

Zusammenfassung

Maligne Zellen weisen häufig eine Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose auf und schützen sich so z.B. vor T-Zellen. Diese Resistenzen können u.a. durch eine verminderte Expression oder Mutationen in pro-apoptotischen Proteinen oder durch Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen bedingt sein. Häufig spielen auch posttranslationale Modifikationen eine wichtige Rolle. Interessanterweise wurden zwei Mitglieder der Todesrezeptor-Familie, Fas und TRAIL-R1, als palmitoyliert beschrieben. Palmitoylierung ist eine wichtige und häufige posttranslationale Modifikation und gleichzeitig die einzige Lipidmodifikation, welche reversibel ist. Da Palmitoylierung u.a. Protein-Protein Interaktionen beeinflussen oder die Lokalisation und Stabilität von Proteinen regulieren kann, erlaubt die Kontrolle der Palmitoylierung oder Depalmitoylierung eines Proteins indirekt auch Kontrolle über die Aktivität der entsprechenden Proteine. Während Palmitoylierung von Proteinen durch die Familie der DHHC-Proteine katalysiert wird, wird der Prozess der Depalmitoylierung durch APT1 und APT2 (Acyl-Protein-Thioesterase 1 und 2) reguliert. Die CLL (Chronische Lymphatische Leukämie) ist u.a. durch eine Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose charakterisiert. Da die Funktion der Palmitoylierung in den Signalwegen von TRAIL-R1 und Fas bisher nicht verstanden ist, sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Hypothesen, in der CLL als Modellerkrankung, untersucht werden: I) APT1 und APT2 sind in CLL-Zellen überexprimiert und stören damit das Gleichgewicht aus Palmitoylierung und Depalmitoylierung, II) APTs interagieren mit TRAIL-R1 und Fas und regulieren so wichtige Schritte im Todesrezeptor-Signalweg und III) die Regulation von Fas und TRAIL-R1 durch APT1 und APT2 ist essentiell für die Induktion Todesrezeptor-vermittelter Apoptose. Diese Arbeit charakterisiert erstmalig die Expression der einzigen bekannten depalmitoylierenden Enzyme APT1 und APT2 in gesunden B-Zellen und in CLL-Zellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Enzyme in CLL Zellen signifikant höher exprimiert werden als in normalen B Zellen. Ihre Überexpression ist funktionell relevant sowohl für die globale Palmitoylierung von Proteinen, als auch für die Palmitoylierung von Fas und TRAIL-R1 im Einzelnen. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide APTs durch deregulierte miRNAs in CLL Zellen auf mRNA- und auf Protein-Ebene reguliert werden. Während APT1 durch miR-138 und miR-200a reguliert wird, sind miR-424 und miR-125a-5p Regulatoren von APT2. Bislang konnte noch keine direkte Interaktion zwischen den APTs und ihren Substraten nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass scheinbar beide APTs, APT1 und APT2, die Todesrezeptoren TRAIL-R1 und Fas direkt depalmitoylieren. Die Interaktion ist dabei abhängig von der Palmitoylierung der Rezeptoren. Weitere Experimente belegen, dass eine vermehrte Palmitoylierung von TRAIL-R1, im Gegensatz zu Fas, zu einer erhöhten Rekrutierung des Rezeptors in DRMs führt und die Internalisierung von TRAIL-R1 begünstigt. Zeitgleich konnte gezeigt werden, dass

eine Inhibition der Depalmitoylierung in Kombination mit der Stimulation der TRAIL-Rezeptoren dazu führt, dass eine stärkere Aktivierung der Caspase-8 nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe von FRAP-Experimenten konnte gezeigt werden, dass palmitoyliertes Fas innerhalb der Zellmembran weniger mobil ist, als der unpalmitoylierter Rezeptor. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf die (bei erhöhter Palmitoylierung) vermehrte Bildung von Todesrezeptor-Aggregaten. Von zentraler funktionaler Bedeutung ist, dass die Inhibition - pharmakologisch über PB oder genetisch über spezifische siRNAs - beider APTs primäre CLL-Zellen gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose sensitiviert. Um die generelle Relevanz dieser Resultate zu prüfen, wurden die APTs deshalb auch in anderen malignen Entitäten, wie z.B. HeLa-Zellen, inhibiert. Auch hier zeigte sich eine signifikante Sensitivierung gegenüber Fas- und TRAIL-vermittelter Apoptose. Hinzu kommt, dass bei Applikation von APT-regulierenden miRNAs maligne Zellen ebenfalls direkt gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose sensitiviert werden konnten. Diese Ergebnisse decken somit einen neuen, bisher unbekanntem Resistenzmechanismus gegenüber Fas und TRAIL-R1 in verschiedenen malignen Entitäten auf, der über miRNAs, einer daraus resultierenden Regulation von APTs und einer Interaktion von APTs mit Todesrezeptoren vermittelt wird.