

Laura Wolpert  
Dr. med.

## Der Einfluss der Deubiquitinase CYLD auf die hepatozelluläre Apoptose

Fach/Einrichtung: NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen)

Doktorvater: Prof. (apl.) Dr. med. Henning Schulze-Bergkamen

Die Dysregulation der Apoptose stellt einen bedeutenden Mechanismus in der Pathogenese vieler Lebererkrankungen dar. So ist auch das lebensbedrohliche Krankheitsbild des akuten Leberversagens durch massive unkontrollierte Apoptose gekennzeichnet. Dabei nimmt die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose insbesondere über den TNF-R1- und den CD95-Rezeptor eine prominente Stellung ein. Angesichts der limitierten Behandlungsoptionen des akuten Leberversagens ist eine Entschlüsselung der zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismen für die Entwicklung neuer Therapieansätze essentiell. Diesbezüglich zeichnet sich eine Modulation der dysregulierten Zelltod-Signalwege als vielversprechender Ansatzpunkt ab. NF- $\kappa$ B kann die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose über die Induktion anti-apoptotischer Proteine gegenregulieren. Allerdings agiert das deubiquitinierende Enzym CYLD als negativer Regulator in der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion und supprimiert auf diese Weise das NF- $\kappa$ B-vermittelte Überlebenssignal. Umgekehrt resultiert eine Ausschaltung von CYLD durch die dann verstärkte NF- $\kappa$ B-Aktivität in einem erhöhten Zellüberleben bei verschiedenen Zelltypen. Für Hepatozyten wurde dieser Zusammenhang bisher jedoch nicht näher untersucht.

Die Intention der vorliegenden Forschungsarbeit bestand darin, die Bedeutung der Deubiquitinase CYLD für die Leberschädigung und die hepatozelluläre Todesrezeptor-vermittelte Apoptose zu analysieren. Dazu wurde ein Mausmodell mit einem kompletten, organunabhängigen CYLD *knockout* (CYLD<sup>-/-</sup>) eingesetzt. Für die Untersuchung des hepatozytären Zelltodes *in vivo* diente das LPS/D-Gal-Schädigungsmodell zur Auslösung der TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose, das Jo2-Schädigungsmodell zur Initiation des CD95-vermittelten Zelltodes. In beiden Leberschädigungsmodellen wiesen die CYLD<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant reduzierte Apoptosesensitivität auf. So ergab die *Western Blot*-Analyse jeweils eine verminderte Caspase- und Bid-Aktivierung bei CYLD-defizienten Mäusen. Dementsprechend war auch in der HE-Färbung sowie im immunhistochemischen Nachweis von gespaltenem PARP (*cleaved* PARP) ein deutlich geringerer Hepatozytenuntergang in ebendieser Experimentalgruppe feststellbar. Jene Ergebnisse bestätigten sich schließlich in der Quantifizierung *cleaved* PARP-positiver Nuklei, wo die Apoptoseraten der WT Hepatozyten signifikant höher im Vergleich zu CYLD<sup>-/-</sup> Hepatozyten ausfielen. Weiterführend galt es den kausalen Ursprung für die reduzierte Apoptoseempfindlichkeit von CYLD<sup>-/-</sup> Mäusen zu determinieren. Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Zusammenhänge erfolgte demnach eine Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Dabei konnte sowohl basal als auch nach LPS-D-Gal- und Jo2-vermittelter Leberschädigung eine vermehrte NF- $\kappa$ B-Aktivität bei CYLD-Defizienz nachgewiesen werden.

Zum Ausschluss von Verzerrungen durch immunregulatorische Effekte – beispielsweise ausgelöst durch eine modifizierte IL-6- und TNF- $\alpha$ -Freisetzung CYLD-negativer Immunzellen – wurden die Ergebnisse *in vitro* an frisch isolierten primären murinen Hepatozyten (PMH) verifiziert. Analog zu den *in vivo*-Resultaten illustrierte der MTT-Viabilitätsassay eine signifikant reduzierte Sensitivität von CYLD<sup>-/-</sup> PMH gegenüber TNF- $\alpha$ - und CD95-induzierter Apoptose. Interessanterweise ließ sich in diesem Experiment schon bei alleiniger Applikation des Transkriptioninhibitors Actinomycin D (ActD) eine verminderte relative Viabilität bei WT und CYLD<sup>-/-</sup> PMH beobachten, was vermutlich auf die Auslösung spontaner Apoptose

infolge der ausbleibenden Expression anti-apoptotischer Proteine zurückzuführen ist. Trotzdem kann das auch hier erhöhte Resistenzniveau CYLD-negativer Hepatozyten als Indiz für die vor ActD-Behandlung gesteigerten Ausgangslevel anti-apoptotischer Proteine gewertet werden. Um eventuelle additive Wirkungen durch die Transkriptionshemmung ausschließen zu können, wurde durch Behandlung der PMH mit dem speziellen CD95-Liganden SuperFas-Ligand eine ActD-unabhängige Apoptosetriggerung durchgeführt. Hier zeigten CYLD-/- PMH ebenso signifikant erhöhte Überlebensraten auf. Als Korrelat der verminderten Apoptosesensitivität ergab die *Western Blot*-Analyse jeweils eine reduzierte Caspase-Aktivierung bei CYLD-defizienten Hepatozyten.

Letztlich gründen die anti-apoptotischen Effekte von NF- $\kappa$ B auf der Induktion überlebensfördernder Gene. Demgemäß wurde die Expression NF- $\kappa$ B-regulierter anti-apoptotischer Gene auf transkriptionaler sowie translationaler Ebene bestimmt. Daraus ließen sich schließlich bei CYLD-defizienten PMH basal und insbesondere nach TNF- und CD95-Rezeptortriggung erhöhte Expressionslevel von Bcl-2, XIAP, cIAP1/2, Survivin und c-Flip ableiten.

Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit darauf schließen, dass eine Deletion von CYLD über eine Verstärkung des anti-apoptotischen NF- $\kappa$ B-Signals zu einer erhöhten Resistenz von Hepatozyten gegenüber TNF- $\alpha$ - und CD95-induzierter Apoptose führt. Somit erweist sich eine Inhibition von CYLD als vielversprechender Therapieansatz, um Hepatozyten vor Todesrezeptor-induzierter Apoptose – wie sie beim akuten Leberversagen vorliegt – zu schützen.