

Corinna Horrix

Dr.sc.hum.

Untersuchungen zum Wirkmechanismus pflanzlicher Ribosomen-inaktivierender Proteine von Typ II an Mamma- und Kolonkarzinomzellen

Promotionsfach: DKFZ

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Martin R. Berger

Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs) des Typs II sind dadurch charakterisiert, dass sie einen translationalen Arrest auslösen, indem sie ein bestimmtes Adenin der 28S rRNA irreversibel depurinieren. Bisher ist allerdings unklar, wie dadurch Apoptose ausgelöst wird, die nach RIP-Exposition beobachtet wurde. Riproximin ist ein neues RIP vom Typ II aus der Pflanze *Ximenia americana*, die in Pulverform in der traditionellen afrikanischen Medizin eingesetzt wird. Ein wässriger Extrakt aus diesem Pflanzenpulver sorgte für eine Remission bei Patienten mit metastasierendem Prostatakarzinom. Riproximin wurde als die wirksame Komponente des Extraktes identifiziert und zeigte sowohl starke, im pikomolaren Bereich liegende zytotoxische Wirkung, als auch anti-neoplastische Wirkung in einem Kolonkrebs-Lebermetastasen-Modell in der Ratte. In einem zellfreien Translationsassay konnte für Riproximin der etablierte RIP-Mechanismus des translationalen Arrests nachgewiesen werden. Allerdings lag die Konzentration, die für eine 50 %ige Inhibition der Translation nötig war, mit 5,5 nM deutlich über den im pikomolaren Bereich zytotoxisch wirksamen Konzentrationen. Das warf die Frage auf, ob die Wirkung von Riproximin allein durch die irreversible Hemmung der Proteinsynthese erklärt werden kann. Daraufhin durchgeführte Microarrays gaben auf RNA-Ebene Hinweise auf die Beteiligung von ER-Stress. Diese physiologische Reaktion der Zelle tritt auf, wenn die Homöostase des ER gestört wird und führt zu einem ähnlichen Effekt, wie der bisher bekannte RIP-Mechanismus. Beide Mechanismen führen zu einem Arrest der zellulären Translation, wobei der etablierte RIP-Mechanismus irreversibel und unspezifisch ist, während ER-Stress einen spezifischen und regulierten Arrest verursacht, bei dem bestimmte Gene noch translatiert werden können.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit in Brust- und Kolonkarzinomzellen untersucht, ob Riproximin-Behandlung ER-Stress auslöst. Dazu wurden die drei bekannten Signalwege der UPR über die drei Sensoren PERK, IRE1 und ATF6 auf RNA- und Proteinebene, sowie

verschiedene Zelltodmechanismen untersucht, die im Rahmen einer ER-Stress-Antwort aktiviert werden. Zum Vergleich wurden die Experimente um zwei weitere Typ II-RIPs erweitert. Dies waren das am besten untersuchte RIP Ricin aus der Pflanze *Ricinus communis* und das toxischste RIP Volkensin aus der Pflanze *Adenia volkensis*. Ricin ist aufgrund seiner hohen Toxizität und der leichten Zugänglichkeit und Produktion auf der Biowaffenliste der US-Seuchenbehörde CDC. Es ist bisher kein Gegenmittel bei Ricin-Intoxikation bekannt.

In den beiden verwendeten Zelllinien konnte die Depurinierung der 28S rRNA intrazellulär durch 24-stündige Behandlung mit Riproximin oder Ricin nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz wurden auch zwei der drei bekannten UPR-Signalwege, nämlich die von ATF6 und PERK ausgehenden Signalkaskaden, durch 24-stündige Behandlung mit Riproximin, Ricin oder Volkensin auf RNA- und Proteinebene aktiviert. Der dritte UPR-Weg, der das Spleißen von XBP-1 durch die Endoribonuklease-Funktion von IRE1 involviert, wurde durch RIP-Therapie nicht aktiviert. Dem bekannten Mechanismus der irreversiblen, allgemeinen Hemmung der Translation durch Depurinierung widersprechend, wurde einige UPR- und Apoptose-assoziierte Gene auf Proteinebene hochreguliert. Diese Expressionssteigerung passt allerdings zu dem Modell der UPR, demzufolge die Phosphorylierung von eIF2 α zur Hemmung der 'Cap'-abhängigen Proteinsynthese führt, bei gleichzeitiger Hochregulierung von Genen mit speziell strukturierten mRNAs wie ATF3, das nach RIP-Exposition tatsächlich verstärkt translatiert wurde. Durch die Aktivierung der UPR lässt sich auch erklären, wie RIPs Apoptose auslösen oder wie es *in vivo* zu den inflammatorischen Reaktionen kommt, die in der klinischen Anwendung von RIPs für Nebenwirkungen sorgen. ER-Stress kann, vor allem über IRE1, verschiedene Apoptose-Routen aktivieren und die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen anregen. Die UPR bietet sich als der Hauptwirkmechanismus an, über den RIPs ihre zytotoxische und anti-neoplastische Wirkung entfalten, da die in diesem Rahmen aktivierten Signalkaskaden alle Ergebnisse erklären und die ebenfalls nachgewiesene Depurinierung nicht zu einem vollständigen translationalen Arrest führte. Die Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass die Depurinierung bei sehr hohen Konzentrationen zum Tragen kommen könnte, da in einer Zelllinie bei der höchsten eingesetzten RIP-Konzentration ein Rückgang in der Menge des ATF3-Proteins beobachtet wurde. Um die UPR als RIP-Wirkmechanismus noch weiter zu untermauern, sollten JNK-vermittelte Signalwege und die Spaltung der ER-assoziierten Caspase-4 untersucht werden, die mit ER-Stress-induzierter Apoptose in Zusammenhang stehen. Spezifische Inhibitoren für die Hemmung der UPR könnten sich schlussendlich als Gegenmittel für Intoxikationen mit Ricin oder anderen toxischen RIPs herausstellen.

