auf eine Keimbahnmutation des CYLD Gens zurückgeführt werden (Zheng G. et al., 2004).

Es finden sich auch Hinweise auf eine Beteiligung von CYLD an der Onkogenese anderer Tumore. In Plasmozytomzelllinien und -gewebeproben zeigt sich oftmals eine erhöhte NF- κ B Aktivität. Dabei spielt neben einer Hochregulation von beispielsweise NIK oder CD40 in einigen Fällen auch die verminderte Expression von CYLD eine Rolle. Es konnte auch gezeigt werden, dass ein Inhibitor von IKK β , einer Untereinheit des NF- κ B-Komplexes, bei vielen Plasmozytomzelllinien zu Apoptose oder Wachstumsreduktion führt (Annunziata C.M. et al., 2007). In CYLD^{-/-} Mäusen wurde eine signifikant erhöhte Rate von Kolitis und Kolitis assoziierten Adenokarzinomen des Kolons durch Behandlung mit AOM (azoxymethane) und DSS (dextrane sulfate sodium) beobachtet (Zhang J., et al., 2006).

Die Entschlüsselung der molekularen Grundlagen dieser Krankheitsbilder bietet einen Ausgangspunkt zur Entwicklung neuer Therapien. Durch Verlust der CYLD Aktivität findet die Hemmung des NF- κ B Signalwegs nur eingeschränkt statt. Erste Überlegungen

beschäftigen sich mit Acetylsalicylsäure, einer Substanz, die unabhängig von CYLD inhibitorisch in den NF- κ B Signalweg eingreift. Vielleicht ist es möglich Acetylsalicylsäure in Zukunft präventiv bei der familiären Variante des Zylindroms oder topisch bei bereits aufgetretenen Tumoren zu verwenden (Lakhani S.R., 2004). Auch die Ausprägung gastrointestinaler Tumore konnte unter anderem durch NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs) beeinflusst werden (Lin A., et al., 2003).

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Änderung der Expression des Tumorsuppressorgens CYLD außer bei den erwähnten Tumorentitäten auch an der molekularen Onkogenese von kolorektalem Karzinom, hepatozellulärem Karzinom und malignem Melanom beteiligt ist. Damit wurden drei Tumore gewählt, die einerseits histologisch von verschiedenen Zelltypen abstammen und andererseits praktisch eine große Bedeutung für die Gesundheit der Menschen weltweit haben. Des Weiteren wird untersucht, ob die erhöhte NF- κ B Aktivität in Tumorzelllinien durch das aktive Einbringen des Tumorsuppressors CYLD vermindert werden kann.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Materialien

Applied Biosystems, California, USA	ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Premix), Template Suppression Reagent
BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round-Bottom Tube
Biochrom AG, Berlin	Phenolrot, PBS
Braun, Melsungen	Aqua ad injectabilia
Cambrex Bio Science, Rockland, USA	Sea-Kem ® LE Agarose
Fluka, Buchs SG, Schweiz	Peptone
Genaxxon, Stafflangen	dNTPs Set
Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA	Trypsin EDTA, MW Standard Ready load 100 bp, Penicillin/Streptomycin
Invitrogen, California, USA	Lipofectamine, Lipofectamine Plus, 100bp DNA Ladder, Superscript Plus, pcDNA3 Vektor, 5x First Strand Buffer
Merck, Darmstadt	DMSO

J.T. Baker, Holland	Ethanol
Millipore, Eschborn	Einmal-Sterilfilter, Porengröße 20 µM
PAN Biotech, Aidenbach	FKS, DMEM
Promega, Heidelberg	Dual –Luciferase® Reporter Assay System, pRL-TK Vektor, PGL ₃ basic Vektor, NFκB luc Vektor
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, RNeasy Mini Kit
Riedel de Haen, Seelze	Methanol
Roche Diagnostics, Mannheim	Restriktionsendonukleasen: Bam HI, Bgl II, Pvu II, ECO R I, NHE I, Puffer für Restriktionsenzyme, Taq-Polymerase, RNase A, LightCycler SyBrGreen Kit, dN6 Primer, PCR reaction buffer
Sigma, St. Louis, USA	Ampicillin, Ethidiumbromid, PEG 8000, DTT, DMEM, Select Yeast Extract, alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität
Sigma Genosys, Cambridge, England	Oligonukleotide

2.1.2 Geräte

Gelelektrophoreseapparaturen:

BioRad, München

Wide Mini Sub[®] Cell GT

International Biotechnologies,
Conneticut, USA

Model QSH Quick Screening Horizontal Gel
Electrophoresis Unit

Heiz- und Kühlblöcke:

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer comfort, Thermomixer compact

Liebisch, Bielefeld

TR-L 288

Spannungsgeräte:

Amersham Pharmacia Biotech, Little
Chalfont, England

Electrophoresis Power Supply 1001, Electrophoresis
Power Supply 301

BioRad, München

Modell 200/2.0 power supply

Waagen:

Sartorius, Göttingen

L2200S

Mettler, Columbus OH, USA, Giessen

PJ 400

Zentrifugen:

Eppendorf, Hamburg	MiniSpin Plus
Hereaeus, Hanau	Biofuge 13, Varifuge 3.2 RS
Qualitron, Espoo, Finnland	Tischzentrifuge
Roche Diagnostics, Mannheim	LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte:

Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA	ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser
Bachofer, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm
Berthold, München	Lumat LB 9507
Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM 25
Heidolph, Kehlheim	Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000
H+P-Labortechnik GmbH, München	Varioklav Dampfsterilisator
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
Kendro, Hanau	Hera safe KS18
MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cyclers PTC- 200

Roche Diagnostics, Mannheim	LightCycler II
Savant, New York, USA	Speedvac Concentrator SC 110
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522
Zeiss, Jena	Axiovert 10

2.1.3 Organismen

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF'	Ultracompetent <i>Escherichia Coli</i>
--------------------------------	--

2.1.4 Säugerzelllinien

Melanom

Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Juso	DSMZ Nr: ACC74, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	DSMZ Nr: ACC62, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
SK Mel 3	ATCC-Nr: HTB-69, Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase eines Melanoms

SK Mel 28 ATCC-Nr: HTB-72, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor

HTZ 19d Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase eines Melanoms

Colon

LoVo ATCC-Nr: CCL-229, Humane Colonzelllinie aus Metastase eines kolorektalem Adenokarzinoms

CaCo ATCC-Nr: HTB-37, Humane Colonzelllinie aus primären kolorektalem Adenokarzinom

HCT 116 ATCC-Nr: CCL-247, Humane Colonzelllinie aus primären kolorektalem Karzinom

HT 29 ATCC-Nr: HTB-38, Humane Colonzelllinie aus primären kolorektalem Adenokarzinom

HT 29 M3 Subtyp von HT 29, mit Methotrexat-Resistenz, hoch differenziert

SW 48 ATCC-Nr: CCL-231, Humane Colonzelllinie aus primären kolorektalem Adenokarzinom

SW 480 ATCC-Nr: CCL-228, Humane Colonzelllinie aus primären kolorektalem Adenokarzinom

Leber

Hep3b ATCC-Nr: HB-8064, Humane Leberzelllinie aus primären hepatozellulärem Karzinom

HepG2 ATCC-Nr: HB-8065, Humane Leberzelllinie aus primären hepatozellulärem Karzinom

PLC Humane Leberzelllinie aus primären hepatozellulärem Karzinom

Primärzellen

NHEM Normale humane epidermale Melanozyten

IEZ Normale humane intestinale epitheliale Zellen

Rektum Normale humane Rektumzellen

Sigma Normale humane Sigmazellen

Leber Normale humane Hepatozyten

Normalgewebereihe aus primärem Gewebe

Thymus

Placenta

Kolon

Fetale Leber

Nebenniere

Gehirn

Testis

Skelettmuskulatur

Uterus

Niere

Humaner Uterus

Humanes Knochenmark

Humanes Gehirn

Humanes Rückenmark

Humanes fetales Gehirn

Humane Prostata

Tränendrüse

Humane Leber

Humane fetale Leber

Trachea

Cerebellum

Leberpaare aus Normalgewebe (N) und hepatozellulärem Karzinom (P)

erhalten von PD Dr. med. Claus Hellerbrand, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin 1,
Klinikum der Universität Regensburg

264 N/P

315 N/P

316 N/P

344 N/P

354 N/P

356 N/P

359 N/P

360 N/P

379 N/P

403 N/P

2.1.5 Vektoren

CYLD Plasmid

Für das CYLD Plasmid wurde mCYLD (= murines CYLD) in den pCS2-EGFB Vektor zwischen die Restriktionsschnittstellen Fse und Asc inkloniert.

Zur Verfügung gestellt von Herrn Fässler, MPI Martinsried.

pRL-TK

Für die Transfektionskontrolle bei der Durchführung des Luciferase Assays wird der kommerziell erhältliche pRL-TK Vektor von Promega (Bestellnummer E2241) benutzt, der für die Renillaluciferase kodiert.

pcDNA₃

Der kommerziell erhältliche pcDNA₃ Vektor von Invitrogen (5400bp) wird für die Festsetzung der NFκB Grundaktivität bei der Durchführung des Luciferase Assays verwendet.

pcmxpl₁

Der pcmxpl₁ Vektor wurde aus pUC19 und CDM8 hergestellt und für die Festsetzung der NFκB Grundaktivität bei der Durchführung des Luciferase Assays verwendet.

Zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. A.-K. Bosserhoff, Institut für Pathologie, Klinikum der Universität Regensburg.

NFκB luc

Bei der Durchführung des Luciferase Assays wird der kommerziell erhältliche NFκB luc Vektor von Promega (Bestellnummer E3292) zur Bestimmung der NFκB Aktivität verwendet. Der Vektor enthält die Konsus-Bindesequenz für NFκB Untereinheiten sieben Mal vor das Luciferasegen kloniert.

PGL₃ basic

Der kommerziell erhältliche PGL₃ basic Vektor von Promega (Bestellnummer E6441) wird bei der Durchführung des Luciferase Assays zur Normierung der Grundaktivität der Zelllinie verwendet.

2.1.6 Oligonukleotide

Primer für RT-PCR und quantitative PCR:

Die Oligonukleotide für den β -Aktin Nachweis wurden von der Firma MWG Biotech, Martinsried, alle anderen Oligonukleotide von der Firma SIGMA Genosys, England synthetisiert. Es wurde eine 100 μ M Stammlösung der Oligonukleotide durch Lösen in H₂O hergestellt und bei -20°C gelagert.

Humane Oligonukleotide:

hCYLC for 223	Exon 3	5' - TGCCTTCCAACCTCTCGTCTTG - 3'
hCYLD rev 451	Exon 4	5' - AATCCGCTCTTCCCAGTAGG - 3'
hCYLD for 1577	Exon 9	5' - GACCGTTCTTCACCACCACT - 3'
hCYLD rev 1898	Exon 9	5' - CAGCGAGCACTTCATTCAGTC - 3'
hCYLD for 1310	Exon 7	5' - TCAGAGAGTGTGACGCAGGA - 3'
hCYLD for 67	Exon 2	5' - GGTGAGGATGGTTCTACACAG - 3'
hCYLD rev 637	Exon 4	5' - GAGAACTGCATGAGGTTGC - 3'
hCYLD rev 1046	Exon 5	5' - GACCTGCGTAATCACTTTCC - 3'
hCYLD for 2138	Exon 11	5' - GGCTTGGAGATAATGATTGG - 3'
hCYLD rev 2647	Exon 16	5' - CAGACATGATGGTGCCTCT - 3'
hCYLD rev 1824	Exon 9	5' - ACTTCAQCCAATGAGCCCACT - 3'
β -Aktin for.		5' - CTACGTGGCCCTGGACTTCGAGC - 3'
β -Aktin rev.		5' - GATGGAGCCGCCGATCCACACGG - 3'

Maus-Oligonukleotide:

mCYLD for 487	Exon 1	5' - CAACTGTGAGGAGAGGCTC - 3'
mCYLD rev 703	Exon 2	5' - GAAACCTTGACCACGACCT - 3'

2.2 Medien, Antibiotika, Puffer

2.2.1. Medien zur Anzucht von *E.coli* und Säugerzellkulturen

Alle Zutaten des LB Mediums wurden in H₂O gelöst und autoklaviert, für Agarplatten wurde noch zusätzlich Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Luria Bertani Medium	10 g/l Peptone 5 g/l Select Yeast Extract 10 g/l NaCl
	Für Platten: + 15g/l Agar Zur Selektion: + 100µg/ml Ampicillin

DMEM	Pulver in demineralisiertem Wasser lösen, pH mit NaHCO ₃ auf 7,3 einstellen, sterilfiltrieren; Zusätze: 10% (v/v) FKS 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin 0,0005% (w/v) Phenolrot
------	---

2.2.2. Antibiotika

Ampicilin-Stammlösung (500x)	50 mg/ml in destilliertem H ₂ O (-20°C)
------------------------------	--

2.2.3. Puffer und Lösungen

RNAse A Lösung	10 mM Tris/ HCl pH 7,0 10 mg/ ml RNAse A
----------------	---

Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung):

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-2% (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 40% (v/v) Sucrose
Ethidiumbromidlösung	0,04% in H ₂ O gelöst

Lösungen für die Zellkultur:

PBS (Phosphate buffered saline)	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ wurde als Pulver bezogen, in destilliertem Wasser gelöst; pH-Wert mit NaHCO ₃ auf 7,6 eingestellt; Lösung sterilfiltriert
---------------------------------	---

Lösungen für die Plasmidisolierung aus *E.coli* (aus dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen):

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris·Cl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysispuffer)	200 mM NaOH 1% SDS (w/v)
Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	3.0 M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer QBT (Equilibrationspuffer)	750 mM NaCl

	50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol (v/v) 0,15% Triton® X-100 (v/v)
Puffer QC (Waschpuffer)	1.0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol (v/v)
Puffer QF (Elutionspuffer)	1.25 M NaCl 50 mM Tris·Cl, pH 8,5 15% Isopropanol (v/v)
Puffer TE	10 mM Tris·Cl, pH 8,0 1 mM EDTA

2.3 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Je nach Verwendungszweck erfolgte die Anzucht von *E. coli* auf festem Nährboden oder in flüssiger Schüttelkultur. Zur Isolation von transformierten Bakterien wurde zusätzlich zum Nährmedium ein Selektionsantibiotikum (Amp) zugesetzt. Die Antibiotikaresistenz wurde dabei vom eingeführten Plasmid codiert. Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde eine Einzelkultur mit einer sterilen Spitze gepickt, bei Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank, die der flüssigen Kulturen bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm.

2.3.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation kompetenter *E. coli* wurden je 100 ng Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde

30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen für 60-75 Sekunden auf 42°C erhitzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien eine Minute auf Eis abgekühlt, es wurden pro Ansatz 500 µl LB Medium zugegeben und die Kultur wuchs 60 Minuten lang bei 37°C unter Schütteln an. Die transformierten *E. coli* wurden dann fünf Minuten bei 4000 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium wieder resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte auf einem selektierenden Medium mit dem Antibiotikum, für das ein Resistenzgen in der eingebrachten Plasmid-DNA vorlag.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen nach beiliegender Isolationsanleitung. Zuerst wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte in 3 ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum gegeben und über Nacht bei 37°C und 250 rpm auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Nachdem die Vorkultur 1/500 bis 1/1000 in 50-150 ml sterilem LB Medium mit Selektionsantibiotikum aufgenommen wurde, inkubierten die Bakterien erneut für 12-16h bei 37°C und 250 rpm auf dem Schüttelinkubator. Danach wurde die Schüttelkultur 10 Minuten bei 4000U/min abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 6 ml des Puffers P1 (siehe 2.2.1) resuspendiert, der Rnase A enthält. Durch Zugabe von 6 ml Puffer P2 wurde die Lysereaktion der Bakterienzellen gestartet. Während SDS Phospholipide und Proteine der Zellmembran denaturierte, zersetzten die Rnase A RNA und das alkalische Milieu DNA. Um die Reaktion abubrechen und eine irreversible Schädigung der Plasmid-DNA zu verhindern, wurden nach fünfminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur 6 ml des Puffers P3 zugegeben. Das darin enthaltene Kaliumacetat neutralisierte das Lysat und führt zur Präzipitation und Fällung von denaturierten Proteinen, genomischer DNA, Zelltrümmern und SDS. Die kleinere Plasmid-DNA blieb hingegen in Lösung. Zur Auftrennung der Bestandteile wurde das Lysat in ein QIAfilter Cartridge System gegeben und dort für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sich die Präzipitationskomplexe in einer Schicht auf der Oberfläche der Lösung abgesetzt hatten, wurde das Lysat unter Entfernung der Präzipitate in ein vorbereitetes HiSpeed Midi Tip filtriert, das zuvor mit 4 ml

Puffer QBT durchspült worden war. Bei der Filtration des geklärten Lysats durch das HiSpeed Midi Tip wurde die Plasmid-DNA gebunden, während zelluläre Bestandteile in der filtrierten Lösung verblieben. Anschließend wurde das HiSpeed Midi Tip mit 20 ml Puffer QC gewaschen um RNA- und Proteinreste zu entfernen und unspezifische Bindungen zu lösen. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mittels 5 ml Puffer QF aus der HiSpeed Midi Tip eluiert. Durch Hinzufügen von 3,5 ml Isopropanol und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Präzipitation der eluierten DNA erreicht. Das Gemisch wurde mittels einer 20 ml Spritze mit konstantem Druck durch einen QIAprecipitator, der die gefällte DNA bindet, filtriert. Um die Membran zu trocknen wurde zweimal mit der Spritze Luft durch den QIAprecipitator gepresst. Anschließend wurde mit 1 ml des Puffers TE die Plasmid-DNA aus dem QIAprecipitator eluiert. Um eine maximale DNA-Ausbeute zu erreichen, wurde das Eluat ein zweites Mal durch den QIAprecipitator filtriert. Dadurch wurden etwa 280-300 µg Plasmid-DNA je 50µl Bakterienkultur gewonnen. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert und im Luciferase-Reporterassay (siehe 2.5.2) weiter verwendet.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken wurden 1µl Plasmid-DNA (etwa 0,3 µg), 2 µl der entsprechenden Enzyme und 2µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffers verwendet. Die Ansätze wurden mit sterilem Wasser auf 19 µl aufgefüllt, für 1-2h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.4.2. Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (0,7-2,0% Agarose in TAE). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm durchgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte nachträglich in Ethidiumbromidlösung (10µg/ml) für 10-30 min. Die angefärbte DNA wurde durch UV-Licht

sichtbar gemacht. Die Größe der Fragmente konnte aufgrund eines ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Längenstandards abgeschätzt werden.

2.4.3. Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden in 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach der Färbung in Ethidiumbromidlösung unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten. Die eigentliche Gelextraktion wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

Zu dem ausgeschnittenen Gelabschnitt wurde das dreifache Volumen des Puffers QG gegeben. Das Gemisch wurde für mindestens 10 Minuten bei 50 °C unter wiederholtem Vortexen bis zur vollständigen Auflösung des Gels inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft und bei Bedarf korrigiert, da ein $\text{pH} \leq 7,5$ für die nachfolgende Reaktion notwendig ist. Bei DNA-Fragmenten < 500 bp und > 4 kb führte die Zugabe von einem Volumen Isopropanol, bezogen auf das Anfangsgewicht des Gelstücks, zu einer Erhöhung des DNA-Ertrages. Um DNA zu binden, wurde das Gemisch in eine QIAquick spin column gegeben und für eine Minute bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde aus dem Sammelgefäß in dieselbe QIAquick spin column überführt und erneut zentrifugiert, um die DNA Ausbeute zu erhöhen. Die in der QIAquick spin column gebundene DNA wurde durch die Zugabe von 0,5 ml des Puffers QG und anschließender Zentrifugation von 1 Minute bei 13000 Umdrehungen von Agaroseresten gereinigt. Zur weiteren Aufbereitung wurden 0,75 ml des Puffers PE in die QIAquick spin column gegeben und 2-5 Minuten vor einminütiger Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen inkubiert. Um Ethanolreste des Puffers PE zu beseitigen, wurde die QIAquick spin column danach noch einmal 1 Minute bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert. Durch Gabe von 30 µl des Puffers EB auf die Membran der QIAquick spin column und einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnten mittels einminütiger Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen etwa 28 µl eines hoch konzentrierten DNA Eluats gewonnen werden. Dies wurde entweder bei -20 °C weggefroren oder direkt für die Sequenzierreaktion (siehe 2.4.9) weiterverwendet.

2.4.4 Isolierung und Reinigung von PCR-Produkten (PEG-Fällung)

Die Isolierung und Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung (siehe 2.4.10) erfolgte mittels PEG-Fällung. Dabei wurden zu 40 µl PCR Produkt 40 µl eines PEG-Mix gegeben, der sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

PEG 8000 (Polyethylene Glycol)
3M NaOAc pH 5,2
1M MgCl₂
Aqua destillata

Dieses Gemisch wurde nach gründlichem Vortexen 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 25minütigen Zentrifugation mit 13000 U/min wurden 100 µl Ethanol (100%) zum Pellet gegeben und das Eppendorfgesäß vorsichtig zweimal geschwenkt. Der Alkohol wurde nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13000 U/min wieder abgenommen. Anschließend wurde das Pellet für zwei Minuten in der Speed Vac getrocknet, in 12 µl H₂O aufgenommen und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Produkt wurde entweder sofort in der Sequenzierreaktion (2.4.10) weiterverarbeitet oder bei -20°C weggefroren.

2.4.5 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde mittels UV-Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für optische Dichten < 1 gilt näherungsweise folgender linearer Zusammenhang:

1 OD_{260nm} Einheit = 50 µg/ ml dsDNA, Plasmide

2.4.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Fragments wurde die Polymerasekettenreaktion angewendet. Der Reaktionsansatz wurde mit sterilem Wasser auf 50µl aufgefüllt.

5µl	10x PCR-Puffer
0,5µl	dNTPs (je 10 mM)
je 1,0 µl	der Primer (20 mM)
10ng	Template-DNA
0.5µl	Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)

Um Verdunstung zu vermeiden, wurde die Reaktion in einem PCR Gerät mit beheizbarem Deckel durchgeführt und nach einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 94°C folgendem Protokoll unterzogen:

Denaturierung bei	94°C 45 sec
Annealing bei	X°C 45 sec
Extension bei	72°C 45 sec

Diese Arbeitsschritte wurden als Zyklus Ymal durchgeführt, woran sich jeweils eine Extensionsphase für 5 min bei 72°C anschloß.

Für die einzelnen Primerpaare wurden in der PCR unterschiedliche Annealingtemperaturen (X°Celsius) und verschiedenen Zyklenzahlen (Y) verwendet.

Primerpaar	Zyklen (Y)	Temperatur (X°Celsius)
hCYLD for 67/ hCYLD rev 637	34	61°
hCYLC for 223/ hCYLD rev 1898	34	62°
hCYLD for 1577/ hCYLD rev 2647	34	61°
hCYLC for 223/ hCYLD rev 451	32-40	63°
hCYLD for 1577/ hCYLD rev 1824	30-36	63°
hCYLD for 67/ hCYLD rev 451	34	66°
hCYLD for 67/ hCYLD rev 1046	32	60°
hCYLD for 1310/ hCYLD rev 1824	32	63°
hCYLD for 1310/ hCYLD rev 1898	34	64°
hCYLD for 1577/ hCYLD rev 1898	32	63°
hCYLD for 2138/ hCYLD rev 2647	32	60°
mCYLD for 487/ mCYLD rev 703	36	62°

Die β -Aktin for/ β -Aktin rev PCR wurde nach einem speziellen Protokoll durchgeführt. Nach einer Denaturierung von 2 min bei 94°, wurden folgende Schritte 23 Mal wiederholt:

Denaturierung bei	94°C 30s
Annealing bei	68°C 2min
Extension bei	68°C 2min

Das Programm wurde mit einer abschließenden Extension von 5 min bei 68°C beendet.

2.4.7 RT- PCR

Mithilfe der Reversen Transkription wurde mRNA in cDNA umgeschrieben, die weiter für PCR (siehe 2.4.5) und quantitative Echtzeit PCR (siehe 2.4.7) verwendet wurde.

Pro Reaktionsansatz wurde etwa 1 μ g Gesamt-RNA, die aus Zelllinien mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen extrahiert wurde (siehe 2.4.10), eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem 20 μ l Ansatz mit folgenden Reaktionszutaten durchgeführt:

- 4 μ l First Strand buffer (5x)
- 2 μ l DTT (0,1 M)
- 1 μ l dNTPs (10 mM)
- 1 μ l dN₆ Primer (random 2mg/ ml)
- 11 μ l RNA + H₂O

Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Nach Abkühlung auf etwa 50°C wurde 1 μ l Superscript II hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte dann bei 37°C für 60 Minuten. Nach der Inkubation wurde eine zehnminütige Denaturierung des Enzyms bei 70°C durchgeführt, gefolgt von einem RNase Verdau mit 1 μ l RNase A Mix für 30 Minuten bei 37°C. Die cDNA wurde bei -20°C weggefroren.

Anschließend wurde zur Ladungskontrolle eine β -Aktin PCR, wie unter 2.4.5 beschrieben, durchgeführt.

2.4.8 Quantitative Echtzeit PCR

Die Quantifizierung der Expressionsstärke von mRNA erfolgte in einer quantitativen Echtzeit PCR mit Hilfe des LightCycler II Systems von Roche Diagnostics, Mannheim. Die benötigte cDNA wurde mittels der RT-PCR (siehe 2.4.7) hergestellt.

Für den 20µl Ansatz der quantitativen Echtzeit PCR wurden folgende Reaktionszutaten verwendet:

10ng	cDNA Template
2µl	LightCycler DNA Master SYBR Green I (10x)
1,5-2,4µl	MgCl ₂ (25mM)
Je 0,5µl	der Primer (20mM)

Der Ansatz wurde mit sterilem, im LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit enthaltenen H₂O auf 20µl aufgefüllt.

Der Versuchsansatz wurde dabei folgendem Programm im LightCycler II unterzogen:

Denaturierung:	1 Zyklus:	20°C/s auf 95°C, 30s
Amplifikation:	40 Zyklen:	20°C/s auf 95°C, 3s
		20°C/s auf X°C, 5s
		20°C/s auf 72°C, 16s
		20°C/s auf Y°C
Analyse der Schmelzkurve:	1 Zyklus:	20°C/s auf 95°C
		20°C/s auf 65°C, 15s
		0,1°C/s auf 95°C
Cooling:		20°C/s auf 40°C, 30s

Für die verschiedenen Gewebe wurden in Abhängigkeit vom Primerpaar unterschiedliche Mess- und Annealingtemperaturen benützt.

Primerpaar	Gewebe	Y: Mess	X: Ann
hCYLC for 223/ hCYLD rev 451	Colon	80°	62°
	Leber	79°	60°
	Melanom	79°	60°
hCYLD for 1577/ hCYLD rev 1824	Leber	79°	60°
	Melanom	84°	60°

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde das Haushaltsgen β -Aktin benutzt. Die Analyse der LightCycler Ergebnisse, das heißt, die Quantifizierung der mRNA Expression, erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

2.4.9 Sequenzierung

Sequenziert wurden PCR-Produkte nach Isolierung und Aufreinigung aus Agarosegelen (siehe 2.4.3) und PCR-Produkte nach PEG-Fällung (siehe 2.4.4).

2 μ l der vorbereiteten Proben wurden auf ein 2%iges Agarosegel mit dem entsprechenden DNA Größenmarker aufgetragen, um die Größe und die ungefähre Konzentration der Probe zu bestimmen. Pro Sequenzier-PCR-Reaktion wurden etwa 1-2 μ g DNA benötigt. Als Primer für die Sequenzierung benutzte man die jeweiligen forward und reverse Primer des RT-PCR-Produktes. Die Sequenziertemperatur wurde in Abhängigkeit vom GC-Gehalt der Primer gewählt. Dabei wurde zwischen normal, einem GC Gehalt von 50%, low, einem GC-Anteil unter 50%, und high, einem GC-Gehalt über 50%, im Primer unterschieden. Die entsprechenden Sequenzierprogramme liefen nach folgendem Schema ab:

	normal	high	low
35 Zyklen mit je			
15 Sekunden	96°C	96°C	96°C
1°C/ sec.	auf 60°C	auf 60°C	auf 50°C
15 Sekunden	55°C	60°C	50°C
1°C/ sec.	auf 60°C	auf 62°C	auf 60°C
4 Minuten:	60°C	62°C	60°C
Danach forever:	8°C	8°C	8°C

Pro Sequenzieransatz wurden 1-2µg DNA, 2µl Primer (3,2µM), je 1µl Premix (Applied Biosystems, USA) pro 100bp des zu sequenzierenden PCR Produktes verwendet und mit H₂O auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt. Der Premix enthielt dabei die fluoreszenzmarkierten Nukleotide, spezielle Reaktionspuffer und die Taq- Polymerase.

Nach der Sequenzier-PCR-Reaktion wurde eine Ethanol-fällung des PCR Produktes durchgeführt. Zu den 20µl des PCR-Produktes wurden 10µl 3M NaAc (pH 4,6) und 250µl Ethanol (100%) zugegeben und mit H₂O auf ein Endvolumen von 350µl aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen inkubierte man die Mischung 10 min. bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Durch eine 20minütige Zentrifugation bei 13.000 U/ min wurde die gefällte DNA pelletiert, der Überstand abgenommen, anschließend das Pellet mit 250µl 70%igem Ethanol gewaschen. Der Alkohol wurde nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 13.000 U/ min wieder abgenommen.

Zur Vorbereitung des Sequenzierprozesses im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA) wurde das Pellet in 25 µl Formamid gelöst und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. 15 µl dieses Produktes wurden anschließend in eine 96-Well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems, USA) gefüllt und kurz zentrifugiert. Das System wurde mit dem Genetic Analyser Plate Septa (Applied Biosystems, USA) bedeckt und anschließend im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser analysiert.

2.4.10 RNA Isolation aus Säugerzellen

Die Isolation von RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Zellen abgenommen und die Kultur einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 1 ml PBS von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgeschabt und bei 3000 U/ min für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 350µl RNA Lysispuffer des RNeasy Kits resuspendiert und lysiert. Danach wurde das Lysat mit 350 µl 70% Ethanol durch kurzes Vortexen vermischt. Die Probe wurde auf eine RNeasy spin column gegeben und bei 10000 UpM 15 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Entsprechend wurde erst mit 700 µl Waschpuffer RW1 und dann mit 500 µl Waschpuffer RPE verfahren. Als letzter Reinigungsschritt wurden 500 µl Waschpuffer RPE auf das Rneasy spin column gegeben und 2 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Die RNA wurde eluiert,

indem 30 µl RNase-freies Wasser für 1 Minute bei 10000UpM durch das Rneasy spin column zentrifugiert wurden. Das RNA-Eluat wurde in der RT-PCR (siehe 2.4.7) weiterverwendet oder bei -20°C weggefroren.

2.5. Zellkulturmethoden

2.5.1. Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach Waschen mit PBS für 5min mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert, in DMEM mit 10% FKS aufgenommen und, 1:2 bis 1:20, verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

2.5.2 Luciferase-Reportergen-Assay

Mithilfe sogenannter Reportergen-Analysen lassen sich regulatorische DNA-Sequenzen untersuchen. Bei der Transfektion werden Luciferase-Vektoren verwendet, die ein Reportergen und das Luciferase-Gen besitzen. Ein weiteres Plasmid enthält eine regulatorische DNA-Sequenz, die Einfluss auf das Reportergen nimmt. Bei Cotransfektion einer Zelle mit Luciferase-Vektor und zweitem Plasmid wird das Reportergen reguliert. Die Aktivität des Luciferase-Gens verhält sich proportional zur Aktivität des Reportergens. Indirekt kann durch Messung der Luciferase-Aktivität die regulatorische Fähigkeit des Reportergens beurteilt werden. Durch Zugabe eines Substrats (Luciferin) für das Enzym Luciferase kommt es zur Chemilumineszenz, welche an einem Luminometer gemessen wird. Um die unterschiedliche Transfektionseffizienz der einzelnen Versuchsansätze anzugleichen, wurden die Zellen mit einem Kontrollvektor (pRL-TK, Promega), der das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla renifor* enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der Renilla Luciferase wurde ebenfalls im Luminometer erfasst.

Zur Durchführung des Luciferase Assays wurde der 'Luciferase Assay' Kit der Firma Promega verwendet.

Hierfür wurden je 200000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und nach der Lipofectamin Methode transfiziert. Je Well wurden 40µl des Gesamtansatzes zugegeben, der sich aus Ansatz 1 und 2 zusammensetzt.

Ansatz 1 (je Doppelwell): 5µl Lipofektamin^{IM}
 35µl DMEM ohne FKS

Ansatz 2 (je Doppelwell): 0,05-0,5 µg/µl Plasmid-DNA (Testvektor)
 1 µg/µl NFκB luc
 0,2 µg/µl pRL-TK
 6 µl Lipofektamin^{Plus}

Ansatz 2 wurde mit DMEM ohne FKS auf 40µl aufgefüllt.

Anschließend wurden die Zellen 24 oder 48 Stunden inkubiert. Zur Ernte wurde das Kulturmedium der transfizierten Zellen abgegossen und die Zellkultur zweimal mit normalem Leitungswasser gespült. Danach wurden der 6- Well Kulturplatte pro Well 300µl Lysispuffer zugegeben und die Zellen 20 Minuten auf einem Schüttler lysiert. Nach der Lyse wurden je 50µl eines Versuchsansatzes mit den im Kit bereitgestellten Chemikalien im Luminometer vermessen.

3 Ergebnisse

Wie in 1.2.3 beschrieben, kann ein Verlust des Tumorsuppressorgens CYLD zum Krankheitsbild des Zylindroms oder eines anderen benignen Adnextumors führen. Diese Dissertation befasst sich mit der Fragestellung, ob eine Änderung der mRNA-Expression von CYLD beim kolorektalen Karzinom, hepatozellulären Karzinom und malignen Melanom vorliegt. Des Weiteren wird untersucht, in welcher Weise die NF- κ B Aktivität in Tumorzellen durch das Einbringen eines CYLD-Plasmids beeinflusst wird. Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits in dem Journal „Carcinogenesis“ veröffentlicht: „Reduced expression of CYLD in human colon und hepatocellular carcinomas“ (Hellerbrand et. al., 2007).

3.1 NF- κ B Aktivität in Tumorzellen

In den drei beispielhaft untersuchten Tumorzelllinien HCT116 (primäres kolorektales Karzinom), HepG2 (primäres hepatozelluläres Karzinom) und Mel Im (humane Melanomzelllinie aus einer Metastase) konnte eine hohe NF- κ B Aktivität beobachtet werden. Der Leervektor pGL3 basic wurde jeweils auf 1 gesetzt und bestätigt somit die Spezifität der Aktivität des NF- κ B luc Vektors. Mit dem NF- κ B luc Vektor wird die transkriptionelle Aktivität der Untereinheiten von NF- κ B vermessen, denn die klassische Promotor-Sequenz für die Bindung von NF- κ B ist in diesem Vektor sieben Mal vor das Luciferasegen kloniert. Wie Abbildung 3-1 zeigt, konnte durch Zugabe des NF- κ B luc Vektors bei den Tumorzelllinien eine endogene NF- κ B Aktivität zwischen 150 und 200 RLU (= relative light units) gemessen werden.

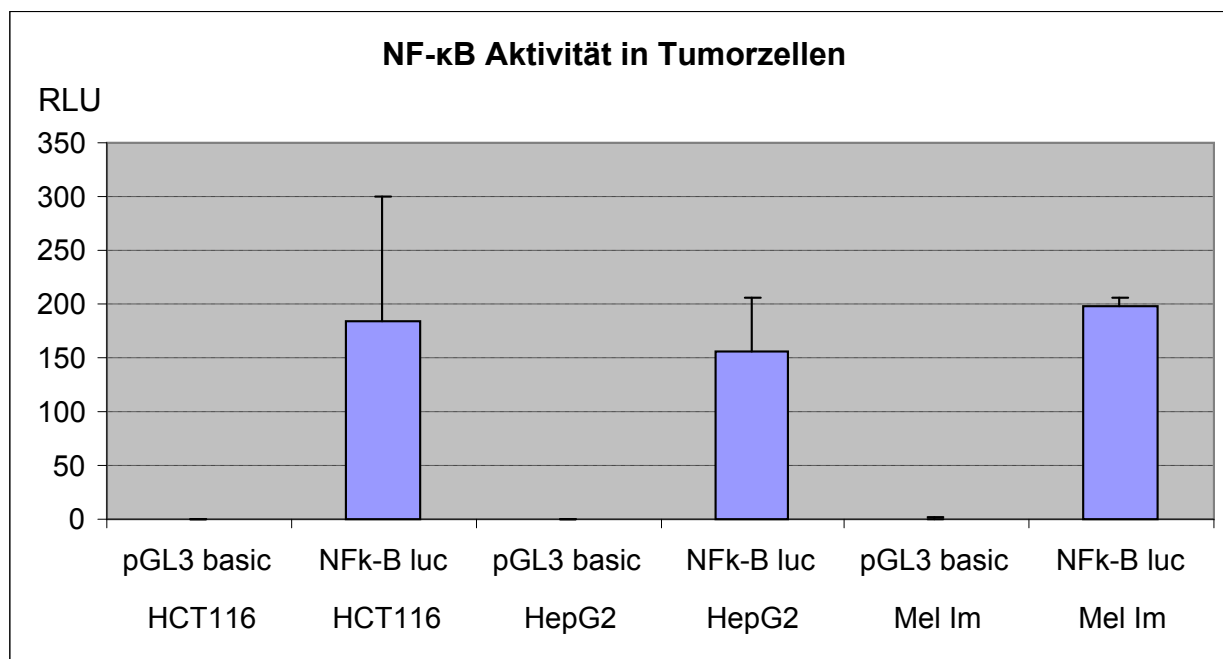


Abbildung 3-1: NFκ-B Aktivität in HCT116, HepG2 und Mel Im bei transienter Transfektion, bestimmt im Reporterassay, pGL3 basic wurde auf 1 gesetzt.

3.2 Etablierung von PCR und quantitativer Echtzeit PCR zur Analyse von CYLD

Zum Nachweis einzelner mRNA-Abschnitte von CYLD mithilfe der PCR-Technik wurden verschiedene Primer etabliert (siehe 2.4.5). Im Ergebnisteil wird bei allen Tumoren das Produkt der Primerpaare 67/637, 223/1898 und 1577/2647 gezeigt. Die Primerpaare 223/451 und 1577/1824 erwiesen sich aufgrund einer Länge von 200 bis 300 Basenpaare als geeignet für die quantitative Echtzeit PCR. Expressionsanalysen auf mRNA Ebene ergaben, dass CYLD in allen untersuchten Normalgeweben aus Leber, Kolon und Melanozyten sowie einer Gewebereihe nachweisbar ist (siehe 3.3.1 und 3.3.2).

Im Rahmen dieser Dissertation fand sich kein Hinweis für eine Mutation vom CYLD in den untersuchten Normal- und Tumorgeweben. Es zeigte sich keine Varianz der mRNA-Expression in Abhängigkeit zur CYLD Produktlänge, die auf eine Deletion oder Insertion schließen lässt. Die bei dem Primerpaar 67/637 in allen untersuchten Zelllinien aufgetretenen zusätzlichen Banden sind unspezifisch. Eine Sequenzierung der Bande bei etwa 500bp in Mel 28 und NHEM erbrachte keine Zuordnung zu einer bekannten DNA-Sequenz. Beispielhaft wurde außerdem eine abschnittsweise Sequenzierung von melanozytärem Normalgewebe,

NHEM, und einer humanen Melanomzelllinie, SK Mel 28, durchgeführt, welche einen regelrechten Befund ohne Mutation ergab.

3.3 Vergleich der CYLD-Expression auf mRNA-Ebene

3.3.1 Normalzellen

Wie aus Abbildung 3-2 ersichtlich ist, zeigen alle verwendeten Normalzellen aus dem Gastrointestinaltrakt (IEZ, Rektum, Sigma), dem Lebergewebe (Leber 1, Leber 2) und den Melanozyten (NHEM 1, NHEM 2) eine deutliche CYLD-mRNA-Expression im untersuchten DNA-Abschnitt. Es wurden mindestens zwei verschiedene Proben je Tumorentität verwendet, um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können.

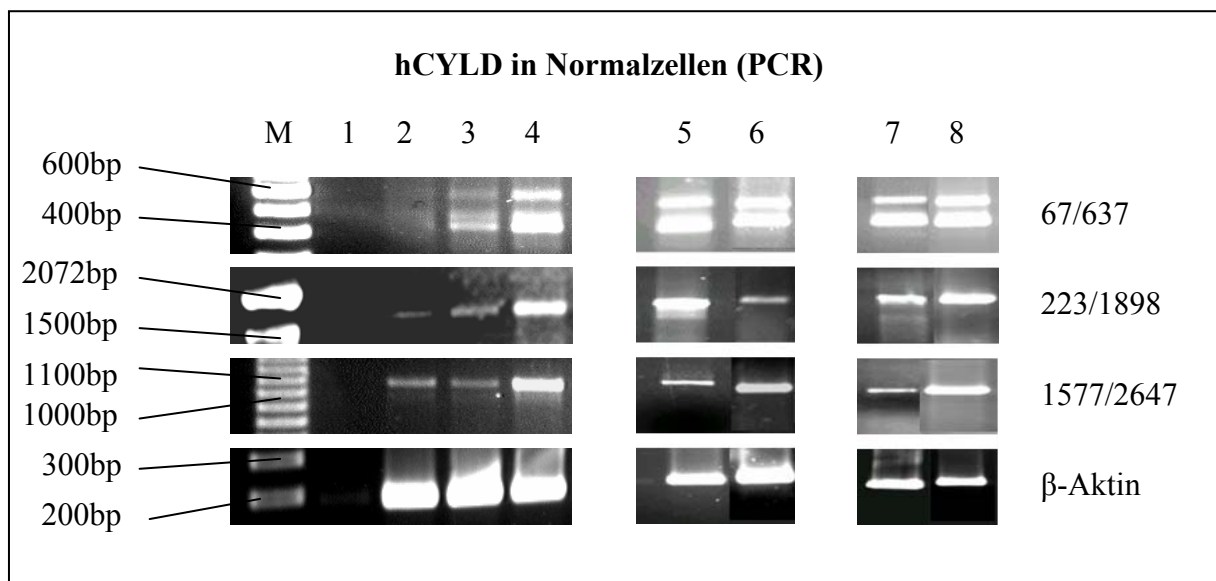


Abbildung 3-2: PCR von hCYLD (Amplifikation von Exon 2 bis Exon 16) und β -Aktin als Kontrolle der RNA Qualität und Ladekontrolle, 1,5% Agarosegel; M: DNA Größenmarker, 1: Negativkontrolle, 2: IEZ, 3: Rektum, 4: Sigma, 5: Leber 1, 6: Leber 2; 7: NHEM 1; 8: NHEM 2.

3.3.2 Normalgewebereihe

Mittels PCR wurde die CYLD-mRNA-Expression in einer Normalgewebereihe untersucht. Wie Abbildung 3-3 zeigt, weisen die untersuchten Gewebetypen quantitative Unterschiede in der CYLD-Expression auf, in keinem Fall fehlt CYLD jedoch komplett. Besonders hohe Konzentrationen liegen in Testis, Plazenta und Cerebellum vor. Deutlich nachweisbar ist CYLD außerdem in Thymus, Kolon, Nebenniere, Skelettmuskulatur, Uterus, Niere, Knochenmark, adultem Gehirn, fetalem Gehirn, Prostata und Trachea. In schwacher Ausprägung findet sich CYLD aber auch in humanem Rückenmark, Speicheldrüsengewebe, humaner adulter und fetaler Leber. CYLD weist also keine besondere Gewebespezifität auf.



Abbildung 3-3: PCR von hCYLD (Amplifikation des Exon 9) und β -Aktin als Kontrolle der RNA Qualität und Ladekontrolle, 1,5% Agarosegel; M: DNA Größenmarker,

- | | |
|----------------------|----------------------------|
| 1: Negativkontrolle | 12: humaner Uterus |
| 2: Thymus | 13: humanes Knochenmark |
| 3: Plazenta | 14: humanes Gehirn |
| 4: Kolon | 15: humanes Rückenmark |
| 5: fetale Leber | 16: humanes fetales Gehirn |
| 6: Nebenniere | 17: humane Prostata |
| 7: Gehirn | 18: Speicheldrüse |
| 8: Testis | 19: humane adulte Leber |
| 9: Skelettmuskulatur | 20: fetale humane Leber |
| 10: Uterus | 21: Trachea |
| 11: Niere | 22: Cerebellum |

3.3.3 Kolon und kolorektales Karzinom

Mithilfe der PCR-Technik wurde die mRNA-Expression von CYLD in Normal- und Tumorzelllinien des unteren intestinalen Traktes untersucht. Wie in Abbildung 3-2 und 3-3 dargestellt, zeigt sich eine deutliche Bande bei normalen intestinalen epithelialen Zellen (IEZ), bei normalen Rektumzellen und, am stärksten ausgeprägt, bei normalen Sigmazellen. Eine schwächere Bande weisen die Tumorzelllinien aus dem primären kolorektalen Adenokarzinom (CaCo, HCT116, SW48, SW480) und einer Metastase (LoVo) auf (Abbildung 3-4 und 3-5). HT29, die aus einem Primärtumor gewonnen wurden, zeigen eine geringe CYLD-Expression. Die in Abbildung 3-5 zusätzlich untersuchte HT29M3 Zelllinie ist ein hoch differenzierter Subtyp von HT29 und weist eine deutliche CYLD-Expression auf. Hier zeigt sich eine Korrelation zwischen Tumordifferenzierung und CYLD-Expression: Bei Verlust der Differenzierung, ein prognostisch ungünstiger Faktor, wird auch eine verminderte Expression des Tumorsuppressorgens CYLD nachgewiesen.

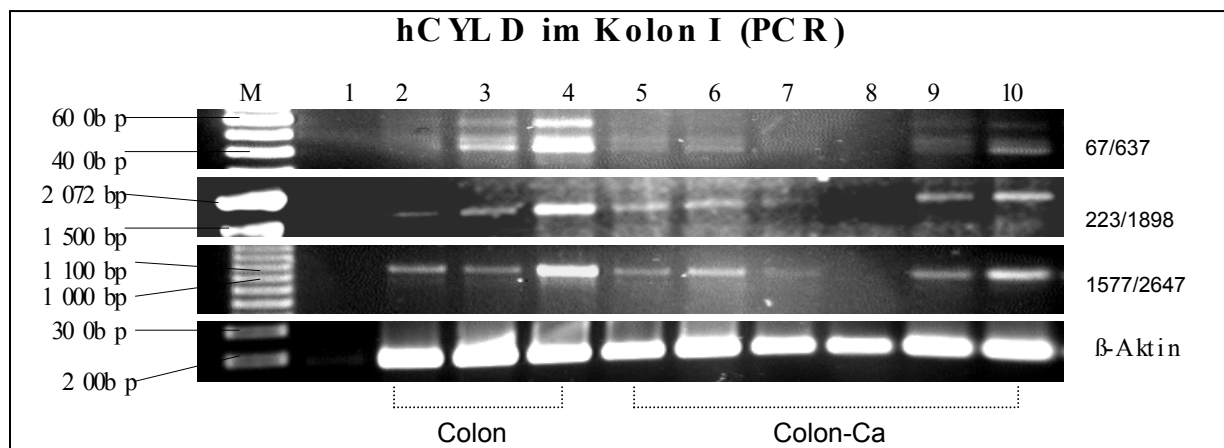


Abbildung 3-4: PCR von hCYLD (Amplifikation von Exon 2 bis Exon 16) und β -Aktin als Kontrolle der RNA Qualität und Ladekontrolle, 1,5% Agarosegel; M: DNA Größenmarker, 1: Negativkontrolle, 2: IEZ, 3: Rektum, 4 Sigma, 5: LoVo, 6: CaCo, 7: HCT116, 8: HT29, 9: SW48, 10: SW480

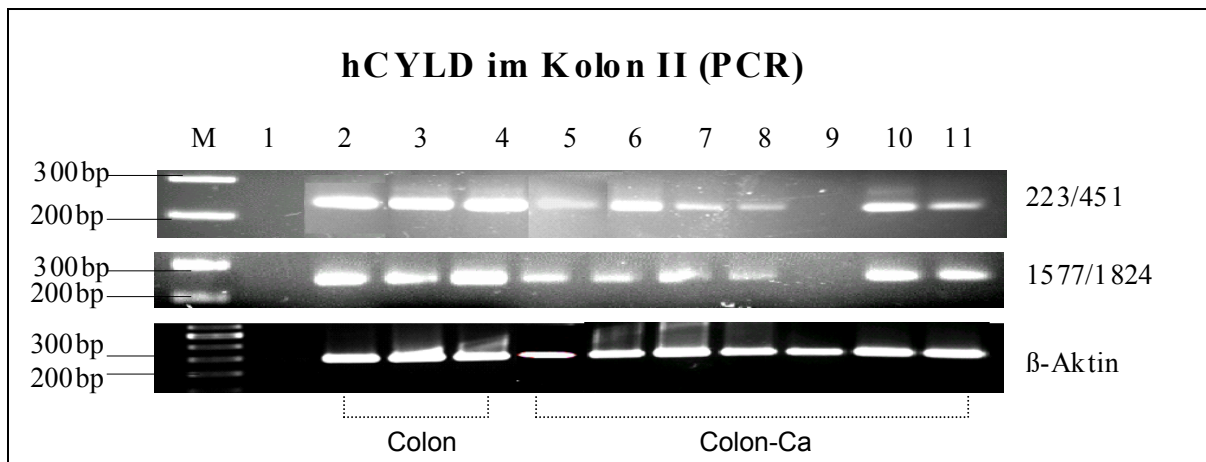


Abbildung 3-5: PCR von hCyld (Amplifikation von Exon 3 bis Exon 4 und in Exon 9), RT-PCR von β -Aktin als Kontrolle der RNA Qualität und Ladekontrolle, 1,5% Agarosegel; M: DNA Größenmarker, 1: Negativkontrolle, 2: IEZ, 3: Rektum, 4: Sigma, 5: HT29M3, 6: LoVo, 7: CaCo, 8: HCT116, 9: HT29, 10: SW48, 11: SW480

Um die unterschiedlich ausgeprägte CYLD-Expression bei Normal- und Tumorgewebe, die sich bereits in der PCR andeutet, zu erfassen, wurde eine quantitative Echtzeit PCR von Exon 3 bis 4 mit dem Primerpaar 223/451 durchgeführt. In Abbildung 3-6 zeigt sich bei einer Normierung der IEZ auf 1 eine verminderte CYLD-Expression aller Tumorzelllinien auf 8% bis 63% des Normalgewebes.

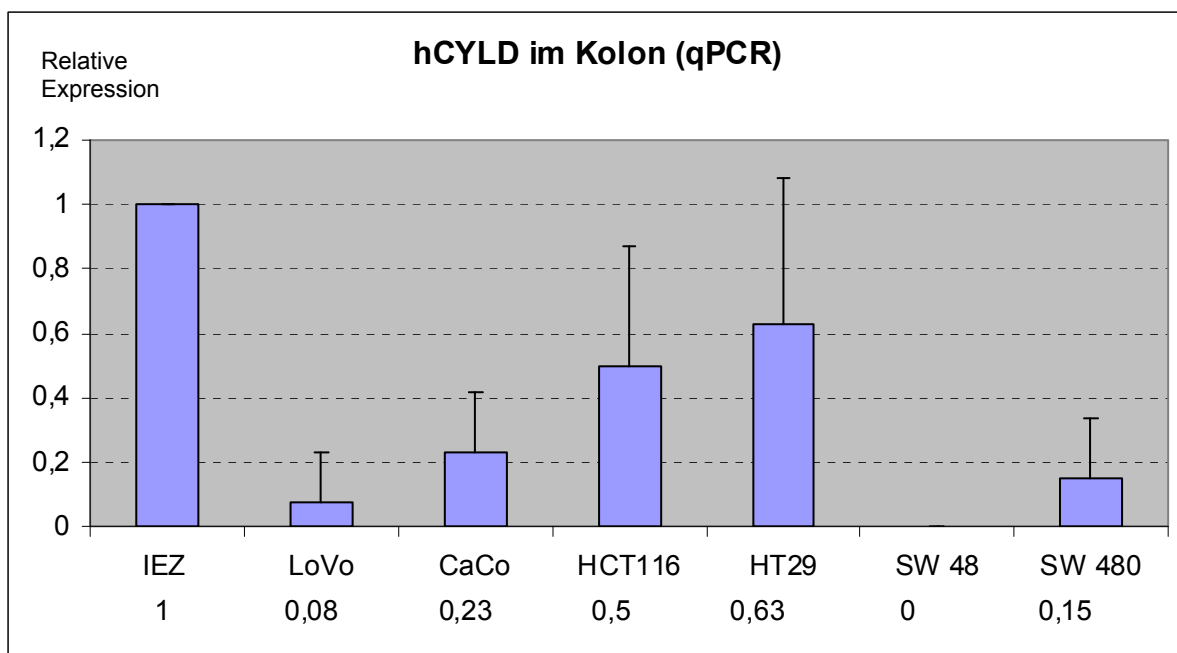


Abbildung 3-6: Ergebnisse der quantitativen Echtzeit PCR der mRNA-CYLD-Expression von Exon 3 bis 4 in normalen intestinalen epithelialen Zellen (IEZ) und in sechs verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien; die Zahlenreihe unter der Grafik verdeutlicht das Verhältnis zu IEZ, die auf eins gesetzt sind.

3.3.4 Hepatozyten und hepatozelluläres Karzinom

Wie Abbildung 3-2 zeigt, kann mittels PCR in beiden Normalgewebeprobe der Leber eine deutliche CYLD-Expression nachgewiesen werden. Die humanen Leberzelllinien aus primärem hepatozellulärem Karzinom hingegen zeigen eine deutlich reduzierte CYLD-Expression, wie aus folgender Abbildung ersichtlich:

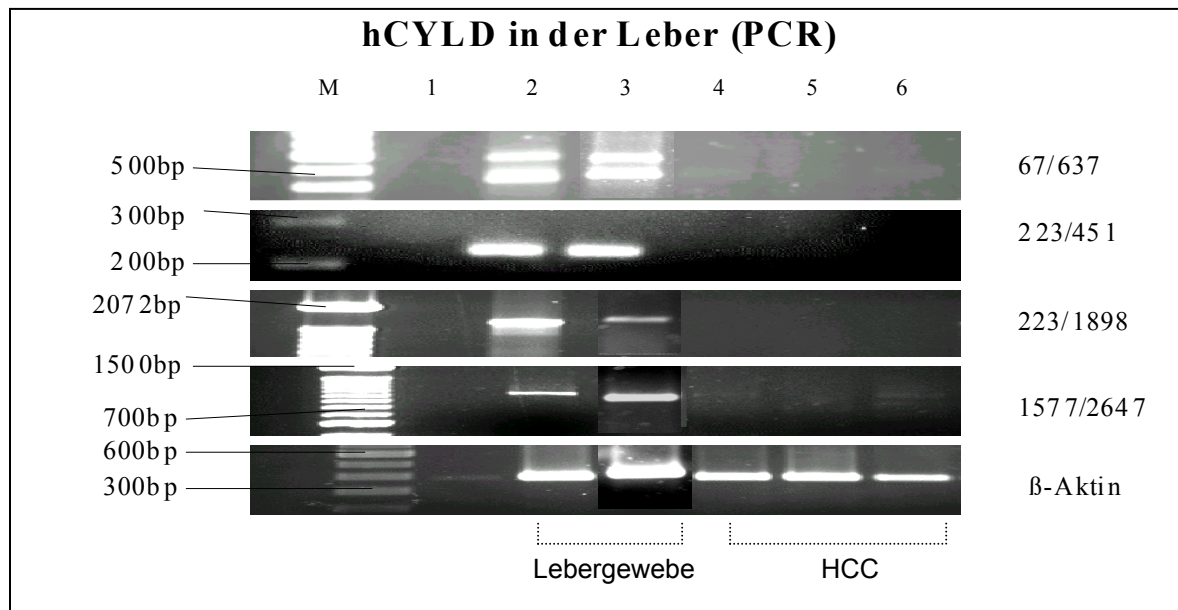


Abbildung 3-7: PCR mit hCYLD (Amplifikation von Exon 2 bis Exon 16), RT-PCT von β -Aktin als Kontrolle der RNA Qualität und Ladekontrolle, 1,5% Agarosegel; M: DNA Größenmarker, 1: Negativkontrolle, 2: Leber 1; 3: Leber 2; 4: Hep3b; 5: HepG2; 6: PLC

Anschließend wurde eine quantitative Echtzeit PCR im Bereich von Exon 3 bis 4 und in Exon 9 zur Quantifizierung der Unterschiede durchgeführt. Es wurde ein Mittelwert der Ergebnisse, die mit dem Primerpaar 223/451 und dem Primerpaar 1577/1824 erzielt wurden, gebildet. Abbildung 3-8 bestätigt, dass die Tumorzelllinie HepG2 CYLD nur in sehr geringen Mengen exprimieren kann. Hep 3b weist im Durchschnitt ein etwas niedrigeres Niveau als das Normalgewebe auf. Für die PLC-Zellreihe war eine Auswertung aus technischen Gründen nicht möglich.

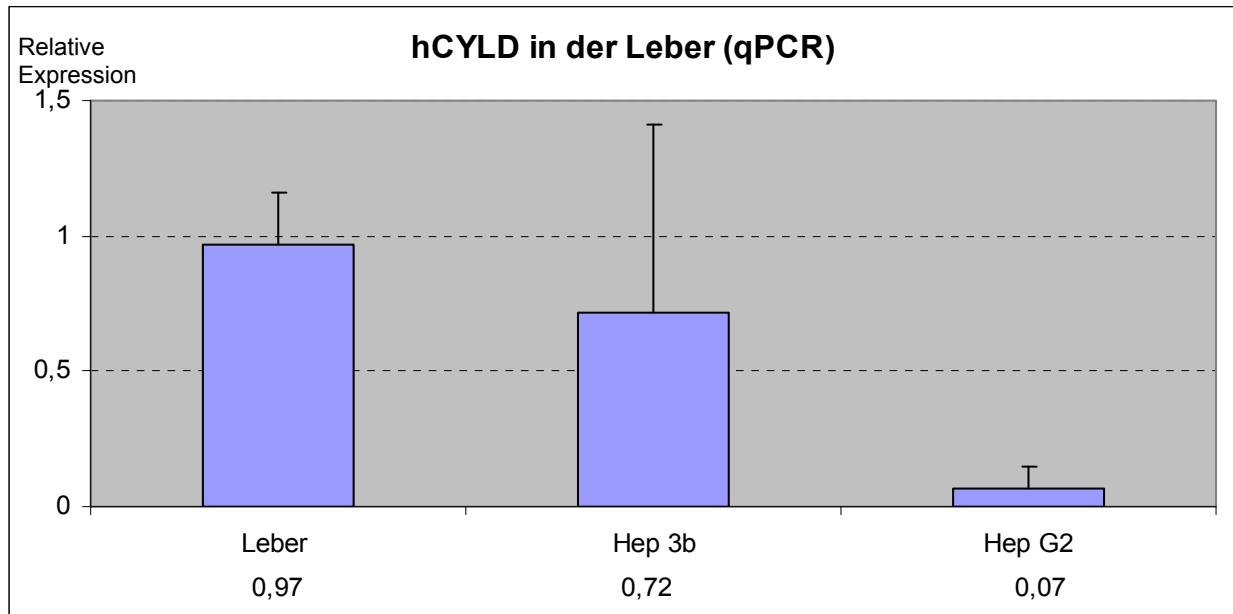


Abbildung 3-8: Ergebnisse der quantitativen Echtzeit PCR der hCYLD-Expression von Exon 3 bis 4 und von Exon 9 in normalen humanen Hepatozyten und zwei verschiedenen Zelllinien aus hepatozellulärem Karzinom; die Zahlenreihe unter der Grafik ist in relativen Einheiten gemessen.

Außerdem wurden Paare von Lebernorgewebe und hepatozellulärem Karzinom von jeweils einem Spender mittels PCR betrachtet. Es bietet sich hierbei die einzigartige Möglichkeit, Veränderungen, die bei der Transformation von Normalgewebe zu Tumorgewebe stattfinden, zu erfassen. Wie Abbildung 3-8 zeigt, besteht eine Tendenz zur Herabregulation der CYLD-Expression im Tumorgewebe.

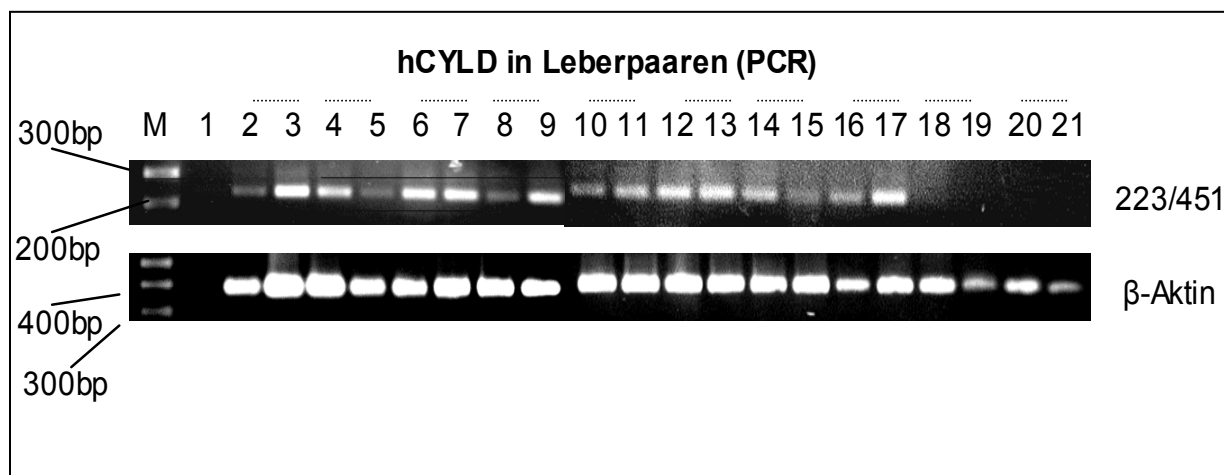


Abbildung 3-9: PCR von hCYLD (Amplifikation von Exon 3 bis Exon 4), RT-PCR von β -Aktin als Kontrolle der RNA Qualität und Ladekontrolle, 1,5%Agarosegel; M: DNA Größenmarker, 1: Negativkontrolle, 2: 360N (=Normalgewebe Leber) , 3: 360P (=hepatozelluläres Karzinomgewebe), 4: 379N, 5: 379P, 6: 403N, 7: 403P, 8: 344N, 9: 344P, 10:315N, 11:315P, 12: 356N, 13: 356P, 14: 316N, 15: 316P, 16: 264N, 17:264P, 18: 354N, 19: 354P, 20: 359N, 21: 359P

Eine eindeutige quantitative Aussage kann aufgrund der unterschiedlichen RNA-Ladung der Proben, die sich in den β -Aktin Banden zeigt, mit dieser Methode nicht getroffen werden. Daher schloss sich im nächsten Schritt eine quantitative Echtzeit PCR an, deren Ergebnisse die Grafik 3-10 darstellt. Bei 70% der Leberpaare zeigt sich eine deutliche Herabregulation der CYLD-Expression im Tumorgewebe auf 10 bis 85% des Normalgewebes. Einzige Ausnahmen sind drei Paare, 379, 315 und 354, die eine erhöhte CYLD-Expression im Tumorgewebe zeigen.

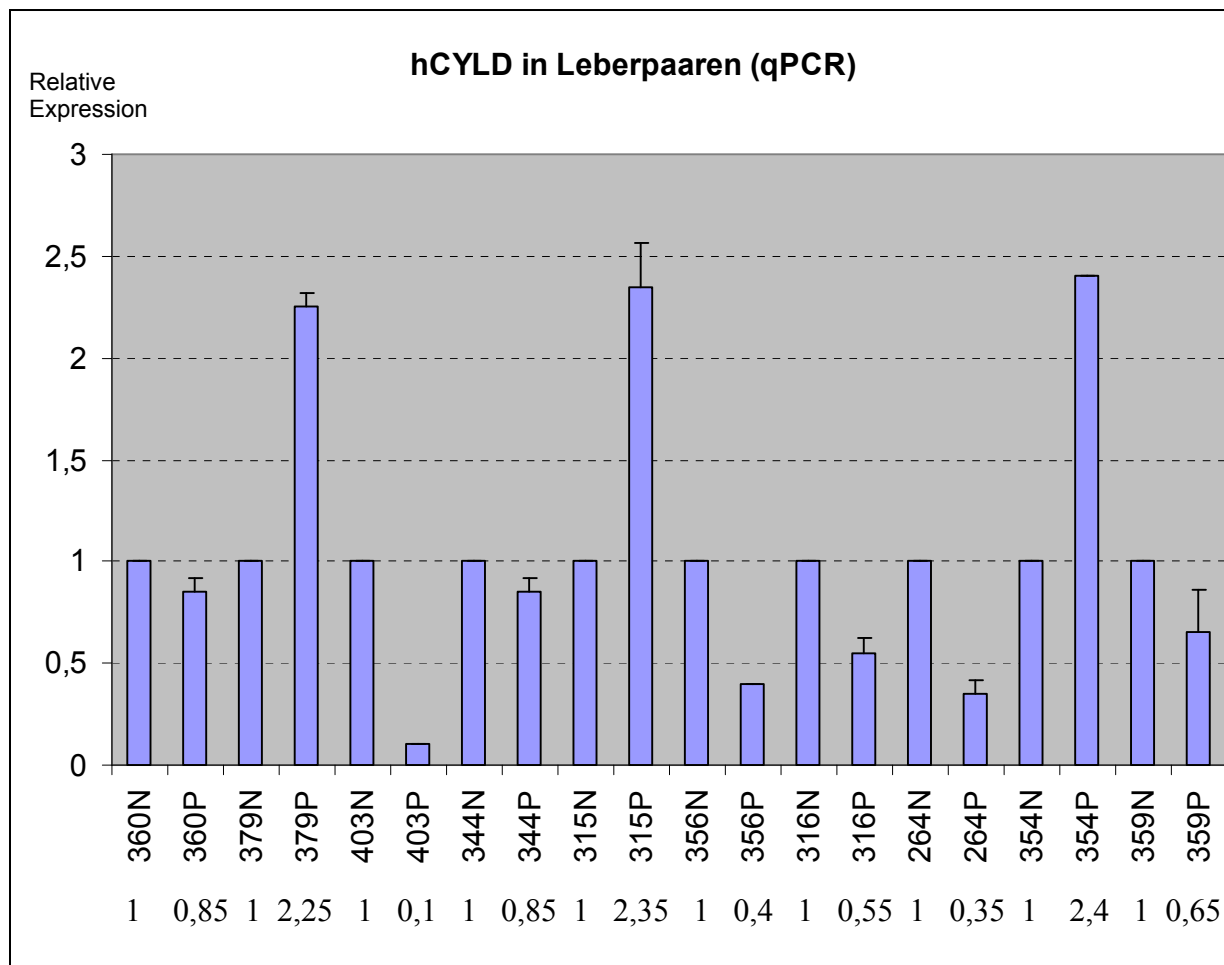


Abbildung 3-10: Ergebnisse der quantitativen Echtzeit PCR der hCYLD-Expression von Exon 3 bis 4 in Paaren von Lebernorgewebe (N) und hepatozellulärem Karzinom (P); die Zahlenreihe unter der Grafik verdeutlicht das relative Verhältnis des Tumorgewebes zum zugeordneten Normalgewebe, das jeweils auf eins gesetzt wurde.

Insgesamt wird beobachtet, dass die CYLD-Expression sowohl in den untersuchten Tumorzelllinien als auch im Tumorgewebe von Spendern gegenüber Normalgewebe vermindert stattfindet.

3.3.5 Melanozyten und Melanom

Die Abbildung 3-2 zeigt in der PCR eine deutliche CYLD-Expression der normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM). Im Vergleich dazu weisen die humanen Melanomzelllinien aus einer Metastase (Mel Im, Mel Ju, Sk Mel 3, HTZ 19d) und einem Primärtumor (Mel Juso, Mel Ho, Mel Wei, Mel Ei, Sk Mel 28) eine deutlich geringere CYLD-Expression auf (Abbildung 3-11). Auch hier erwies sich die PCR nicht als geeignet, genaue Aussagen zu treffen, weil verschiedene cDNA Mengen in die PCR eingegangen sind, wie die Aktinkontrolle zeigt.

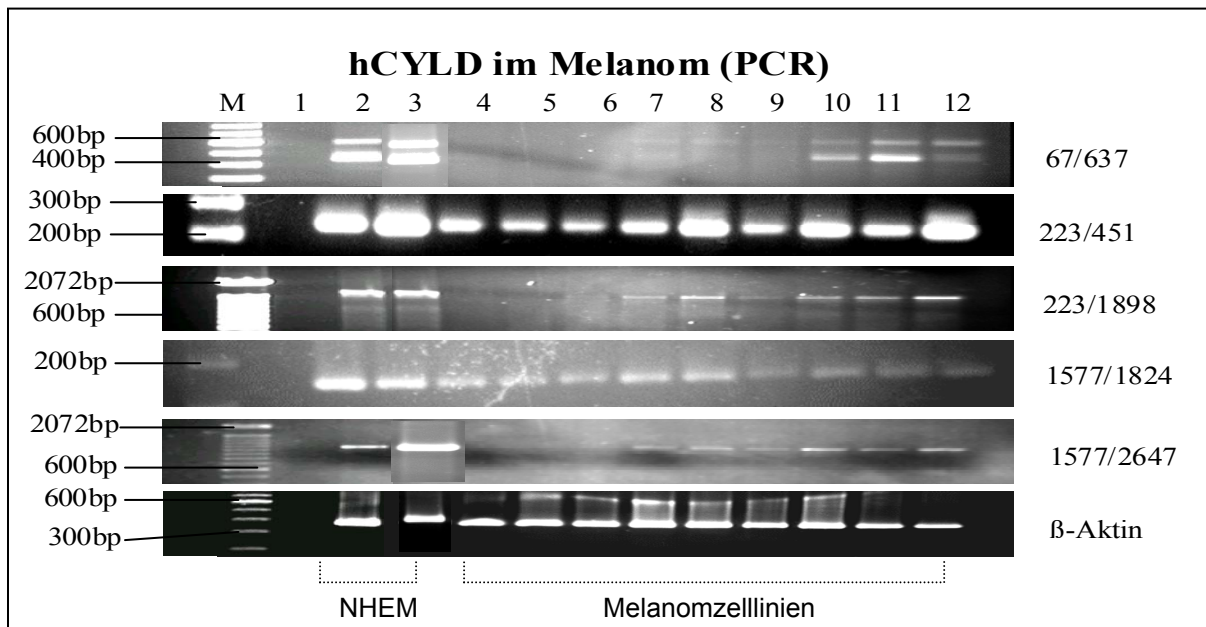


Abbildung 3-11: PCR von hCyld (Amplifikation von Exon 2 bis Exon 16), RT-PCR von β -Aktin als Kontrolle der RNA Qualität und Ladekontrolle, 1,5% Agarosegel; M: DNA Größenmarker, 1: Negativkontrolle, 2: NHEM 1, 3: NHEM 2, 4: Mel Im, 5: Mel Ju, 6: Mel Juso, 7: Mel Ho, 8: Mel Wei, 9: Mel Ei, 10: SK Mel 3, 11: HTZ19d, 12: SK Mel 28

Anschließend wurde eine quantitative Echtzeit PCR von Exon 2 bis 3 und im Exon 9 durchgeführt, deren Ergebnisse Abbildung 3-12 zeigt. Es wurde ein Mittelwert der Ergebnisse, die mit dem Primerpaar 223/451 und dem Primerpaar 1577/1824 erzielt wurden gebildet. Die Tumorzelllinien Mel Im, Mel Juso, Mel Ho, Mel Wei, HTZ19 und Sk Mel 3 scheinen die Fähigkeit zur CYLD-Expression weitgehend verloren zu haben. Hingegen zeigen Mel Ei, Sk Mel 28 und Mel Ju gering verminderte Werte gegenüber normalen humanen

dermalen Melanozyten. Die Standardabweichung von NHEM wird durch die unterschiedliche Qualität der verwendeten Melanozytenproben begründet. Daher wurde nicht das Normalgewebe, sondern mit Mel Ei eine stabile Zellreihe auf eins gesetzt. Auch bei dieser Tumorentität führt die geringe CYLD-Expression zu technischen Schwierigkeiten in der quantitativen Echtzeit PCR.

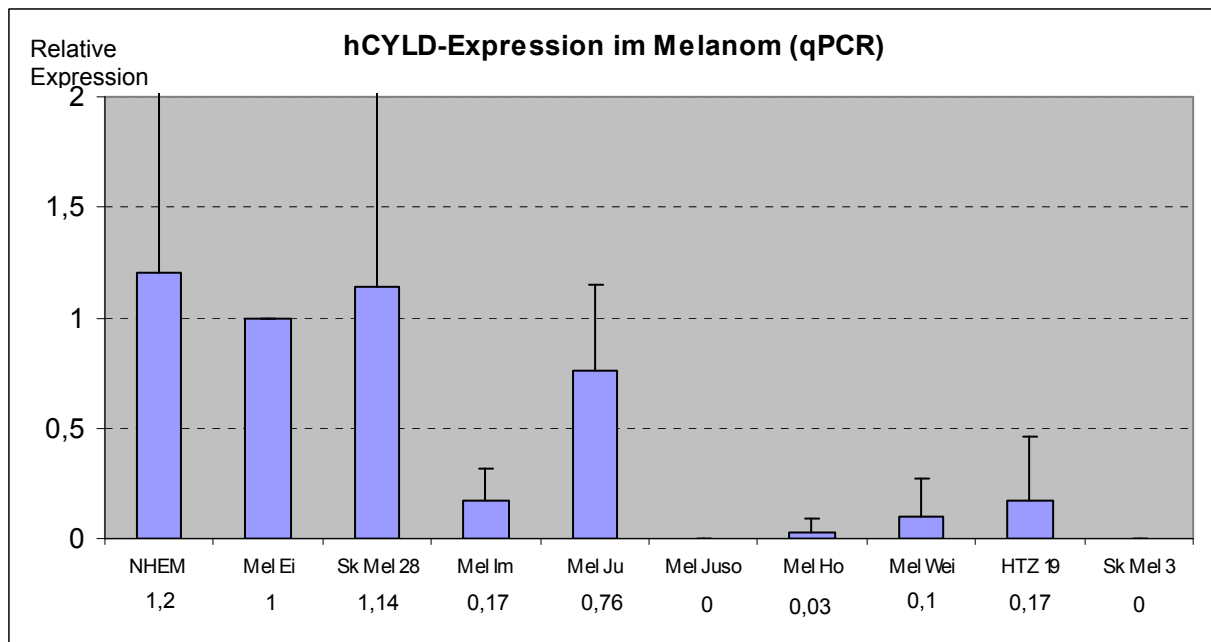


Abbildung 3-12: Ergebnisse der quantitativen Echtzeit PCR der hCYLD-Expression von Exon 3 bis 4 und von Exon 9 in normalen humanen Melanozyten und in neun verschiedenen Melanomzelllinien; die Zahlenreihe unter der Grafik verdeutlicht das Verhältnis zu Mel Ei, die auf eins gesetzt sind.

Teilweise divergierende Ergebnisse der einzelnen Verfahren sind in technisch-experimentellen Schwierigkeiten begründet. Es kann aber eindeutig nachgewiesen werden, dass die normalen humanen Melanozyten eine ausgeprägte CYLD-Expression zeigen, die bei den Tumorzelllinien deutlich vermindert ist. Dabei ist aus Abbildung 3-11 ersichtlich, dass keine der untersuchten Proben die Fähigkeit zur CYLD-Expression völlig verloren hat.

3.4 Regulation der NF- κ B Aktivität von Tumorzellen durch CYLD

Die NF- κ B Aktivität wird mit Hilfe des Reporterassays in Abhängigkeit von CYLD analysiert. Mit HepG2 (primäres hepatozelluläres Karzinom), HCT116 (primäres kolorektales Karzinom) und Mel Im (humane Melanomzelllinie aus einer Metastase) wurden drei Tumorzelllinien für die transiente Transfektion gewählt, die eine vergleichsweise geringe CYLD-Expression auf mRNA Ebene zeigen. Für den Luciferase-Reporterassay (2.5.2) wurde nach der Lipofektamin Methode das CYLD-Plasmid in Konzentrationen von 0,005 bis 0,5 μ g je Doppelwell eingebracht. Nach einer Inkubationszeit von 24h (HepG2, Mel Im) beziehungsweise 48h (HCT116) konnte die Luciferaseaktivität mittels eines Luminometers gemessen und damit die jeweilige NF- κ B Aktivität bestimmt werden. Als Kontrolle diente NF κ B luc, PGL3 basic wurde auf eins normiert.

3.4.1 Kontrolle der Transfektion mit dem CYLD-Plasmid auf RNA-Ebene

Um vor der Durchführung des Reporterassays zu überprüfen, ob das CYLD-Plasmid bei der transienten Transfektion von den Zellen aufgenommen wird, wurde HCT 116- und HepG2 mRNA aus einer Zellkultur gewonnen, die zuvor mit 0,1 μ g CYLD Expressionsplasmid transfiziert worden war. Im Vergleich dazu wurde die RNA einer gleichzeitig kultivierten jedoch nicht transfizierten Zellkultur betrachtet. Die RNA Extraktion erfolgte mit dem Rneasy® Mini Kit (siehe 2.4.10). Die PCR wurde mit einem speziellen Primerpaar (mCYLD for 487/ mCYLD rev 703) durchgeführt, da die einklonierte CYLD-DNA von der Maus stammt.

Wie aus Abbildung 3-13 ersichtlich, konnte in der Tumorzelllinie HCT 116 durch Einbringen des Vektors die Expression von CYLD induziert werden. Während die nicht transfizierten HCT 116 Zellen in der PCR keine Bande zeigen, weisen die behandelten Zellen eine deutliche CYLD-Expression auf. Dies beweist, dass das Einbringen des CYLD-Plasmids in HCT 116 erfolgreich stattgefunden hat. Auch bei HepG2 kann nach transients Transfektion eine deutliche Zunahme der CYLD-Expression beobachtet werden. Die schwach ausgeprägte Bande der unbehandelten Zellen lässt sich auf eine unspezifische Reaktion zurückführen.

In mehreren Versuchsanordnungen zeigte sich eine optimale Transfektionsdauer von 24h für die Zelllinien HepG2 und Mel Im sowie 48h für HCT 116.

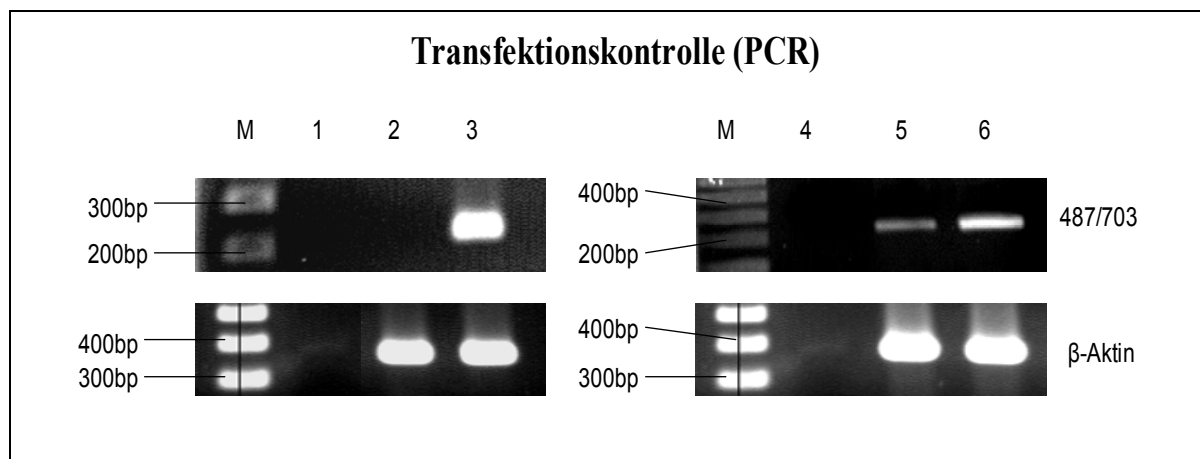


Abbildung 3-13: PCR von mCylD (Amplifikation von Exon 1 bis Exon 2), RT-PCR von β -Aktin als Kontrolle der RNA Qualität und Ladekontrolle, 1,5% Agarosegel; M: DNA Größenmarker, 1: Negativkontrolle, 2: HCT116 ohne CYLD Transfektion, 3: HCT116 mit CYLD Transfektion, 4: Negativkontrolle, 5: HepG2 ohne CYLD Transfektion, 6: HepG2 mit CYLD Transfektion

3.4.2 HCT116

Abbildung 3-14 zeigt die Ergebnisse einer transienten Transfektion der Tumorzelllinie HCT116 mit verschiedenen Konzentrationen des CYLD Expressionskonstrukts. CYLD kann in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge des Plasmids die NF κ -B Aktivität senken. Bei einer CYLD Konzentration von 0,1 μ g und weniger wird eine zunehmende Reduktion der NF- κ B Aktivität erreicht. Die NF- κ B Aktivität verhält sich damit umgekehrt proportional zu den eingesetzten Konzentrationen des CYLD-Vektors.

Da CYLD, wie bereits auf molekularer Ebene gezeigt wurde, physiologisch nur in sehr geringen Mengen vorkommt, kann ein überhöhter CYLD Einsatz gegenteilige Effekte erzeugen. Damit erklärt sich, dass eine Vektormenge von 0,5 μ g scheinbar zu einer Steigerung der NF- κ B Aktivität führt. Die optimale Vektormenge zur maximalen NF κ -B Senkung lässt sich nicht allgemein definieren, sondern ist bei jedem einzelnen Versuch anders anzusetzen. Dies ist durch eine unterschiedliche Transfektionseffizienz durch Varianzen in der Zellkultur begründet.

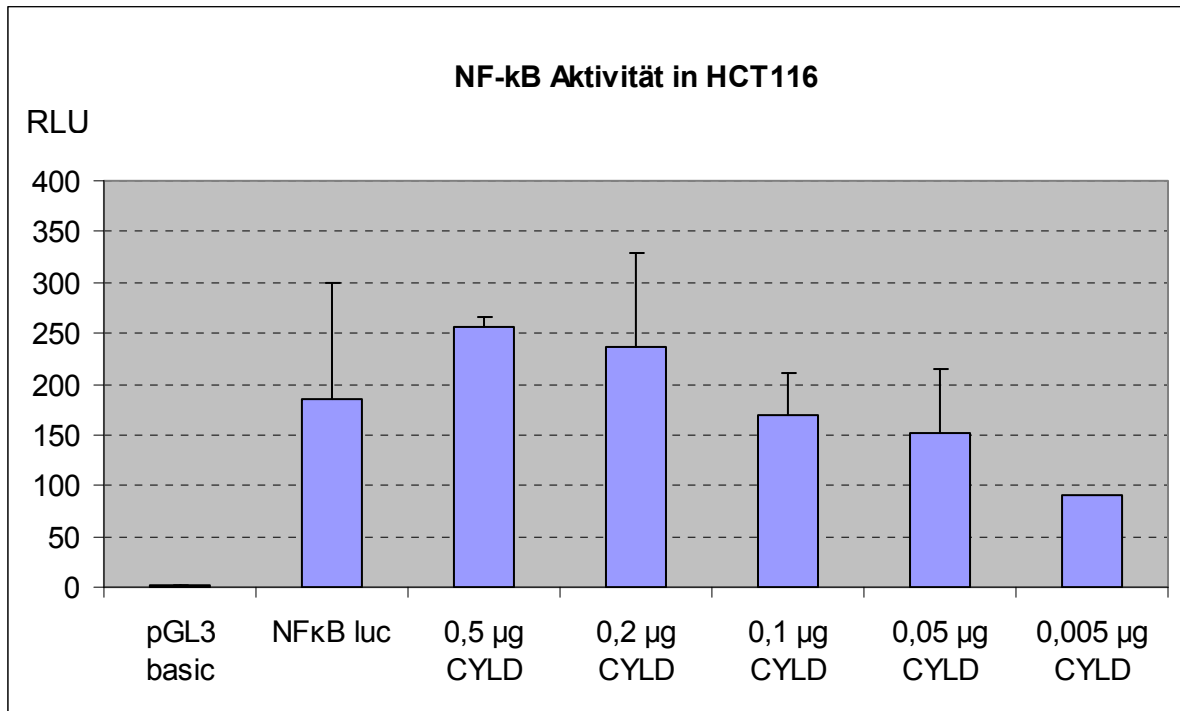


Abbildung 3-14: NFκ-B Aktivität in HCT116 bei transienter Transfektion mit verschiedenen Mengen von mCYLD, bestimmt im Reporterassay, die NFκ-B Aktivität in pGL3 basic wurde als 1 angenommen.

Dennoch lässt sich die Konzentration der Transfektion des CYLD Vektors abschätzen. Durch einen variablen, niedrig dosierten Einsatz von CYLD kann die NFκ-B Aktivität in der Tumorzelllinie HCT116 gesenkt werden.

3.4.3 HepG2

Aus Abbildung 3-15 ist ersichtlich, dass auch bei der Tumorzelllinie HepG2 in Abhängigkeit von der Vektormenge bei transienter Transfektion eine Senkung der NFκ-B Aktivität erzielt werden kann. Dabei konnte durch den Einsatz geringer CYLD Mengen die NFκ-B Aktivität besonders wirkungsvoll reduziert werden.

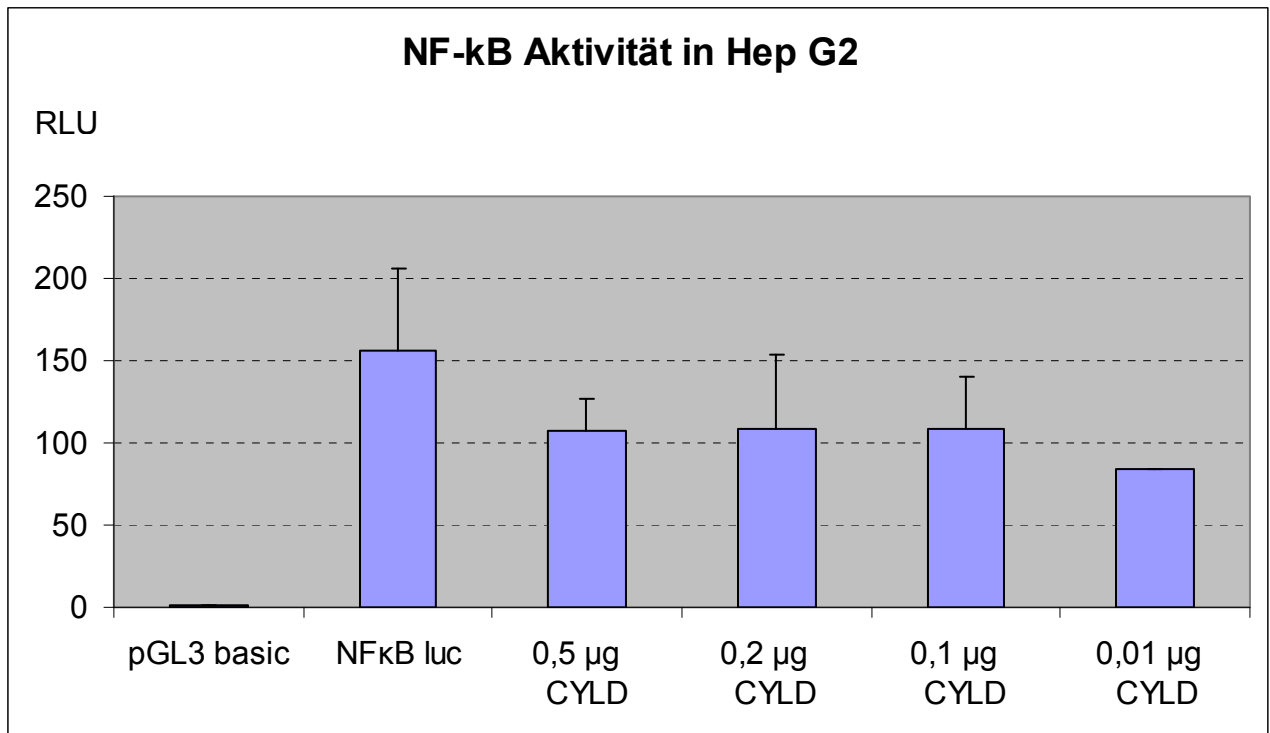


Abbildung 3-15: NFκ-B Aktivität in HepG2 bei transienter Transfektion mit verschiedenen Mengen von mCYLD, bestimmt im Reporterassay, die NFκ-B Aktivität in pGL3 basic wurde als 1 angenommen.

3.4.4 Mel Im

Auch in der Melanomzelllinie Mel Im ermöglicht die transiente Transfektion mit dem CYLD Plasmid eine Senkung der NF κ -B Aktivität. Wie in Abbildung 3-16 dargestellt, wurde ein guter Erfolg mit 0,2 und 0,1 μ g Vektor erzielt. Mit 0,01 μ g des CYLD Plasmids wurde eine Konzentration gewählt, die zur Hemmung der NF- κ B Aktivität vermutlich nicht mehr ausreicht.

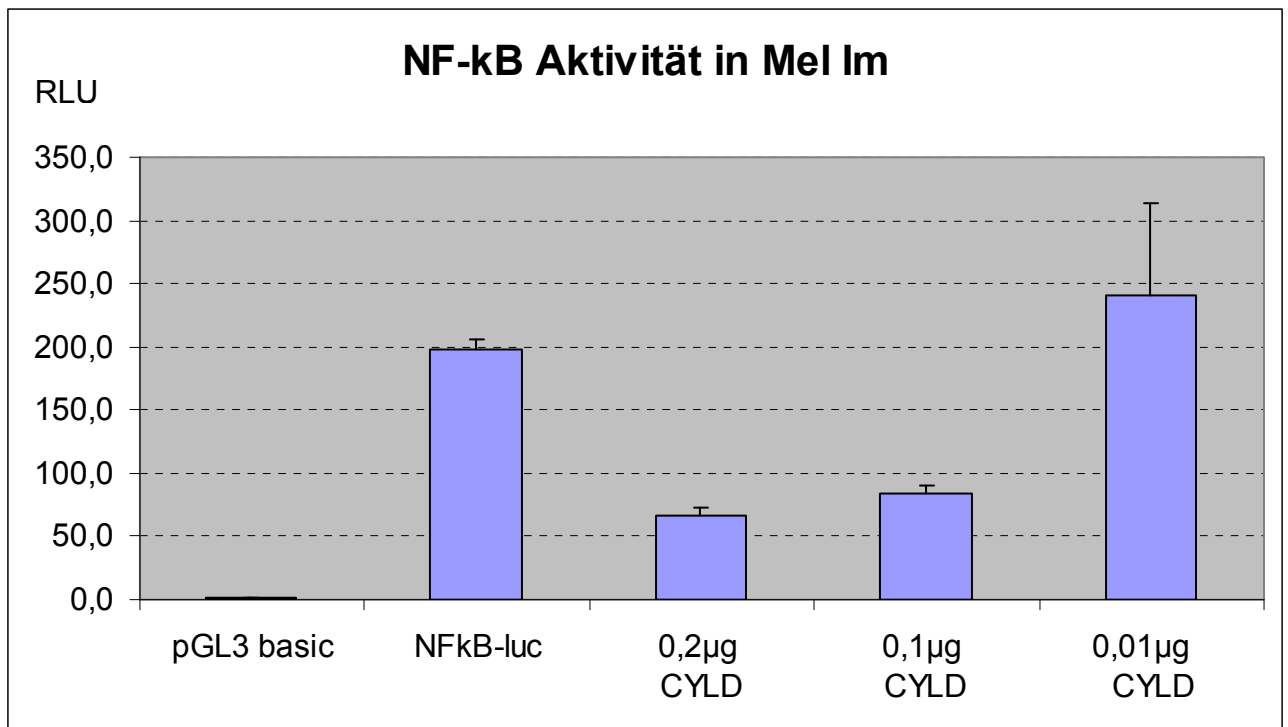


Abbildung 3-16: NF κ -B Aktivität in Mel Im bei transienter Transfektion mit verschiedenen Mengen von mCYLD, bestimmt im Reporterassay, die NF κ -B Aktivität in pGL3 basic wurde als 1 angenommen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich spezifisch für jede Tumorentität eine CYLD Konzentration ermitteln ließ, die die NF- κ B Aktivität in den Zellen senkt.

4 Diskussion

In dieser Dissertation wird die Transkription des Tumorsuppressorgens CYLD in Normal- und Tumorgewebe verglichen und der Einfluss von CYLD auf die NF- κ B Aktivität untersucht. CYLD ist ein Deubiquitinationsenzym, welches den TRAF-Komplex inaktivieren und damit die Freisetzung von NF- κ B hemmen kann (Kovalenko A. et al., 2003). Es ist bekannt, dass eine erhöhte NF- κ B Aktivität in vielen Tumoren auftritt, insbesondere auch in den in dieser Dissertation untersuchten Entitäten: Hepatozelluläres Karzinom (Diao J. et al., 2001, Aruro M. et al., 2005), kolorektales Karzinom (Lind D.S. et al., 2001) und malignes Melanom (Kuphal S. et al., 2004). Zwischen erhöhter NF- κ B Aktivität und Onkogenese besteht durch Proliferationsförderung und Apoptosehemmung ein direkter Zusammenhang (Lin A. et al., 2003). Es ist daher davon auszugehen, dass das Tumorsuppressorgen CYLD über den NF- κ B Signalweg Einfluss auf die Onkogenese nehmen kann. Dies wurde erstmals bei dem Zylindrom, einem überwiegend benignem Tumor der Haarfollikelzellen, beobachtet (Massoumi R., et al., 2006). Hier führt der Verlust beider Allele von CYLD zum Bild des sogenannten Turbantumors. Es stellt sich nun die Frage, ob der Mechanismus des CYLD-Verlusts auch in der Entstehung anderer Tumore eine Rolle spielen kann. In dieser Dissertation wurde daher die CYLD-Expression in kolorektalem Karzinom, hepatozellulärem Karzinom und malignem Melanom im Vergleich zum Normalgewebe untersucht. Damit wurden drei Tumore gewählt, die weltweit große Bedeutung und einen hohen Anteil an den malignen Neubildungen haben. Grundlage der Onkogenese sind intestinale epitheliale Zellen beim kolorektalen Karzinom, Hepatozyten beim hepatozellulären Karzinom und Melanozyten beim Melanom.

Außerdem wurde in dieser Dissertation der Frage nachgegangen, ob durch eine transiente Transfektion mit CYLD eine Verringerung der NF- κ B Aktivität in Tumorzellen erreicht werden kann. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit therapeutischer Optionen in der Tumorbehandlung.

4.1 CYLD im Normalgewebe

Die Untersuchung einer Normalgewebereihe zeigt, dass CYLD in jedem Gewebe nachweisbar ist, aber in unterschiedlichen Mengen exprimiert wird (siehe 3.3.2). Auch in den untersuchten Normalzellen aus dem gastrointestinalen Trakt, der Leber und den Melanozyten war die CYLD-Expression stets nachweisbar (siehe 3.3.1). Damit wurden Ergebnisse des Artikels „Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene“ (Bignell G.R. et al., 2000) im Wesentlichen bestätigt.

Das Gen CYLD wird also nicht gewebespezifisch exprimiert, sondern kommt ubiquitär vor. Dabei können Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Gewebe beobachtet werden. Übereinstimmungen mit Bignell G. R. et al., 2000 legen die Vermutung nahe, dass in manchen Geweben eine höhere oder niedrigere CYLD-Expression vorliegt. Eine ausgeprägte Expression zeigt sich in Testis, Placenta, Gehirn und Skelettmuskulatur. Die Ursache hierfür ist noch unklar. Im Kolongewebe liegt eine höhere CYLD-Transkription als im adulten und fetalen Lebergewebe vor. Ursächlich hierfür könnte die unterschiedliche Position und Funktion der Zellen im metabolischen Kreislauf sein. Die intestinalen epithelialen Zellen bilden die Pforte zur Außenwelt und sind dadurch wesentlich häufiger Angriffen von Mikroorganismen und Toxinen ausgesetzt. Dies könnte eine erhöhte Entzündungsaktivität und damit auch eine Gegenregulation durch CYLD in gesunden intestinalen epithelialen Zellen auslösen. Virale oder bakterielle Antigene, wie z.B. NTHi, besitzen die Fähigkeit den NF- κ B Signalweg in Zellen zu initiieren. Gleichzeitig wird wie von Jono H. et al., 2004 beschrieben in gesunden Zellen durch die erhöhte NF- κ B Aktivität eine gesteigerte Expression und Aktivierung von CYLD ausgelöst. In gesunden Geweben besteht daher ein Gleichgewicht zwischen gesteigerter NF- κ B Aktivität und hoher CYLD-Expression. Die unterschiedliche CYLD-Expression verschiedener Gewebe scheint mit der jeweiligen Funktion und dem Aktivierungszustand der Zellen in Verbindung zu stehen.

Alle Normalgewebe und -zellen zeigen eine absolut gesehen geringe CYLD-Expression, die nur durch den Einsatz hoher cDNA Mengen dargestellt werden konnte (siehe 3.2). Relativ liegt jedoch eine deutlich höhere CYLD-Expression als in den untersuchten Tumorgeweben vor.

4.2 CYLD im Tumorgewebe

In PCR und quantitativer Echtzeit PCR zeigen alle untersuchten Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms, hepatozellulären Karzinoms und malignen Melanoms eine verminderte CYLD-Expression gegenüber dem jeweiligen Normalgewebe (siehe 3.3.3-3.3.5). Dabei konnte kein Unterschied in der CYLD-Expression bei Tumorzelllinien aus Primärtumoren und Metastasen im kolorektalem Karzinom und malignem Melanom gefunden werden. Auch im hepatozellulären Tumorgewebe ist die CYLD-Expression in 70% der untersuchten Proben gegenüber Normalgewebe aus demselben Organ vermindert (siehe 3.3.4).

Wie in der Literatur beschrieben, zeigt sich auch bei anderen Tumorentitäten eine verminderte CYLD-Expression. Zum Beispiel zeigt die Mehrzahl der untersuchten Plasmazytome eine erhöhte NF- κ B Aktivität, die in einigen Fällen mit einem biallelischen Verlust von CYLD assoziiert ist (Annunziata C. M. et al., 2007). Es könnte außerdem ein Zusammenhang von Entzündungsgeschehen und Tumorgenese bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und einer verminderten CYLD-Expression bestehen. Costello et al. zeigte, dass bei Patienten mit Mb Crohn und Colitis ulcerosa eine verminderte mRNA-Expression von CYLD gefunden wurde. Dies kann auf eine mangelnde Kontrolle des Entzündungsgeschehens im Körper hinweisen und könnte die Entstehung von kolorektalen Tumoren beeinflussen, die eine häufige Krankheitskomplikation darstellen (Hellerbrand C. et al., 2007, Costello C.M., et al., 2005).

Eine reduzierte CYLD-Aktivität kann sowohl quantitativ durch eine verminderte CYLD Transkription als auch qualitativ durch einen Funktionsverlust durch Mutation bedingt sein. Für Letzteres fand sich in dieser Dissertation kein Hinweis. In ausgewählten Tumorzelllinien konnte eine Deletion auf gesamter Länge des Genes ausgeschlossen und keine Mutation nachgewiesen werden. Eventuell könnte eine Störung der Transkription von CYLD im Tumorgewebe vorliegen. Wie aus Abbildung 1-5 ersichtlich, sind bei der Induktion des NF- κ B Signalweges durch Cytokine und bakterielle Antigene unter anderem die Anwesenheit des IKK-Komplexes und p65 für die Initiierung der CYLD Transkription erforderlich (Jono H. et al., 2004). Eine Störung dieser Proteine, aber auch weiterer unbekannter Transkriptionsfaktoren, könnte an der mangelnden CYLD Expression maßgeblich beteiligt sein.

CYLD liegt intrazellulär zudem in einer aktiven, nicht phosphorylierten, Form und einer nicht aktiven, phosphorylierten, Form vor. Die Phosphorylierung führt zu einem reversiblen Verlust

der Deubiquitinationsfunktion von CYLD. Unklar ist, über welche Mechanismen die Phosphorylierung von CYLD reguliert ist. Möglicherweise liegt im Tumorgewebe nicht nur ein absoluter Mangel an CYLD vor, sondern zusätzlich auch ein relativer Mangel an aktiviertem CYLD.

4.2.1 Die dosisabhängige Hemmung der NF- κ B Aktivität durch CYLD

Wie bereits in der Literatur beschrieben (Lin A. et al., 2003, Diao J. et al., 2001; Kuphal S. et al., 2004; Lind D. S. et al., 2001), wurde in drei ausgewählten Tumorzelllinien, HCT116, HepG2 und Mel Im, eine erhöhte NF- κ B Aktivität gefunden. Diese konnte jeweils durch transiente Transfektion mit einem CYLD-Plasmid signifikant gesenkt werden.

Von entscheidender Bedeutung bei der Hemmung der NF- κ B Aktivität durch CYLD ist die Menge des eingesetzten Plasmids: Nur mit geringen Konzentrationen konnte eine deutliche Senkung der NF- κ B Aktivität erreicht werden. Auch im Normalgewebe wird CYLD in vergleichsweise geringen Mengen exprimiert. Beim Einsatz von physiologischen Mengen des CYLD-Plasmids wurde die stärkste Hemmung der NF- κ B Aktivität beobachtet. Die Plasmidkonzentration, die zur maximalen Senkung der NF- κ B Aktivität führt, unterscheidet sich nicht nur zwischen den Zelllinien, sondern auch von Versuch zu Versuch. Dafür sind variable Faktoren verantwortlich, die sich einer Normierung entziehen, wie etwa wechselnde Qualitäten der verwendeten Zellpopulationen.

Ein Einsatz höherer Plasmidkonzentrationen führt zu einem geringeren Effekt in der Hemmung der NF- κ B Aktivität. Dies könnte durch ungeklärte Gegenregulationsmechanismen der Zelle ausgelöst sein.

Durch das dosisabhängige Einbringen des CYLD-Plasmids konnte die erhöhte NF κ B Aktivität in Tumorzellen gesenkt werden. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen der verminderten CYLD-Expression auf RNA-Ebene und der erhöhten NF- κ B Aktivität in Tumorzellen, die durch externe CYLD Substitution zumindest partiell ausgeglichen werden kann. Daraus ergibt sich auch ein neues therapeutisches Target.

4.2.2 Die Regulation von CYLD in Abhängigkeit von NF- κ B

Die physiologischen Autoregulationsmechanismen bewirken gleichzeitig mit der NF- κ B Aktivierung die Induktion von CYLD, um ein Gleichgewicht zwischen Förderung und Hemmung der NF- κ B Aktivität zu erreichen (Jono H. et al., 2004). In den untersuchten Tumorzelllinien liegt trotz hoher NF- κ B Aktivität jedoch nur eine geringe CYLD-Expression vor. Dieser pathologische Zustand kann durch verschiedene Mechanismen bedingt sein.

Viele Liganden, die NF κ B aktivieren, benötigen die Anwesenheit bestimmter Faktoren, wie TRAF2 oder TRAF6, um CYLD zu induzieren. Mutationen oder Verluste im Bereich dieser Faktoren könnten für eine verminderte CYLD-Expression verantwortlich sein (Jono H. et al., 2004). Bestimmte Liganden des NF- κ B Signalweges würden dann nur noch die NF- κ B Aktivität, aber nicht mehr die CYLD-Expression fördern.

Bei dem Transkriptionsfaktor NF- κ B handelt es sich um ein Dimer, das aus verschiedenen Mitgliedern der REL Familie besteht. Je nach Zusammensetzung des Dimers findet die Transkription verschiedener Gene in unterschiedlichem Ausmaß statt (Karin M. et al., 2002). Eventuell werden in Tumorzellen bestimmte Dimere bevorzugt aktiviert, welche die CYLD Transkription nur wenig fördern.

Zwar ist bekannt, dass CYLD in Abhängigkeit von der NF- κ B Aktivierung reguliert wird, jedoch nicht die beteiligten Mechanismen und Enzyme. Eventuell liegen weitere Regulationsmechanismen auf Protein-Ebene vor. So könnten in Tumorzellen Möglichkeiten bestehen, CYLD Proteine rasch abzubauen oder durch Bindung in Komplexen funktionsunfähig zu machen.

Momentan kann nicht beantwortet werden, warum die CYLD-Transkription in Tumorzellen nur eingeschränkt stattfindet. Dazu sind genauere Kenntnisse über die Regulation von CYLD notwendig. Die verminderte CYLD-Expression ist jedoch als eine wichtige Ursache der erhöhten NF- κ B Aktivität in Tumorzellen anzusehen. Daneben spielen auch andere tumorassoziierte chromosomale und genetische Veränderungen eine Rolle bei der dauerhaften NF- κ B Aktivierung in der Onkogenese (Karin M. et al., 2002).

CYLD ist ein wichtiger Inhibitor des NF- κ B Signalweges, welcher in Tumoren häufig konstitutiv aktiviert ist. Es konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass eine verminderte CYLD-Expression nicht nur, wie bereits bekannt im Zylindrom, sondern auch im kolorektalen Karzinom, hepatozellulären Karzinom und malignen Melanom vorliegt. Das Tumorsuppressorgen CYLD spielt daher eine wichtige Rolle in der molekularen Onkogenese der untersuchten Tumorentitäten. Zusätzlich zeigt sich ein neues therapeutisches Target:

Durch gezielten Einsatz von CYLD kann die NF- κ B Aktivität in Tumorzelllinien reduziert werden.

4.3 Ausblick

In dieser Dissertation konnte bei den untersuchten Tumorzelllinien und –geweben meist eine verminderte CYLD-Expression gegenüber den Normalzellen nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass CYLD inhibitorisch auf die NF- κ B Aktivität wirkt, welche bei Tumoren häufig stark erhöht ist. Der Verlust von CYLD könnte ausreichend sein, die Onkogenese zu initiieren oder zu beschleunigen. Eine wichtige zukünftige Aufgabe wird sein, die Regulation des Tumorsuppressorgens CYLD in der Onkogenese näher zu bestimmen. Hieraus ergeben sich neue therapeutische Targets in der klinischen Onkologie. Es konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass durch das Einbringen von CYLD die NF- κ B Aktivität in Zellkulturen gesenkt werden kann. Eventuell gelingt es in Zukunft, therapeutisch in den NF- κ B Signalweg einzugreifen.

Welchen Stellenwert hat der Mangel des Tumorsuppressorgens CYLD in der Entstehung der untersuchten Tumorentitäten? Weitere Forschung wird zeigen, ob der Reduktion der CYLD-Transkription eine Schlüsselrolle in der Onkogenese zukommt oder ob der Mangel an CYLD infolge einer Akkumulation verschiedener Störungen im NF- κ B Signalweg entsteht und so das Fortschreiten der Karzinogenese fördert. Drei von zehn untersuchten Proben aus hepatozellulärem Karzinom weisen keine Abnahme der CYLD-Expression gegenüber Normalgewebe aus demselben Organ auf. Es könnte sich hier um eine kompensatorische CYLD-Erhöhung handeln, eventuell liegt auch ein Funktionsverlust des Proteins vor. Durch weitere Untersuchungen, auch im Bereich von kolorektalem Karzinom und malignem Melanom, kann der Stellenwert von CYLD in der Onkogenese der einzelnen Tumorarten genauer definiert werden.

Ein Zusammenhang zwischen der verminderten CYLD-Expression und erhöhter NF- κ B Aktivität konnte in den Tumorzelllinien HCT116, HepG2 und Mel Im gezeigt werden. Noch ist jedoch unklar, welche Veränderungen zu der verminderten CYLD-Expression führen. Dazu sind genauere Kenntnisse über die Regulation von CYLD und den Zusammenhang mit dem NF- κ B Signalweg nötig.

Des Weiteren gelang es, in vitro durch dosisabhängigen Einsatz des CYLD-Plasmids die NF- κ B Aktivität zu senken. Damit stellt sich die weit reichende Frage, ob Methoden entwickelt

werden können, den CYLD Mangel auch in vivo bei Tumorpatienten zu substituieren und ob mit dieser Maßnahme tatsächlich eine effektive Hemmung der Tumorproliferation erreicht werden kann.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle des Tumorsuppressorgens CYLD in der Entstehung von kolorektalem Karzinom, hepatozellulärem Karzinom und malignem Melanom. Ein Großteil der Ergebnisse wurde bereits 2007 in „Carcinogenesis“ publiziert: „Reduced expression of CYLD in human colon und hepatocellular carcinomas“ (Hellerbrand et. al., 2007).

CYLD ist ein Inhibitor des NF- κ B Signalweges und hemmt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der an Immunantwort, Entzündungsgeschehen, Apoptose und Onkogenese beteiligt ist.

In allen untersuchten Normalzellen des gastrointestinalen Traktes, der Leber und bei den Melanozyten konnte mittels PCR und quantitativer Echtzeit PCR eine deutliche CYLD-Expression auf ganzer Länge des Genes festgestellt werden. Auch in einer Normalgewebereihe wurde in allen Proben eine unterschiedlich stark ausgeprägte CYLD-Expression gefunden. Es handelt sich also um ein ubiquitär auftretendes Molekül.

Die untersuchten Tumorzelllinien aus kolorektalem Karzinom, hepatozellulärem Karzinom und malignem Melanom zeigen eine verminderte CYLD-Expression gegenüber Normalzellen. 70% des hepatozellulären Karzinomgewebes weisen ebenfalls eine geringere CYLD-Expression als Normalgewebe aus demselben Organ auf.

Wie in der Literatur beschrieben, konnte bei den drei Tumorzelllinien HCT116, HepG2 und Mel Im eine hohe NF- κ B Aktivität beobachtet werden. Durch transiente Transfektion mit einem CYLD-Plasmid konnte dosisabhängig eine Senkung der NF- κ B Aktivität erreicht werden.

Ein Mangel des Tumorsuppressorgens CYLD trägt zu einer erhöhten NF- κ B Aktivität in Tumorzellen bei und ist damit auch an der molekularen Onkogenese von kolorektalem Karzinom, hepatozellulärem Karzinom und malignem Melanom beteiligt. Zumindest in vivo kann dieser Mangel durch Einbringen eines CYLD-Plasmids substituiert und so die NF- κ B Aktivität reduziert werden.

CYLD kommt damit eine Schlüsselrolle in der molekularen Onkogenese zu. Die Zukunft wird zeigen, ob gezielte Therapiestrategien den Mangel an CYLD ausgleichen können.

6 **Abbildungsverzeichnis**

1-1	Schematischer Aufbau der Adenom-Karzinom Sequenz des kolorektalen Karzinoms (aus Arends J.W., 2000, S.414)	S. 14
1-2	Schematischer Aufbau des CYLD Gens (modifizierte Abbildung aus Saito K. et al., 2004)	S. 20
1-3	CYLD vermittelte Regulation des NF- κ B Signalweges (Abbildung aus Ideda F. et al. 2006)	S. 22
1-4	Schematische Darstellung des NF- κ B Signalwegs (Abbildung aus Wilkinson K.D., 2003)	S. 23
1-5	Schematische Darstellung der CYLD-Regulation (Abbildung aus Jono H. et al., 2004)	S. 25
1-6	Regulation des TNF- α oder TPA/UV induzierten NF- κ B Signalweges in Keratinozyten durch CYLD (Abbildung aus Massoumi R., et al., 2006, S. 674)	S. 27
3-1	NF- κ B Aktivität in Tumorzellen	S. 56
3-2	hCYLD in Normalzellen (PCR)	S. 57
3-3	Gewebereihe (PCR)	S. 58
3-4	hCYLD im Kolon I (PCR)	S. 59
3-5	hCYLD im Kolon II (PCR)	S. 60
3-6	hCYLD im Kolon (qPCR)	S. 61
3-7	hCYLD in der Leber (PCR)	S. 62
3-8	hCYLD in der Leber (qPCR)	S. 63
3-9	hCYLD in Leberpaaren (PCR)	S. 64
3-10	hCYLD in Leberpaaren (qPCR)	S. 65
3-11	hCYLD im Melanom (PCR)	S. 66
3-12	hCYLD im Melanom (qPCR)	S. 67
3-13	Transfektionskontrolle (PCR)	S. 69
3-14	NF- κ B Aktivität in HCT 115	S. 70
3-15	NF- κ B Aktivität in Hep G2	S. 71
3-16	NF- κ B Aktivität in Mel Im	S. 72

7 Abkürzungsverzeichnis

Nicht gesondert aufgeführt sind die im deutschen Sprachgebrauch üblichen Standardabkürzungen.

Im Folgenden werden Maßeinheiten und allgemeine Begriffe der Molekularbiologie definiert.

A	Adenosin
Abb.	Abbildung(en)
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
C	Cytosin
° C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA, copy DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DP	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ double positive
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
et al.	Lat : « unter anderem »
FKS	Fötale Kälberserum
for	forward
G	Guanin
g	Gramm, Gravitationskraft
k	Kilo (10 ³)
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Milli (10 ⁻³)
M	Mol, molar

mA	Milliampere
mRNA	messenger RNA
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p	Pico (10^{-12})
P	Phosphorylierung
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
rev.	Reverse
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde(n)
SP	Single positive
Std.	Stunde(n)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Cell Receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
V	Volt

Die weiteren Abkürzungen beziehen sich auf im Text häufig verwendete Moleküle und spezielle Fachausdrücke.

A20 = TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha induced protein 3
AFP	α -Fetoprotein
ALM	Akrolentiginöses Melanom
APC	Adenomatosis Polyposis Coli Gene
BAFF	B cell activating factor
BAF 57 = SMARCE1	SWI/SNF related matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1
Bcl-3	B-Cell CLL/lymphoma 3
CAP-GLY	C-terminal glycine-rich cytoskeleton associated protein
cb1 = kif11	Kinesin family member 11
CD40L	CD40 Ligand
CDK-4	Cyclin-Dependent Kinase 4
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis
CYLD	cylindromatosis gene
DMBA	7,12-dimethylbenzanthracene
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
hCyld	humanes CYLD
IL-1	Interleukin-1
IKK	I κ B-Kinase
I κ B	Inhibitor κ B
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
k-ras	Kirsten Sarcoma Virus, Mitglied der ras-Onkogen Familie
lck	lymphocyte protein tyrosine kinase
LMM	Lentigo-Maligna-Melanom
LPS	Lipopolysaccharid
LT- β	lymphotoxin β
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCC	mutated in colon cancer

mCYLD	murines CYLD
MKK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase
mlh	Mut L (E.coli) Human Homolog
MMS2 = UBE2V2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
msh	MutS Human Homolog
Myc = c-myc	Myelocystomatosis Virus Homologue Protein
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	nuclear factor kappa b
NIK	NF- κ B inducing kinase
NM	Noduläres Melanom
Nm32	Not in Metastasis
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
NTHi	nontypeable Hämophilus influenzae
p14 ^{arf}	Protein 14, alternative reading frame
P27 ^{kip1} = CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PB	Phenobarbital
PGN	peptidoglycan
pms	Postmeiotic Segregation Increased
Pten/mmac1	Phosphatase and Tensin Homolog Deletion Chromosome Ten
Ras	Rat Sarcoma Virus
RB	Retinoblastom
Rel	reticuloendotheliosis
RIP	receptor interacting protein
SMAD = DPC	Deleted in Pancreatic Cancer
SSM	Superfiziell Spreitendes Melanom
TGF β	Transforming growth factor-beta
TLR	Toll-like Receptor
TNF α	tumour necrosis factor α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate
TRADD	tumour necrosis factor receptor 1-associated death domain protein
TRAF	tumour necrosis factor receptor-associated factor
TRIP	TRAF interacting protein

TRPA	transient receptor potential cation channel subfamily A member 1
Ubc 13	ubiquitin conjugating enzyme 13
UCH	ubiquitin C-terminal hydrolase
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site family
Zap 70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa

8 Literatur

- 1 Abarca J.F., Casiccia C. C., 2002
Skin cancer und ultraviolat-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000
Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine 2002, 18: S.294-302
- 2 Aggarwal B.B., 2004
Nuclear factor- κ B: The enemy within
CancerCell, Volume 6, Issue 3, Sep 2004, S. 203-208
- 3 Annunziata C.M., Davis R. E., Demchenko Y., Bellamy W., Gabrea A., Zhan F., Lenz G., Hanamura I., Wright G., Xiao W., Dave S., Hurt E.M., Tan B., Zhao H., Stephens O., Santra M., Williams D.R., Dang L., Barlogie B., Shaughnessy , Kuehl W.M., Staudt L.M., 2007
Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF- κ B Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma
Cancer Cell 2007, Aug, 12: S.115-130
- 4 Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg), 2004
Krebs in Deutschland
4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe
Saarbrücken, 2004
<http://www.rki.de/>
- 5 Arends J. W., 2000
Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal cancer
Journal of Patholog 2000, 190: S.412-416
- 6 Arsuero M., Cavin L.G., 2005
Nuclear factor- κ B and liver carcinogenesis
Cancer Letters 2005, 229: S. 157-169

- 7 Bignell G.R., Warren R., Seal S., Takahashi M., Rapley E., Barfoot R., Green H., Brown C., Biggs P. J., Lakhani S.R., Jones C., Hansen J., Blair E., Hofmann B., Siebert R., Turner G., Evans D.G., Schrandt-Stumpel C., Beemer F.A., van Den Ouweland A., Halley D., Delpech B., Cleveland M.G., Leigh I., Leisti J., Rasmussen S., 2000
Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene
Nature Genetics 2000, Jun, 25(2); S.160-165
- 8 Block T. M., Mehta A. S., Fimmel C. J., Jordan R., 2003
Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma
Oncogene 2003, 22, S. 5093-5107
- 9 Böcker, Denk, Heitz, 2001
Pathologie
2., vollständig überarbeitete Auflage, Urban Fischer Verlag München, Jena
- 10 Brummelkamp T.R., Nijman S.M., Dirac A.M., Bernards R., 2003
Loss of cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF- κ B
Nature 2003, Aug 14, 424(6950), S.797-801
- 11 Bühling K.J., Lepenies J., Witt K. (Hrsg), 2000
Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie
2. Auflage, Urban Fischer Verlag München, Jena
- 12 Chen F., 2004
Endogenous Inhibitors of Nuclear Factor- κ B, An Opportunity for Cancer Control
Cancer Research 2004, Nov 15, 64, S.8135-8138
- 13 Costello C.M., Mah N., Häsler R., Rosenstil P., Waetzig G.H., Hahn A., Lu T., Gurbuz Y., Nikolaus S., Albrecht M., Hampe J., Lucius R., Klöppel G., Eickhoff H., Lehrach H., Lengauer T., Schreiber S., 2005
Dissection of the Inflammatory Bowel Disease Transcriptome Using Genome-Wide cDNA Microarrays
PLoS Medicine 2005, Aug, Vol 2, Iss 8, e199, S.771-787

- 14 Courtois G., Smahi A., 2006
NF- κ B-related genetic diseases
Cell Death and Differentiation 2006, 13, S.843-851

- 15 Czerwenka K., Manavi M., Pischinger K., 2003
Einführung in die Molekularbiologie
Verlag Wilhelm Maudrich Wien, München, Bern

- 16 Diao J., Garces R., Richardson C. D., 2001
X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis
Cytokine & Growth Factor Reviews 12, 2001, S.189-205

- 17 Elwood J.M., Jopson J., 1997
Melonama And Sun Exposure: An Overview Of Published Studies
International Journal of Cancer, 2007, Vol. 73, Iss. 2, S.198-203

- 18 Funk J.O., 2004
Aspirin gegen Zylindromatosis ? Molekulare Funktionen des CYLD Tumorsupressors
Hautarzt 2004, Mar ; 55(3) : S. 327-328

- 19 Garbe C., Dummer R., Kaufmann R., Tilger W. (Hrsg), 1997
Dermatologische Onkologie
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

- 20 Gerok N., Blum H.E. (Hrsg), 1995
Hepatology
2. Auflage, Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore

- 21 Hellerbrand C., Bumès E., Bataille F., Dietmaier W., Massoumi R., Bosserhoff A.K.,
2007
Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas
Carcinogenesis, 2007, Vol. 28, No 1, S.21-27

- 22 Hiddemann W., Huber H., Bartram C. (Hrsg), 2004
Die Onkologie: Teil 1: Allgemeiner Teil: Epidemiologie, Pathogenese,
Grundprinzipien der Therapie
Teil 2: Spezieller Teil: Solide Tumoren, Lymphome, Leukämien
1. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- 23 Hövelmeyer N., Wunderlich F.T., Massoumi R., Jakobsen C. G., Song J., Wörns M.,
Merkwirth C., Kovalenko A., Aumailley M., Strand D., Brüning J.C., Galle P.R.,
Wallach D., Fässler R., Waisman A., 2007
Relation of B cell homeostasis and activation by the tumor suppressor gene CYLD
The Journal of Experimental Medicine 2007 Oct 29; 204(11): 2615-27
- 24 Hu G., Onder M., Gill M., Aksakal B., Oztas M., Gurer M. A., Celebi J. T., 2003
A Novel Missense Mutation in CYLD in a Family with Brooke-Spiegler Syndrome
The Journal of Investigative Dermatology 2003, Oct., 121(4), S.732-734
- 25 Ikeda F., Dikic I. 2006
CYLD in Ubiquitin Signaling and Tumor Pathogenesis
Cell, 2006, May 19, Vol.125, S.643-645
- 26 Jono H., Lim J. H., Chen L.F., Xu H., Trompouki E., Pan Z.K., Mosialos G., Li J.D.,
2004
NF- κ B Is Essential for Induction of CYLD, the Negative Regulator of NF- κ B
J. Biol. Chem. 2004, Aug 27, 279(35): S. 36171-36174
- 27 Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O.
Gratzl M. (Hrsg der deutschen Ausgabe), 2002
Histologie
5., neu übersehene und aktualisierte Auflage 2002, Springer-Verlag Berlin,
Heidelberg, New York
- 28 Karin M., Cao Y., Greten F. R., Li Z.-W., 2002
NF- κ B In Cancer: From Innocent Bystander To Major Culprit

Nature Reviews 2002, Apr, Vol. 2, S.301-310

29 Karin M., Delhase M., 2000

The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling
Immunology 2000, Vol. 12, S.85-98

30 Kerl H., Garbe C., Cerroni L., Wolff H. H. (Hrsg), 2003

Histopathologie der Haut
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

31 Kovalenko A., Chable-Bessia C., Cantarella G., Israel A., Wallach D., 2003

The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by
deubiquitination
Nature 2003, Aug 14, 424(6950), S.801-805

32 Kuphal S., Poser I., Jobin C., Hellerbrand C. and AK Bosserhoff, 2004

Loss of E-cadherin leads to upregulation of NF- κ B activity in malignant melanoma
Oncogene 2004, Sep, 20

33 Lakhani S. R.(M.D.), 2004

Putting the Brakes on Cyndromatosis?
New England Journal of Medicine 2004, Jan. 8; 350(2), S.187-188

34 Lin A., Karin M., 2003

NF- κ B in cancer: a marked target
Seminars in Cancer Biology 13 (2003), S. 107-114

35 Lind D. S., Hochwald S. N., Malaty J., Rekkas S., Hebig P., Mishra G., Moldawer L
.L., Copeland III E. M., MacKay S., 2001

Nuclear factor- κ B is upregulated in colorectal cancer
Surgery 2001, Aug, Volume 130, Number 2, S.363-369

36 Lineberry N., Fathman G., 2006

CYLD: deubiquitination-induced TCR signaling

Nature Immunology, Vol 7, No 4, 2006, Apr; S.369-370

37 Macdonald F., Ford C. H. J., 1997

Molecular Biology of Cancer

The Medical Perspectives Series

BIOS Scientific Publishers Limited, 1997

38 Massoumi R., Chmielarska K., Hennecke K., Pfeifer A., Fässler R., 2006

Cyld Inhibits Tumor Cell Proliferation by Blocking Bcl-3-Dependent NF- κ B Signaling

Cell, 125, 2006, May 19, S.665-677

39 Massoumi R., Podda M., Fässler R., Paus R., 2006

Cylindroma as Tumor of Hair Follicle Origin

Journal of Investigative Dermatology, 2006, Vol.126, S.1182-1184

40 Molls M., Vaupel P. (Eds.), 1998

Blood Perfusion and Microenvironment of Human Tumors: Implications for Clinical Radiooncology

Medical Radiology Diagnostic Imaging and Radiation Oncology

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

41 Pomerantz J. L., Baltimore D., 2002

Two Pathways to NF- κ B

Molecular Cell 2002, Oct., Vol. 10, S.693-701

42 Regamey A., Hohl D., Liu J. W., Roger T., Kogerman P., Toftgard R., Huber M., 2003

The Tumor Suppressor CYLD Interacts with TRIP and Regulates Negatively Nuclear Factor κ B Activation by Tumor Necrosis Factor

The Journal of Experimental Medicine 2003, Dec. 15, 198(12), S.1959-1964

43 Reiley W., Zhang M., Sun SC., 2004

Negative Regulation of JNK Signaling by the Tumor Suppressor CYLD

The Journal of Biological Chemistry 2004, Dec 31; 279(53), S.55161-55167

- 44 Reiley W., Zhang M., Wie J., Losiewicz M, Donohue K. B., Norbury C. C., Sun S.-C., 2006
Regulation of T cell development by deubiquitinating enzyme CYLD
Nature Immunology, Vol 7, No 4, 2006, Apr, S.411-417

- 45 Reiley W., Zhang M., Wu X., Granger E., Sun S.-C., 2005
Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation
Molecular and Cellular Biology 2005, May; S. 3886-3895

- 46 Saito K., Kigawa T., Koshiba S., Sato K., Matsuo Y., Sakamoto A., Takagi T., Shirouzu M., Miyata Y., Hirakawa N., Inoue M., Terada T., Nagase T., Kikuno R., Nakayama M., Ohara O., Tanaka A., Yokoyama S., 2004
The Cap-Gly Domain of CYLD Associates with the Proline-Rich Sequence in Nemo/IKK γ
Structure, 2004, Sep; 12(9); S. 1719-1728

- 47 Scheinfeld N., Hu G., Gill M., Austin C., Celebi J.T., 2003
Identification of a recurrent mutation in the CYLD gene in Brooke-Spiegler syndrome
Clinical and Experimental Dermatology 2003, Sep 28, S.593-541

- 48 Stegmeier F., Sowa M.E., Nalepa G., Gygi S.P., Harper J.W., Elledge S.J., 2007
The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis
PNAS, 2007, May 22, Vol. 104, no.21; S. 8869-8874

- 49 Stokes A., Wakano C., Koblan-Huberson M., Adra C. N., Fleig A., Turner H., 2006
TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD
Cellular Signaling, 2006, Feb 21

- 50 Tang G., Minemoto Y., Dibling J., Purcell N. H., Zhiwei L., Karin M., Lin A., 2001
Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes
Nature 2001, Nov 15, 414, S.313-317

- 51 Trompouki E., Hatzivassiliou E., Tschirritzis T., Farmer H., Ashworth A., Mosialos G., 2003
CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by TNFR family members
Nature 2003, Aug 14, 424(6950), S.793-796
- 52 Vogelstein B., Kinzler K. W., 2004
Cancer genes and the pathways they control
Nature Medicine, Vol.10, Number 8, 2004, Aug., S.789-799
- 53 Wagener Christoph, 1999
Molekulare Onkologie – Entstehung und Progression maligner Tumore
2., aktualisierte und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- 54 Wang L., Baiocchi R. A., Pal S., Mosialos G., Caligiuri M., Sif S., 2005
The BRG1- and hBRM-Associated Factor BAF57 Induces Apoptosis by Stimulating Expression of the Cyldromatosis Tumor Suppressor Gene
Molecular And Cellular Biology, 2005, Sep, S.7953-7965
- 55 Waris G., Siddiqui A., 2003
Regulatory mechanism of viral hepatitis B and C
Journal of Bioscience, Vol. 28, No. 3, 2003, Apr., S. 311-321
- 56 Wilkinson K.D., 2003
Signal transduction: Aspirin, ubiquitin and cancer
Nature 2003, Aug 14, 424(6950), S.738-739
- 57 Yoshida H., Jono H., Kai H., Li J.-D., 2005
The Tumor Suppressor Cyldromatosis (CYLD) Acts as a Negative Regulator for Toll-like Receptor 2 Signaling via Negative Cross-talk with TRAF6 and TRAF7
The Journal Of Biological Chemistry, Vol 280, No 49, 2005, Dec 9, S.41111-41121
- 58 Zhang J., Stirling B., Temmerman S.T., Ma C.A., Fuss I.J., Derry J.M.J., Jain A., 2006

Impaired regulation of NF- κ B and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice

The Journal of Clinical Investigation, Vol. 116, No 11, 2006, Nov, S.3042-3049

59 Zheng G., Hu L., Huang W., Chen K., Zhang X., Yang S., Sun J., Jiang Y., Luo G., Kong X., 2004

CYLD Mutation Causes Multiple Familial Trichoepithelioma in Three Chinese Families

Human Mutation 2004, April, 23., S.400f

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Elisabeth Ursula Bumes
Wohnort: Rennweg 2a
93049 Regensburg
Tel.: 0941/9455514
Mobil: 0177/9636324
Email: elisabeth.bumes@gmx.de

Geburtstag und -ort: 22.05.1980 in Regensburg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1990-1999 Werner-von-Siemens Gymnasium Regensburg (Abschluss:
Abitur, Note 1,0)

Studium

WS 1999/00 – Studium Germanistik/Betriebswirtschaftslehre
WS 2000/01 (MA) an der Universität Regensburg

SS 2001 – Vorklinischer Abschnitt des Studiengangs
WS 2002/03 Humanmedizin an der LMU München
(Abschluss: Ärztliche Vorprüfung, Note 2,0)

SS 2003 – Klinischer Abschnitt des Studiengangs Humanmedizin an der
WS 2006/07 Universität Regensburg

05/2007 Ablegen des Staatsexamens an der Universität Regensburg
(Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1,50) und
Approbation

Studienbegleitende Tätigkeiten

Praktisches Jahr:

27.02.-18.06.2006 1. Tertial: Neurologie am Bezirksklinikum Regensburg
19.06.-08.10.2006 2. Tertial: Innere Medizin am Klinikum Amberg
09.10.2006-28.01.2007 3. Tertial: Chirurgie am Kantonsspital Winterthur, Schweiz

Veröffentlichung *„Reduced expression of CYLD in human colon and hepato-
cellular carcinomas“*, Claus Hellerbrand, Elisabeth Bumes
et.al., Carcinogenesis 2007 28(1): 21-27.

Stipendium Stipendiatin nach dem bayerischen Begabtenförderungsgesetz

Berufstätigkeit:

seit 01.07.2007 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik und
Poliklinik der Universität Regensburg im Bezirksklinikum
Regensburg

Regensburg, den 28.07.2008

.....