

Barbara Christina Behm
Dr. med.

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. med. Martina Müller-Schilling

Charakterisierung der alpha-Amanitin-induzierten Apoptosesignalwege - neue Therapieoptionen und die Bedeutung des Antidots Silibinin bei Knollenblätterpilzvergiftungen

α -Amanitin, das Gift des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), verursacht massiven Leberzellschaden und führt in fulminanten Verläufen zu akutem Leberversagen. Seine Toxizität ist auf die Blockade der Transkription und folglich der Proteinbiosynthese zurückzuführen. Wir konnten die Tumorsuppressorproteine p53, p63 und p73 als die zentralen Regulatoren in α -Amanitin-vermittelter Apoptose der Leberzellen identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben und charakterisieren wir erstmals die durch α -Amanitin induzierten Apoptosesignalwege und definieren hierdurch weitere mögliche therapeutische Interferenzen bei α -Amanitin-Intoxikationen.

α -Amanitin induziert *in vitro* zeit- und konzentrationsabhängig die Akkumulation von p53, p63 und p73. Stimulationsexperimente der Todesrezeptoren zeigen, dass α -Amanitin den Todesrezeptor-vermittelten Apoptosesignalweg induziert. Ferner zeigen wir, dass α -Amanitin den extrinsischen Apoptosesignalweg über die Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R2 p53/p63/p73-abhängig aktiviert. Dies erfolgt durch die Translokation von intrazellulär gespeicherten CD95- und TRAIL-R2-Rezeptoren auf die Zelloberfläche. Zusätzliche Blockadeversuche mit dem Caspaseinhibitor ZVAD-fmk zeigen, dass sowohl Initiator- als auch Effektor-Caspasen involviert sind.

In weiterführenden Untersuchungen zeigen wir, dass α -Amanitin-vermittelte Apoptose durch RNA-Interferenz mit der p53-Familie deutlich gehemmt wird. Jenseits seiner wichtigen Rolle als transkriptioneller Aktivator von Apoptose beschreiben wir hier folglich eine wesentliche Funktion der p53-Familie in der Transkriptions-unabhängigen Induktion von Apoptose.

Von weiterer klinischer Bedeutung bewirkt die Blockade des Todesrezeptor-vermittelten (extrinsischen) Signalweges einen beachtlichen protektiven Effekt auf α -Amanitin-exponierte Zellen. Durch den Einsatz von Todesrezeptorblockern und dominant negativem FADD, welches den Todesrezeptor-vermittelten Signalweg blockiert, wird die Apoptoserate signifikant gesenkt.

Darüber hinaus beschreiben wir die therapeutische Wirkung des Antidots Silibinin in α -Amanitin-exponierten Zellen. Die Behandlung mit Silibinin führt zu einem signifikanten Rückgang der Apoptoserate. Neben seiner Eigenschaft als Membranstabilisator und Antioxidanz beschreiben wir hier erstmals wesentliche Funktionen von Silibinin im Zytoplasma. Silibinin führt zu einer deutlichen Induktion von anti-apoptotischem MDM-2 und einer Herunterregulation des Tumorsuppressorproteins p53 sowie von aktivierten Caspasen in α -Amanitin-behandelten Zellen.

α -Amanitin induziert Apoptose über den extrinsischen Apoptosesignalweg und aktiviert die p53-Familie als zentralen, Transkriptions-unabhängigen Regulator der Apoptosesignalkaskaden. Wir haben Möglichkeiten gezielter therapeutischer Interventionen identifiziert und können die Apoptoserate in primären humanen Hepatozyten damit deutlich verringern.

Somit ergeben sich neue Therapieoptionen bei Knollenblätterpilzvergiftungen aus der Interferenz mit p53, p63 und p73 sowie durch die Blockade der Todesrezeptoren und Caspasen.