

## **Abstract**

The treatment of Neuroblastoma (NB) is still very difficult and the search for new modalities of therapy is of great significance. The fungal antibiotic cerulenin and human anti-NB IgM antibodies have recently been identified in our group as potent mediators of cytotoxicity in NB cells, apparently by induction of apoptosis (David 1996; Heiligtag 1998).

The initial characterization of the involved apoptotic pathway and the identification of potential receptors/targets, respectively, were performed in this study.

Cerulenin was identified as a potent inducer of apoptosis in a variety of tumor cells by both the externalisation of phosphatidylserine residues and the cleavage of PARP with NB cell lines showing a particular high sensitivity. The induction of apoptosis by cerulenin is apparently independent of its function as noncompetitive inhibitor of fatty acid synthase (FAS). The amount and the endogenous activity of FAS did not show any relationship to the sensitivity of the respective cell lines against cerulenin. Furthermore the dose-dependent effects of cerulenin regarding inhibition of FAS activity and induction of apoptosis were contrary.

The DNA-damaging potential of cerulenin was then demonstrated by overexpression of the tumor suppressor protein p53 as well as of the growth arrest & DNA-damage-inducible protein 153 (GADD153). However, induction of apoptosis and regulation of the p53 responsible gene products p21/WAF and Bax are independent of p53. The apparent loss of p53 function is probably due to differences in post-translational modifications since cytoplasmatic sequestering could be excluded as reason for p53 nonfunctionality and comparison with the effects of the known DNA damaging drugs doxorubicin and etoposide showed similar increases in p53 levels. The induction of apoptosis involved the early mitochondrial release of cytochrome C independent of overexpression of

## Abstract

---

Bax at this time and the subsequent activation of caspases 9 and 3, but not of caspase 8. A strong overexpression of Bax was observed in the most susceptible cell lines including all NB cell lines at later time points. The NB cell lines showed furthermore the development of an additional band of 18 kDa, apparently a recently described more cytotoxic cleavage product of Bax. This cleavage product appears to be necessary for the mitochondrial breakdown in the cerulenin system. Since induction of apoptosis is independent of the p53 status as well as of caspase 8 cerulenin is a very promising new agent in the treatment of cancer, in particular NB.

In the IgM mediated apoptosis two potential receptors had been identified by immunoblot analysis, namely hsp 90 and a so far unknown protein termed NB-p260 and were now more thoroughly characterized. It was verified that hsp 90 might function as apoptosis-mediating cell surface receptor, but since preadsorption experiments had shown that its ability to inhibit IgM mediated apoptosis was small compared to that of NB-p260, the latter appears to be the predominant apoptosis-mediating receptor.

For the molecular characterization of NB-p260, the protein was purified to homogeneity by sequential anion, cation exchange and hydroxyapatite chromatography as well as preparative gelelectrophoresis. NB-p260 was then unambiguously identified by both MALDI-MS and N-terminal sequence analysis to be comprised of two different actin-binding proteins, ABP-278 and ABP-280. However, only the recently identified ABP-278 but not ABP-280 was presented on the surface of LAN-1 NB cells as measured by biotinylation analysis. The apoptosis-mediating capability of NB-p260 was confirmed by preadsorption experiments of anti-NB IgM antibodies with the purified protein that resulted in the complete abolishment of induction of apoptosis by anti-NB IgM. The involved apoptotic pathway induced by binding of IgM is not mediated by caspase 8, but probably by the stress-activated protein kinase pathway.

## Zusammenfassung

Die Behandlung des Neuroblastoms (NB) ist nach wie vor außerordentlich schwierig, weswegen die Suche nach neuen Therapieformen von größter Bedeutung ist. Das Pilzantibiotikum Cerulenin sowie humane anti-NB IgM Antikörper wurden kürzlich in unserer Gruppe als potente Vermittler von Zytotoxizität in NB-Zellen identifiziert, wahrscheinlich durch Induktion der Apoptose (David 1996; Heiligtag 1998).

Die initiale Charakterisierung der dabei involvierten apoptischen Signalwege und die Identifizierung möglicher Rezeptoren bzw. Zielstrukturen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Cerulenin konnte mittels der Externalisierung von Phosphatidylserin-Resten und der Spaltung von PARP als potentes Apoptose-auslösendes Agens in verschiedensten Tumorzelllinien identifiziert werden, wobei sich humane NB Zelllinien durch eine besondere Anfälligkeit auszeichneten. Die Auslösung der Apoptose scheint unabhängig von der Funktion Cerulenins als nichtkompetitiver Inhibitor der humanen Fettsäuresynthase (FAS) zu sein. Weder die Expression noch die endogene Aktivität der FAS korrelierten mit der Sensitivität gegenüber Cerulenin. Darüber hinaus waren die dosis-abhängigen Effekte von Cerulenin auf die Inhibierung der FAS-Aktivität und der Induktion der Apoptose gegenläufig.

Das DNA-schädigende Potential von Cerulenin konnte dann mittels der Überexpression des Tumorsuppressor-Proteins p53 und des „growth arrest & DNA-damage-inducible“ Proteins 153 (GADD153) gezeigt werden. Allerdings waren die Induktion der Apoptose und die Regulierung der p53 induziblen Genprodukte p21/WAF und Bax p53-unabhängig. Dieser offensichtliche Verlust der p53-Funktion ist wahrscheinlich durch post-translationale Modifikationen verursacht, denn sowohl cytoplasmatische Sequestrierung als auch die Akkumulation zu geringer Mengen an p53 konnten durch Vergleich mit den bekannt DNA-schädigenden Substanzen Doxorubicin und Etoposid als Gründe für die Nichtfunktionalität von p53 ausgeschlossen werden.

## Zusammenfassung

---

Die Induktion der Apoptose ging einher mit der frühen mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C und der nachfolgenden Aktivierung der Caspase 9 und 3, während Caspase 8 nicht beteiligt war. Eine Überexpression von Bax konnte allerdings erst später und nur in den anfälligsten Zelllinien, u.a. allen NB Zelllinien, beobachtet werden. Des Weiteren trat exklusiv in allen NB Zelllinien zusätzlich eine weitere Bande von 18 kDa auf, bei der es sich wahrscheinlich um ein kürzlich beschriebenes cytotoxischeres Spaltprodukt von Bax handelt. Dieses Spaltprodukt scheint im Falle des Cerulenins für den Zusammenbruch der Mitochondrien verantwortlich zu sein. Da die Induktion der Apoptose sowohl vom p53 Status als auch von Caspase 8 unabhängig ist, stellt Cerulenin ein vielversprechendes neues Agens in der Krebsbehandlung und dabei insbesondere beim NB dar.

Bei der IgM-vermittelten Apoptose waren zwei potentielle Rezeptoren mittels Immunoblotanalyse identifiziert worden, hsp 90 und ein bisher unbekanntes als NB-p260 bezeichnetes Protein, die im Rahmen dieser Untersuchungen genauer charakterisiert werden sollten. Es konnte bestätigt werden, daß hsp 90 als Apoptose-vermittelnder Zelloberflächenrezeptor agieren könnte. Allerdings haben Preadsorptionsexperimente gezeigt, daß die Fähigkeit von hsp 90 die IgM-vermittelte Apoptose zu inhibieren im Verhältnis zu der des NB-p260 klein ist, weswegen das NB-p260 als der dominante Apoptose-vermittelnde Rezeptor angesehen wird. Zur Charakterisierung des NB-p260 wurde das Protein mittels Anionenaustausch-, Kationenaustausch- und Hydroxylapatit-Chromatographie sowie preparativer Gelelektrophorese vollständig gereinigt und anschließend mittels MALDI-MS und N-terminaler Sequenzierung als Mischung aus ABP-278 und ABP-280 identifiziert. Allerdings konnte nur das kürzlich identifizierte ABP-278, nicht aber ABP-280 mittels Biotinylierungsanalyse auf der Oberfläche von LAN-1 NB Zellen nachgewiesen werden. Die Apoptose-vermittelnde Wirkung des NB-p260 konnte über Preadsorptionsversuche mit dem gereinigten Protein nachgewiesen werden, die zum vollständigen Verlust der Induktion der Apoptose durch anti-NB IgM führten. Der beteiligte apoptotische Signalweg ist unabhängig von Caspase 8 und scheint über den Stress-aktivierten Protein-Kinase (SAPK) Weg zu laufen.