

Katharina Becker
Dr. med.

Die Bedeutung des Tumorsuppressors CYLD für die Proliferation hepatozellulärer Karzinomzellen *in vitro* und muriner Hepatozyten *in vivo*

Promotionsfach: NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen)
Doktorvater: Prof. (apl.) Dr. med. Henning Schulze-Bergkamen

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit eine der häufigsten Tumorerkrankungen und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Bei insgesamt limitierten Behandlungsoptionen hat die Erforschung molekularer Pathomechanismen zur Entwicklung erster zielgerichteter Therapien geführt, deren Wirksamkeit in den letzten Jahren belegt werden konnte. Um die Behandlung des HCCs langfristig zu verbessern, bedarf es tiefergehender Erkenntnisse zu dessen molekularen Entstehungsmechanismen.

CYLD ist ein Tumorsuppressorgen, das erstmals im Zusammenhang mit der familiären Zylindromatose identifiziert wurde, einer Erkrankung mit einer Disposition für multiple Tumoren der Hautanhangsgebilde. Auch beim hepatozellulären Karzinom ist die CYLD-Expression vermindert. Essentielle Funktionen von CYLD bei Apoptose, Gewebshomöostase und Tumorsuppression in der Leber wurden durch Studien der eigenen sowie anderer Arbeitsgruppen belegt und sprechen zusätzlich für eine Beteiligung von CYLD an der Hepatokarzinogenese.

Die vorliegende Arbeit zielte darauf ab, die Bedeutung von CYLD für die Proliferation und Invasion humaner HCC-Zellen sowie muriner Hepatozyten *in vivo* zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass ein siRNA-vermittelter *knockdown* der CYLD-Expression *in vitro* zu einer verstärkten Cyclin D1-Expression in HCC-Zellen führt, jedoch ohne messbare Auswirkungen auf die G₁/S-Phasen-Progression des Zellzyklus. Darüber hinaus kam es in diesen Zellen zu einer verstärkten Expression der proliferationsfördernden Proteine Bcl-3 und β -Catenin. Der *knockdown* der CYLD-Expression führte weiterhin in Huh7-Zellen zur spontanen Kerntranslokation von Bcl-3 und erleichterte dessen weitere UV-stimulierte nukleäre Translokation. In Matrigel-basierten Invasionsversuchen zeigten Huh7-Zellen mit gehemmter CYLD-Expression ein verstärktes Invasionspotenzial. Hingegen war die Zellmigration im Wundheilungsversuch *in vitro* nach CYLD *knockdown* beeinträchtigt. Auf molekularer Ebene kam es in den HCC-Zellen nach CYLD *silencing* zur gesteigerten Expression mesenchymaler, allerdings auch epithelialer Cadherine. Insgesamt ließ sich also zeigen, dass CYLD eine negativ regulierende Wirkung auf multiple proliferationsfördernde Moleküle ausübt und die Invasion von HCC-Zellen unterdrücken kann. Die Rekonstitution von CYLD

in HCC-Zellen stellt damit einen interessanten Ansatzpunkt zukünftiger Therapiebemühungen dar.

Zur zusätzlichen Untersuchung der Rolle von CYLD für die Proliferation von Hepatozyten *in vivo* wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Mausmodelle verwendet: Zum einen wurden Mäuse mit einem kompletten, organunabhängigen CYLD *knockout* ($CYLD^{-/-}$) analysiert. Zum anderen wurden Mäuse untersucht, die eine leberspezifische, durch die Albumin-Cre Rekombinase getriggerte Deletion von Exon 7 und 8 des *Cyld*-Gens aufweisen ($CYLD^{exon7/8}xAlbCre$) und infolgedessen ausschließlich die natürlich vorkommende Splicevariante short CYLD (sCYLD) exprimieren. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hatten anhand dieser Mausmodelle eine Bedeutung von CYLD für die Gewebshomöostase und Karzinogenese in der murinen Leber gezeigt: Während sich bei $CYLD^{-/-}$ -Mäusen keinerlei Auffälligkeiten fanden, fielen in den Lebern der $CYLD^{exon7/8}xAlbCre$ -Mäuse eine biliär betonte chronische Leberschädigung mit progredienter Fibrose sowie eine verstärkte Sensibilität gegenüber chemisch induzierten Lebertumoren auf. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der hepatozellulären Proliferation bei diesem Phänotyp zu eruieren. Periportale Proliferate sowie gesteigerte Expressionsniveaus von E-Cadherin in den Lebern der $CYLD^{exon7/8}xAlbCre$ -Mäuse lieferten Hinweise auf eine Aktivierung des *Oval Cell* Kompartiments, also hepatischer Progenitorzellen. Die erhöhte Expression von Bcl-3 und Cyclin D1 in den Lebern der $CYLD^{exon7/8}xAlbCre$ -Mäuse nach DEN/Phenobarbital-Behandlung bestätigte den hyperproliferativen Phänotyp und deutete auf eine Verstärkung des Bcl-3-vermittelten NF- κ B-Signalwegs hin. Die funktionelle Analyse der Genexpressionsprofile erbrachten basal Veränderungen der ribosomalen Translation und mRNA-Prozessierung; nach DEN/Phenobarbital-Behandlung ließen sich die signifikant regulierten Gene u.a. den Prozessen der entzündlichen Immunantwort, der Angiogenese sowie dem programmierten Zelltod zuordnen. Bei der Untersuchung von Adhäsionsmarkern in den CYLD *knockout*-Modellen fiel neben der oben erwähnten Überexpression von E-Cadherin in den Lebern der $CYLD^{exon7/8}xAlbCre$ -Mäuse ein zunehmender Verlust von E-Cadherin in den Lebern der $CYLD^{-/-}$ -Mäuse nach DEN/Phenobarbital-Behandlung auf, der sich als epithelial-mesenchymale Transition im Prozess der Kanzerogenese interpretieren lässt. Zusammenfassend lässt sich folgern, dass es im Rahmen der Leberschädigung bei den $CYLD^{exon7/8}xAlbCre$ -Mäusen unter anderem zur Proliferation hepatischer Epithel- und Progenitorzellen kommt.

Schließlich wurde die Rolle von CYLD bei der Leberregeneration nach 1/3-Leberteilresektion in den CYLD *knockout*-Mausmodellen untersucht. Interessanterweise fand sich eine durch die

partielle Hepatektomie ausgelöste Herunterregulierung der endogenen CYLD-Expression bei Kontrolltieren. Dies stellt möglicherweise einen Mechanismus zur Proliferationsstimulation im Rahmen der Leberregeneration dar. In den CYLD *knockout* Mausmodellen zeigte sich, dass die ausschließliche Überexpression von sCYLD eine rasche Induktion hepatozellulärer Proliferation begünstigt, während ein kompletter CYLD-Verlust erst nach längerer Latenzzeit einen proliferationsfördernden Effekt hat. Dieser ging mit der verstärkten Expression der Zellzyklusproteine Cyclin D1, Cyclin B1 und PCNA einher. Auf molekularer Ebene ließ sich in den Lebern der *CYLD^{exon7/8}xAlbCre*-Mäuse eine Aktivierung des kanonischen, nicht jedoch des Bcl-3-vermittelten NF-κB-Signalwegs nachweisen. Diese könnte für die Sensitivierung der Hepatozyten für Wachstumsfaktoren und für die frühe Proliferation verantwortlich sein. In den Zellen der betreffenden Lebern kam es zur Überexpression von Myc und Gadd45β sowie zu einer Aktivierung des JNK-Signalwegs. Bei Untersuchung der *CYLD^{-/-}*-Lebern fanden sich hingegen Hinweise auf eine vermehrte Aktivierung der Wnt-Signalkaskade sowie eine starke Induktion des Epidermal Growth Factor Receptors. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust von CYLD eine begünstigende Wirkung auf die Leberregeneration hat. Im Umkehrschluss weist dies auf eine inhibitorische Funktion von CYLD bei der hepatozellulären Proliferation hin.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass eine verminderte Expression von CYLD über diverse molekulare Mechanismen hepatozelluläre Proliferation begünstigt und somit unter anderem für eine vermehrte Krebsentstehung in der Leber prädisponiert.