

Dominik Fuchs

Dr. sc. hum.

Mechanismen und Effekte der adaptiven Modifikation des 26S Proteasoms bei kontinuierlicher Proteasominhibition und Aufhebung der Effekte durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

Geboren am 10. April 1978 in Heidelberg

Diplom der Fachrichtung Biotechnologie am 30.6.2003 an der FH Mannheim

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Dr. h. c. V. Daniel

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist essenzieller Bestandteil aller eukaryotischen Zellen, dient dem selektiven nicht-lysosomalen Abbau zytosolischer und nuklearer Proteine und besteht aus dem Ubiquitin-System und dem 26S Proteasom. Das UPS spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, zu denen Immunantwort, Differenzierung, Proliferation, Zellzyklusregulation, Gentranskription und Apoptose zählen. Diese Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Der erste Teil beschreibt die adaptive Modifikation des UPS als Antwort auf eine dauerhafte Inhibition der proteosomalen Chymotrypsin-ähnlichen Peptidaseaktivität in humanen Namalwa Burkitt Lymphomzellen. Hierfür wurden die Zellen durch eine mindestens vierwöchige dauerhafte Inkubation an eine anfänglich letale Konzentration des Proteasominhibitors Bortezomib adaptiert. Namalwa^{ad} Zellen zeigten, verglichen mit nicht-adaptierten Namalwa Zellen, eine gesteigerte Expression und *de novo* Biosynthese von Proteasomen mit veränderter Untereinheiten-Zusammensetzung. Dieses ging einher mit einer erhöhten proteolytischen Aktivität des Proteasoms sowie einer verminderten Expression von TPP II. Namalwa^{ad} Zellen exprimierten verstärkt 26S Proteasomen, in die ausschließlich die konstitutiven proteolytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ sowie 19S Regulationskomplexe inkorporiert wurden. Dagegen kam es, im Gegensatz zu der Proteasom-Komposition in nicht-adaptierten Namalwa Zellen, zu keiner Inkorporation der Immunoproteasomuntereinheiten LMP2 ($\beta 1i$), MECL-1 ($\beta 2i$) und LMP7 ($\beta 5i$) sowie des PA28 Regulationskomplexes mehr. Diese qualitativen und quantitativen Modifikationen des 26S Proteasoms ermöglichten Namalwa^{ad} Zellen eine deutlich erhöhte Proliferationsrate sowie eine Resistenz gegenüber der Induktion eines Zellzyklusarrests durch

Proteasominhibitoren. Außerdem zeigten sich Namalwa^{ad} Zellen resistent gegenüber der Apoptoseinduktion durch die Proteasominhibitoren Bortezomib und Lactacystin, den Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin sowie γ -Bestrahlung. Zu dieser Apoptoseresistenz trug auch die Deregulation verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine bei. Während anti-apoptotische Proteine wie die Hitzeschockproteine Hsp27, Hsp70 und Hsp90 sowie Mcl-1 und Bcl-3 in Namalwa^{ad} Zellen unbehindert oder bei Inkubation mit Bortezomib verstärkt exprimiert wurden, war die Expression der pro-apoptotischen Proteine p53 und p73 stark supprimiert. Die funktionelle Suppression eines einzelnen dieser überexprimierten anti-apoptotischen Proteine reichte alleine nicht aus, um Namalwa^{ad} Zellen gegenüber Bortezomib oder Lactacystin zu sensibilisieren. Weder die funktionelle Suppression von Hsp27 noch von Hsp70 mittels RNA-Interferenz führte zu einer signifikant erhöhten Apoptoseinduktion durch die beiden Proteasominhibitoren. Nicht an der Entstehung der entwickelten Apoptoseresistenz beteiligt war die Transmembranpumpe P-Glykoprotein, die Zellen eine allgemeine Medikamentenresistenz verleihen kann. P-Glykoprotein war weder in Namalwa noch in Namalwa^{ad} Zellen exprimiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde demonstriert, dass der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Simvastatin die in Namalwa^{ad} Zellen entstandene Apoptoseresistenz überwinden kann. Simvastatin inhibierte darüber hinaus die Hyperproliferation von Namalwa^{ad} Zellen und induzierte einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase. Die antineoplastischen Effekte von Simvastatin in Namalwa^{ad} Zellen beruhen nicht auf einer Inhibition des Proteasoms, sondern auf der Depletion der Isoprenoide FPP und insbesondere GGPP und sind durch deren Zugabe reversibel. Ohne eine posttranslationale Modifikation mit Isoprenoiden, der so genannten Isoprenylierung, liegen kleine GTPasen wie RhoA in inaktiver Form im Zytoplasma vor. Es wurde nachgewiesen, dass Simvastatin sowohl in Namalwa als auch in Namalwa^{ad} Zellen die Isoprenylierung von RhoA durch Depletion von GGPP inhibiert. Dadurch wird die Translokation von RhoA zur zytoplasmatischen Seite der Zellmembran und seine anschließende Aktivierung verhindert.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen eine kritischere Betrachtung des Einsatzes von Bortezomib als Monotherapie nahe und liefern stattdessen eine experimentelle Grundlage für eine Kombinationstherapie mit Simvastatin oder anderen Statinen um bereits die Entstehung einer Resistenz gegenüber Bortezomib zu verhindern und bei bestehenden Bortezomib-Resistenzen eine weitere therapeutische Option zu liefern.