

Ahmed Murtaja

Dr. med.

Antineoplastische Wirkung von Riproximin: *in vitro*- und *in vivo*- Untersuchungen an einer Pankreaskarzinomzelllinie der Ratte

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum DKFZ

Doktorvater: Prof. Dr. Martin R. Berger

Die Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Riproximin mit dem MTT-Assay zeigte eine deutliche Sensitivität aller untersuchten Zellen (ASML- MZL, Klon 3, Klon 5 und Klon 10) gegenüber Riproximin, dem neuen Ribosomen- inaktivierenden- Protein (RIP) vom Typ- 2. Das neue Zytostatikum zeigte eine unterschiedliche Wirkung auf die jeweiligen Zellen. Nach 24-stündiger Behandlung mit Riproximin reagierten die Zellen des Klons 5 am empfindlichsten ( $IC_{50} = 10,4 \text{ pM}$ ), gefolgt von den Zellen des Klons 2 ( $IC_{50} = 32,5 \text{ pM}$ ), denen der MZL ( $IC_{50} = 64,5 \text{ pM}$ ) und denen des Klons 10 ( $IC_{50} = 171,5 \text{ pM}$ ). Die  $IC_{50}$  verringerte sich mit zunehmender Inkubationszeit. Nach 96 Stunden zeigten die Zellen des Klons 5 die höchste Empfindlichkeit ( $IC_{50} = 0,8 \text{ pM}$ ), die Zellen der MZL hatten eine  $IC_{50}$  von  $3,6 \text{ pM}$ . Die  $IC_{50}$ - Werte von Klon 10 und Klon 2 lagen bei  $8,5 \text{ pM}$  und  $11,3 \text{ pM}$ .

Durch die Western- blot Analyse konnte eine Aktivierung der Caspasen 8 und 9 durch proteolytische Spaltung gezeigt werden. Außerdem konnte eine Expressionserhöhung von ATF3 und Caspase 3 gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass Riproximin die Apoptose der Tumorzellen über den Todes-Rezeptor-, mitochondrialen und ER- Streß-induzierten Signalweg einleiten kann. Dies konnte anhand der PCR- Analyse bestätigt werden. Hier wurde gezeigt, dass Riproximin die Expression der meisten Apoptose- Gene steigert, während die Expression von wenigen gehemmt wird. Eine synergistische Steigerung des antiproliferativen Effektes von Riproximin um das 6 fache konnte in Kombination mit Trail (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand), einem Mitglied der TNF- Familie, erreicht werden.

Um das Tumorwachstum *in vivo* zu kontrollieren, wurden die ASML- Pankreaskarzinomzellen mit den Markergenen eGFP und Luciferase transfiziert. Die Proliferationsrate dieser Tumorzellen änderte sich nicht nach der Transfektion mit diesem Plasmid. Nach intraperitonealer Gabe von  $50 \text{ mg/kg}$  Luciferin wurden von den markierten Tumorzellen Lichtemissionen freigesetzt, die mit einer Kamera (IVIS Imaging<sup>TM</sup>100)

detektiert werden konnten. Die Intensität der emittierten Lichtsignale korrelierte mit dem Tumorwachstum.

Um die antineoplastische Wirkung von Riproximin *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Lebermetastasen- Modell der Ratte etabliert. In diesem orthotopen, isogenen Transplantationsmodell bildeten  $6 \times 10^6$  ASML- Zellen nach der Inkulation in die vena mesocolica zuverlässig diffuse, multilobuläre Lebermetastasen in der Nacktratte. Ohne Therapie führten diese spätestens nach drei bis vier Wochen zum Tod des Tieres. Riproximin wurde in verschiedenen Dosierungen und Applikationsformen verabreicht. Die Bolusgabe von  $3,4 \mu\text{g/kg}$  Riproximin intravenös, peroral oder intraperitoneal wirkte toxisch auf die mit Tumorzellen transplantierten Tiere. Die intravenöse Injektion von  $1,7 \mu\text{g/kg}$  dreimal täglich jeden zweiten Tag führte zur Verlängerung der Überlebenszeit der Nacktratten um 18 %, das Lebergewicht dieser Tiere wurde um 50 % reduziert verglichen mit dem Lebergewicht der unbehandelten Tiere ( $p < 0,01$ ). Die intraperitoneale Gabe von  $1,7 \mu\text{g/kg}$  Rpx jeden zweiten Tag für 20 Tage war ähnlich wirksam, die mittlere Überlebenszeit verlängerte sich um 30 % und das mittlere Lebergewicht verringerte sich um 50 % verglichen mit der Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

Die perorale Therapie mit  $10 \text{ mg/kg}$  Dinalin war nahezu unwirksam, die mittlere Überlebenszeit war nur zwei Tage länger als bei den unbehandelten Tieren, das Lebergewicht war ca. 2 g geringer als bei der Kontrolle. Die Kombinationstherapie mit  $5 \text{ mg/kg}$  Dinalin und  $1,7 \mu\text{g/kg}$  Riproximin war weniger wirksam als die Monotherapie mit Rpx: die mittlere Überlebenszeit war um 5 Tage kürzer und das Lebergewicht war um 6 g höher als bei der Monotherapie mit Rpx. Die intraperitoneale Gemcitabintherapie mit einer Dosis von  $50 \text{ mg/kg}$  einmal wöchentlich für zwei Wochen zeigte vergleichbare Ergebnisse wie die Therapie mit  $1,7 \mu\text{g/kg}$  Rpx jeden zweiten Tag für 20 Tage. Die Kombinationstherapie von Rpx und Gemcitabin war weniger wirksam als die jeweilige Monotherapie.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Riproximin für die Therapie des Pankreaskarzinoms Potenzial besitzt.