

Helene Bayer

Dr. sc. hum.

Identifizierung von Riproximin-Isoformen aus Fruchtkernen von *Ximenia americana* und Charakterisierung ihrer Bindungseigenschaften

Promotionsfach: DKFZ

Doktorvater: Prof. Dr. M. R. Berger

Da die klassische zytostatische Chemotherapie bei metastasierenden Tumoren selten eine kurative Wirkung besitzt und mit starken Nebenwirkungen verbunden ist, basieren moderne Ansätze für ihre Weiterentwicklung auf einer zielgerichteten und individualisierten Tumortherapie. Eine Klasse von zielorientierten Molekülen stellen pflanzliche Lektine dar. Rpx als Vertreter dieser Klasse wurde kürzlich aus einem afrikanischen Pflanzenpulver aufgereinigt, welches in der Traditionellen Afrikanischen Medizin eingesetzt wird und bei einem Patienten mit Prostatakarzinom eine Remission bewirkt hatte. Später wurde Rpx aus Fruchtkernen der Pflanze *Ximenia americana* isoliert, um eine definierte und nicht limitierte Quelle zu haben.

Das aus Fruchtkernen isolierte Rpx besteht, analog zum Rpx aus Pflanzenmaterial, aus einer Mischung verschiedener Isoenzyme. Für die Entwicklung von Rpx als Tumorthapeutikum war es deshalb wichtig, die einzelnen Isoformen zu identifizieren und zu charakterisieren. Da die Rpx-Isoformen mit den Standardmethoden weder auf biochemischen noch auf molekularbiologischen Ebene identifiziert werden konnten, musste sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene auf *de novo* Sequenzierungen zurückgegriffen werden. Dabei konnten Teilstrecken zweier Isoformen identifiziert werden.

Für die Entwicklung von Rpx als zielgerichtetem Therapeutikum sollte außerdem die Zielstruktur identifiziert werden. Dafür wurde Rpx in einem Glykan-Mikroarray mit über 150 zellbasierten Zuckerstrukturen untersucht. Rpx zeigte eine Bindung an zwei unterschiedliche Strukturtypen, zum einen an die NA2/NA3-Strukturen der komplexen N-Glykane, zum anderen an die Tn3-Strukturen („clustered“ Tn) der O-Glykane und damit eine sehr enge Zuckerspezifität. „Clustered“ Tn kommen als Tumorantigene auf den Mucinen von Zellen vor, das Vorkommen der NA-Strukturen ist noch nicht vollständig charakterisiert. Außerdem konnte beobachtet werden, dass Rpx bevorzugt an nicht sialylierte Strukturen bindet.

Um die Bindung an die im Glykan-Mikroarray identifizierten Strukturen biochemisch zu validieren wurden Modellproteine stellvertretend für die einzelnen Zuckerstrukturen einge-

setzt: das Glykoprotein Asialofetuin (ASF) als Vertreter der NA2/NA3-Glykane und asialyliertes bovines submaxillares Mucin (aBSM) für die „clustered“ Tn-Strukturen. Parallel wurden die entsprechenden nativen, sialylierten Formen Fetuin (Fet) und BSM verwendet. Die Ergebnisse aus dem Glykan-Mikroarray waren in den direkten Bindungsversuchen mit den Modellproteinen gut reproduzierbar. Kompetitive Untersuchungen mit den Modellproteinen im ELISA zeigten, dass Rpx in der Lage war die Glykoproteine ASF und aBSM gleichzeitig zu binden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstellen von Rpx unterschiedliche Spezifitäten besitzen. Trotz der hohen Affinität von ASF zu Rpx, die in den biochemischen Untersuchungen nachgewiesen wurde, war ASF in dem kompetitiven Assay nicht in der Lage, die Bindung von Rpx an aBSM deutlich aufzuheben.

Die Ergebnisse aus den biochemischen Untersuchungen sollten anschließend in zellulären Assays validiert werden. Bei MDA-MB-231-Zellen konnte eine Verstärkung der Rpx-Aktivität nach enzymatischer Modifikation der Zelloberflächen nachgewiesen werden. Damit wurde gezeigt, dass die Rpx-Aktivität abhängig von den Oberflächenstrukturen der Zellen ist.

Weiterhin wurde der kompetitive Einfluss der Modellproteine bzw. ihrer Zuckerstrukturen auf die Rpx-Zytotoxizität in zellulären Assays untersucht. Rpx wurde dabei in unterschiedlichen Zelllinien in Kombination mit ASF und aBSM bzw. den entsprechenden sialylierten Formen eingesetzt. Die hohe Affinität zu ASF, die in den biochemischen Untersuchungen nachgewiesen worden war, relativierte sich in den zellulären Versuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Rpx-Aktivität und die entsprechende Hemmung durch die Glykoproteine von der eingesetzten Zelllinie und damit von Zuckerstrukturen an deren Zelloberflächen abhängig waren. Desialylierte Strukturen zeigten im Vergleich zu den nativen, sialylierten Formen eine deutlich höhere Hemmung der Rpx-Aktivität. Da ASF und aBSM in HeLa-Zellen beide eine starke Hemmung der Rpx-Zytotoxizität gezeigt hatten, wurden diese in drei verschiedenen Kombinationen mit unterschiedlichen Wirkanteilen bezogen auf die erwartete Gesamthemmung eingesetzt und der Kombinationseffekt statistisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Hemmwirkungen beider Glykoproteine über einen breiten Konzentrationsbereich additiv verhielten. Bei höherem Wirkanteil von ASF verschob sich dieser Effekt in die antagonistische Richtung. Bei einem hohen Wirkanteil von aBSM wurde ein eher synergistischer Effekt beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Wechselwirkungen in einem komplexen System, welches an Zelloberflächen gegeben ist, nicht nur die Affinität der einzelnen Strukturen eine Rolle spielt, sondern auch die Anzahl der Interaktionspartner, die Konformation und die Wechselwirkungen der einzelnen Moleküle.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, das Zusammenspiel von Lektinen und ihren Bindungspartnern auf Zelloberflächen zu verstehen, um diese zielgerichtet für therapeutische oder diagnostische Zwecke einsetzen zu können. Das Auffinden der Bindungspartner für Rpx soll dabei helfen, eine Zielstruktur für Rpx auf Tumoren zu definieren, um dessen Entwicklung als Tumorthapeutikum zu fördern.