

ChengCheng Christine Zhang

Dr. med.

## **Intrazelluläre Mechanismen des HMGB1-induzierten Zelltodes in kolorektalen Karzinomen**

Fach/Einrichtung: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Wilfried Roth

Kolonkarzinome sind weltweit die zweithäufigste Karzinomart und die dritthäufigste Krebstodesart. Besonders metastasierte Kolonkarzinome, die in über 30% der Fälle bereits bei der Erstdiagnose vorliegen, haben eine ungünstige Prognose. Daher ist die Entwicklung neuer experimenteller Therapieansätze, die auf einem verbesserten tumorbiologischen Verständnis aufbauen, essentiell.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung des Nekrose-assoziierten Proteins High-mobility group box 1 (HMGB1) auf humane Kolonkarzinomzellen untersucht werden.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten in Glioblastomzellen bereits deutliche zytotoxische Effekte des rhHMGB1 Proteins demonstriert werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HMGB1 Protein auch auf Kolonkarzinomzellen eine stark zytotoxische Wirkung hat. Dabei stellt der HMGB1-induzierte Zelltod eine neue Form des Zelltodes dar und unterscheidet sich grundsätzlich von bekannten Zelltodformen wie z.B. Apoptose. Charakteristisch für diese spezifische Art des Zelltodes waren die morphologischen Veränderungen der Zellen unter Behandlung mit HMGB1, die sich im Phasenkontrastmikroskop als vakuolenartige Strukturen darstellten und in elektronen-mikroskopischen Aufnahmen als Riesenmitochondrien identifiziert werden konnten. Die beobachtete HMGB1-abhängige Zytotoxizität sowie die Bildung der Riesenmitochondrien konnte partiell durch das antiinflammatorische und antivirale Triperthen Glycyrrhizin blockiert werden, das als Inhibitor von HMGB1 wirkt. Die Behandlung mit HMGB1 resultierte in einer starken Zunahme von reaktiven Oxygen Spezies (ROS). In der Folge konnten weder eine Aktivierung der Caspasen nachgewiesen werden, noch eine Freisetzung von Cytochrom C. Stattdessen wurde eindeutig gezeigt, dass das HMGB1 Protein an die mitochondrialen Markerproteine Cytochrom C sowie COX IV bindet, ohne diese jedoch zu degradieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Interaktionen des HMGB1 Proteins mit apoptotischen Zelltodmechanismen untersucht werden. Eine Überexpression von Bcl-2 als anti-apoptotisches und Mitochondrienmembran stabilisierendes Protein bewirkte eine signifikante Reduktion der durch HMGB1-induzierten Zytotoxizität. Auch die Menge an freigesetzten ROS wurde durch Bcl-2 signifikant reduziert. Ein wichtiges Ergebnis bestand in der sehr ausgeprägten synergistischen Wirkungsverstärkung der Apoptose Induktoren ABT-737 bzw. TRAIL in Kombination mit rhHMGB1. Doch nicht nur das rekombinante HMGB1 führte zu einer erhöhten Sensitivität für Zytostatika-induzierten Zelltod, sondern auch das endogene HMGB1. Bei einer Überexpression von endogenem HMGB1 konnte ebenfalls eine signifikant stärkere Zytotoxizität im Rahmen einer Behandlung mit TRAIL und ABT-737 beobachtet werden. Der HMGB1-Inhibitor Glycyrrhizin konnte auch bei diesen Versuchen eine Reduktion der Zytostatika- und HMGB1-induzierten Zytotoxizität bewirken.

Dass der alleine durch rhHMGB1-induzierte Zelltod keine Apoptose-typischen Charakteristika aufweist, wurde durch unterschiedliche Untersuchungen untermauert. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-2 signifikant protektive Effekte auf den rhHMGB1-induzierten Zelltod bewirkte, dennoch kam es weder zu einer Aktivierung der Effektorcaspase 3 als Schlüsselenzym der Apoptose noch zu einer Freisetzung des Cytochrom C als Signal von mitochondrialem Stress in das Zytosol. Interessanterweise konnte eine Bindung von endogenem HMGB1 an die mitochondrialen Proteine Cytochrom C und COX IV nachgewiesen werden. Ein weiteres Charakteristikum des HMGB1-induzierten Zelltodes ist die Generation von ROS in den Mitochondrien. Diese ROS Produktion ist offenbar ein wichtiger Faktor für die Zytotoxizität des HMGB1 Proteins, da durch die partiell protektiv wirksame Bcl-2 Überexpression eine verminderte Bildung von ROS nachgewiesen wurde. Insgesamt scheinen die Mitochondrien also nicht zuletzt durch ihre morphologischen Veränderungen eine besondere Rolle in dem HMGB1-vermittelten Zelltod zu spielen und zentraler Angriffspunkt der beobachteten Zytotoxizität zu sein. In Zusammenschau unserer Ergebnisse löst also HMGB1 alleine zwar keinen apoptotischen Zelltod aus, kann jedoch über Mitochondrien abhängige Mechanismen die Kolonkarzinomzellen für klassische Apoptose sensibilisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem die Expression von HMGB1 in humanen Kolonkarzinomen untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass eine fehlende oder verminderte Expression von endogenem HMGB1 mit einer schlechteren Tumordifferenzierung und einem aggressiveren Metastasierungsverhalten assoziiert ist. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HMGB1 eine wichtige tumorbiologische Rolle bei Kolonkarzinomen spielt.

Zusammengefasst eröffnen die in dieser Arbeit erhobenen Daten die Möglichkeit, endogenes wie rekombinantes HMGB1 als einen wichtigen Ansatzpunkt einer experimentellen Therapie metastasierter Kolonkarzinome in Betracht zu ziehen. Nach weiterer Aufklärung der genauen Wirkweise des HMGB1 Proteins sowie abhängig von Ergebnissen zukünftiger Untersuchungen zu möglichen Nebenwirkungen, könnte das HMGB1 Protein in Zukunft auch therapeutisch zur Behandlung von Kolonkarzinomen genutzt werden.