

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-,
Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des COP9 Signalosoms bei der
hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie:
Mögliche Konsequenzen für die Klinik

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mathilde Feist

aus Dresden

Datum der Promotion: 22.06.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	8
1.1	Hypertherme Intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC).....	8
1.2	COP9 Signalosom (CSN).....	11
1.2.1	Der Aufbau des CSN und die Regulation der Expression der CSN-Untereinheiten	11
1.2.2	Das CSN und seine Rolle im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	14
1.2.3	Das CSN und seine Rolle bei der Zellzykluskontrolle	16
1.2.4	Das CSN und seine Phosphorylierungsfunktion	16
1.2.5	Das CSN und seine Funktion bei der DNA-Reparatur.....	17
2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Material.....	21
3.1.1	Geräte	21
3.1.2	Chemikalien.....	22
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	22
3.1.4	Antikörper	23
3.1.5	Größenstandards.....	24
3.1.6	Kits	24
3.1.7	miRNA Mimics und Inhibitoren	24
3.1.8	Zellkulturmedium und Zusätze	24
3.1.9	Eukariotische Zelllinien	25
3.2	Methoden	26
3.2.1	Zellkultur	26
3.2.1.1	Kultivierung der HT29-Zellen und siCSN5/siGFP-Zellen	26
3.2.1.2	Inkubation der Zellen mit MMC, CDDP, Curcumin	26
3.2.1.3	Zellyse.....	26
3.2.1.4	Transfektion von HT29-Zellen mit miRNA let-7a-1 Inhibitor und miRNA let-7a-1 Mimic.....	27
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	27
3.2.2.1	Caspase3-ELISA.....	27
3.2.2.2	SDS-PAGE.....	27
3.2.2.3	Western-Blot	28
3.2.2.4	Ponceau-Färbung	28
3.2.2.5	Blockieren.....	28
3.2.2.6	Immundetektion	28
3.2.2.7	Entwicklung.....	29
3.2.2.8	Densitometrie und Statistische Auswertung.....	29

4	ERGEBNISSE	30
4.1	Untersuchung zum Einfluss der HIPEC auf das CSN	30
4.1.1	Analyse der MMC-Wirkung auf das CSN.....	30
4.1.2	Analyse der MMC-Wirkung in Zellen mit geringem CSN.....	34
4.1.3	Analyse der CDDP-Wirkung auf das CSN.....	35
4.2	Etablierung von Caspase-3 als quantitativer Marker für Apoptose in HT29-Zellen	37
4.3	Curcumin potenziert die MMC-Wirkung	39
4.4	miRNA let-7 beeinflusst die MMC-Wirkung.....	42
5	DISKUSSION.....	45
5.1	Molekularbiologische Untersuchung der HIPEC	45
5.1.1	In-vitro-HIPEC-Zellkultur-Modell.....	45
5.1.2	Die Rolle des CSN bei der HIPEC	45
5.1.3	Die Apoptoserate nach HIPEC	49
5.1.4	Die Rolle von miRNAs bei der MMC-Wirkung.....	51
5.2	Mögliche Konsequenzen für die Klinik.....	54
5.2.1	Veränderung der Dauer der HIPEC	54
5.2.2	HIPEC mit Kombination aus MMC und Curcumin	55
5.2.3	HIPEC mit miRNAs	56
5.3	Ausblick	58
	LITERATURVERZEICHNIS.....	59
	ANHANG.....	70

ZUSAMMENFASSUNG

Peritonealkarzinose galt lange Zeit als palliative Situation. Die Entwicklung eines lokalen Behandlungskonzepts, zytoreduktive Chirurgie in Kombination mit hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC), ermöglicht heutzutage eine kurative Therapie. Die häufig verwendeten Chemotherapeutika Mitomycin C (MMC) und Cisplatin (CDDP) führen über ihre alkylierende Wirkung zu Doppelstrangbrüchen. Die DNA-Defekte induzieren Reparaturmechanismen, an denen das COP9 Signalosom (CSN) beteiligt ist. Das CSN ist ein Proteinkomplex, bestehend aus 8 Untereinheiten. Es ist ein Regulator des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und kontrolliert die Stabilität von Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Außerdem ist es bei der Zellzykluskontrolle involviert und bestimmt die Aktivität von Tumorsuppressorproteinen wie p53. Die koordinierte Expression des CSN wird durch miRNAs der let-7-Familie reguliert. miRNA let-7a-1 bindet an die mRNA der CSN-Untereinheiten und agiert als negativer Regulator der CSN-Expression.

Um die Rolle des CSN bei der HIPEC zu entschlüsseln, wurden HT29-Kolontumorzellen entsprechend den Bedingungen der HIPEC für 1 h und 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC und CDDP, erwärmt in Medium auf 42°C, behandelt. Mittels Western Blot wurde das CSN und die mit dem CSN-interagierenden Proteine analysiert, wobei sich ein Anstieg der CSN-Untereinheiten unter MMC-Inkubation als Hinweis auf DNA-Reparatur zeigte. Dieser Prozess konnte durch Transfektion der HT29-Zellen mit miRNA Mimics der let-7-Familie verhindert werden und eine verstärkte Expression des Zellzyklusregulators p27 und des Tumorsuppressorproteins p53 wurde beobachtet. Außerdem wurde die Apoptoserate nach HIPEC mittels Caspase-3-Elisa quantifiziert, wobei sich nach 4 h MMC-Inkubation ein signifikanter Anstieg der aktivierten Caspase-3 zeigte. Nach 1 h MMC-Behandlung wurde nur unter sehr hoher MMC-Konzentration ein Anstieg der aktivierten Caspase-3 nachgewiesen. Um die Apoptoserate zu steigern, wurde Curcumin, ein Hemmstoff CSN-assoziiierter Kinasen mit anti-proliferativen und anti-karzinogenen Eigenschaften getestet. Durch die Kombination von Curcumin mit MMC konnte eine signifikante Verbesserung der Apoptoserate erzielt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das CSN eine restriktive Rolle bei der HIPEC spielt, da es die Tumorzellen bei der DNA-Reparatur unterstützt und die Apoptose verzögert. Um die CSN-Aktivität zu blockieren und die Effizienz der HIPEC zu verbessern, kommen zwei Mechanismen in Betracht: Erstens die Anwendung von

Curcumin bei der HIPEC. Curcumin blockiert CSN-assoziierte Kinasen und steigert den MMC-Effekt. Mit dem Einsatz von Curcumin könnte die MMC-Konzentration reduziert werden, mit der Konsequenz geringerer toxischer Nebenwirkungen für Patienten. Zweitens wäre die Zugabe von miRNA-let-7a-1 Mimic zur Chemoperfusionslösung denkbar. miRNA let-7a-1 Mimics verhindern die CNS-Expression und begünstigen pro-apoptotische Bedingungen. Weitere Studien sind notwendig, um die hier gewonnenen Erkenntnisse unter klinischen Bedingungen anzuwenden.

ABSTRACT

Peritonealcarcinomatosis has long been considered as a palliative situation. Local treatment strategies have been developed combining cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) offering a curative therapy. The frequently used chemotherapeutic agent Mitomycin C (MMC) and Cisplatin (CDDP) generating double-strand breaks with their alkylating properties. The DNA damage induces repair mechanisms including the COP9 signalosome (CSN). The CSN is a protein complex composed of 8 subunits (CSN1-CSN8). It is a regulator of the ubiquitin proteasome system (UPS) and controls protein stability of DNA damage repair effectors. Furthermore it is involved in cell cycle regulation and determines the activity of tumor suppressor proteins such as p53. The coordinated expression of CSN subunits is modulated by miRNAs of the let-7 family. miRNA let-7a-1 binds to the mRNA of CSN subunits and acts as a negative regulator of their expression.

To investigate the role of the CSN during HIPEC, colon cancer HT29 cells were incubated under HIPEC-conditions for 1 h or 4 h with different concentrations of MMC and CDDP in medium heated to 42°C. By Western blotting the CSN and its interacting proteins were analysed. Increased CSN subunit expression has been detected, possibly as an indication for DNA-damage repair. Transfection of the HT29-cells with miRNA let-7a-1 mimic prevents this process and an overexpression of cellcycle regulator p27 and of tumor suppressor protein p53 has been monitored. Moreover apoptosis after HIPEC has been detected with Caspase-3-ELISA. Significant increase of activated Caspase-3 was measured after 4 h MMC-incubation. After 1 h MMC-treatment increase of activated Caspase-3 has been detected only under high MMC-concentration. To improve apoptosis Curcumin, an inhibitor of CSN-associated kinases with anti-proliferative and anti-carcinogenic qualities has been tested. The combination of Curcumin with MMC achieved a significant improvement of apoptosis.

In summary the CSN plays a restrictive role during HIPEC because it supports the tumor cells during DNA-repair and delayed apoptosis. For blocking CSN-activities and improving the efficiency of HIPEC two mechanisms are possible: First, the application of Curcumin during HIPEC. Curcumin blocks CSN-associated kinases and enhances the MMC-effect. With Curcumin the MMC-concentration could be reduced with the consequence of less toxic side effects for the patients. Secondly, addition of miRNA mimic to the chemoperfusion media would be a plausible strategy. miRNA let-7a-1

mimic impairs the CSN-expression and promotes pro-apoptotic conditions. Further studies are necessary to apply these findings under clinical conditions.

1 EINLEITUNG

Tumore des Gastrointestinaltrakts können zu einer Metastasierung des Peritoneums führen. Die Erfolgsrate einer Behandlung mit systemischer Chemotherapie ist gering (Franko et al, 2012) und lange Zeit galt eine manifeste Peritonealkarzinose als palliative Situation mit einem mittleren Überleben von 6 Monaten (Sadeghi et al, 2000). Durch die Entwicklung neuer chirurgischer Techniken (zytoreduktive Chirurgie und Peritonektomie) in Kombination mit hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC), initiiert durch Paul H. Sugarbaker, ist heutzutage eine kurative Behandlung möglich (Sugarbaker & Jablonski, 1995; Sugarbaker & Ryan, 2012). Unterschiedlichen Studien zufolge kann so zum Beispiel bei Peritonealkarzinose kolorektalen Ursprungs bei kompletter Zytoreduktion ein mittleres Überleben von 30-60 Monaten und ein 5-Jahres Überleben von 20-40% erzielt werden (Sugarbaker & Ryan, 2012).

Die bei der HIPEC verwendeten Chemotherapeutika induzieren DNA-Defekte und führen somit zur Apoptose der Tumorzellen (van de Vaart et al, 1998). Durch die DNA-Defekte werden unterschiedliche molekularbiologische Mechanismen ausgelöst, bei denen das COP9 Signalosom (CSN) eine wichtige Rolle spielt (Hannß & Dubiel, 2011; Matsuoka et al, 2007). Das CSN hat eine Schlüsselfunktion bei Zellzykluskontrolle (Dohmann et al, 2008; Liu et al, 2003), der DNA-Reparatur (Groisman et al, 2003; Kob et al, 2009) und beim Zellüberleben und reguliert die Stabilität von Protoonkogenen und Tumorsuppressorproteinen (Bech-Otschir et al, 2001). Die genaue Kenntnis der molekularbiologischen Wirkung der HIPEC und der Rolle des CSN könnte zu neuen Therapieansätzen führen.

1.1 Hypertherme Intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC)

Die HIPEC wurde zum ersten Mal 1980 angewendet (Spratt et al, 1980). 1995 erfolgte eine Kombination mit zytoreduktiver Chirurgie und Peritonektomie durch P.H. Sugarbaker am Washington Cancer Institute, heute ist es ein weltweit genutztes Verfahren (Sugarbaker, 1995; Sugarbaker & Ryan, 2012). Nach Resektion des Primärtumors, aller makroskopisch sichtbaren Metastasen und der Entfernung des tumortragenden Peritoneums wird für 30 bis 120 Minuten bei 41° bis 43°C eine Lavage des Abdomens mit Chemotherapeutikum durchgeführt (*Abb. 1*) (González-Moreno et al, 2010; Turaga et al, 2013).

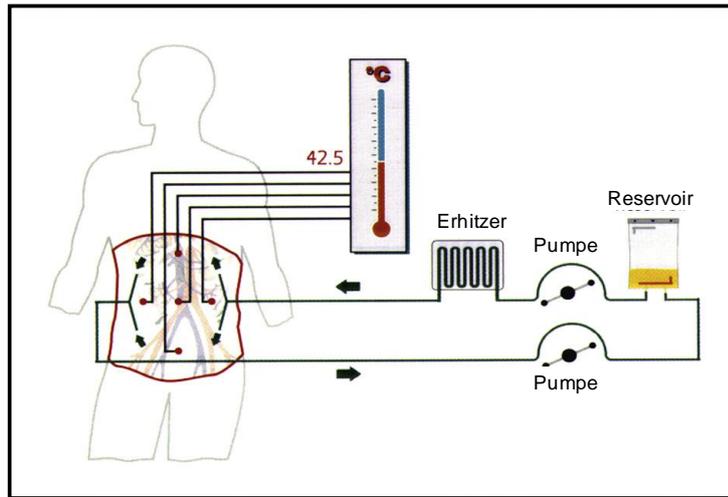


Abb.1. Schematische Darstellung der HIPEC

Mittels Perfusionssystem, bestehend aus Zulauf-/Ablaufschlauch und Temperatursonde wird die Peritonealhöhle mit Chemotherapielösung bei 42°C für 30-120 min gespült. Ziel der HIPEC ist die Elimination von Mikrometastasen nach zytoreduktiver Chirurgie (Abb. modifiziert nach (Roviello et al, 2010)).

Durch die lokale Anwendung sind mögliche, verbliebene Mikrometastasen direkt der zytotoxischen Wirkung ausgesetzt und eine rasche Aufnahme des Chemotherapeutikums ins Gewebe konnte nachgewiesen werden (Panteix et al, 1993). Die Hyperthermie wirkt ebenfalls zytotoxisch, verstärkt gleichzeitig die Wirkung der verwendeten Chemotherapeutika und erhöht deren Eindringtiefe (Ceelen et al, 2000). Es wird angenommen, dass die Eindringtiefe der Chemotherapeutika ins Gewebe zwischen 3 und 5 mm beträgt (El-Kareh & Secomb, 2004). Dementsprechend ist die komplette R0-Tumorresektion ein prognostisch wichtiger Faktor (Elias et al, 2001). Für die Einschätzung, ob bei einem Patienten mit Peritonealkarzinose eine R0-Resektion erreicht werden kann und eine kurative Therapie möglich ist, wird der Peritonealkarzinoseindex (PCI) erhoben (Harmon & Sugarbaker, 2005; Jacquet & Sugarbaker, 1996). Dabei werden Abdomen und Becken in 13 Regionen unterteilt und unter Berücksichtigung der Größe der Läsionen wird die Ausbreitung der Peritonealkarzinose berechnet (Abb.2). Ein geringer PCI geht dementsprechend mit einer guten Prognose einher. So konnte für Kolontumore mit einem PCI von bis zu 6 Punkten ein 5-Jahres Überleben von 44% erreicht werden, wohingegen 7-12 Punkte mit einem 5-Jahres Überleben von 22% und mehr als 19 Punkte mit 7% einhergehen (Elias et al, 2010).

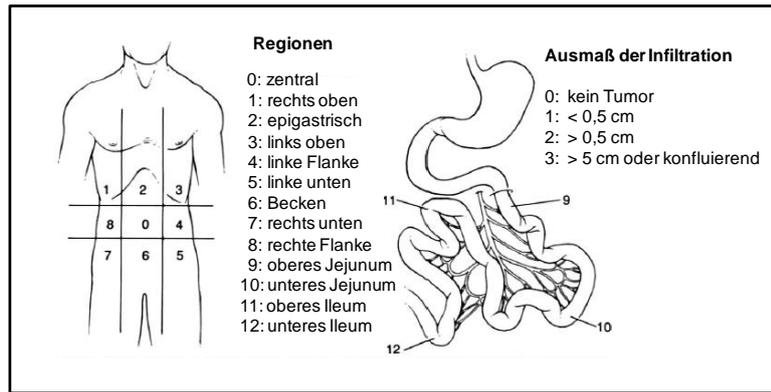


Abb.2. Peritonealkarzinoseindex

Um das Ausmaß der Peritonealkarzinose eines Patienten zu berechnen, wird das Abdomen in 9 Quadranten eingeteilt, wobei der untere Rippenrand und die Spina iliaca anterior superior als Orientierung für die horizontalen Linien gelten. Die Nummerierung erfolgt im Uhrzeigersinn, beginnend unter dem rechten Diaphragma. Die Regionen 9-12 entfallen auf den Dünndarm. Je nach Größe der Läsion werden 0-3 Punkte pro Region vergeben (Abb. modifiziert nach (Harmon & Sugarbaker, 2005)).

Für die Wahl des Chemotherapeutikums gibt es unterschiedliche Protokolle (Abb.3). In der Klinik für Visceralchirurgie der Charité Berlin wird u.a. eine Kombination aus Mitomycin C (MMC) und Cisplatin (CDDP) oder MMC alleine für 60 min bei 42°C verwendet (Abb.4).

Center/Country	HIPEC drug (s) and doses	HIPEC duration (min)	Concomitant intravenous chemotherapy	EPIC	Indication
Washington hospital center/ Washington, DC (USA)	Mitomycin C, 15 mg/m ² Doxorubicin, 15 mg/m ²	90	5-FU, 400 mg/m ² LV, 20 mg/m ²	5-FU 4 d	Appendiceal, and colorectal carcinomatosis
Washington hospital center/ Washington, DC (USA)	Cisplatin, 50 mg/m ² Doxorubicin, 15 mg/m ²	90	5-FU, 400 mg/m ² LV, 20 mg/m ²	Taxol 4 d	Gastric cancer, peritoneal mesothelioma, ovarian cancer
Washington hospital center/ Washington, DC (USA)	Oxaliplatin, 130 mg/m ²	60	5-FU, 400 mg/m ² LV, 20 mg/m ²	5-FU 4 d	Appendiceal, and colorectal carcinomatosis
Washington hospital center/ Washington, DC (USA)	Melphalan, 50-70 mg/m ²	60	No	No	Carcinomatosis with incomplete cytoreduction
Gustave roussy institute/ Villejuif (France)	Oxaliplatin, 460 mg/m ²	30	5-FU, 400 mg/m ² LV, 20 mg/m ²	No	Colorectal carcinomatosis
National cancer institute/ Amsterdam (Netherlands)	Mitomycin C, 35 mg/m ²	90	No	No	Appendiceal, and colorectal carcinomatosis
National cancer institute/ Milan (Italy)	Cisplatin, 43 mg/L Doxorubicin, 15.25 mg/L	90	No	No	Peritoneal mesothelioma, advanced ovarian cancer
National cancer institute/ Milan (Italy)	Mitomycin C, 3.3mg/m ² /L Cisplatin, 25 mg/m ² /L	90	No	No	Appendiceal, and colorectal carcinomatosis; advanced ovarian cancer; peritoneal mesothelioma
Centre hospitalo-universitaire lyon-sud/Lyon (France)	Mitomycin C, 10 mg/mL of perfusate	90	No	No	Appendiceal, gastric and colorectal carcinomatosis
Centre hospitalo-universitaire lyon-sud/Lyon (France)	Mitomycin C, 0.5 mg/kg Cisplatin 0.7 mg/kg	90	No	No	Peritoneal mesothelioma
Centre hospitalo-universitaire lyon-sud/Lyon (France)	Cisplatin, 20 mg/m ² /L	90	No	No	Recurrent and chemoresistant stage III ovarian cancer
National cancer institute/ Bethesda, MD (USA)	Cisplatin, 250 mg/m ²	90	No	5-FU + Taxol 1 d	Peritoneal mesothelioma

L: liter of perfusate; HIPEC: Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy; EPIC: Early postoperative intraperitoneal chemotherapy.

Abb.3. HIPEC-Protokolle

Es existieren unterschiedliche Protokolle für die intraperitoneale Chemotherapie (Abb. aus (González-Moreno et al, 2010)).

A	3,3 mg (MMC)/m ² x KO x 1l (Perfusat) 25 mg (CDDP)/m ² x KO x 1l (Perfusat)
B	35 mg (MMC)/m ² x KO x 1l (Perfusat)

Abb.4. HIPEC-Protokolle der Klinik für Visceralchirurgie der Charité Campus Mitte

Für die intraperitoneale Chemotherapie wird entweder MMC alleine (**A**) oder in Kombination mit CDDP (**B**) für 60 min verwendet. Die Chemotherapeutikakonzentration wird in Bezug zur Körperoberfläche (KO) berechnet.

MMC induziert durch seine alkylierende Wirkung Interstrand Crosslinks zwischen Adenin- und Guaninnukleotiden (Tomasz & Palom, 1997). CDDP bildet Interstrand Crosslinks zwischen benachbarten Purinen und Intrastrand Crosslinks. Es kommt zur Blockade der DNA-Synthese (Cohen & Lippard, 2001). Kann der DNA-Defekt nicht behoben werden, kommt es zur Apoptose der Tumorzellen. MMC wirkt bei systemischer Anwendung myelotoxisch und kann Schädigungen der Niere verursachen (Verwey et al, 1987). CDDP ist ebenfalls für seine renale Toxizität bekannt (Phelps et al, 1987).

1.2 COP9 Signalosom (CSN)

Das CSN wurde 1996 als Repressor von Licht-abhängigem Wachstum in *Arabidopsis thaliana* entdeckt (Chamovitz et al, 1996) und konnte 1998 erstmalig in humanen Zellen identifiziert werden (Seeger et al, 1998). Der Proteinkomplex ist evolutionär hochkonserviert, kommt in allen Eukaryoten vor (Deng et al, 2000) und spielt eine wichtige Rolle bei Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle (Dohmann et al, 2008; Liu et al, 2003), DNA-Reparatur (Matsuoka et al, 2007; Shiloh, 2006) und Angiogenese (Pollmann et al, 2001).

1.2.1 Der Aufbau des CSN und die Regulation der Expression der CSN-Untereinheiten

Im strukturellen Aufbau zeigt das CSN Ähnlichkeiten mit dem 26S Proteasom Lid Komplex (Glickman et al, 1998; Seeger et al, 1998; Wei & Deng, 1999) und dem eukaryotischen Translations Initiations Komplex 3 (eIF3) (Pick et al, 2009). In

Mammalia besteht das CSN aus 8 Untereinheiten, CSN1-CSN8 (Abb.5) (Deng et al, 2000). In der strukturellen Massenspektrometrie zeigen sich zwei symmetrische Module, CSN1/2/3/8 und CSN4/5/6/7, die zwischen CSN1 und CSN6 verbunden sind (Sharon et al, 2009).

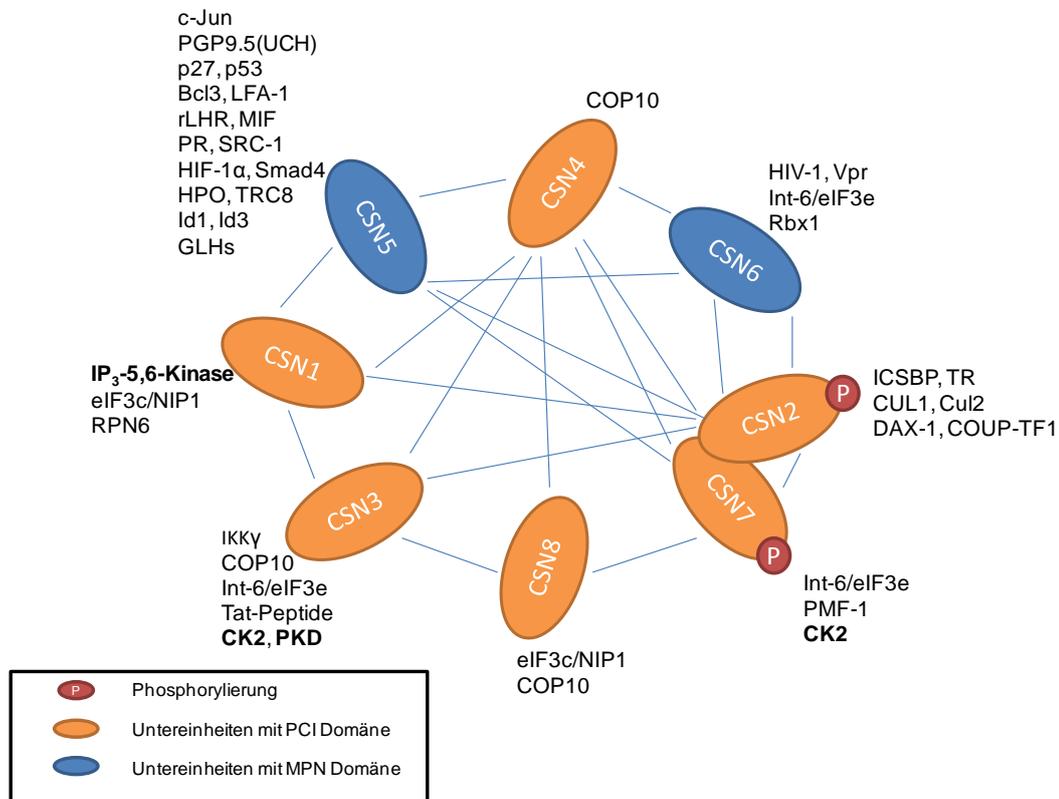


Abb.5. Das CSN und seine Untereinheiten

Das CSN besteht aus 8 Untereinheiten, deren Interaktion schematisch dargestellt ist (blaue Linien). Die CK2, PKD, IP3-5/6 Kinase sind mit dem CSN assoziiert (Abb. modifiziert nach (Bech-Otschir et al, 2005)).

Die Untereinheiten CSN1-4, 7 und 8 enthalten eine PCI-Domäne (Proteasom, COP9 signalosome, Initiation factor 3). Die PCI-Domänen sind wichtig für Interaktionen zwischen den CSN-Untereinheiten und mit anderen Proteinen. Außerdem bilden sie das Gerüst des Komplexes (Tsuge et al, 2001; Wei & Deng, 2003). Die Untereinheiten CSN5, auch als JAB1 (Jun-activation domain-binding protein 1) bezeichnet und CSN6 enthalten eine MPN-Domäne (Mpr-Pad1-N-terminal). Die MPN-Domäne des CSN5 hat zusätzlich ein JAMM-Motiv (JAB1 MPN Domäne Metalloenzym), welches als katalytisches Zentrum für die Deneddylierungsaktivität gilt (Cope et al, 2002). Außerdem sind die Proteinkinasen Casein-Kinase II (CK2), Proteinkinase D (PKD) und Inositol 1,3,4-triphosphat 5/6 Kinase (5/6 Kinase) mit dem CSN-Komplex assoziiert, die verschiedene Substrate des CSN phosphorylieren (Sun et al, 2002; Uhle et al, 2003).

Der Transkriptionsfaktor STAT1 aktiviert c-Myc, wodurch das RNA-binding-Protein Lin28B mit Hilfe der TUTase4 (TUT4) den Abbau der pre-let-7a miRNA induziert (Heo et al, 2009). Der c-Myc/Lin28B/let-7 Signalweg kann durch IFN α/γ induziert werden, was für Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse von Bedeutung sein könnte (Leppert et al, 2011).

1.2.2 Das CSN und seine Rolle im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das UPS ist das wichtigste proteolytische System in eukaryotischen Zellen. Es sorgt für den kontrollierten Abbau von Zyklinen, Proteinen, Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen, die u.a. an Zellzykluskontrolle und Zellwachstum beteiligt sind und hält sie im Gleichgewicht (Deshaies & Joazeiro, 2009; Hershko & Ciechanover, 1998). Dysregulation im proteolytischen System kann zu maligner Transformation führen (Richardson & Zundel, 2005). Im Mittelpunkt des hochkonservierten Proteinsystems steht das 26S Proteasom. Proteine werden für den Abbau mittels Ub markiert und durch das Proteasom zu kleinen Peptiden abgebaut. Die Peptide werden zu Aminosäuren gespalten und stehen wieder für die Proteinbiosynthese zur Verfügung (Grabbe et al, 2011; Hochstrasser, 2000). Die Markierung mittels Ub (Ubiquitinierung) erfolgt durch eine Enzymkaskade (Abb.7) bestehend aus E1-Aktivierungs-Enzym, E2-Konjugations-Enzym und E3-Ligationsenzym (Grabbe et al, 2011; Hershko & Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 2000).

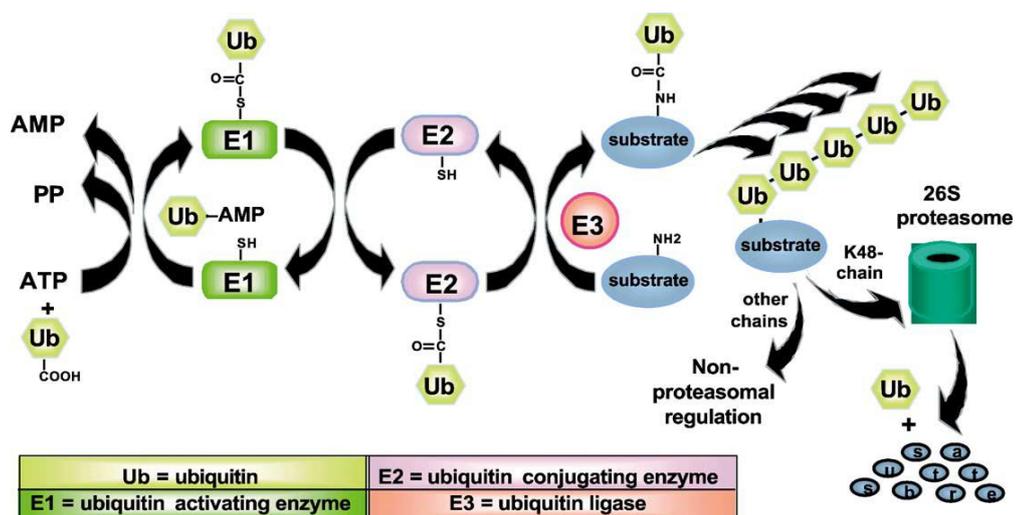


Abb.7. Ubiquitin-Proteasom-System

Damit ein Protein vom 26S Proteasom für den Abbau erkannt wird, ist die Ubiquitinierung erforderlich. Die Übertragung von Ubiquitin auf das Substrat wird durch eine Enzymkaskade vermittelt. E1 aktiviert Ub, es erfolgt die Übertragung auf E2, E3 sorgt für die Substraterkennung. Nach der Polyubiquitinierung des Substrats erfolgt der Abbau durch das Proteasom (Abb. modifiziert nach (Pray et al, 2002)).

Es gibt 2 große Familien von Ub-E3-Ligasen: HECT-Domän (homologous to he E6-AP-carboxyl terminus) und RING-Ligasen (really interesting new gene). HECT-Domän E3 Ligasen bilden Thioesterkomplexe mit Ub in Anwesenheit von E2s und vermitteln so die Übertragung des Ub auf Targetproteine (Scheffner & Staub, 2007). RING-Ligasen enthalten als katalytisches Zentrum 2 Zinkionen und interagieren darüber mit E2s. Sie vermitteln die Übertragung des Ub von E2s, indem sie Substrat und E2s in räumliche Nähe bringen (Lipkowitz & Weissman, 2011). RING-Ligasen sind die größte Familie und kommen häufig in Komplexen vor (Petroski & Deshaies, 2005).

Eine Superfamilie der Ubiquitin Ligasen bilden CRLs. Sie bestehen aus Cullin und RING-Protein und binden über Adapterproteine und Rezeptoren spezifische Substrate (Petroski & Deshaies, 2005). Culline bilden das Gerüst der CRLs. Es gibt 7 verschiedene Culline: Cul1, 2, 3, 4a, 4b, 5 und 7 (Petroski & Deshaies, 2005). Am C-Terminus binden Culline RING domain Proteine (Rbx1 oder Rbx2), die die Interaktion mit E2 bzw. den Transfer des Ub auf das Substrat vermitteln. Am N-Terminus binden verschiedene Adaptorproteine und Rezeptorproteine, die über die Substratspezifität entscheiden (Jackson & Xiong, 2009). Cul1 CRLs enthalten das Adaptorprotein SKP1 und ein F-Box Protein als Substratrezeptor. Cul2 und Cul5 CRLs binden Substrate über ein Elongin-BC Adaptor und ein Suppressor des Zytokin Signalling/Elongin BC (SOCS/BC)-box Protein als Substratrezeptor. Cul3 CRLs binden Substrate über ein Substratrezeptor Protein, das eine BTB-Domäne enthält. Cul4 CRLs enthalten als Adaptorprotein das DNA-damage-binding protein-1 (DDB1) (Jackson & Xiong, 2009; Petroski & Deshaies, 2005). Einige der Cullin-basierten E3-Komplexe haben eine große Bedeutung bei der DNA-Replikationskontrolle, Zellzykluskontrolle, Apoptose und Tumorgenese (Hannß & Dubiel, 2011; Richardson & Zundel, 2005).

CRLs werden durch den Neddylierungs-Deneddylierungs-Signalweg reguliert (*Abb.8*). Neddylierung sorgt für die allosterische Aktivierung des Ub Transfers vom E2 auf das Substrat. Inaktiviert werden CRLs durch die hydrolytische Abspaltung des Nedd8 durch die Deneddylierungsaktivität der CSN5 Untereinheit des CSN (Cope et al, 2002; Lyapina et al, 2001).

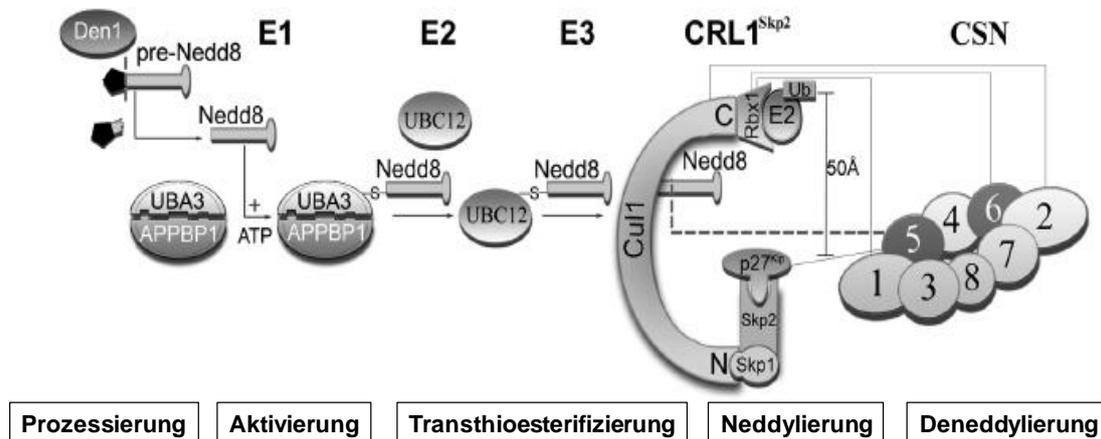


Abb.8. Kontrolle der Deneddylierung durch das COP9 Signalosom

Die Bindung von Nedd8 an Cul1 (Neddylierung) bedingt eine Konformationsänderung der $CRL1^{Skp2}$ und erlaubt die räumliche Nähe zwischen E2 und dem Substrat ($p27^{kip}$). Dies hat die Ubiquitinierung von p27 und dessen Abbau durch das Proteasom zur Folge. CSN5 induziert die hydrolytische Spaltung des Nedd8 von Cul1 (Deneddylierung), wodurch $CRL1$ inaktiviert ist und Substratproteine vor dem Abbau durch das UPS geschützt sind (Abb. modifiziert nach (Schmaler & Dubiel, 2010)).

1.2.3 Das CSN und seine Rolle bei der Zellzykluskontrolle

Der CDK (cyklin dependent kinase) Inhibitor p27 unterdrückt die Aktivierung von Cyclin E-CDK2 oder Cyclin D-CDK4-Komplexen, was wiederum den Zellzyklus in der G1-Phase stoppt und einen Übergang in die S-Phase verhindert (Toyoshima & Hunter, 1994). Der Abbau des p27 erfolgt über das oben beschriebene UPS und wird durch $CRL1^{Skp2}$ vermittelt. Skp2 formt dabei einen Komplex mit Cul1 und Skp1, sein Substrat ist p27 (Frescas & Pagano, 2008). Das CSN reguliert die Aktivität von $CLR1^{Skp2}$. Somit hat das CSN Einfluss auf die G1-Phase des Zellzyklus (Kato & Yoneda-Kato, 2009; Tomoda et al, 1999).

Darüber hinaus ist vermutlich das CSN für die Stabilität von $CRL1^{Skp2}$ Komponenten zuständig. Die CSN-assoziierte Deubiquinase USP15 stabilisiert Rbx1 und wahrscheinlich Skp2 (Heffeld et al, 2005).

1.2.4 Das CSN und seine Phosphorylierungsfunktion

CSN-assoziierte Kinasen phosphorylieren transkriptionale Regulatoren wie p105, I κ B α , c-Jun und p53. Die Phosphorylierung kann Proteine entweder vor dem Abbau durch das UPS stabilisieren oder aber für den Abbau markieren (Bech-Otschir et al, 2001; Seeger et al, 1998).

Die CSN-vermittelte Phosphorylierung veranlasst das Tumorsuppressorprotein p53 zum Abbau durch das UPS. Ein zuständige E3 ist CRL1^{JFK}, welches das so phosphorylierte p53 erkennt (Sun et al, 2011). 50% aller Tumore zeigen eine Mutation im p53-Gen (Olivier et al, 2010). Die Stabilität des p53-Proteins ist notwendig, um Tumorentstehung und Wachstum zu verhindern. Normalerweise wird neusynthetisiertes p53 permanent ubiquitiniert und damit für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Der Abbau wird durch Mdm2, eine weitere p53 spezifische Ub-Ligase vermittelt (Brooks & Gu, 2006; Kubbutat et al, 1997). DNA-Defekte induzieren eine spezifische Phosphorylierung, die p53 stabilisiert und vor dem Abbau durch das UPS bewahrt. So kann es als Tumorsuppressor Zellen mit genetischer Instabilität durch Apoptose eliminieren (Hirao et al, 2000). Das CSN agiert als destabilisierender Faktor des p53, da die CSN-spezifische Phosphorylierung das p53 für den Abbau durch das UPS markiert (Bech-Otschir et al, 2001).

Im Gegensatz dazu sorgt die CSN-vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun für die Stabilisierung vor dem UPS. CSN-assoziierte Kinasen phosphorylieren c-Jun an dessen NH₂-terminus, sowie an Ser-63 und Ser-73, was c-Jun vor der Ubiquitinierung und der Degradierung durch das UPS schützt (Naumann et al, 1999; Seeger et al, 1998). c-Jun ist für die Induktion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Tumorzellen verantwortlich. VEGF gilt als wichtigster pro-angiogenetischer Regulator. Somit spielt das CSN eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese (Pollmann et al, 2001).

1.2.5 Das CSN und seine Funktion bei der DNA-Reparatur

Zellen sind permanent exogenem und endogenem Stress, wie Chemikalien, UV- oder ionisierender Strahlung ausgesetzt, der DNA-Defekte induzieren kann. Um die Stabilität des Genoms zu gewährleisten, stehen der Zelle komplexe DNA-Reparatur-Systeme zur Verfügung (Ciccio & Elledge, 2010). Extrem zytotoxisch scheinen DSBs (double-strand breaks) zu sein. Sie können exogen durch ionisierende Strahlung oder Chemikalien hervorgerufen werden, sind aber andererseits Teil der meiotischen Rekombination und des Immunsystems im Rahmen der V(D)J-Rekombination (Bassing & Alt, 2004). Lässt sich der DNA-Defekt nicht beheben, kommt es bei der Zellzykluskontrolle an bestimmten Kontrollpunkten zum Zellzyklusarrest, zu Transkriptionsaktivierung, Zellalterung, Apoptose oder zur „mitotischen Katastrophe“. Um die Zelle davor zu

bewahren, unterliegt die DNA-Reparatur einer festen Kontrolle (Bensimon et al, 2011; Hannß & Dubiel, 2011).

Die zelluläre Antwort auf DNA-Defekte wird durch eine große Anzahl von Proteinkinasen reguliert. Im Mittelpunkt stehen die Proteinkinase ATM (ataxia-teleangiectasia mutated) und die Proteinkinase ATR (ATM and RAD3-related). Reguliert wird die ATM durch den MRN (Mre11-Rad50-NBS1) Komplex und reagiert auf DSBs. Die ATR wird durch ATRIP (ATR-interacting protein) reguliert und spielt eine Rolle bei single-strand DNA (ssDNA) (Bensimon et al, 2011; Matsuoka et al, 2007). Beide Kinasen lösen über die Phosphorylierung von Proteinen Signalkaskaden aus, einschließlich der Chk1 und Chk2 (checkpoint kinases), was weitere Phosphorylierung wichtiger Proteine der DNA-Reparatur in Gang setzt (Matsuoka et al, 2007; Shiloh, 2006). Dabei werden unter anderem die CSN-Untereinheiten CSN1, CSN3 und CSN7a phosphoryliert (Abb.9) (Matsuoka et al, 2007).

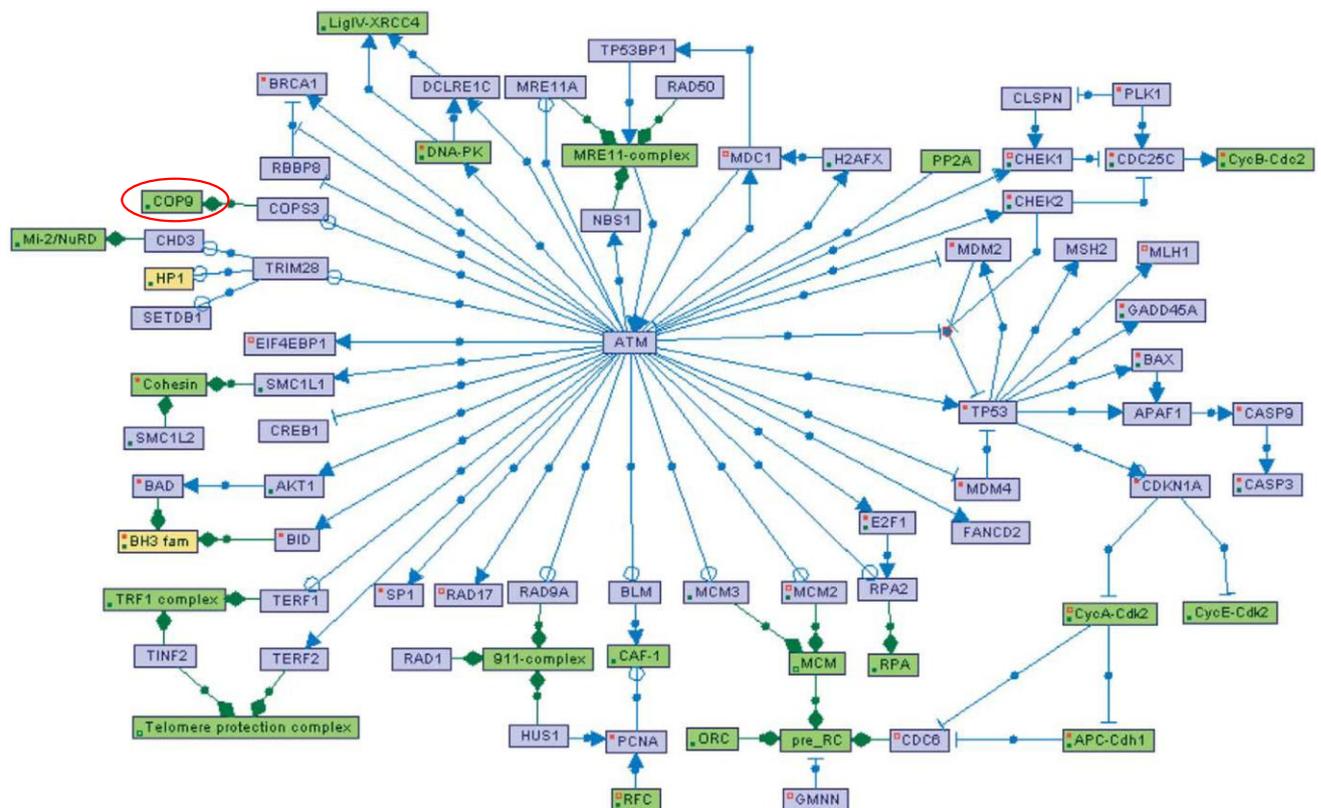


Abb.9. Durch ATM-regulierte Proteine im Rahmen der DNA-Reparatur

Kommt es zum DNA-Defekt, werden wichtige Proteine der DNA-Reparatur durch das ATM-Protein aktiviert, u.a. das CSN (Abb. modifiziert (Shiloh, 2006)).

Als Plattform im UPS spielt das CSN eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur: Durch seine Deneddylierungsfunktion reguliert das CSN CRLs und kontrolliert die Ubiquitinierung und den Abbau von Proteinen, die bei der DNA-Reparatur involviert sind (Groisman et al, 2003). Außerdem bildet das CSN Komplexe mit Cul4-Ligasen, die eine entscheidende Rolle bei der Chromatininformation während der DNA-Reparatur und bei der Checkpoint Kontrolle spielen (Hong et al, 2005; Jia et al, 2005). Darüber hinaus entscheidet es durch assoziierte Kinasen über die Stabilität von wichtigen DNA-Reparatur-Effektoren, wie p53 und p27 (Hannß & Dubiel, 2011).

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Es soll die Wirkung der HIPEC auf das CSN in HT29-Kolontumorzellen untersucht werden. Folgende Fragen stehen im Vordergrund:

Wie wirkt sich die HIPEC auf das CSN und andere Regulatoren der DNA-Reparatur aus?

Um den Mechanismus der bei der HIPEC verwendeten Chemotherapeutika zu untersuchen, sollen HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC oder CDDP inkubiert werden. Mit Hilfe von Western Blot können Veränderungen der Proteinkonzentration der CSN-Untereinheiten und anderer an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine analysiert werden.

Wie wirkt sich die HIPEC auf die Apoptose von HT29-Zellen aus?

Mittels eines spezifischen ELISAs, der aktivierte Caspase-3 erfasst, soll nach Inkubation der HT29-Zellen ein quantitativer Marker für die Apoptose von HT29-Zellen etabliert werden. Damit soll die Apoptoserate in Abhängigkeit der MMC-Konzentration gemessen werden.

Wie kann die Apoptoserate von Tumorzellen nach HIPEC erhöht werden?

Es soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Wirkung der Chemotherapeutika durch Zusatzstoffe, wie zum Beispiel dem Hemmstoff der CSN-assoziierten Kinasen Curcumin, potenziert werden kann. In Bezug auf die HIPEC könnte das zu einer Reduktion der Chemotherapeutika führen und Patienten könnten durch geringere Nebenwirkungen profitieren.

Kann die restriktive Wirkung des CSN bei der DNA-Reparatur durch miRNAs verhindert werden?

Unter der Annahme, dass das CSN eine positive Rolle bei der DNA-Reparatur spielt, würde ein Absinken der CSN-Konzentration den Weg in Richtung Apoptose ebnen. Somit könnten miRNAs, die die Expression der CSN-Untereinheiten unterdrücken, als therapeutische Targets zur Hemmung des CSN in Betracht gezogen werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Benutzte Geräte

Geräte	Hersteller
Blottingpapier, 703	VWR, Darmstadt
Blotting Schwämme	BIO-RAD, München
Campinggas Butan/Propan	Carl Roth, Karlsruhe
Clean bench "Microflow Biological Safety Cabinet"	Michael Trenkner, Pharma- und Elektrotechnik, Koblenz
Falcon tubes 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glasplattenhalterungssystem	BIO-RAD, München
Glasplatten Mini PROTEAN system 0,75 mm	BIO-RAD, München
Inkubator Hera cell	Heraeus Instruments, Hanau
Kämme, 15 well, 0,75 mm	BIO-RAD, München
Kodak medical X-film	Kodak, Stuttgart
Magnetrührer MR3000	Heidolph, Kelheim
Mikroskop Typ Wiloverts 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Minizentrifuge GMC-060	neoLab®, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	LaborOptik, Friedrichsdorf
Nitrocellulosetransfermembran Protran®	Whatman®, Dassel
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Pipette Boy "Pipetus®"	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettenspitze 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal tubes 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Saran Folie	DOW, Schwalbach
Schüttler "Unimax 2010"	Heidolph, Kelheim
SDS-PAGE System "Mini-PROTEAN® 3 cell"	BIO-RAD, München
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spectra Max® M2	Molecular Devices GmbH, Biberbach
Thermoinkubator	Certomat®, Goettingen
Thermometer	B.Braun Biotech International, Melsungen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermomix®MM Wasserbad	B.Braun Biotech International, Melsungen
Tischzentrifuge Fresco 17	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraspec	Amersham Pharmacia Biotech
Vortexer, REAX control	Heidolph, Kelheim
Waage	Sartorius Mechantronics, Göttingen
Western Blot System	BIO-RAD, München
X-ray Kassette	Kisker Biotech, Steinfurt
Zellkulturplatte, 6-well, CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale, 94 mm x 16 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifuge: Megafuge 1.OR Thermoscientific	Heraeus Instruments, Hanau

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Benutzte Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Aprotininpulver	AppliChem, Darmstadt
Cisplatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
Curcumin	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	AppliChem, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	AppliChem, Darmstadt
Lipofectamine ® 2000 Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Mitomycin C	Medac GmbH, Wedel
Natriumazid (NaN_3)	AppliChem, Darmstadt
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	AppliChem, Darmstadt
Neomycinsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nonidet ® (NP40)	AppliChem, Darmstadt
OptiMem®1+GlutaMAX™ 1	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS Dulbecco w/o Mg^{2+}	Biochrom, Berlin
Peressigsäure (PAA)	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	AppliChem, Darmstadt
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Roti ®-Load 1, 4x Konz.	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem, Darmstadt
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
0,05% Trypsin-EDTA	Invitrogen, Darmstadt
Tryptophanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween	AppliChem, Darmstadt

3.1.3 Puffer und Lösungen

Für alle Puffer wurde destilliertes Wasser benutzt und der pH-Wert bei Raumtemperatur eingestellt.

Tabelle 3: Puffer, Lösungen und ihre Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungslösung	5% Magermilchpulver , 1 x PBS-T zu 100 ml
30 mM Cisplatin-Lösung	1,85 mg Cisplatin, 200 µl DMSO
20 mM Curcumin-Lösung	30,6 mg Curcumin, 4 ml DMSO
Entwicklerlösung	50% X-OMA Ex II Lösung A, 5% X-OMA Ex II Lösung B, 0,025% X-OMA Ex II Lösung C Aqua dest. zu 2 l
Fixierlösung	40% RPX-OMAL LO Lösung A, 10% RPX-OMAL LO Lösung B Aqua dest. zu 1 l
3 mM Mitomycin C-Lösung	2 mg Mitomycin C, 2 ml PBS
10x PBS	80 g NaCl, 2 g HCl, 2,4 g Na ₂ HPO ₄ , 14,4 g KH ₂ PO ₄ Aqua dest. zu 1 l, (pH 7,4)
PBS-T	1 x PBS, 0,1% Tween 20
1x Ponceau Färbung	0,1% Ponceau, 5% Essigsäure
Roti®-Load 1, 4 x Konz.	1:4 Lösung in Probe
5x SDS-PAGE Puffer	75,5 g Tris, 360 g Glycin, 25 g SDS Aqua dest. zu 5 l
Triplelysatpuffer (TLB)	50 mM Tris HCl (pH 7,4), 150 nM NaCl, 0,02% NaN ₃ , 0,1% SDS, 1% NP40, 0,5% Natriumdeoxycholat zu 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin
Tris-HCl	Tris 1,5 M, HCL, Aqua dest. pH 8,8 Tris 0,5 M, HCL, Aqua dest. pH 6,7
1x Western Blot Puffer	144 g Glycin, 30 g Tris, 10% Methanol Aqua dest. zu 1 l

3.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper gegen humane Proteine und ihre Verdünnung

Antikörper gegen	Hersteller	Verdünnung	Herkunft
Caspase3	Epitomics®	1:2000	Kaninchen
β-Catenin	Santa Cruz	1:1000	Kaninchen
c-Jun	Santa Cruz	1:500	Kaninchen
c-Myc	Santa Cruz	1:1200	Kaninchen
CSN1	BIOMOL	1:4000	Kaninchen
CSN3	Seeger et al., 1998	1:1000	Kaninchen
CSN5	GeneTex, Inc.	1:500	Maus
CSN6	BIOMOL	1:500	Kaninchen
CSN8	BIOMOL	1:5000	Kaninchen
Cul1	Santa Cruz	1:400	Kaninchen
Cul3	BD Transduction Laboratories TM	1:500	Maus
Cul4	Santa Cruz	1:100	Kaninchen
α-Kaninchen	Seramun	1:2000	Kaninchen

Lin28B	Abcam	1:500	Kaninchen
α -Maus	Seramun	1:2000	Maus
p27	Santa Cruz	1:500	Kaninchen
p53	Chromogen	1:5000	Maus
PPAR γ	Santa Cruz	1:500	Kaninchen
Stat1	Santa Cruz	1:400	Maus
γ -Tubulin	Santa Cruz	1:1000	Maus

3.1.5 Größenstandards

Tabelle 5: Standards

Standard	Hersteller
Page Ruler, Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.6 Kits

Alle Kits wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
ELISA-kit Caspase-3 (active)	Invitrogen, Darmstadt
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.1.7 miRNA Mimics und Inhibitoren

Tabelle 7: Verwendete miRNA Mimics und Inhibitoren

microRNA	Hersteller
miRNA let-7a-1-Inhibitor	Dharmacon ThermoScientific,
miRNA let-7a-1-Inhibitor Neg.Kontrolle	Schwerte
miRNA let-7a-1-Mimic	
miRNA let-7a-1-Mimic Neg.Kontrolle	

3.1.8 Zellkulturmedium und Zusätze

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank verwendet.

Tabelle 8: Zellkulturmedium und Zusätze

Zellkulturmedium / Zusätze	Hersteller
Dulbecco´s MEM	Biochrom AG, Berlin
FCS 10%	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin (2 mM)	Biochrom AG, Berlin
OptiMem®1+ GlutaMAX™ 1	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS (1x) Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Penicillin (100 U/ml)	Biochrom AG, Berlin
Pyromycin (1 µg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
0,05% Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tryptanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.1.9 Eukariotische Zelllinien

Die verwendeten HT29-Zellen stammen aus einem Adenokarzinom des Kolon (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Die siCSN5-Zellen zeigen einen stabilen Knockdown der CSN-Untereinheit 5 und wurden verglichen mit siGFP transfizierten Kontrollzellen. Sie stammen aus einem Cervixkarzinom und wurden freundlicherweise von W. Henke und A. Peth bereitgestellt (Peth et al, 2007).

Tabelle 9: Eukariotische Zelllinien

Zelllinie	Bemerkung
HT29	Adhärente, humane Kolonadenokarzinomzelllinie
siCSN5 HeLa	Adhärente, humane Cervixkarzinomzelllinie, stabil transfizierter Knockdown der Untereinheit CSN5
siGFP HeLa	Kontrollzellen

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung der HT29-Zellen und siCSN5/siGFP-Zellen

HT29-Zellen wurden in Dulbecco's MEM-Medium und die HeLa-Zellen in RPMI 1640 Medium bei Standardbedingungen von 37°C und 5% CO₂ in 10 cm Schalen im Inkubator kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin versetzt. Den siCSN5/siGFP-Zellen wurde außerdem 1 µg/ml Pyromycin hinzugefügt. Ein Mediumwechsel fand alle 3 Tage statt. Bei Anzeichen des Überwachsens wurden die Zellen gesplittet.

3.2.1.2 Inkubation der Zellen mit MMC, CDDP, Curcumin

Die Zellen wurden mit PBS (1 x) gewaschen, mit Trypsin von der Platte gelöst und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt. Danach wurden die Zellen in den unten genannten Konzentrationen auf 6-well-Platten mit 2 ml Medium pro Well ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen im Brutschrank mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC, CDDP oder Curcumin, welche zusammen mit Medium im Wasserbad auf 42°C erhitzt wurden, für 1 h/4 h/24 h inkubiert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Anzahl der Zellen für die Inkubation und Konzentration der Chemikalien

Zelllinie	Zellzahl pro Well	Mitomycin C (µM)	Cisplatin (µM)	Curcumin (µM)
HT29	0,5x 10 ⁶	0-10-50-100-200	0-50-100-150-200	50
HT29 transfiziert mit let7a-1 miRNA Mimic/ Inhibitor	0,25x 10 ⁶	50		
siCSN5/siGFP	1x 10 ⁶	0-100		

3.2.1.3 Zellyse

Die Zellen wurden mit 2 ml/Well PBS (1x) gewaschen und mit 120 µl/Well Triple Lysat Puffer, versetzt mit den Proteaseinhibitoren PMSF und Aprotinin, lysiert. Die lysierten Zellen wurden in 1,5 ml Tubes überführt und bei 13.000 rpm bei -4°C für 10 min

zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Tubes überführt und entweder direkt für SDS-PAGE oder ELISA verwendet bzw. bei -80°C eingefroren.

3.2.1.4 Transfektion von HT29-Zellen mit miRNA let-7a-1 Inhibitor und miRNA let-7a-1 Mimic

HT29-Zellen wurden auf einer 6 Well-Platte mit $0,25 \times 10^6$ Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 h wurde mit der Transfektion begonnen. Dazu wurde Lipofectamin® 2000 mit dem serumfreien Medium OptiMem gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. let-7a-1 miRNA Inhibitor (200 nM, 400 nM) und let-7a-1 miRNA Mimic (100 nM, 200 nM), sowie die zugehörigen Negativkontrollen wurden ebenfalls mit OptiMem gemischt und für 5 min inkubiert. Danach wurde Lipofectamin hinzugefügt und für 20 min inkubiert. Das miRNA:Lipofectamin Verhältnis beträgt 1:1, entsprechend dem Herstellerprotokoll. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS (1x) gewaschen und 2 ml der Transfektionslösung pro Well wurden verteilt. Nach 4-6 h und nach 24 h fand ein Mediumwechsel mit Dulbecco's MEM-Medium statt.

Um das Ergebnis der Transfektion zu kontrollieren, wurde nach weiteren 24 h ein Western Blot durchgeführt.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Caspase3-ELISA

Zur Messung des Apoptosegrads nach Inkubation der HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC wurde ein ELISA gegen aktive Caspase-3 verwendet. Die Zelllysate wurden mit Diluent Puffer 1:10 verdünnt, auf die Platte aufgetragen und entsprechend dem Herstellerprotokoll behandelt. Die Konzentration der Caspase-3 wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mit dem Program Soft Max Pro der Firma Molecular Devices GmbH ausgewertet.

3.2.2.2 SDS-PAGE

Für die Aufspaltung der Proteine entlang ihrer Ladung wurde die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) verwendet. Das Gel besteht aus einem Sammelgel und Trenngel und setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für SDS-PAGE

Trenngel 10%	Sammelgel 15%
0,05 ml 10% APS	0,03 ml 10% APS
3,33 ml PAA	0,5 ml PAA
0,1 ml 10% SDS	0,05 ml 10% SDS
0,01 ml TEMED	0,006 ml TEMED
2,5 ml Tris 1,5 M (pH 8,8)	1,25 ml Tris 0,5 M (pH 6,8)
Add 10 ml H ₂ O	Add 3 ml H ₂ O

Die Lysate wurden mit 1 x Ladepuffer (Roti ®-Load) im Verhältnis 1:4 versetzt und bei 95°C für 5 min erhitzt. Anschließend wurden je 12 µl der Proben in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der PAGE-Ruler, Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas benutzt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 140 V für 75 min in 1 x SDS-PAGE-Puffer (*Tabelle 3*).

3.2.2.3 Western-Blot

Der Transfer der auf dem SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran fand in 1 x Transferpuffer (*Tabelle 3*) bei 250 mA auf Eis statt. Gel und Membran wurden von je 2 Lagen Blottingpapier umgeben.

3.2.2.4 Ponceau-Färbung

Für den Nachweis des Transfers der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde die Membran mit 1 x Ponceaulösung für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbung für 5 min mit PBS-T (1x) ausgewaschen.

3.2.2.5 Blockieren

Es folgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsplätze auf der Membran. Dafür wurde diese für 1 h in 100 ml Blockierungslösung, bestehend zu 5% aus Magermilchpulver und PBS-T (1x) (*Tabelle 3*) gelegt.

3.2.2.6 Immundetektion

Die Membran wurde für 2 Stunden mit dem Primärantikörper und für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in 5% Blockierungslösung verdünnt (*Tabelle 4*). Nach jeder Antikörperinkubation wurde die Membran 3 x für 5 min mit PBS-T(1x) gewaschen.

3.2.2.7 Entwicklung

Die Membran wurde für 1 min mit ECL-Lösung (Pierce® ECL Western Blotting Substrate) nach dem Herstellerprotokoll inkubiert. Die ECL-Lösung enthält eine Peroxidase, die an den sekundären Antikörper bindet und so für die Detektion verantwortlich ist. Für die Filmentwicklung wurden Kodak UV Filme verwendet. Mit Hilfe von unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden die zu untersuchenden Proteine anhand ihrer Banden nachgewiesen.

3.2.2.8 Densitometrie und Statistische Auswertung

Um den Anstieg der CSN-Untereinheiten zu quantifizieren, wurden die Western blots mit Hilfe der ImageJ Software densitometrisch ausgewertet. Die mit ImageJ erhaltenen Daten für die CSN-Untereinheiten wurden mit der Ladekontrolle γ -Tubulin normalisiert. Die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung wurden berechnet. Der ungepaarte *t*-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet. Jedes Experiment wurde 3-mal unabhängig voneinander durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchung zum Einfluss der HIPEC auf das CSN

Um die Rolle des CSN bei der HIPEC zu entschlüsseln, wurde ein HIPEC-Zellkulturmodell entwickelt, bestehend aus HT29-Zellen, Wasserbad, Thermoinkubator und Chemotherapeutikum. Zunächst sollte die Wirkung der Chemotherapeutika MMC und CDDP auf das CSN mittels Western Blot untersucht werden.

4.1.1 Analyse der MMC-Wirkung auf das CSN

HT29-Zellen wurden für 1 h und 4 h zu HIPEC-äquivalenten Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC behandelt und die CSN-Untereinheiten und andere regulatorisch wirksame Proteine mittels Western Blot mit den angezeigten Antikörpern analysiert (Abb. 10).

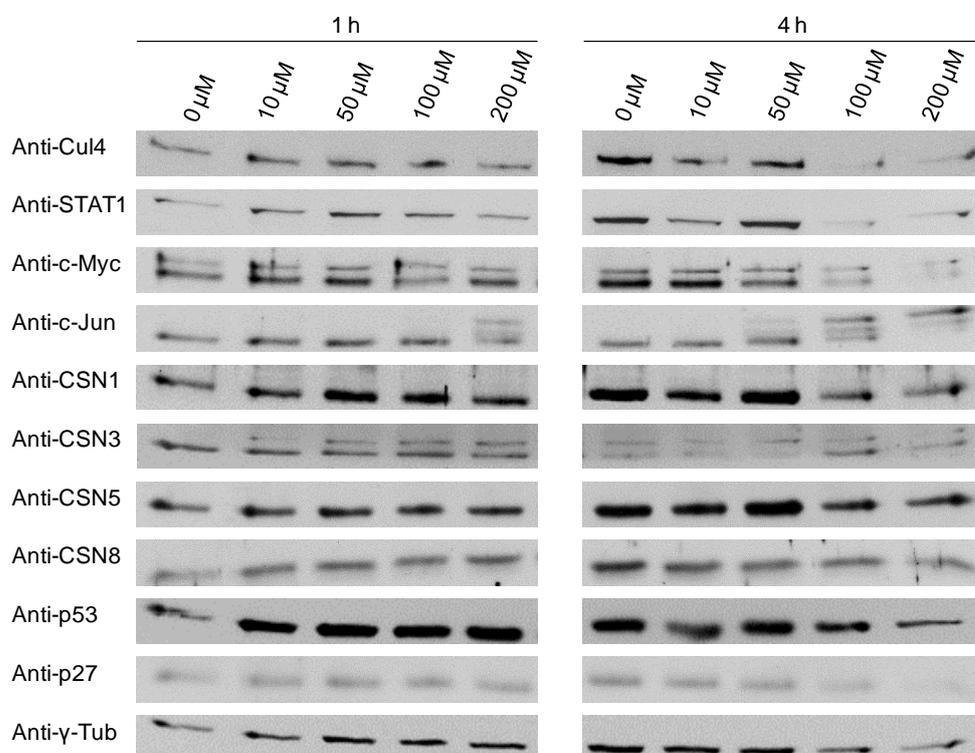


Abb.10. Analyse des Einflusses von MMC auf das CSN und CSN-interagierende Proteine

Inkubation von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC, erwärmt in Medium auf 42°C. Nach 1 h und 4 h wurden die Zellen lysiert. Die Proteine wurden entsprechend ihrer Ladung in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. γ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente.

Dabei wurde bei der vierstündigen Inkubation bei einer MMC-Konzentration von 100 μ M und 200 μ M in der Ladekontrolle γ -Tubulin und in den anderen Proteinen eine verminderte Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet, was an der bereits einsetzenden Apoptose liegen kann. Für Cul4 und den Transkriptionsfaktor

STAT1 konnte keine Veränderung nachgewiesen werden. Die CSN-Untereinheiten CSN5 und CSN8 zeigten in Abhängigkeit der MMC-Konzentration bei 1 h und 4 h einen Anstieg des Proteinlevels, für CSN3 ließ sich eine doppelte Bande detektieren, was Zeichen einer Phosphorylierung sein könnte. Für die Transkriptionsfaktoren c-Myc und c-Jun wurde eine Phosphorylierung nachgewiesen. c-Jun wurde bei 1 h Inkubation und einer MMC-Konzentration von 200 μM phosphoryliert, wohingegen bei 4 h die Phosphorylierung schon ab einer MMC-Konzentration von 50 μM nachweisbar war. Die Phosphorylierung des c-Myc Proteins schien unabhängig von der MMC-Konzentration stattzufinden. Das Tumorsuppressorprotein p53 und der Zellzyklusregulator p27 zeigten bei 1 h Inkubation einen leichten Konzentrationsanstieg und verhielten sich bei 4 h MMC-unabhängig.

Der nach MMC-Behandlung beobachtete Anstieg der CSN-Untereinheiten wurde mittels Densitometrie quantifiziert (Abb.11). Die mit ImageJ erhaltenen Daten für die CSN-Untereinheiten wurden mit der Ladekontrolle γ -Tubulin normalisiert.

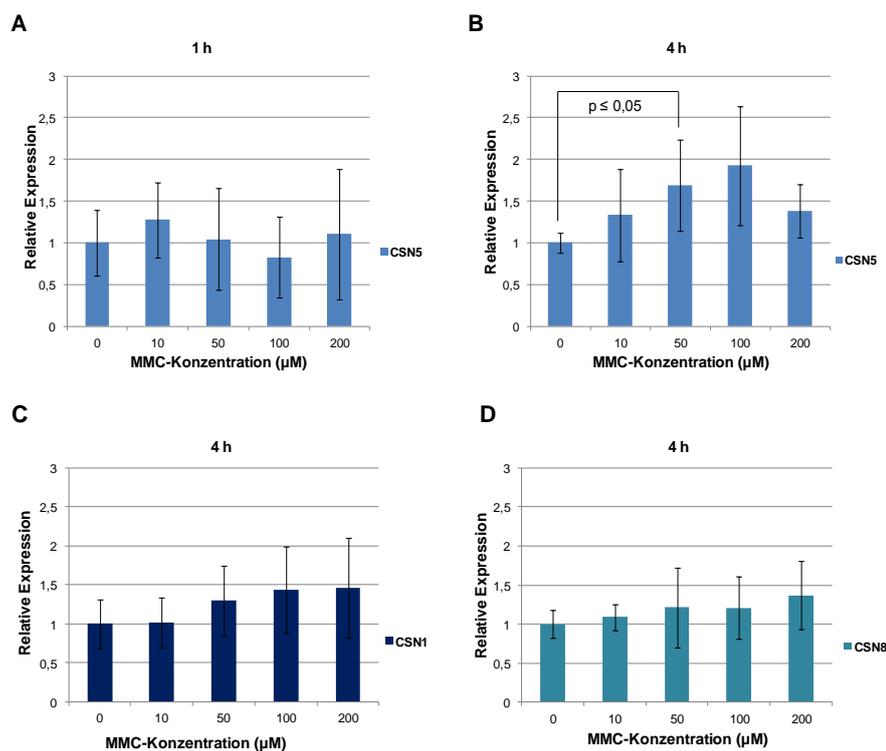


Abb.11. Densitometrische Analyse der CSN-Expression nach MMC-Behandlung.

Inkubation von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h (A) und 4 h (B,C,D). Die Zellen wurden lysiert und die Proteine im Western Blot untersucht. Der Anstieg der CSN-Untereinheiten wurde mittels ImageJ Software densitometrisch analysiert. Als Ladekontrolle wurde γ -Tubulin verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente.

Für die Untereinheit CSN5 wurde bei 1 h MMC-Behandlung der Anstieg nicht bestätigt. Bei 4 h MMC-Behandlung wurde ein relativer Konzentrationsanstieg der Untereinheit CSN5 detektiert, mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$ für die Konzentration $50 \mu\text{M}$ MMC im Vergleich zur Negativkontrolle. In den übrigen Konzentrationen wurde ein Trend nachgewiesen. Für die Untereinheiten CSN1 und CSN8 wurde ebenfalls eine Tendenz des Anstiegs beobachtet, der nicht statistisch signifikant ist. Somit wurde bei der vierstündigen MMC-Behandlung der HT29-Zellen zunächst von einem Trend des Anstiegs der CSN-Untereinheiten ausgegangen.

Um den konzentrationsabhängigen Anstieg der CSN-Untereinheiten genauer zu erfassen, wurde eine weitere Versuchsreihe zu den oben beschriebenen HIPEC-äquivalenten Bedingungen mit einer feineren Konzentrationseinstellung gewählt (Abb.12).

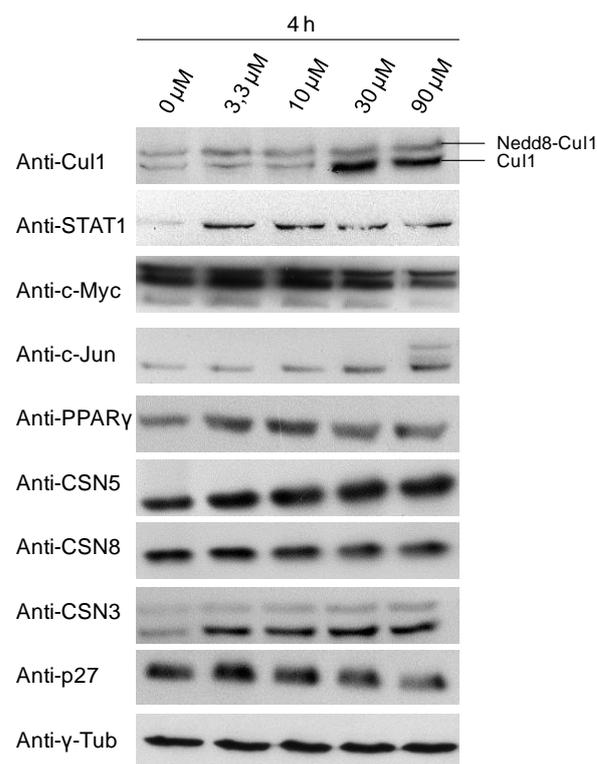


Abb.12. Der Einfluss von MMC auf das CSN und seine Interaktionspartner ist konzentrationsabhängig

Inkubation von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC, erwärmt in Medium auf 42°C , für 4 h. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine entsprechend ihrer Ladung in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. γ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Für die Untereinheiten CSN3, CSN5 und CSN8 bestätigte sich ein Anstieg der Expression in Abhängigkeit der MMC-Konzentration. Außerdem zeigte CSN3 wieder

eine doppelte Bande, die Zeichen einer Phosphorylierung sein kann. Um zu detektieren, inwieweit sich die Deneddylierungsfunktion des CSN unter MMC-Behandlung verändert, wurde ein Antikörper gegen Cul1 getestet. Dabei wurde bei einer Konzentration von 30 μM und 90 μM MMC ein Anstieg von deneddyliertem Cul1 nachgewiesen. Zusätzlich wurde der peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) untersucht, der bei der Unterdrückung von Metastasenwachstum bei Kolontumoren eine Rolle spielt (Sasaki et al, 2006). In Abhängigkeit der MMC-Konzentration zeigte sich für PPAR γ ein leichter Anstieg in der Protein steady-state-Konzentration.

Es stellte sich die Frage, inwieweit die bisher beobachteten Veränderungen zeitabhängig sind. Dazu wurden HT29-Zellen für 24 h bei sonst gleichen Bedingungen wie in den vorherigen Experimenten, behandelt (Abb.13). Dabei wurde für die Untereinheit CSN5 bei 3,3 μM MMC ein leichter Konzentrationsanstieg im Vergleich zur Negativkontrolle detektiert. CSN8 wies keine Veränderungen auf. Die Transkriptionsfaktoren c-Myc und STAT1 wurden in Abhängigkeit der MMC-Konzentration nach 24 h Inkubation abgebaut. Cul3 zeigte bei 90 μM einen Anstieg der deneddylierten Bande, vermutlich hervorgerufen durch die CSN-vermittelte Spaltung des Nedd8 vom Cul3. Insgesamt ist nach 24 h bei hohen MMC-Konzentrationen von Apoptose auszugehen.

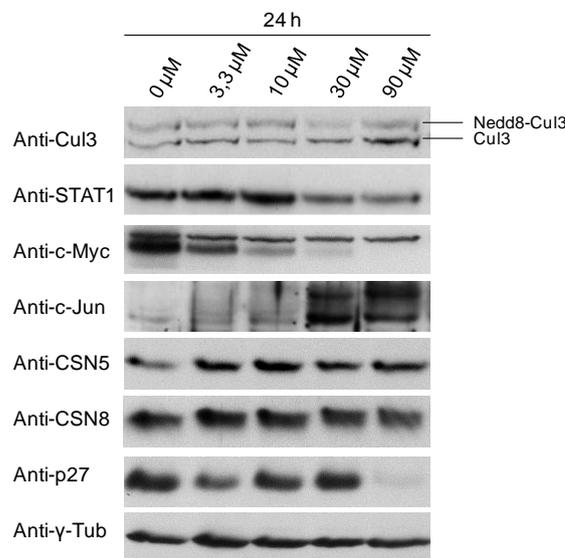


Abb.13. Untersuchung des Einflusses von MMC auf das CSN und CSN-interagierende Proteine in Abhängigkeit zur Zeit

Inkubation von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 24 h. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine entsprechend ihrer Ladung in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. γ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Phänomene zellzyklusabhängig sind, wurden HT29-Zellen mittels Behandlung durch serumfreies Medium synchronisiert und anschließend zu den oben genannten Bedingungen mit MMC behandelt (*Abb. 14*). In den CSN-Untereinheiten wurde ähnlich wie in den bisherigen Ergebnissen ein leichter Anstieg nachgewiesen. Der Zellzyklusregulator p27 zeigte bei 1 h Inkubation einen deutlichen Anstieg in der Proteinkonzentration.

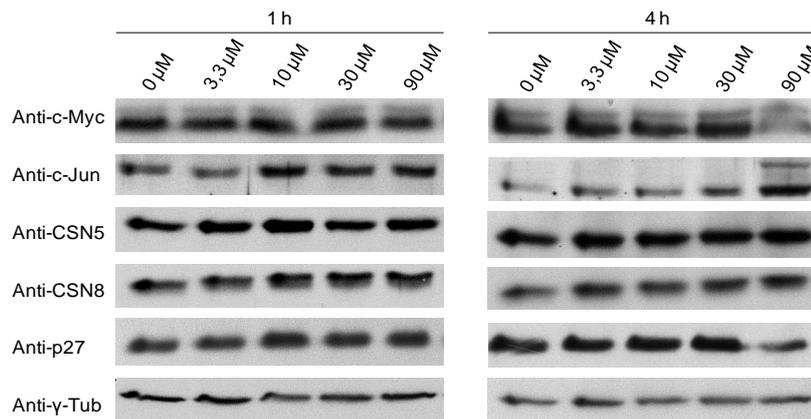


Abb.14. Untersuchung des Einflusses von MMC auf das CSN und CSN-interagierende Proteine in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Inkubation von synchronisierten HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h und 4 h. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine entsprechend ihrer Ladung in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. γ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

4.1.2 Analyse der MMC-Wirkung in Zellen mit geringem CSN

Um eine Beteiligung des CSN an der HIPEC genauer zu erfassen, wurden siCSN5- und siGFP-HeLa-Zellen für 1 h und 4 h zu HIPEC-äquivalenten Bedingungen mit MMC behandelt und die CSN-Untereinheiten und andere regulatorisch wirksame Proteine mittels Western Blot mit den angezeigten Antikörpern analysiert (*Abb. 15*).

siCSN5-HeLa-Zellen haben im Gegensatz zu den GFP-Kontrollzellen einen stabilen Knockdown der CSN-Untereinheit 5, was bei Betrachtung des CSN5-Antikörpers deutlich zu sehen war. Wie zu erwarten, wurde in den siCSN5-Zellen für Cul1 keine deneddylierte Bande im Vergleich zu den siGFP-Zellen nachgewiesen, wohingegen sich in den Kontrollzellen die Deneddylierung des Cul1 bei MMC-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigte. Bei 4 h Inkubation wurde c-Jun sowohl in den siCSN5-, als auch in den siGFP-Zellen, unter MMC-Behandlung phosphoryliert, bei einer 1 h Inkubation war keine Phosphorylierung zu beobachten.

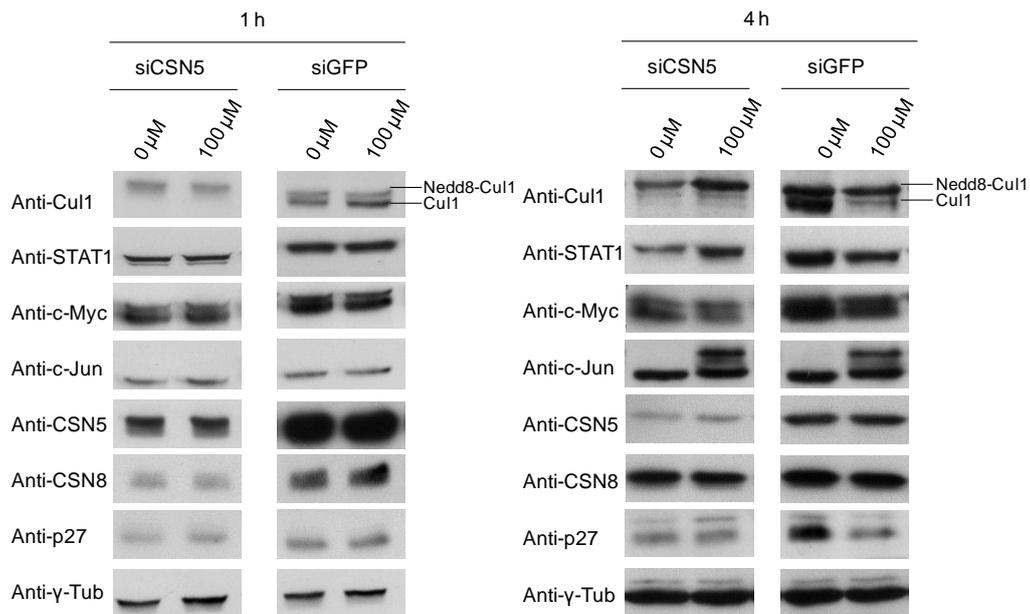


Abb.15. Analyse der MMC-Wirkung in siCSN5-Zellen

Inkubation von siCSN5/siGFP-Zellen mit 100 μM MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h und 4 h. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine entsprechend ihrer Ladung in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. γ-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

4.1.3 Analyse der CDDP-Wirkung auf das CSN

Um zu untersuchen, ob CDDP ebenfalls einen Anstieg der CSN-Untereinheiten auslösen könnte, wurden HT29-Zellen für 1 h und 4 h zu HIPEC-äquivalenten Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen CDDP behandelt und die CSN-Untereinheiten und andere regulatorisch wirksame Proteine mittels Western Blot mit den angezeigten Antikörpern analysiert (Abb. 16).

Bei der vierstündigen Inkubation zeigte sich bei einer CDDP-Konzentration von 200 μM in der Ladekontrolle γ-Tubulin und in den anderen Proteinen eine verminderte Konzentration, was an bereits stattgefundenen Apoptose liegen kann. Die CSN-Untereinheiten wiesen keine Veränderungen in der Protein-steady-state Konzentration auf. Für CSN3 und CSN1 ließ sich eine doppelte Bande nachweisen, was Hinweis auf eine Phosphorylierung sein kann. Das Tumorsuppressorprotein p53 und der Zellzyklusregulator p27 zeigten ähnlich wie bei der MMC-Inkubation für 1 h einen leichten Konzentrationsanstieg und verhielten sich bei 4 h stabil. Die Transkriptionsfaktoren c-Myc und c-Jun wurden phosphoryliert; c-Jun in Abhängigkeit von der CDDP-Konzentration, c-Myc permanent. Cul4 und der Transkriptionsfaktor STAT1 zeigten keine Veränderung.

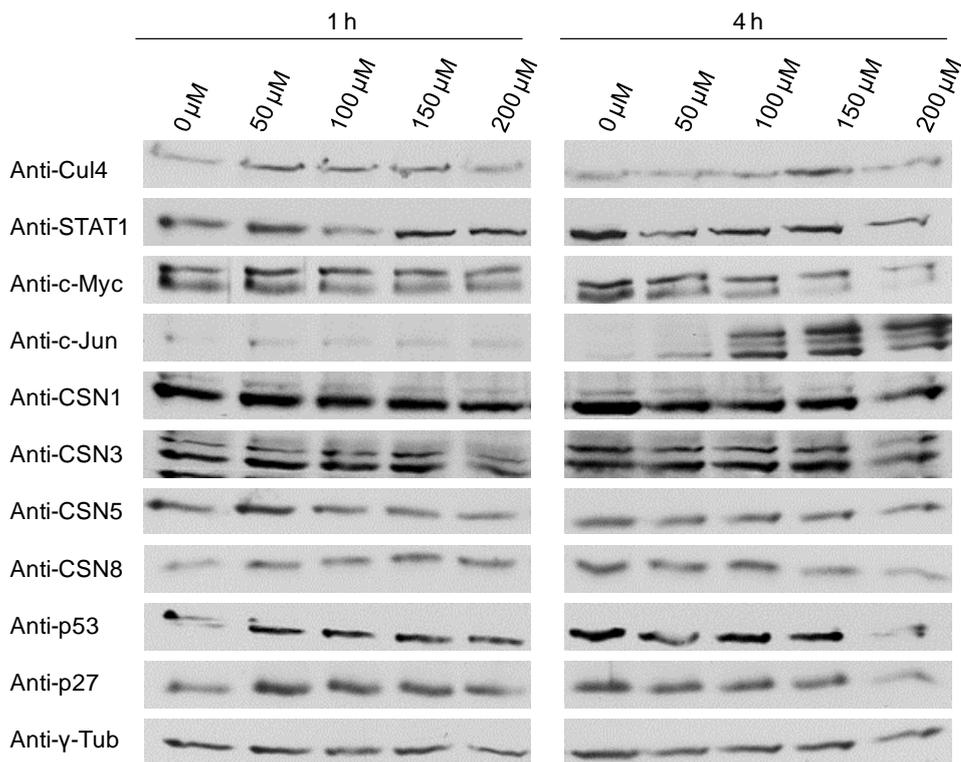


Abb.16. Analyse des Einflusses von CDDP auf das CSN und CSN-interagierende Proteine

Inkubation von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen CDDP, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h und 4 h. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine entsprechend ihrer Ladung in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. γ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Nachdem im Gegensatz zu CDDP bei der Inkubation mit MMC ein Anstieg der CSN-Untereinheiten nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, wie es sich mit dem CSN bei der Kombination der beiden Chemotherapeutika verhalten würde (*Abb. 17*).

Dazu wurden HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC in Kombination mit 150 μ M CDDP zu den oben genannten HIPEC-äquivalenten Bedingungen behandelt. Auch unter Verwendung von MMC mit CDDP wurde für die CSN-Untereinheiten keine Veränderung in der Proteinkonzentration nachgewiesen, sodass der unter MMC-Inkubation beobachtete Effekt des Anstiegs der CSN-Untereinheiten durch CDDP gehemmt sein könnte. Für CSN1 ließ sich auch hier eine zweite Bande detektieren, die Zeichen einer Phosphorylierung sein kann. Das Tumorsuppressorprotein p53 zeigte bei 1 h Inkubation einen leichten Konzentrationsanstieg und verhielt sich bei 4 h stabil. Für den Zellzyklusregulator p27 wurde ein konstantes Proteinlevel nachgewiesen. c-Myc erschien permanent phosphoryliert, für c-Jun wurde bei 1 h in Abhängigkeit der Chemotherapeutika-

konzentrationen eine verstärkte Phosphorylierung detektiert. Für Cul4 und den Transkriptionsfaktor STAT1 ließ sich keine Veränderung nachweisen.

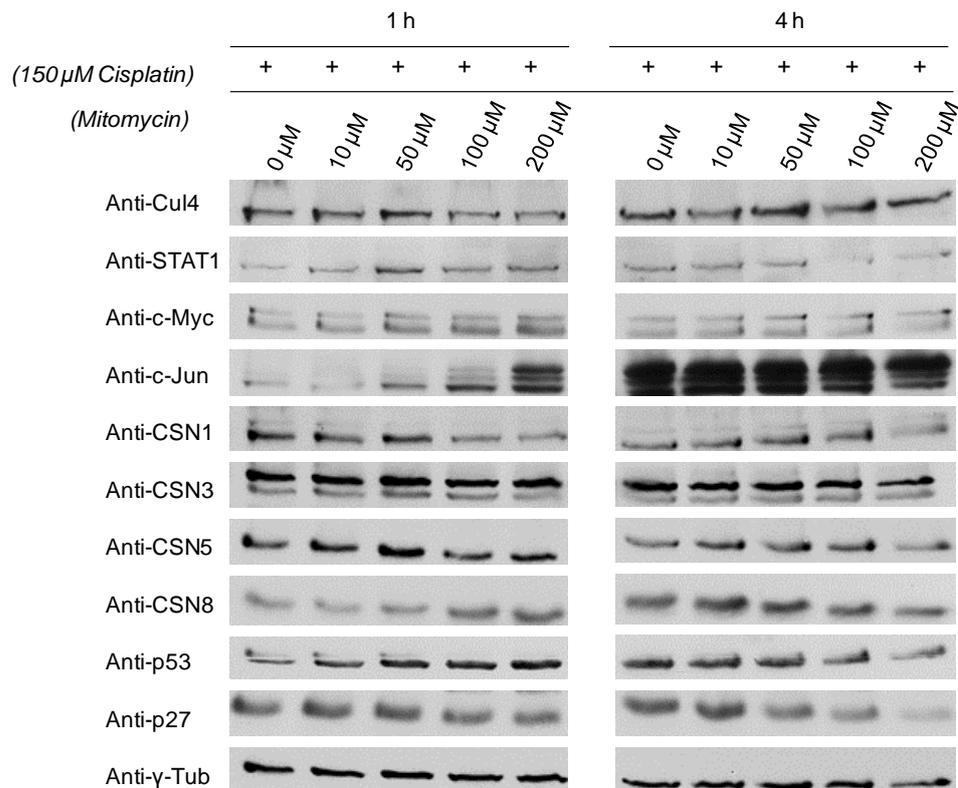


Abb.17. Analyse des Einflusses von MMC in Kombination mit CDDP auf das CSN und CSN-interagierende Proteine

Inkubation von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC in Kombination mit 150 μM Cisplatin, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h und 4 h. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine entsprechend ihrer Ladung in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. γ-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

4.2 Etablierung von Caspase-3 als quantitativer Marker für Apoptose in HT29-Zellen

Zur Quantifizierung der Apoptoserate nach MMC-Behandlung sollte ein ELISA verwendet werden, der aktive Caspase-3 detektiert. Caspase-3 steht am Ende des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalwegs und ist deshalb ein geeigneter Marker zur Messung von Apoptose (Cohen, 1997; Reed, 2000).

HT29-Zellen wurden wie bisher zu HIPEC-äquivalenten Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC für 1 h und 4 h behandelt, die Zellen lysiert und mittels ELISA die aktivierte Caspase-3 Konzentration analysiert (Abb. 18).

Bei 1 h Inkubation zeigte sich keine Veränderung in der relativen Caspasekonzentration. Bei 4 h Inkubation stieg in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration die Caspaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant an.

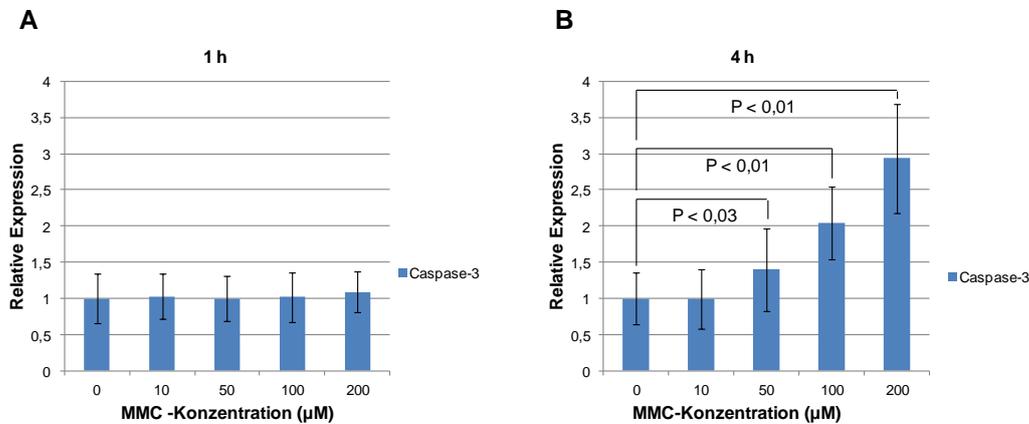


Abb.18. Caspase-3 als Marker für Apoptose in HT29-Zellen

Behandlung von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h (A) und 4 h (B). Die Zellen wurden lysiert und ein ELISA gegen aktivierte Caspase-3 verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 (A), 5 (B) unabhängige Experimente.

In den unter Abb.18 gezeigten Ergebnissen, konnte nach 1 h keine Veränderung in der aktivierten Caspase beobachtet werden. Um eine mögliche verzögerte Reaktion der Caspase-3 nachzuweisen, wurde eine zusätzliche Versuchsreihe durchgeführt.

Dabei wurden nach 1 h MMC-Behandlung die Lyse wie bisher nicht sofort, sondern erst nach 3 h durchgeführt. Die Zellen wurden solange in Vollmedium im Inkubator belassen (Abb. 19).

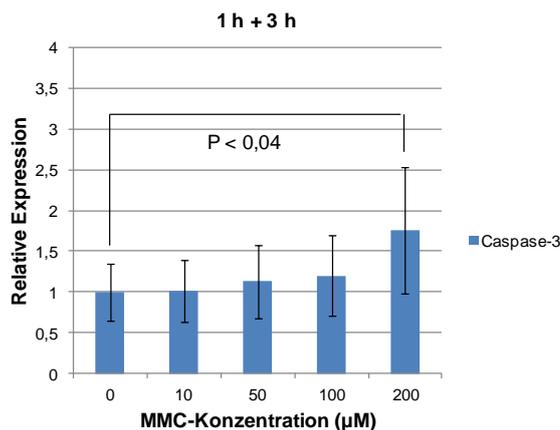


Abb.19. Nachweis einer verzögerten Apoptosereaktion nach 1 h MMC-Behandlung

Inkubation von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h und anschließendem Mediumwechsel. Nach 3 h wurden die Zellen lysiert und die Konzentration der aktivierten Caspase-3 mittels ELISA analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente.

Unter diesen Bedingungen wurde für die Konzentration 200 μM MMC ein statistisch signifikanter Anstieg der Caspase-3 im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen.

4.3 Curcumin potenziert die MMC-Wirkung

Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy 3-methoxy phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) ist ein Polyphenol aus der Wurzel *Curcuma longa* Linn. Antiproliferative, antikarzinogene (Aggarwal et al, 2007; Ravindran et al, 2009) und nephroprotektive Eigenschaften (Zhou et al, 2011) sind beschrieben und machen Curcumin zu einem vielversprechenden Wirkstoff für die Anwendung in der HIPEC, was im Zellkulturmodell genauer untersucht werden sollte.

Dazu wurden die HT29-Zellen zu HIPEC-äquivalenten Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC allein und in Kombination mit 50 μM Curcumin behandelt und der unter 4.2 beschriebene Caspase-3 Elisa verwendet (Abb.20). Bei 1 h Inkubation zeigte sich keine Veränderung in der relativen Caspasekonzentration. Nach 4 h Behandlung stieg in Abhängigkeit der MMC-Konzentration die Caspaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant an.

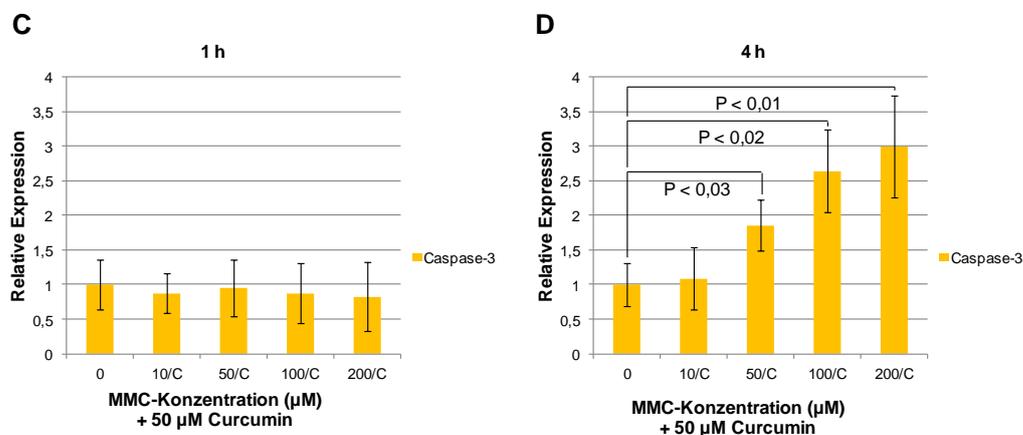


Abb.20. Untersuchung der Apoptoserate nach Behandlung von HT29-Zellen mit MMC in Kombination mit Curcumin

Behandlung von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC in Kombination mit Curcumin, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h (C) und 4 h (D). Die Zellen wurden lysiert und ein ELISA gegen aktivierte Caspase-3 verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 (C), 4 (D) unabhängige Experimente.

Um den Unterschied der Ergebnisse zwischen MMC und der kombinierten Anwendung genauer zu erfassen, wurden in einer neuen Versuchsreihe für 4 h die Konzentrationen 0/50/100 μM MMC alleine und in Kombination mit 50 μM Curcumin bei sonst gleichen

Bedingungen wie im vorherigen Versuch getestet. Es konnte eine signifikante Erhöhung der aktivierten Caspase-3 in der Kombination mit 50 μ M Curcumin im Vergleich zu MMC allein nachgewiesen werden (Abb.21).

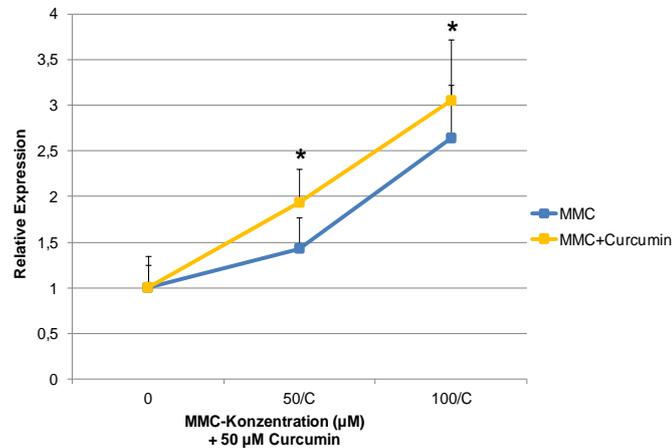


Abb.21. Curcumin potenziert die MMC-Wirkung

Behandlung von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC in Kombination mit Curcumin, erwärmt in Medium auf 42°C, für 4 h. Die Zellen wurden lysiert und ein ELISA gegen aktivierte Caspase-3 verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. (*)P < 0,01

Inwieweit das CSN von der Kombination MMC mit Curcumin beeinflusst wird, sollte mittels Western Blot untersucht werden (Abb.22). Da Curcumin als Inhibitor CSN-assoziiierter Kinasen identifiziert werden konnte (Henke et al. 1999), stellte sich die Frage, ob es möglich wäre, den durch MMC induzierten Anstieg der CSN-Untereinheiten durch Curcumin zu verhindern.

Dazu wurden HT29-Zellen zu HIPEC-äquivalenten Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC allein und in Kombination mit 50 μ M Curcumin inkubiert. Anschließend wurden die CSN-Untereinheiten mittels Western Blot analysiert. Bei der Inkubation von 4 h zeigte sich bei einer MMC-Konzentration von 200 μ M in der Ladekontrolle γ -Tubulin und in den anderen Proteinen eine verminderte Konzentration, was an bereits stattgefundenen Apoptose liegen könnte. Die CSN-Untereinheiten CSN5 und CSN8 zeigten in Abhängigkeit der MMC-Konzentration bei 1 h einen Konzentrationsanstieg, nach 4 h Inkubation war keine Veränderung erkennbar. Für CSN3 ließ sich unabhängig vom Konzentrations- und Zeitfaktor eine doppelte Bande nachweisen. Für die Transkriptionsfaktoren c-Myc und c-Jun konnte eine Phosphorylierung detektiert werden. c-Jun wurde bei 1 h Inkubation ab einer MMC-Konzentration von 100 μ M phosphoryliert, bei 4 h zeigte sich die Phosphorylierung

permanent. Die Phosphorylierung des c-Myc Proteins erschien unabhängig von der MMC-Konzentration. Das Tumorsuppressorprotein p53 und der Zellzyklusregulator p27 zeigten bei 1 h Inkubation einen leichten Konzentrationsanstieg und verhielten sich bei 4 h stabil. Für den Transkriptionsfaktor STAT1 fiel bei 1 h MMC-Behandlung ein Anstieg in Abhängigkeit zur MMC-Konzentration auf. Außerdem wurde ein Antikörper gegen Caspase-3 im Western Blot getestet. Hierbei wurde in der Konzentration der ungespaltenen Caspase keine Veränderung nachgewiesen, die gesplattene Form ließ sich nicht darstellen. Es kann angenommen werden, dass die Caspase-Konzentration insgesamt stabil bleibt, sich aber ihre Aktivität ändert. Für Cul4 konnte keine Veränderung beobachtet werden.

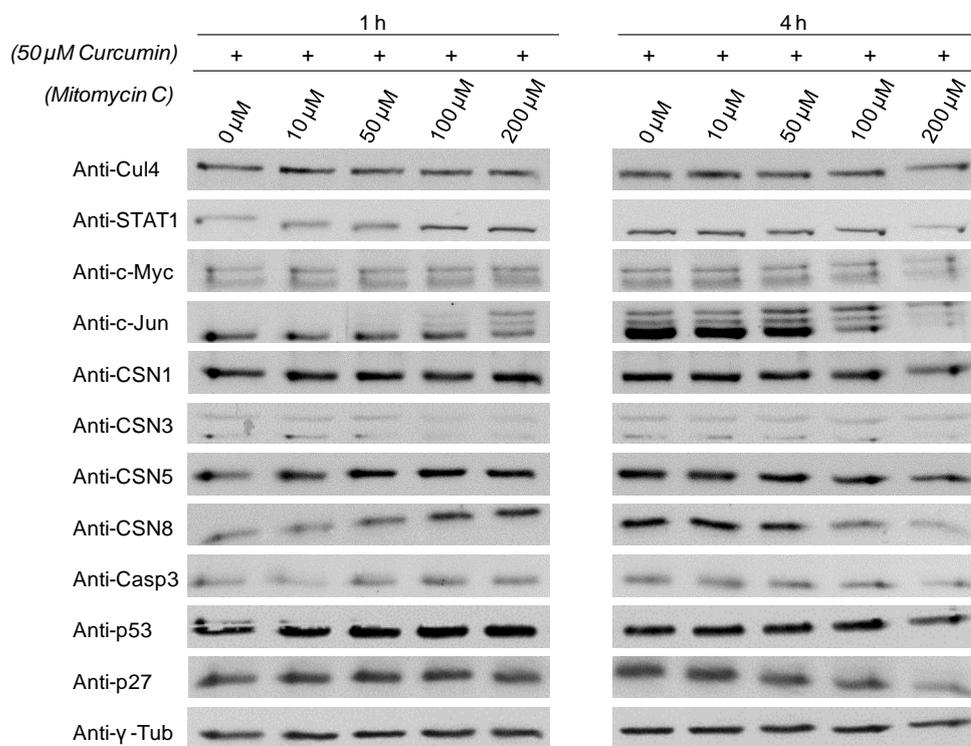


Abb.22. Analyse des Einflusses von MMC in Kombination mit Curcumin auf das CSN und CSN-interagierende Proteine

Inkubation von HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC in Kombination mit 50 μM Curcumin, erwärmt in Medium auf 42°C, für 1 h und 4 h. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

4.4 miRNA let-7 beeinflusst die MMC-Wirkung

Um eine mögliche Beteiligung des CSN an der durch MMC ausgelösten DNA-Reparatur zu verhindern, sollte die Wirkung von miRNAs der let-7 Familie, zur Blockade der CSN-Untereinheiten, in Kombination mit MMC analysiert werden.

Zunächst wurde der Einfluss von miRNA let-7a-1 auf das CSN und Proteine des c-Myc/Lin28B/let-7a-1-Signalwegs in HT29-Zellen ohne MMC-Behandlung untersucht. Dazu wurden HT29-Zellen mit miRNA let-7a-1 Inhibitor und miRNA let-7a-1 Mimic transfiziert und die CSN-Untereinheiten nach 24 h mittels Western Blot analysiert (Abb.23). miRNA let-7a-1 Mimics wirken ähnlich wie endogene miRNAs und blockieren die CSN-Expression. In den durchgeführten Experimenten konnte in den CSN-Untereinheiten CSN5 und CSN8 keine Veränderung nachgewiesen werden. Allerdings zeigte der Transkriptionsfaktor STAT1 eine vermehrte Expression bei der Transfektion mit miRNA-let-7a-1 Inhibitor im Vergleich zur Negativkontrolle. Das kann Zeichen für eine positive CSN-Rückkopplung sein.

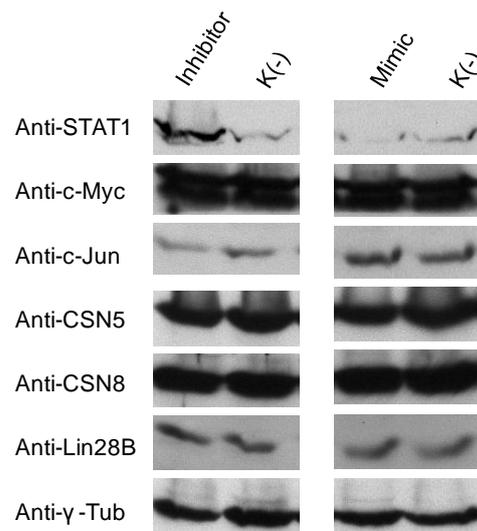


Abb.23. Untersuchung des Einflusses von miRNA let-7a-1 auf das CSN und Proteine des c-Myc/LIN28B/let-7-Signalwegs in HT29-Zellen

HT29-Zellen wurden mit let-7a-1 Inhibitor und Mimic transfiziert. Nach 4 h und 24 h fand ein Mediumwechsel statt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Auch wenn zunächst eine direkte Veränderung der CSN-Expression nach Transfektion mit miRNA let-7a-1 Inhibitor und Mimic in HT29-Zellen im Western Blot nicht detektiert werden konnte, bestand die Überlegung, ob mittels let-7a-1 miRNA Mimic die CSN-

Expression blockiert werden und vielleicht der sonst beobachtete Anstieg der CSN-Untereinheiten nach MMC-Inkubation verhindert werden könnte.

Dafür wurden HT29-Zellen nach Transfektion mit miRNA let-7a-1 Mimic zu HIPEC-äquivalenten Bedingungen mit 50 μ M MMC für 4 h inkubiert und mittels Western Blot die CSN-Untereinheiten analysiert (Abb.24). Es wurden 2 Kontrollen verwendet, eine Negativkontrolle ohne MMC und eine Negativkontrolle mit MMC. Bei der Verwendung von miRNA Mimics mit MMC wurde für die CSN-Untereinheiten CSN1, 5 und 8 eine verminderte Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen. Für c-Myc wurde in allen 3 Proben eine Phosphorylierung detektiert. Für c-Jun war eine Phosphorylierung nur unter MMC-Behandlung erkennbar. Der Transkriptionsfaktor STAT1 zeigte unter Transfektion mit Mimics und MMC-Behandlung eine verminderte Expression im Vergleich zur Negativkontrolle. Insgesamt fiel auf, dass bei der Kombination mit Mimics und MMC auch die Expression der Ladekontrolle γ -Tubulin verringert erschien, was Zeichen für bereits stattgefundene Apoptose sein könnte.

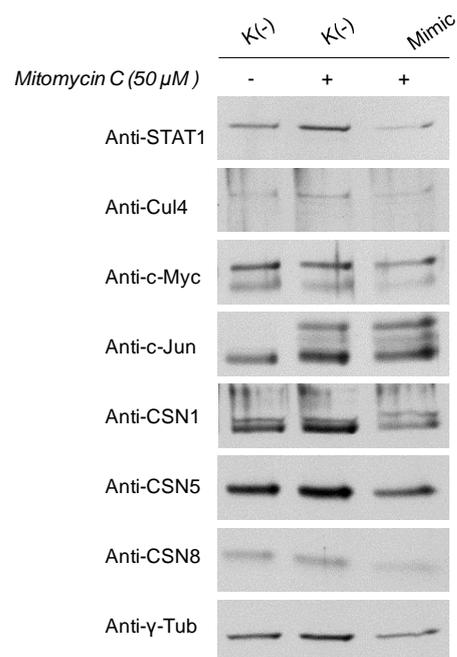


Abb.24. miRNA-let-7a-1 Mimic verhindert den Anstieg der CSN-Untereinheiten

HT29-Zellen wurden mit let-7a-1 Mimic transfiziert. Nach 4 h fand ein Mediumwechsel statt. Nach 24 h wurden die Zellen mit 50 μ M MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Die Konzentrationsveränderung der CSN-Untereinheiten wurde mittels Densitometrie analysiert (Abb.25). Für CSN1, CSN5 und CSN8 wurde eine statistisch signifikante Verminderung der Expression nachgewiesen.

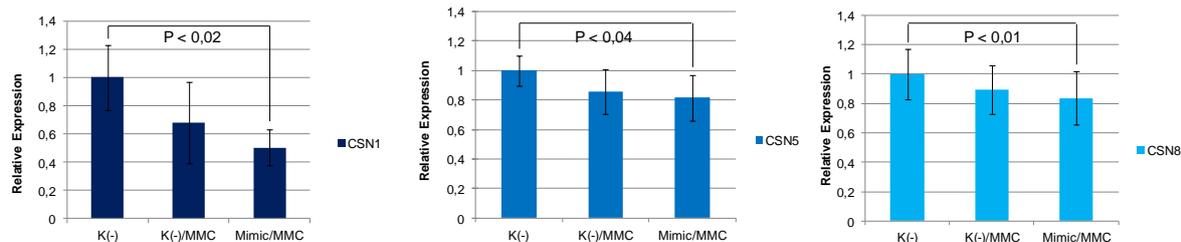


Abb.25. Densitometrische Analyse der CSN-Expression nach Transfektion mit miRNA-let-7a-1 und MMC-Behandlung

HT29-Zellen wurden mit let-7a-1 Mimic transfiziert. Nach 4 h fand ein Mediumwechsel statt. Nach 24 h wurden die Zellen mit 50 μ M MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. Der Expression der CSN-Untereinheiten wurde densitometrisch mittels ImageJ Software quantifiziert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Da durch die Anwendung von miRNA let-7a-1 Mimic der Anstieg der CSN-Untereinheiten unter MMC verhindert werden konnte, stellte sich unweigerlich die Frage, wie es sich mit dem Zellzyklusregulator p27 und dem Tumorsuppressorprotein p53 als wichtige DNA-Reparatur-Effektoren verhält. In einer weiteren Versuchsreihe wurde nach Transfektion mit miRNA let-7a-1 Mimic und MMC-Behandlung neben den CSN-Untereinheiten auch p27 und p53 detektiert (Abb.26). In den mit miRNA let-7a-1 Mimic transfizierten Zellen wurde unter MMC eine verstärkte Expression von p27 und p53 im Vergleich zur Negativ Kontrolle beobachtet.

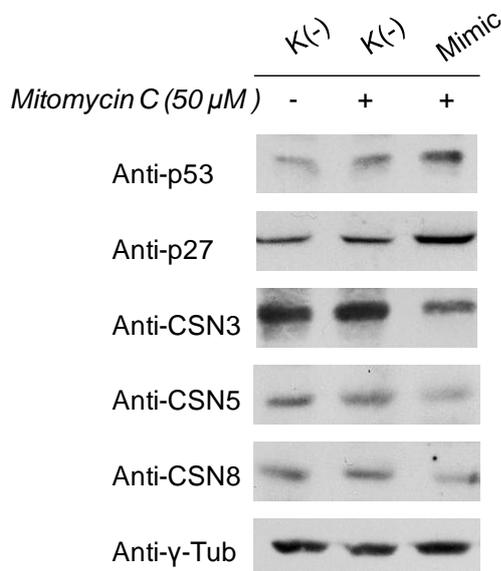


Abb.26. miRNA-let-7a-1 Mimic induziert den Anstieg der pro-apoptotischen Proteine p27 und p53

HT29-Zellen wurden mit let-7a-1 Mimic transfiziert. Nach 4 h fand ein Mediumwechsel statt. Nach 24 h wurden die Zellen mit 50 μ M MMC, erwärmt in Medium auf 42°C, für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression im Western Blot analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

5 DISKUSSION

5.1 Molekularbiologische Untersuchung der HIPEC

Die in der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Rolle des CSN bei der HIPEC sollen im Folgenden erläutert werden, sowie die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Klinik.

5.1.1 In-vitro-HIPEC-Zellkultur-Modell

Für das HIPEC-Zellkultur-Modell wurden die Bedingungen entsprechend den in der Klinik verwendeten HIPEC-Protokollen gewählt (*Abb.3*). Das Modell, bestehend aus HT29-Kolontumorzellen, die für 1 h und 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC und CDDP, erwärmt in Medium auf 42°C, behandelt werden, bietet optimale Bedingungen, um grundlegende Untersuchungen zur HIPEC durchzuführen. In der Literatur sind ähnliche Modelle beschrieben (Pelz et al, 2013).

5.1.2 Die Rolle des CSN bei der HIPEC

Der Anstieg der CSN-Untereinheiten als Zeichen für DNA-Reparatur

Erstes Indiz für die Hypothese, das CSN spiele eine Rolle bei der durch die HIPEC ausgelösten DNA-Reparatur, lieferte der Anstieg der CSN-Untereinheiten nach MMC-Inkubation. Dieser Effekt zeigte sich bei 1 h und 4 h Inkubation in Abhängigkeit von der verwendeten MMC-Konzentration. Je höher die MMC-Konzentration, desto stärker war die CSN-Expression mittels Western Blot erkennbar (*Abb.10/12*). Unter CDDP war dieser Effekt nicht zu beobachten (*Abb.16*). Bei der Quantifizierung konnte bei vierstündiger Inkubation für CSN5 ein signifikanter Anstieg bei einer MMC-Konzentration von 50 µM analysiert werden (*Abb.11 B*). Für die Untereinheiten CSN1 und CSN8 konnte bei 4 h Inkubation eine Tendenz bestätigt werden (*Abb.11 C/D*).

Weshalb für CSN5 der Anstieg nach MMC-Inkubation am deutlichsten zu sehen war, kann folgendermaßen erklärt werden: Neben dem CSN Komplex, bestehend aus den Untereinheiten CSN1-CSN8, bilden die Untereinheiten unterschiedliche Subkomplexe („mini-CSNs“) oder können als Monomer vorliegen. CSN4-7 bilden einen Subkomplex, der als Mini-CSN beschrieben ist. CSN5 ist Teil des Holo-CSN, des Mini-CSN und kann aber auch in freier Form vorliegen (Sharon et al, 2009; Tomoda et al, 2002; Wei et al, 2008). Außerdem ist bekannt, dass CSN5 unabhängig vom Komplex reguliert wird. Die Reduktion von CSN5 ist nicht verbunden mit einer verminderten Expression der

anderen Untereinheiten (Peth et al, 2007). Dass CSN5 einzeln vorliegen kann und unabhängig vom Gesamtkomplex reguliert wird, könnte erklären weshalb für CSN5 der Anstieg nach MMC-Inkubation am deutlichsten zu sehen war. Insgesamt kann von einem Trend im Anstieg der Untereinheiten nach MMC-Behandlung ausgegangen werden, der ein Hinweis auf vermehrte CSN-Aktivität und Interaktion mit anderen Proteinen ist (Abb.27).

Die Phosphorylierung der CSN-Untereinheiten als Zeichen für DNA-Reparatur

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des CSN an der DNA-Reparatur ist die Phosphorylierung des CSN. Im Rahmen von DNA-Reparaturprozessen werden die CSN-Untereinheiten CSN1, CSN3 und CSN7 phosphoryliert (Matsuoka et al, 2007).

Bei der Inkubation der HT29-Zellen mit MMC für 1 h und 4 h wurde eine Phosphorylierung für CSN3 nachgewiesen (Abb.10/12). Unter CDDP-Behandlung erschien CSN1 und CSN3 phosphoryliert (Abb.16). Zwischen den Inkubationszeiten 1 h und 4 h gab es bezüglich der Phosphorylierung keinen Unterschied. Allerdings ist die Phosphorylierung bereits in der Negativkontrolle ohne Chemotherapeutikum erkennbar. Die Negativkontrolle wurde nur mit Medium inkubiert, ebenfalls bei einer Temperatur von 42°C. Möglicherweise wird die Phosphorylierung des CSN nicht nur durch MMC und CDDP, sondern auch durch die verwendete Hyperthermie hervorgerufen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Hyperthermie als konstante Versuchsbedingung verwendet, da hier nicht der Unterschied zwischen hyperthermer und normothermer Chemotherapie untersucht werden sollte. Eine bessere zytotoxische Wirkung unter Hyperthermie wurde bereits in experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen (González-Moreno et al, 2010; Hildebrandt & Wust, 2007).

Unter den Bedingungen der HIPEC, Hyperthermie mit Chemotherapeutikum, kann die Phosphorylierung des CSN als Folge der DNA-Reparatur bzw. als Indiz für eine Beteiligung an der DNA-Reparatur angenommen werden (Abb.27).

Mögliche Konsequenzen der verstärkten Expression von CSN-Untereinheiten

Die Metalloproteaseaktivität der Untereinheit CSN5 ist für die hydrolytische Abspaltung des Ub-ähnlichen Proteins Nedd8 von Cullinen verantwortlich und inaktiviert dadurch CRLs, was Proteine vor dem Abbau durch das UPS stabilisiert (Lyapina et al, 2001). Darüber hinaus kann eine Inaktivierung von CRLs zum Umbau der CRLs führen, was die Anpassung an veränderte Substratspezifität ermöglicht (Schmaler & Dubiel, 2010).

Die Erhöhung der CSN-Konzentration hat eine Erhöhung der CSN-vermittelten Deneddylaseaktivität zur Folge.

Nach MMC-Behandlung der HT29-Zellen wurde eine verstärkte Deneddylierung von Cul1 mittels Western Blot detektiert (*Abb.12*). Je höher die MMC-Konzentration war, desto stärker war die Bande für deneddyliertes Cul1 im Vergleich zum neddylierten Cul1. Wenn Cul1 deneddyliert ist, kann kein Ub-Transfer stattfinden, Proteine können also nicht für den Abbau durch das Proteasom mittels Ub markiert werden, sondern sind stabilisiert. Dies gilt auch für Effektoren der DNA-Reparatur. Somit kann der Prozess der Protein stabilisierung Zeichen für verstärkte DNA-Reparatur sein (*Abb.27*).

Neben der Interaktion mit Cul1 bildet das CSN Komplexe mit Cul4-Ligasen, die eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Chromatininformation spielen (Hong et al, 2005; Jia et al, 2005). Die CRL4 Ddb2 Ubiquitin Ligase ist im Komplex mit dem CSN inaktiviert. Nach UV-Strahlung konnte eine Aktivierung durch die Ablösung des CSN vom Komplex und darauf folgende Neddylierung beobachtet werden (Groisman et al, 2003). Ähnlich den Ergebnissen unter UV-Strahlung wäre eine Neddylierung des Cul4 unter MMC oder CDDP zu erwarten gewesen. Bei Behandlung der HT29-Zellen mit MMC oder CDDP konnte im Western Blot für Cul4 keine Veränderung detektiert werden. Die genaue Kenntnis über die Interaktion zwischen dem CSN und Cul4 könnte helfen, die Rolle des CSN bei der DNA-Reparatur noch besser zu verstehen und sollte in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden.

Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun

Es ist bekannt, dass CSN-assoziierte Kinasen den Transkriptionsfaktor c-Jun phosphorylieren (Seeger et al, 1998). Neben der Phosphorylierung durch das CSN wird c-Jun durch die Proteinkinase c-Jun NH₂-Terminal Kinase (JNK) phosphoryliert (Dérijard et al, 1994). Ist das Protoonkogen c-Jun phosphoryliert, kann es über Aktivierung des activator protein-1 (AP-1) Signalwegs VEGF induzieren. Es kommt zur Angiogenese und das Wachstum solider Tumore und Metastasen wird begünstigt (Naumann et al, 1999; Pollmann et al, 2001).

Eine Phosphorylierung von c-Jun konnte sowohl bei MMC-, als auch bei CDDP-Inkubation in Abhängigkeit zur Konzentration beobachtet werden (*Abb.10/16*). Je höher die verwendete Konzentration des Chemotherapeutikums, desto stärker erschien die

Phosphorylierung. Dieser Effekt schien zeitabhängig zu sein, da bei 4 h die Phosphorylierung von c-Jun schon unter geringerer Konzentration zu sehen war. Es ist anzunehmen, dass in der durch die Chemotherapeutika ausgelöste Stresssituation die Proteinkinase JNK aktiviert wird, die die Phosphorylierung des c-Jun Proteins veranlasst. Gleichzeitig sorgt die CSN-vermittelte Phosphorylierung von c-Jun für eine Stabilisierung vor dem Abbau durch das UPS (Uhle et al, 2003). Die CSN-vermittelte Stabilisierung kann durch den Anstieg der CSN-Untereinheiten unter MMC noch verstärkt werden und die durch c-Jun induzierte Angiogenese und Zellproliferation wird begünstigt (*Abb.27*).

Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Myc

Das Onkoprotein c-Myc ist ein wichtiger Regulator von Zellzykluskontrolle, Zellproliferation, maligner Transformation und eine Überexprimierung in Tumorgewebe wurde nachgewiesen (Junttila & Westermarck, 2008).

Bei der Behandlung der HT29-Zellen mit MMC oder CDDP konnte eine Phosphorylierung von c-Myc beobachtet werden (*Abb.10/12/16*). Diese erschien unabhängig von der verwendeten Konzentration des Chemotherapeutikums. Ein Unterschied zwischen 1 h und 4 h Behandlung bestand nicht. Da sich die Phosphorylierung auch schon in der Negativkontrolle ohne Chemotherapeutikum zeigte, ist anzunehmen, dass bereits unter Hyperthermie die Phosphorylierung ausgelöst wird. Das c-Myc Protein enthält am N-Terminus zwei unterschiedliche Phosphorylierungsstellen: Serin 62 und Threonin 58. Die Phosphorylierung an Ser-62 erfolgt durch die extracellular-regulated kinase 1,2 (ERK) und stabilisiert c-Myc (Pulverer et al, 1994). Die Phosphorylierung von T58 wird von der glycogen synthase kinase (GSK-3beta) nach erfolgter S62 Phosphorylierung veranlasst und induziert den Abbau durch das UPS (Gregory et al, 2003; Yeh et al, 2004). c-Myc ist Target der F-Box Proteins Fbw7 enthaltenden CRL (CRL1^{Fbw7}) und wird durch das UPS abgebaut (Welcker et al, 2004). Bei den hier vorliegenden Ergebnissen lässt sich nicht zwischen den einzelnen Phosphorylierungsstellen differenzieren. Somit kann nicht klar unterschieden werden, ob die Phosphorylierung von c-Myc unter MMC die Stabilisierung oder den Abbau zur Folge hat. Vor dem Hintergrund, dass das CSN mit seiner Funktion als Deneddylase, CRLs inaktiviert und eine verstärkte Deneddylierung von Cul1 unter MMC-Behandlung auffiel (*Abb.12*), kann eine Stabilisierung von Proteinen, die durch das UPS abgebaut werden, angenommen werden, so auch von c-Myc (*Abb.27*).

Die Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 und des Zellzyklusinhibitors p27

Bei der Behandlung der HT29-Zellen mit MMC oder CDDP konnte für p53 und p27 in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration bei 1 h ein leichter Anstieg nachgewiesen werden; bei 4 h zeigten sich p53 und p27 auf einem stabilen Niveau (Abb.10/16).

p27 hat eine kurze Halbwertszeit und wird über das UPS abgebaut, vermittelt über CRL1^{Skp2} (Frescas & Pagano, 2008). Es ist anzunehmen, dass die unter MMC beobachtete verstärkte Deneddylierung von Cul1 (Abb.12) zu einer Stabilisierung von p27 vor dem UPS führt. p53 liegt in geringer Konzentration in der Zelle vor und hat eine Halbwertszeit von ca. 20 min (Proctor & Gray, 2008). DNA-Defekte induzieren eine spezifische Phosphorylierung von p53 an Ser15 durch die ATM-Kinase. Die Serin/Threoninkinase Chk2 sorgt für eine Phosphorylierung an Ser20. Beide Phosphorylierungen am N-Terminus des p53-Proteins liegen dicht an der Mdm2-binding Region und verhindern so die Interaktion mit Mdm2 und den damit verbundenen Abbau über das UPS (Appella & Anderson, 2001). Ein für p53 zuständiges E3 ist CRL1^{JFK} (Sun et al, 2011), sodass die unter MMC beobachtete Deneddylierung von Cul1 (Abb.12) ebenfalls zu einer Stabilisierung vor dem UPS führen kann. Neben der Stabilisierung des p53 Proteins im Rahmen von DNA-Defekten kommt es außerdem zu einer verstärkten Translation des Proteins (Emami, 2011). Je nach Ausmaß des DNA-Defekts kann p53 selbst Zellzyklusarrest induzieren, DNA-Reparatur regulieren oder falls sich der Defekt nicht reparieren lässt Apoptose induzieren (Helton & Chen, 2007). Das Tumorsuppressorprotein p53 und der Zellzyklusregulator p27 sind wichtige DNA-Reparatur-Effektoren und bestimmen den Verlauf und die Folgen der DNA-Reparatur. Die hier beobachtete Stabilität in der vierten Stunde ist ein deutliches Zeichen dafür, dass unter MMC/CDDP DNA-Reparaturmechanismen ablaufen.

5.1.3 Die Apoptoserate nach HIPEC

Signifikante Apoptose nach 4 h HIPEC

Bei der Untersuchung des CSN nach 4 h MMC-Behandlung fiel bereits im Western Blot unter der MMC-Konzentration 100 µM und 200 µM eine verminderte Konzentration aller detektierten Proteine, einschließlich der verwendeten Ladekontrolle γ -Tubulin auf (Abb.10). Diese Beobachtung kann Hinweis auf bereits stattgefundenene Apoptose der Tumorzellen sein, was mittels ELISA gegen aktivierte Caspase-3 bestätigt wurde

(Abb.18). Ein signifikanter Anstieg der aktivierten Caspase-3 konnte nach 4 h Inkubation bei einer MMC-Konzentration von 50 μM , 100 μM und 200 μM gemessen werden (Abb.18). Je höher die verwendete MMC-Konzentration, desto stärker war der Anstieg der Caspase-3 messbar. Nach 1 h Inkubation konnte eine Veränderung des Levels an aktivierter Caspase-3 nicht detektiert werden.

Caspase-3 wird mittels hydrolytischer Spaltung zwischen Asp 175 und Ser 176 aktiviert (Nicholson et al, 1995) und ist innerhalb kürzester Zeit verfügbar. So konnte zum Beispiel bei der Behandlung von Jurkat-Zellen mit Staurosporin gezeigt werden, dass die Spaltung des Caspase-3-Proenzym zur aktiven Form innerhalb der ersten Stunde beginnt, innerhalb der folgenden 2 h zunimmt, bei 3 h ein Plateau erreicht und nach 4 h auf einem konstanten Level bleibt (Saunders et al, 2000). In der Klinik wird die HIPEC überwiegend für 60-90 min angewandt (González-Moreno et al, 2010; Turaga et al, 2013), um nach Resektion aller makroskopisch sichtbaren Metastasen möglicherweise verbliebene Mikrometastasen zu zerstören. Was könnte es für die klinische Anwendung bedeuten, wenn bei der Behandlung von HT29-Zellen zu vergleichbaren Bedingungen wie bei der HIPEC nach 1 h keine aktive Caspase-3 detektiert wird? Möglich wäre eine verzögerte Reaktion der Tumorzellen, sodass direkt nach 1 h MMC-Behandlung eine Veränderung der aktivierten Caspase-3 noch nicht messbar ist. Dieser Überlegung wurde in einem modifizierten Versuchsaufbau nachgegangen (Abb.19). Hierbei wurde bei einer MMC-Konzentration von 200 μM ein signifikanter Anstieg der aktivierten Caspase-3 nachgewiesen (Abb.19). Im Vergleich zu 4 h MMC-Inkubation wurde jedoch für niedrigere Konzentrationen keine Veränderung gemessen.

Basierend auf den gewonnenen Daten mittels HIPEC-Zellkulturmodell muss man schlussfolgern, dass in der 1.Stunde der MMC-Behandlung DNA-Reparaturmechanismen ablaufen, die vermutlich eine schnelle Apoptose verhindern. Diese Reparaturmechanismen werden zumindest teilweise durch das CSN vermittelt.

Der zusätzliche Einfluss des Kinase-Hemmstoffs Curcumin auf die Apoptose

Zur Verbesserung der Apoptoserate wurde die Kombination MMC mit Curcumin getestet. Curcumin ist ein Inhibitor CSN-assoziiertes Kinasen (Henke et al, 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Curcumin den Ub- und Proteasom-abhängigen Abbau von c-Jun in Tumorzellen induziert (Pollmann et al, 2001). Darüber hinaus kann die Anwendung von Curcumin das Tumorsuppressorprotein p53 vor einem Abbau durch

das UPS stabilisieren und Apoptose in Tumorzellen induzieren (Bech-Otschir et al, 2001).

Bei 4 h Inkubation der HT29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC und 50 μ M Curcumin konnte ein signifikanter Anstieg der aktivierten Caspase-3 mittels ELISA nachgewiesen werden. Je höher die verwendete MMC-Konzentration, desto stärker war der Anstieg der aktivierten Caspase erkennbar (*Abb.20/21*). Bei 1 h Inkubation konnte keine Veränderung der Caspaseaktivität nachgewiesen werden (*Abb.20*). Neben der Verbesserung der Apoptoserate könnte durch Curcumin gleichzeitig die restriktive Wirkung des CSN bei der HIPEC beeinflusst werden. Bei 4 h Inkubation der HT29-Zellen mit MMC in Kombination mit Curcumin blieb der sonst unter MMC beobachtete Anstieg der CSN-Untereinheiten aus (*Abb.22*).

5.1.4 Die Rolle von miRNAs bei der MMC-Wirkung

Bei der Untersuchung des CSN nach MMC-Inkubation konnte ein Anstieg der CSN-Untereinheiten bereits nach 1 h und nach 4 h detektiert werden, was hinweisend auf einen Regulationsmechanismus auf Translationsebene sein kann (*Abb.10/12*). Daher ergibt sich die Frage, inwieweit miRNAs einen Einfluss bei der MMC-Wirkung haben könnten.

miRNAs spielen eine wichtige Rolle bei Entwicklung, Differenzierung, Zellzykluskontrolle und Apoptose (Garofalo et al, 2008; Kloosterman & Plasterk, 2006). Defekte in der DNA-Reparatur und Fehlexpression von miRNAs sind wichtige Schritte im Rahmen der Tumorentstehung (Bartkova et al, 2005; Gorgoulis et al, 2005; Kumar et al, 2007). Vermutlich werden mehr als die Hälfte aller Protein-codierenden Gene durch miRNAs reguliert (Friedman et al, 2009). Es gibt eine Reihe von miRNAs, die sensibel auf DNA-Defekte reagieren oder miRNAs die Gene von DNA-Reparaturproteinen regulieren und somit eine wichtige Rolle in Tumoren spielen und die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber DNA-Defekt-induzierenden Substanzen beeinflussen können (Hu & Gatti, 2011; Wan et al, 2011; Wouters et al, 2011). Kennzeichnend für Tumorgewebe ist eine generelle Verminderung der miRNA Expression (Lu et al, 2005). So konnte zum Beispiel für miRNAs der let-7 Familie eine verminderte Expression in Tumorgewebe nachgewiesen werden (Zhong et al, 2010). miRNA let-7 agiert als Tumorsuppressor durch Regulation von RAS, HMGA2 und c-Myc (Johnson et al, 2005; Lee & Dutta, 2007; Mayr et al, 2007; Sampson et al, 2007).

Verknüpft mit der Erkenntnis, dass miRNAs der let-7 Familie die Expression des CSN regulieren (Leppert et al, 2011), ist es wahrscheinlich, dass MMC über DNA-Reparatursignalwege let-7 miRNAs reduziert und so einen schnellen Anstieg der CSN-Untereinheiten bewirkt. Daher ergab sich die Überlegung ob die MMC-Wirkung durch gezielte Blockade der CSN-Expression mittels Transfektion mit miRNA Mimics der let-7 Familie erhöht werden könnte.

miRNA let-7a-1 verhindert den durch MMC induzierten Anstieg der CSN-Untereinheiten

Durch Transfektion der HT29-Zellen mit miRNA let-7a-1 Mimic und anschließender MMC-Inkubation konnte eine statistisch signifikante Verminderung der CSN-Expression erreicht werden. Für CSN1, CSN5 und CSN8 ließ sich der sonst unter MMC beobachtete Anstieg der Untereinheiten mittels Mimics verhindern (Abb.24/ 25).

Um den Unterschied zwischen der Transfektion und anschließender MMC-Inkubation und der MMC-Inkubation alleine deutlich zu machen, wurden zwei Negativkontrollen verwendet. In der Negativkontrolle mit MMC wäre ein Anstieg der CSN-Untereinheiten zu erwarten gewesen. Dieser konnte hier allerdings nicht gezeigt werden. Möglich wäre eine Beeinflussung durch die miRNA Mimic Negativkontrolle.

Auffällig war außerdem, dass die verwendete Ladekontrolle γ -Tubulin unter Mimic-Transfektion und anschließender MMC-Inkubation statt auf einem konstanten Level zu bleiben, ebenfalls vermindert erschien. Die Ursache dafür könnte bereits einsetzende Apoptose sein. Ein Target der let-7 miRNA ist Caspase-3 (Tsang & Kwok, 2008). Interessant wäre dementsprechend die Messung der Apoptose nach Transfektion und folgender MMC-Inkubation mittels Caspase-3 ELISA. Allerdings wird für die Transfektion eine sehr geringe Zellzahl benötigt und der ELISA ist erst bei Verwendung einer hohen Zellzahl sensitiv, sodass eine Modifizierung des Versuchs notwendig wäre. Entsprechende Versuche sind geplant.

miRNA let-7a-1 induziert den Anstieg des Zellzyklusregulators p27 und des Tumorsuppressors p53

Neben der verminderten Expression der CSN-Untereinheiten konnte bei Transfektion der HT29-Zellen mit miRNA-let-7a-1 Mimic und folgender MMC-Behandlung der Anstieg von p53 und p27 beobachtet werden (Abb.26).

Dies kann als Konsequenz der Reduktion der CSN-Untereinheiten verstanden werden, da der Abbau des Zellzyklusregulators p27 und des Tumorsuppressorproteins p53 über

das UPS durch das CSN vermittelt wird (Bech-Otschir et al, 2001; Huang et al, 2006). Abhängig vom Ausmaß des DNA-Defekts entscheidet p53 über den Ausgang der DNA-Reparatur und induziert Zellzyklusarrest und Reparaturmechanismen bis hin zur Apoptose (Helton & Chen, 2007). Somit kann der hier beobachtete Anstieg der DNA-Reparatureffektoren p27 und p53 bei gleichzeitig verminderter Expression der CSN-Untereinheiten Hinweis auf ein pro-apoptisches Milieu sein (Abb.27).

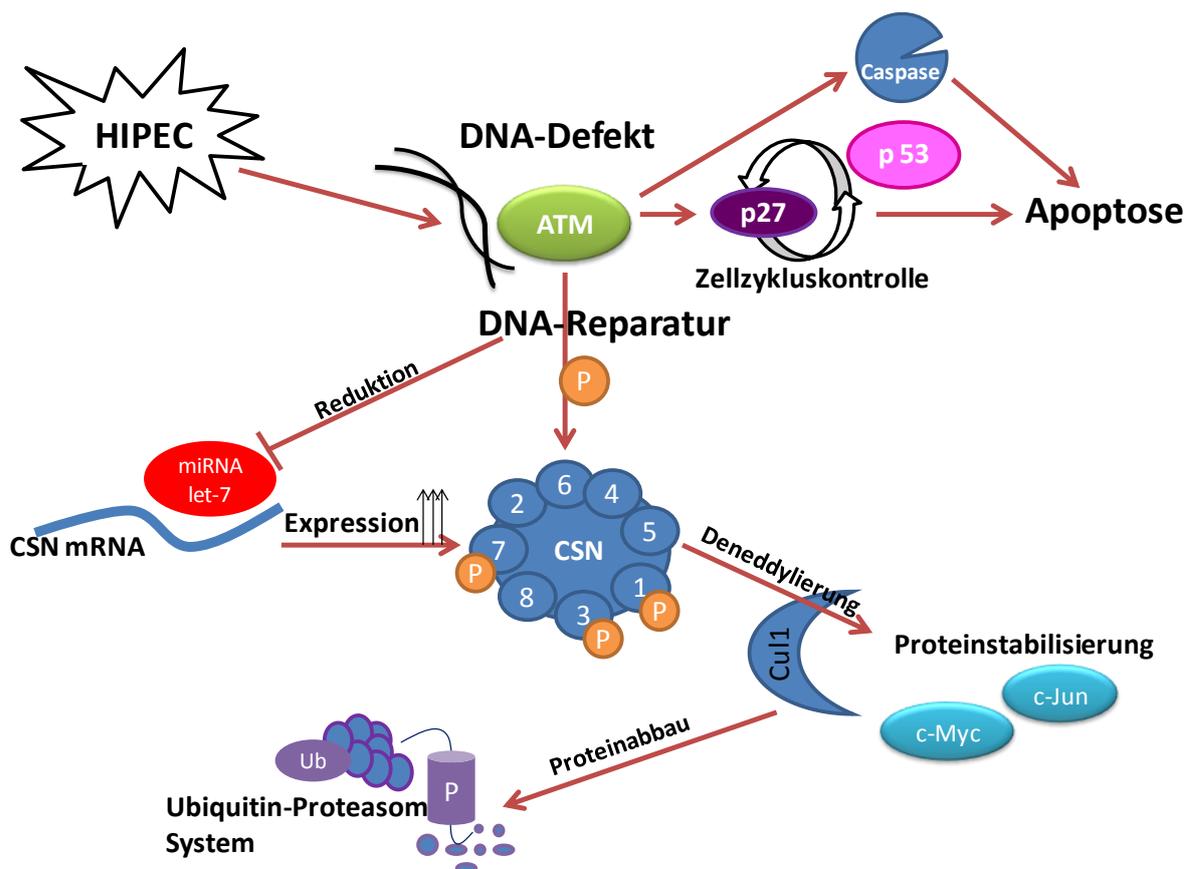


Abb.27. Die Rolle des COP9 Signalosom bei der HIPEC

Durch die bei der HIPEC verwendeten Chemotherapeutika werden DNA-Defekte induziert, an deren Reparatur das CSN beteiligt ist: Vermittelt über das ATM-Protein werden die CSN-Untereinheiten CSN1, CSN3 und CSN7 phosphoryliert. miRNA let-7a-1 regulieren die Expression der CSN-Untereinheiten durch Blockade der CSN-mRNA. Im Rahmen der DNA-Reparaturvorgänge kommt es zu einer verstärkten Expression der CSN-Untereinheiten, vermutlich durch regulatorische Vorgänge auf Translationsebene. Außerdem induziert das CSN die Deneddylierung von Cul1, was die Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Myc vor dem Abbau durch das UPS schützt. Können die DNA-Defekte nicht behoben werden, kommt es zur Apoptose der Tumorzellen.

5.2 Mögliche Konsequenzen für die Klinik

Aus den molekularbiologischen Erkenntnissen, die mittels HIPEC-Zellkulturmodell gewonnen wurden, ergeben sich folgende Überlegungen, die für die klinische Anwendung der HIPEC von Bedeutung sein könnten.

5.2.1 Veränderung der Dauer der HIPEC

Bei den Untersuchungen zur Apoptoserate nach HIPEC im HT29-Zellkulturmodell wurde nach 4 h Behandlung ein signifikanter Anstieg der aktivierten Caspase-3 gemessen, die direkte Messung nach 1 h ergab keinen Hinweis auf Apoptose (*Abb. 18*) und im modifizierten Versuchsaufbau zur Detektion einer verzögerten Caspase-3 Aktivierung konnte dies nur bei einer sehr hohen MMC-Konzentration nachgewiesen werden (*Abb. 19*). Somit stellt sich die Frage, ob es nicht effektiver wäre, die HIPEC über einen längeren Zeitraum durchzuführen. Innerhalb der HIPEC-Protokolle existiert eine zeitliche Varianz von 30-120 min (González-Moreno et al, 2010; Turaga et al, 2013). Unterschiedlichen Studien zufolge, zusammengefasst von de Bree in „Recent Results in Cancer Research“ 2007, ist nach 90-120 min ein Großteil des Chemotherapeutikums resorbiert, weshalb sich ein längerer Zeitraum für die HIPEC bisher nicht durchgesetzt hat (de Bree & Tsiftsis, 2007).

Die hier gewonnenen Daten geben Hinweis, dass aufgrund von DNA-Reparaturmechanismen die Apoptose verzögert eintritt und erst eine Dauer von 4 h HIPEC zur Apoptose der Tumorzellen führt.

In der Klinik ist das Ergebnis der HIPEC von unterschiedlichen Faktoren abhängig: Je nach Ausmaß der Zytoreduktion und der Peritonektomie wird ein Verlust der Chemotherapielösung in den zentralen Kreislauf beobachtet (Van der Speeten et al, 2010), außerdem gilt der histologische Typ des Tumorgewebes als prädiktiver Faktor für den Erfolg der HIPEC (Bruin et al, 2010). Somit lassen sich die mittels *in-vitro* HIPEC-Model gewonnenen Daten zwar nicht 1:1 auf die klinische Situation übertragen, können aber als Anhalt für weitere Untersuchungen zur Optimierung der HIPEC gesehen werden. Die Varianz in den HIPEC Protokollen lässt sich nicht leugnen und erst im Juni 2013 forderte die „American Society of Peritoneal Surface Malignancies“ eine Standardisierung der HIPEC-Protokolle (Turaga et al, 2013). In Folge dessen wurde bei Peritonealkarzinose kolorektalen Ursprungs ein HIPEC-Protokoll mit 40 mg MMC, einer Perfusionszeit von 90 min und einer Temperatur von 42°C beschlossen.

Erst wenn eine Standardisierung erfolgt sei, könnten Bedingungen wie die Dauer der HIPEC reevaluiert werden (Turaga et al, 2013).

5.2.2 HIPEC mit Kombination aus MMC und Curcumin

In Studien konnte gezeigt werden, dass trotz der lokalen Anwendung Chemotherapeutikum in den zentralen Kreislauf des Patienten gelangt und zu Nebenwirkungen führen kann (Kusamura et al, 2007; Lambert et al, 2009; van Ruth et al, 2004). Nach 90 min HIPEC mit MMC sind vermutlich 62% des Chemotherapeutikums resorbiert, 9% im Urin und 29% in der Chemotherapielösung verblieben (Van der Speeten et al, 2010). Nebenwirkungen wie Knochenmarksdepression, Nephrotoxizität und Neutropenie sind beschrieben (Kusamura et al, 2007; Lambert et al, 2009). Es bestand die Überlegung, ob die Verwendung von Curcumin bei der HIPEC zu einer Reduktion der Chemotherapiekonzentration führen und MMC-assoziierte Nebenwirkungen verhindern könnte. Diese Idee basiert auf Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Curcumin in Tumorzellen die Zellproliferation über die Aktivierung der zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27 unterdrückt (Aggarwal et al, 2007) und Apoptose über Aktivierung von Caspasen und anderer an der Apoptose beteiligten Proteine induziert (Ravindran et al, 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Curcumin die Zytotoxizität von MMC über die Verminderung der Expression des Rad51 Proteins, ein wichtiges Protein bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, verstärkt (Ko et al, 2011) und dass es MMC-assoziierte Nebenwirkungen verringert und nephroprotektiv wirkt (Zhou et al, 2011).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass Curcumin in Kombination mit MMC synergistisch wirkt und der Anstieg der Caspase-3 gesteigert wird (*Abb.20, 21*). Die Kombination der beiden Wirkstoffe verbessert die Apoptoserate signifikant. Diese Ergebnisse und die Kenntnis, dass bisher für Curcumin keine Toxizität nachgewiesen werden konnte und es neben der oben beschriebenen antikarzinogenen Wirkung nephroprotektiv wirkt, machen es zu einem geeigneten Zusatzstoff für die HIPEC (*Abb.28*). Möglich wäre eine klinische Studie: HIPEC mit Curcumin. Bisher gibt es folgende Erfahrung mit Curcumin in der Klinik für Visceralchirurgie der Charité Campus Mitte: 2009 wurde eine Fallstudie bei einer Patientin mit Lebermetastasen kolorektalen Ursprungs durchgeführt. Die Patientin erhielt eine palliative Chemotherapie

(systemisch) in Kombination mit Curcumin (oral). Es wurde eine Regression der Lebermetastasen beschrieben. Allerdings ist die Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt aufgrund der lipophilen Eigenschaft Curcumins begrenzt (Braumann et al, 2009). Die Anwendung Curcumins bei der HIPEC hätte den Vorteil der lokalen Wirkung in der Peritonealhöhle mit der direkten Wirkung auf die Tumorzellen und der Potenzierung der MMC-Wirkung. Denkbar wäre durch die Verwendung Curcumins eine Verringerung der MMC-Konzentration, was wiederum Nebenwirkungen von MMC verhindern könnte.

Ein Patent für die Anwendung von Curcumin bei der HIPEC wurde eingereicht, leider hat sich ergeben, dass bereits seit 2011 ein ähnliches Patent in den USA besteht.

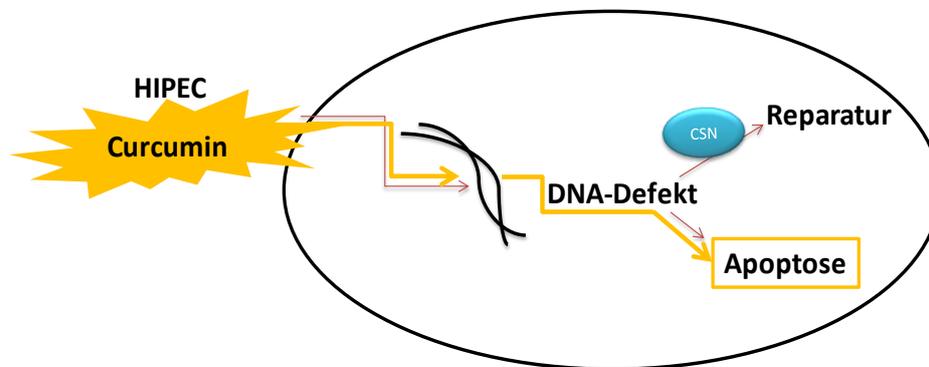


Abb.28. HIPEC mit Curcumin

Die bei der HIPEC verwendeten Chemotherapeutika induzieren DNA-Defekte. Können die Tumorzellen die DNA-Defekte nicht beheben, kommt es zur Apoptose. Das CSN unterstützt die Tumorzellen bei der DNA-Reparatur. Durch die Anwendung des CSN-assoziierten Kinase-Inhibitors Curcumin kann der apoptotische Effekt der HIPEC verbessert werden.

5.2.3 HIPEC mit miRNAs

Derzeit werden miRNAs als Biomarker für Diagnosestellung, Prognose oder zur Kontrolle des Therapieerfolgs maligner Erkrankungen genutzt (Nana-Sinkam & Croce, 2013). Die therapeutische Anwendung wird bereits untersucht, allerdings bestehen Probleme durch fehlende geeignete Übertragungssysteme, schlechter zellulärer Aufnahme, sowie die Gefahr der Toxizität (Hoshino & Matsubara, 2012). Für die Übertragung ins Gewebe werden Kollagen, Nanopartikel oder Liposom-Hyaluronsäure als Transporter diskutiert (Hoshino & Matsubara, 2012).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte an HT29-Zellen gezeigt werden, dass let-7a-1 Mimics in Kombination mit MMC den Anstieg des CSN unterdrücken (Abb.24/25), was wiederum eine Beteiligung des CSN an der DNA-Reparatur verhindern könnte.

Gleichzeitig wurde die Expression der Faktoren p27 und p53 verstärkt (Abb.26), als Hinweis auf pro-apoptotische Bedingungen.

Aufgrund der lokalen Applikation in der Peritonealhöhle bietet das HIPEC-Verfahren optimale Bedingungen für die Verwendung von miRNAs. Die Zugabe von miRNA let-7a-1 zur Chemotherapielösung wäre denkbar (Abb.29). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass let-7a-1 Mimics die DNA-Reparatur verhindern und die Effizienz der HIPEC erhöhen könnten. Chemotherapeutika wie MMC könnten in Kombination mit Inhibitoren des DNA-Reparatur-Programms den therapeutischen Effekt verbessern.

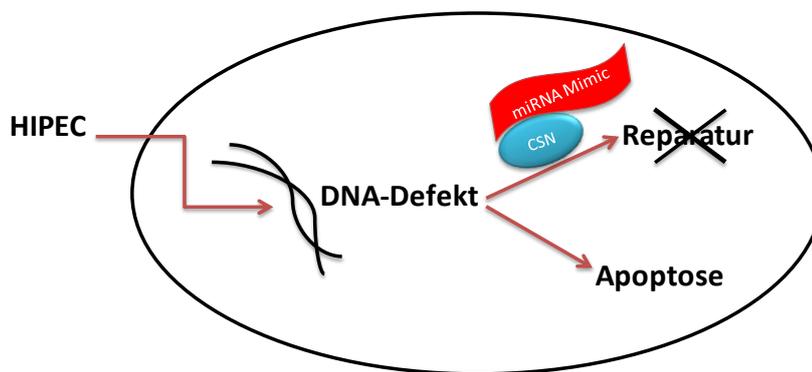


Abb.29. HIPEC mit miRNA let-7a-1 Mimic

Die bei der HIPEC verwendeten Chemotherapeutika induzieren DNA-Defekte. Das CSN unterstützt die Tumorzellen bei der DNA-Reparatur. miRNAs der let-7 Familie agieren als negativer Regulator des CSN und bieten eine interessante therapeutische Option bei der HIPEC. Durch die gezielte Blockade des CSN mittels miRNA let-7a-1 Mimic könnte die Apoptose der Tumorzellen gefördert werden.

5.3 Ausblick

Seit der 1980 erstmalig verwendeten intraperitonealen Chemotherapie bei Peritonealkarzinose wurden zahlreiche in vivo und in vitro Studien zur Verbesserung der HIPEC durchgeführt (Francescutti et al, 2013; Pelz et al, 2013; Raue et al, 2010). In der hier vorliegenden Arbeit hat sich das CSN als interessantes Target für die klinische Anwendung herausgestellt. Veränderungen der CSN-Untereinheiten (Expression, Phosphorylierung) und Modifizierungen CSN-interagierender Proteine im Rahmen der DNA-Reparatur wurden beobachtet. In zukünftigen Experimenten sollte die Rolle des CSN bei der DNA-Reparatur, die Phosphorylierungsstellen des CSN und spezifische Hemmstoffe der CSN-assoziierten Kinasen noch genauer untersucht werden. Dies könnte mittels Phosphorylierungsassays, Dichtegradientenzentrifuge und quantitativer Massenspektrometrie erfolgen. Das MMC-HT29-Zell-Modell bietet optimale Bedingungen dafür.

Neben der weiterführenden molekularbiologischen Untersuchung des CSN erscheint es sinnvoll, die durch die zytorreduktive Chirurgie und Peritonektomie gewonnenen histologischen Präparate auf die Expression der CSN-Untereinheiten zu analysieren. In unterschiedlichen Tumorentitäten konnte bereits eine Überexpression des CSN nachgewiesen werden (Lee et al, 2011). Sollte auch in Präparaten der Peritonealkarzinose eine verstärkte Expression des CSN detektiert werden, würde das die hier vorgeschlagene klinische Anwendung bekräftigen.

LITERATURVERZEICHNIS

Aggarwal BB, Banerjee S, Bharadwaj U, Sung B, Shishodia S, Sethi G (2007) Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* **73**: 1024-1032

Appella E, Anderson CW (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* **268**: 2764-2772

Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**: 864-870

Bassing CH, Alt FW (2004) The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**: 781-796

Bech-Otschir D, Kapelari B, Dubiel W (2005) The COP9 Signalosome: Its Possible Role in the Ubiquitin System, Vol. 1, Mayer, R. J.; Ciechanover A.; Rechtsteiner M.; Ubiquitin and the Chemistry of Life WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.

Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W (2001) COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* **20**: 1630-1639

Bensimon A, Aebersold R, Shiloh Y (2011) Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Lett* **585**: 1625-1639

Braumann C, Guenther N, Loeffler LM, Dubiel W (2009) Liver metastases after colonic carcinoma--palliative chemotherapy plus curcumin. *Int J Colorectal Dis* **24**: 859-860

Brooks CL, Gu W (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* **21**: 307-315

Bruin SC, Verwaal VJ, Vincent A, van't Veer LJ, van Velthuysen ML (2010) A clinicopathologic analysis of peritoneal metastases of colorectal and appendiceal origin. *Ann Surg Oncol* **17**: 2330-2340

Ceelen WP, Hesse U, de Hemptinne B, Pattyn P (2000) Hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion in the treatment of locally advanced intra-abdominal cancer. *Br J Surg* **87**: 1006-1015

Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng XW (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* **86**: 115-121

Ciccia A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**: 179-204

Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326 (Pt 1)**: 1-16

Cohen SM, Lippard SJ (2001) Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **67**: 93-130

Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* **298**: 608-611

de Bree E, Tsiftsis DD (2007) Principles of perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. *Recent Results Cancer Res* **169**: 39-51

Deng XW, Dubiel W, Wei N, Hofmann K, Mundt K, Colicelli J, Kato J, Naumann M, Segal D, Seeger M, Carr A, Glickman M, Chamovitz DA (2000) Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet* **16**: 202-203

Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**: 399-434

Dohmann EM, Levesque MP, De Veylder L, Reichardt I, Jürgens G, Schmid M, Schwechheimer C (2008) The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Development* **135**: 2013-2022

Dérjard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-1037

El-Kareh AW, Secomb TW (2004) A theoretical model for intraperitoneal delivery of cisplatin and the effect of hyperthermia on drug penetration distance. *Neoplasia* **6**: 117-127

Elias D, Blot F, El Otmany A, Antoun S, Lasser P, Boige V, Rougier P, Ducreux M (2001) Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. *Cancer* **92**: 71-76

Elias D, Gilly F, Boutitie F, Quenet F, Bereder JM, Mansvelt B, Lorimier G, Dubè P, Glehen O (2010) Peritoneal colorectal carcinomatosis treated with surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of 523 patients from a multicentric French study. *J Clin Oncol* **28**: 63-68

Emami S (2011) Interplay between p53-family, their regulators, and PARPs in DNA repair. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **35**: 98-104

Fraille JM, Quesada V, Rodríguez D, Freije JM, López-Otín C (2012) Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* **31**: 2373-2388

Francescutti V, Rivera L, Seshadri M, Kim M, Haslinger M, Camoriano M, Attwood K, Kane JM, Skitzki JJ (2013) The benefit of intraperitoneal chemotherapy for the treatment of colorectal carcinomatosis. *Oncol Rep* **30**: 35-42

Franco J, Shi Q, Goldman CD, Pockaj BA, Nelson GD, Goldberg RM, Pitot HC, Grothey A, Alberts SR, Sargent DJ (2012) Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: a pooled analysis of north central cancer treatment group phase III trials N9741 and N9841. *J Clin Oncol* **30**: 263-267

Frescas D, Pagano M (2008) Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 438-449

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**: 92-105

Garofalo M, Condorelli G, Croce CM (2008) MicroRNAs in diseases and drug response. *Curr Opin Pharmacol* **8**: 661-667

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**: 615-623

González-Moreno S, González-Bayón LA, Ortega-Pérez G (2010) Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Rationale and technique. *World J Gastrointest Oncol* **2**: 68-75

Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA, Kastriakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**: 907-913

Grabbe C, Husnjak K, Dikic I (2011) The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 295-307

Gregory MA, Qi Y, Hann SR (2003) Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem* **278**: 51606-51612

Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, Kisselev AF, Tanaka K, Nakatani Y (2003) The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* **113**: 357-367

Hannß R, Dubiel W (2011) COP9 signalosome function in the DDR. *FEBS Lett*

Harmon RL, Sugarbaker PH (2005) Prognostic indicators in peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. *Int Semin Surg Oncol* **2**: 3

Helton ES, Chen X (2007) p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* **100**: 883-896

Henke W, Ferrell K, Bech-Otschir D, Seeger M, Schade R, Jungblut P, Naumann M, Dubiel W (1999) Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid'. *Mol Biol Rep* **26**: 29-34

Heo I, Joo C, Kim YK, Ha M, Yoon MJ, Cho J, Yeom KH, Han J, Kim VN (2009) TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* **138**: 696-708

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479

Hetfeld BK, Helfrich A, Kapelari B, Scheel H, Hofmann K, Guterman A, Glickman M, Schade R, Kloetzel PM, Dubiel W (2005) The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol* **15**: 1217-1221

Hildebrandt B, Wust P (2007) Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Res* **134**: 185-193

Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**: 1824-1827

Hochstrasser M (2000) Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science* **289**: 563-564

Hong EJ, Villén J, Gerace EL, Gygi SP, Moazed D (2005) A cullin E3 ubiquitin ligase complex associates with Rik1 and the Clr4 histone H3-K9 methyltransferase and is required for RNAi-mediated heterochromatin formation. *RNA Biol* **2**: 106-111

Hoshino I, Matsubara H (2012) MicroRNAs in cancer diagnosis and therapy: from bench to bedside. *Surg Today*

Hu H, Gatti RA (2011) MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *J Mol Cell Biol* **3**: 151-158

Huang X, Wagner E, Dumdey R, Peth A, Berse M, Dubiel W, Berndt C (2006) Phosphorylation by COP9 Signalosome-Associated CK2 Promotes Degradation of p27 during the G1 Cell Cycle Phase. *Israel Journal of Chemistry* **46**: 231-238

Jackson S, Xiong Y (2009) CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci* **34**: 562-570

Jacquet P, Sugarbaker PH (1996) Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* **82**: 359-374

Jia S, Kobayashi R, Grewal SI (2005) Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nat Cell Biol* **7**: 1007-1013

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**: 635-647

Junttila MR, Westermarck J (2008) Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies. *Cell Cycle* **7**: 592-596

Kato JY, Yoneda-Kato N (2009) Mammalian COP9 signalosome. *Genes Cells* **14**: 1209-1225

Kloosterman WP, Plasterk RH (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* **11**: 441-450

Ko JC, Tsai MS, Weng SH, Kuo YH, Chiu YF, Lin YW (2011) Curcumin enhances the mitomycin C-induced cytotoxicity via downregulation of MKK1/2-ERK1/2-mediated Rad51 expression in non-small cell lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **255**: 327-338

Kob R, Kelm J, Posorski N, Baniahmad A, von Eggeling F, Melle C (2009) Regulation of the anaphase-promoting complex by the COP9 signalosome. *Cell Cycle* **8**: 2041-2049

Komander D, Clague MJ, Urbé S (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 550-563

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**: 299-303

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* **39**: 673-677

Kusamura S, Baratti D, Younan R, Laterza B, Oliva GD, Costanzo P, Favaro M, Gavazzi C, Grosso F, Deraco M (2007) Impact of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy on systemic toxicity. *Ann Surg Oncol* **14**: 2550-2558

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**: 853-858

- Lambert LA, Armstrong TS, Lee JJ, Liu S, Katz MH, Eng C, Wolff RA, Tortorice ML, Tansey P, Gonzalez-Moreno S, Lambert DH, Mansfield PF (2009) Incidence, risk factors, and impact of severe neutropenia after hyperthermic intraperitoneal mitomycin C. *Ann Surg Oncol* **16**: 2181-2187
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**: 858-862
- Lee MH, Zhao R, Phan L, Yeung SC (2011) Roles of COP9 signalosome in cancer. *Cell Cycle* **10**: 3057-3066
- Lee YS, Dutta A (2007) The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* **21**: 1025-1030
- Leppert U, Henke W, Huang X, Müller JM, Dubiel W (2011) Post-Transcriptional Fine-tuning of COP9 Signalosome Subunit Biosynthesis is Regulated by the c-Myc/Lin28B/let-7 Pathway. *J Mol Biol* **409**: 710-721
- Lipkowitz S, Weissman AM (2011) RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **11**: 629-643
- Liu C, Powell KA, Mundt K, Wu L, Carr AM, Caspari T (2003) Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms. *Genes Dev* **17**: 1130-1140
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**: 834-838
- Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, Serino G, Tsuge T, Zhou C, Wolf DA, Wei N, Deshaies RJ (2001) Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**: 1382-1385
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**: 1160-1166
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP (2007) Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* **315**: 1576-1579
- Nana-Sinkam SP, Croce CM (2013) Clinical Applications for microRNAs in Cancer. *Clin Pharmacol Ther* **93**: 98-104
- Naumann M, Bech-Otschir D, Huang X, Ferrell K, Dubiel W (1999) COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem* **274**: 35297-35300

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43

Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**: 773-786

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a001008

Panteix G, Guillaumont M, Cherpin L, Cuichard J, Gilly FN, Carry PY, Sayag A, Salle B, Brachet A, Bienvenu J (1993) Study of the pharmacokinetics of mitomycin C in humans during intraperitoneal chemohyperthermia with special mention of the concentration in local tissues. *Oncology* **50**: 366-370

Pelz JO, Vetterlein M, Grimmig T, Kerscher AG, Moll E, Lazariotou M, Matthes N, Faber M, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Gasser M (2013) Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis: role of heat shock proteins and dissecting effects of hyperthermia. *Ann Surg Oncol* **20**: 1105-1113

Peth A, Berndt C, Henke W, Dubiel W (2007) Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects the CSN complex and target protein stability. *BMC Biochem* **8**: 27

Petroski MD, Deshaies RJ (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 9-20

Phelps JS, Gandolfi AJ, Brendel K, Dorr RT (1987) Cisplatin nephrotoxicity: in vitro studies with precision-cut rabbit renal cortical slices. *Toxicol Appl Pharmacol* **90**: 501-512

Pick E, Hofmann K, Glickman MH (2009) PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. *Mol Cell* **35**: 260-264

Pollmann C, Huang X, Mall J, Bech-Otschir D, Naumann M, Dubiel W (2001) The constitutive photomorphogenesis 9 signalosome directs vascular endothelial growth factor production in tumor cells. *Cancer Res* **61**: 8416-8421

Pray TR, Parlati F, Huang J, Wong BR, Payan DG, Bennett MK, Issakani SD, Molineaux S, Demo SD (2002) Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist Updat* **5**: 249-258

Proctor CJ, Gray DA (2008) Explaining oscillations and variability in the p53-Mdm2 system. *BMC Syst Biol* **2**: 75

Pulverer BJ, Fisher C, Vousden K, Littlewood T, Evan G, Woodgett JR (1994) Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene* **9**: 59-70

Raue W, Kilian M, Braumann C, Atanassow V, Makareinis A, Caldenas S, Schwenk W, Hartmann J (2010) Multimodal approach for treatment of peritoneal surface malignancies in a tumour-bearing rat model. *Int J Colorectal Dis* **25**: 245-250

Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB (2009) Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J* **11**: 495-510

Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* **157**: 1415-1430

Richardson KS, Zundel W (2005) The emerging role of the COP9 signalosome in cancer. *Mol Cancer Res* **3**: 645-653

Roviello F, Caruso S, Marrelli D, Pedrazzani C, Neri A, De Stefano A, Pinto E (2010) Treatment of peritoneal carcinomatosis with cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: State of the art and future developments. *Surg Oncol*

Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL, Porcheron J, Peix JL, François Y, Vignal J, Gilly FN (2000) Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* **88**: 358-363

Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* **67**: 9762-9770

Sasaki T, Fujii K, Yoshida K, Shimura H, Sasahira T, Ohmori H, Kuniyasu H (2006) Peritoneal metastasis inhibition by linoleic acid with activation of PPARgamma in human gastrointestinal cancer cells. *Virchows Arch* **448**: 422-427

Saunders PA, Cooper JA, Roodell MM, Schroeder DA, Borchert CJ, Isaacson AL, Schendel MJ, Godfrey KG, Cahill DR, Walz AM, Loegering RT, Gaylord H, Woyno IJ, Kaluzhny AE, Krzyzek RA, Mortari F, Tsang M, Roff CF (2000) Quantification of active caspase 3 in apoptotic cells. *Anal Biochem* **284**: 114-124

Scheffner M, Staub O (2007) HECT E3s and human disease. *BMC Biochem* **8 Suppl 1**: S6

Schmalzer T, Dubiel W (2010) Control of Deneddylation by the COP9 Signalosome. *Subcell Biochem* **54**: 57-68

Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, Gordon C, Naumann M, Dubiel W (1998) A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J* **12**: 469-478

Sharon M, Mao H, Boeri Erba E, Stephens E, Zheng N, Robinson CV (2009) Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. *Structure* **17**: 31-40

Shiloh Y (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* **31**: 402-410

Spratt JS, Adcock RA, Muskovin M, Sherrill W, McKeown J (1980) Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. *Cancer Res* **40**: 256-260

Sugarbaker PH (1995) Peritonectomy procedures. *Ann Surg* **221**: 29-42

Sugarbaker PH, Jablonski KA (1995) Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg* **221**: 124-132

Sugarbaker PH, Ryan DP (2012) Cytoreductive surgery plus hyperthermic perioperative chemotherapy to treat peritoneal metastases from colorectal cancer: standard of care or an experimental approach? *Lancet Oncol* **13**: e362-369

Sun L, Shi L, Wang F, Huangyang P, Si W, Yang J, Yao Z, Shang Y (2011) Substrate phosphorylation and feedback regulation in JFK-promoted p53 destabilization. *J Biol Chem* **286**: 4226-4235

Sun Y, Wilson MP, Majerus PW (2002) Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *J Biol Chem* **277**: 45759-45764

Tomasz M, Palom Y (1997) The mitomycin bio-reductive anti-tumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol Ther* **76**: 73-87

Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, Yoshida M, Yoneda-Kato N, Kato JY (2002) The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem* **277**: 2302-2310

Tomoda K, Kubota Y, Kato J (1999) Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* **398**: 160-165

Toyoshima H, Hunter T (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**: 67-74

Tsang WP, Kwok TT (2008) Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis* **13**: 1215-1222

Tsuge T, Matsui M, Wei N (2001) The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J Mol Biol* **305**: 1-9

Turaga K, Levine E, Barone R, Sticca R, Petrelli N, Lambert L, Nash G, Morse M, Adbel-Misih R, Alexander HR, Attiyeh F, Bartlett D, Bastidas A, Blazer T, Chu Q, Chung K, Dominguez-Parra L, Espat NJ, Foster J, Fournier K, Garcia R, Goodman M, Hanna N, Harrison L, Hoefler R, Holtzman M, Kane J, Labow D, Li B, Lowy A, Mansfield P, Ong E, Pameijer C, Pingpank J, Quinones M, Royal R, Salti G, Sardi A, Shen P, Skitzki J, Spellman J, Stewart J, Esquivel J (2013) Consensus Guidelines from The American Society of Peritoneal Surface Malignancies on Standardizing the Delivery of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) in Colorectal Cancer Patients in the United States. *Ann Surg Oncol*

Uhle S, Medalia O, Waldron R, Dumdey R, Henklein P, Bech-Otschir D, Huang X, Berse M, Sperling J, Schade R, Dubiel W (2003) Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J* **22**: 1302-1312

van de Vaart PJ, van der Vange N, Zoetmulder FA, van Goethem AR, van Tellingen O, ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH, Bartelink H, Begg AC (1998) Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer* **34**: 148-154

Van der Speeten K, Stuart OA, Chang D, Mahteme H, Sugarbaker PH (2010) Changes induced by surgical and clinical factors in the pharmacology of intraperitoneal mitomycin C in 145 patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother Pharmacol*

van Ruth S, Mathôt RA, Sparidans RW, Beijnen JH, Verwaal VJ, Zoetmulder FA (2004) Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of mitomycin during intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Clin Pharmacokinet* **43**: 131-143

Verwey J, de Vries J, Pinedo HM (1987) Mitomycin C-induced renal toxicity, a dose-dependent side effect? *Eur J Cancer Clin Oncol* **23**: 195-199

Wan G, Mathur R, Hu X, Zhang X, Lu X (2011) miRNA response to DNA damage. *Trends Biochem Sci* **36**: 478-484

Wei N, Deng XW (1999) Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet* **15**: 98-103

Wei N, Deng XW (2003) The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 261-286

Wei N, Serino G, Deng XW (2008) The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci* **33**: 592-600

Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JE, Grim JA, Harper JW, Eisenman RN, Clurman BE (2004) The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9085-9090

Wouters MD, van Gent DC, Hoeijmakers JH, Pothof J (2011) MicroRNAs, the DNA damage response and cancer. *Mutat Res* **717**: 54-66

Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T, Counter CM, Nevins JR, Means AR, Sears R (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* **6**: 308-318

Zhong X, Li N, Liang S, Huang Q, Coukos G, Zhang L (2010) Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *J Biol Chem* **285**: 41961-41971

Zhou C, Wee S, Rhee E, Naumann M, Dubiel W, Wolf DA (2003) Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol Cell* **11**: 927-938

Zhou QM, Wang XF, Liu XJ, Zhang H, Lu YY, Huang S, Su SB (2011) Curcumin improves MMC-based chemotherapy by simultaneously sensitising cancer cells to MMC and reducing MMC-associated side-effects. *Eur J Cancer*

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AP-1	Activator protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASP	Asparaginsäure
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATR	ATM and RAD3-related
ATRIP	ATR-interacting Protein
BTB	Broad-complex, Trimtrack, Brick a brac
CDDP	Cisplatin
CDK	Cyklin dependent kinase
Chk1,2	checkpoint kinases
CK2	Casein Kinase II
COP	constitutive photomorphogenic
CRL	Cullin-RING Ubiquitin Ligasen
CSN	COP9 Signalosom
Cul	Cullin
DDB1	DNA-damage-binding protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DSBs	double-strand breaks
DUB	Deubiquitinierungsenzyme
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF3	eukariotischer Translations Initiations Komplex 3
ERK	extracellular regulated kinase 1,2
FCS	Fetal calf serum
GSK3 β	glycogen synthase kinase
h	Stunde
HECT	homologous to E6-AP-carboxyl terminus
HIPEC	hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
IFN	Interferon
JAB1	Jun-activation domain binding protein 1

JAMM	JAB1 MPN Domäne Metalloenzym
JNK	c-Jun NH2-Terminal Kinase
5/6 Kinase	Inositol 1,3,4-triphosphat 5/6 Kinase
µM	microMolar
Mdm2	Mouse double minute 2
min	Minute
MMC	Mitomycin C
MPN	Mpr-Pad1-N-terminal
mRNA	messengerRNA
miRNA	microRNA
MRN	Mre 11-Rad50-NBS1
Nedd8	neuronally expressed developmentally downregulated 8
PBS	Phosphate bultered saline
PCI	Peritonealkarzinoseindex
PCI	Proteasom COP9 signalosome Initiation factor 3
PKD	Proteinkinase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PPARγ	proliferator-activated-receptor gamma
Rbx	RING-Box protein
RING	really interesting new gene
RNA	ribonucleid acid
rpm	rounds per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	Serin
ssDNA	single-strand DNA
TCA	Trichloressigsäure
Temed	Tetramethylethylendiamin
TUT4	TUTase4
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
USP15	Ubiquitin specific protease 15
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mathilde Feist, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des COP9 Signalosoms bei der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie: Mögliche Konsequenzen für die Klinik“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Mathilde Feist hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Can hyperthermic intraperitoneal chemotherapy efficiency be improved by blocking the DNA repair factor COP9 signalosome?

(Feist M, Huang X, Müller JM, Rau B, Dubiel W)

Int J Colorectal Dis 2014

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Experimente und Schreiben des Papers.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Publikationsliste

Paper

Can hyperthermic intraperitoneal chemotherapy efficiency be improved by blocking the DNA repair factor COP9 signalosome?

(Feist M, Huang X, Müller JM, Rau B, Dubiel W)

Int J Colorectal Dis 2014

Poster

The effect of mitomycin C on the COP9 signalosome: consequences for HIPEC

(Feist M, Dubiel W, Rau B)

8th Peritonealconference 2012, Berlin

The role of the COP9 signalosome during HIPEC: possible consequences for clinical application

(Feist M, Dubiel W, Rau B)

The European Cancer Congress 2013, Amsterdam

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Rau und Herrn Prof. Dubiel für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und die sehr gute Betreuung bedanken. Für die Hilfe bei der Einarbeitung in die verwendeten Methoden gilt mein besonderer Dank Xiaohua Huang. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und Bereitschaft zur kontinuierlichen Diskussion der Ergebnisse.