

Cristina Ileana Voss  
Dr. sc. hum.

## **Identifizierung und Charakterisierung des antineoplastischen Wirkstoffs Riproximin, ein neues Ribosomen-inaktivierendes Protein vom Typ 2 aus *Ximenia americana***

Geboren am 03 Januar 1969 in Brasov, Rumänien  
Diplom der Fachrichtung Technologische Biochemie in Juli 1992 an der Universität Bukarest, Rumänien

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)  
Doktorvater: Professor Dr. med. Martin R. Berger

Ein Pflanzenmaterial unbekannter Zusammensetzung, das in der traditionellen afrikanischen Heilkunde Verwendung findet, zeigte in ersten Untersuchungen eine hohe antineoplastische Aktivität *in vitro*. Dadurch ausgelöste Untersuchungen an einer Reihe von 16 humanen und einer Ratten-Tumorzelllinie wiesen für den wässrigen Extrakt eine hohe, jedoch selektive antineoplastische Wirkung nach. Am empfindlichsten gegenüber der Extrakt-Behandlung waren die Estrogen-Rezeptor-positiven MCF7 Mammakarzinom-, die BV173 chronisch-myeloischen Leukämie- und die CC531 Ratten-Kolonkarzinom-Zellen, für die 1,7, 1,8 bzw. 3,3 µg Pflanzenmaterial / ml ausreichten, um das Wachstum der Zellen um 50% gegenüber der Kontrolle zu inhibieren (IC<sub>50</sub>). Der IC<sub>50</sub>-Wert der chronisch-myeloischen Leukämie Zelllinie AR230, die am wenigsten sensitiv gegenüber der Therapie reagierte, lag mit 170 µg/ml ca. 100-fach höher. Der IC<sub>50</sub> Mittelwert aller Zelllinien lag bei 49 µg/ml.

Darüber hinaus wurde die *in vivo* Wirkung des Extrakts wurde in einem Ratten-Lebermetastasen-Modell untersucht, das auf der hochempfindlichen Zelllinie CC531 aufbaute. Eine ausgeprägte antitumorale Wirkung wurde sowohl nach peroraler wie auch nach intraperitonealer Behandlung mit 100 bzw. 5 mg Pflanzenmaterial/kg Körpergewicht beobachtet.

Die physikalisch-chemische Charakterisierung des/der Wirkstoffs(e), gefolgt von Untersuchungen auf Substanzklassen-spezifische Merkmale, wiesen auf ein Protein hin. Zur Purifizierung wurde ein mehrstufiges Auftrennungsprotokoll etabliert, das mit einer Affinitätschromatographie-Stufe endet. Die so aufgereinigte Probe zeigte eine ausgesprochen hohe zytotoxische Wirkung gegenüber MCF7 Zellen (IC<sub>50</sub> = 0.2 ng/ml). Mittels SDS-PAGE wurden als deren Hauptbestandteile zwei heterodimerische Proteine identifiziert. Aus 1g Pflanzenmaterial wurden 60-110µg Proteinprobe gewonnen.

Eines dieser Proteine wurde massenspektrometrisch analysiert. Der Vergleich der massenspektrometrischen Daten mit Protein-Datenbanken ergab keine Übereinstimmung, was bedeutet, dass das aus dem afrikanischen Pflanzenmaterial aufgereinigte Protein bislang unbekannt ist. Die *de novo* aus den Massenspektren bestimmte Sequenz von drei kurzen tryptischen Peptiden zeigte aber eine erkennbare Homologie zu bekannten Protein-Sequenzen von Vertretern der Klasse der Ribosomen-inaktivierenden Proteine (RIPs) vom Typ 2. Auf Basis der ermittelten Peptid-Sequenzen wurden degenerierte Primer entworfen, mit deren Hilfe ein etwa 450 bp langes PCR-Fragment von aus dem Pflanzenmaterial gewonnener DNA amplifiziert wurde. Die in Protein übersetzte Sequenz dieses 450 bp Fragments bestätigte die Homologie des neu identifizierten Proteins zu bekannten Proteinen aus der Klasse der RIPs vom Typ 2.

Aus der gleichen DNA wurde das Gen für die große Untereinheit der Ribulose bis-Phosphat Carboxylase (*rbcL*) amplifiziert und sequenziert. Basierend auf dieser Sequenz wurde durch eine phylogenetische Analyse nachgewiesen, dass das Pflanzenmaterial von *Ximenia americana*, einer semiparasitischen, tropischen Pflanze, stammte. Nüsse der *Ximenia americana* beinhalten eine hohe antineoplastische Aktivität ( $IC_{50} = 33 \text{ ng/ml}$ ) mit einer Form der Konzentration-Wirkungskurve, welche der des wässrigen Extrakts sehr ähnlich war. Der ca. 50-fache Unterschied in der Wirkung weist darauf hin, dass in dem afrikanischen Pflanzenmaterial Pflanzenteile mit unterschiedlich hohem Wirkstoffgehalt gemischt wurden.

Auf RNA, gewonnen aus frischen Blättern von *Ximenia americana*, war es möglich, die komplette cDNA-Sequenz (1878 bp) des neu identifizierten Proteins, ausgehend von den bekannten 450 bp, mittels 3' und 5' RACE zu bestimmen. Die davon abgeleitete Proteinsequenz (601 Aminosäuren) zeigte alle Merkmale eines Precursors für ein Ribosomen-inaktivierendes Protein vom Typ 2. Als Name wurde in Anlehnung an den Pflanzenamen die Bezeichnung **Riproxim**in gewählt.

Erste Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Riproxim in zeigten eine deutliche Inhibition der Proteinsynthese in zellfreien Lysaten. Per Microarray-Untersuchung wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, deren Expression durch die Behandlung mit Riproxim in beeinflusst wird. Western-Blot-Untersuchungen gewährten einen ersten Einblick in den zeitlichen Verlauf der Proteinexpression bei Riproxim in-Behandlung. Die beobachteten Veränderungen stehen in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Untersuchungen zum Wirkmechanismus anderer RIPs vom Typ 2. Diese Untersuchungen stellen die Grundlage für eine weitergehende, gezielte Analyse der durch Riproxim in-Exposition betroffenen zellulären Stoffwechselwege dar.

Aus dieser Arbeit wird deutlich, dass sowohl Riproxim in als auch Riproxim in-haltige *Ximenia*-Extrakte ein hohes antineoplastisches Potential aufweisen, das in einer zukünftigen Medikamentenentwicklung für die Krebstherapie ausgenutzt werden sollte.