

Kerstin Beate Grund

Dr. med.

Sensibilisierung von Tumorzellen für TRAIL-induzierte Apoptose durch den Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ -Agonisten Troglitazon

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Wilfried Roth

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit zellulären Resistenzmechanismen maligner Tumoren gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Mittels Kombinationsbehandlung mit dem als Antidiabetikum eingesetzten PPAR γ -Agonisten Troglitazon wurden Möglichkeiten zur Überwindung der Apoptoseresistenz evaluiert sowie die zu Grunde liegenden Mechanismen analysiert. In den untersuchten Glioblastom-, Kolonkarzinom- und Neuroblastomzelllinien konnte durch die Behandlung mit dem bereits in klinischen Studien erprobten Todesliganden TRAIL Caspase-abhängige Apoptose induziert werden. Die TRAIL-vermittelte Apoptose wurde negativ reguliert durch die Expressionspiegel der antiapoptotischen Proteine FLIP-L, FLIP-S und Survivin. In geringerem Ausmaß erwies sich die Überexpression von FLIPL als Resistenzfaktor auch gegenüber zytostatischer Behandlung. Der durch Troglitazon induzierte Zelltod war dagegen unabhängig von Caspasen.

Durch eine Kombination des Todesliganden TRAIL mit dem PPAR γ -Agonisten Troglitazon ließ sich ein deutlich synergistischer Effekt bezüglich Zelltod und Caspasen-Aktivierung in allen untersuchten Tumorzelllinien bewirken. In der immortalisierten, nicht-neoplastischen Astrozytenzelllinie SVFHAS zeigte sich hingegen keine Sensibilisierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch Troglitazon. Dieses Ergebnis bestätigt die postulierte Selektivität der Toxizität von TRAIL gegenüber maligne entarteten Zellen, welche auch durch eine Kombination mit Troglitazon nicht beeinflusst wird.

Des Weiteren erfolgte eine Analyse der zellulären Mechanismen der Troglitazon-induzierten Sensibilisierung für TRAIL-vermittelte Apoptose. Im Rahmen einer Analyse der Oberflächenexpression von Todesrezeptoren nach Behandlung mit Troglitazon zeigte sich eine deutliche Steigerung der Expression des agonistisch wirksamen TRAIL Rezeptors TRAIL-R2. Die Rezeptoren TRAIL-R1, TRAIL-R3 und TRAIL-R4 wurden dagegen in den untersuchten Tumorzelllinien nur schwach exprimiert. Zur Charakterisierung der Troglitazon-induzierten intrazellulären Regulationsmechanismen wurde eine vergleichende Expressionsanalyse verschiedener antiapoptotischer Proteine in behandelten und unbehandelten Tumorzellen durchgeführt. Es zeigte sich eine Troglitazon-abhängige Suppression der antiapoptotischen Proteine FLIPL, FLIP-S und Survivin. Während die Expression von Survivin sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene durch Troglitazon reguliert wurde, erwies sich die Troglitazon-vermittelte Suppression der

FLIP-Expression als rein posttranslational vermittelt. Als möglicher Mechanismus der Troglitazon-induzierten Suppression von c-FLIP wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Troglitazon auf den Oxidationsstatus von Tumorzellen untersucht. Die Ergebnisse belegen eine Abhängigkeit der Suppression von c-FLIP von einem vermehrten zytosolischen Gehalt reaktiver Sauerstoffradikale nach Behandlung mit Troglitazon. Insbesondere bezüglich der antitumoralen Wirkung werden zunehmend auch PPAR γ -unabhängige Effekte durch Troglitazon beschrieben. Da eine Expression des klassischen Glitazon-Rezeptors PPAR γ in den untersuchten Zelllinien auf sehr unterschiedlichem Niveau und in der Glioblastomzelllinie U251 nicht nachzuweisen war, ist in Bezug auf die proapoptotischen Effekte einer Troglitazon-Behandlung von einer PPAR γ -unabhängigen Wirkung auszugehen.

Neben proapoptotischen Effekten einer Troglitazon-Behandlung zeigten sich in dieser Arbeit auch antiapoptotische Effekte und somit eine ambivalente Wirkung des PPAR γ -Agonisten Troglitazon auf Tumorzellen. Unabhängig von der Alteration der c-FLIP Expression erwies sich die antiapoptotische Wirkung als pERK1/2- und pBAD-vermittelt und abhängig von einer Aktivierung des intrazellulären Rezeptors PPAR γ durch Troglitazon. Im Rahmen einer Analyse der subzellulären Lokalisation von pERK1/2 nach Behandlung mit Troglitazon konnte eine Blockierung der nukleären Translokation von pERK1/2 durch aktiviertes PPAR γ demonstriert werden. Daraus folgt die Hypothese, dass das vermehrt zytosolisch lokalisierte pERK1/2 das BAD-Protein phosphorylieren kann, welches infolgedessen seine proapoptotische Funktion nicht mehr ausüben kann. Durch eine Koinkubation mit dem MEK1-Inhibitor U0126 sowie mit dem PPAR γ -Inhibitor BADGE konnte sowohl die Troglitazon-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 als auch von BAD inhibiert werden. Während bereits die Kombination des Todesliganden TRAIL mit dem Antidiabetikum Troglitazon eine synergistische Zytotoxizität in Tumorzellen gezeigt hatte, konnte die Zytotoxizität im Rahmen dieser Arbeit durch eine Dreifach-Kombination mit Inhibitoren des MAP Kinase Signalweges beziehungsweise des Rezeptors PPAR γ weiter deutlich verstärkt werden.

Sowohl TRAIL, Troglitazon als auch Inhibitoren des MAP-Kinase Signalweges werden derzeit in klinischen Studien als Einzelsubstanz oder in Kombination mit anderen Substanzen untersucht. Vorbehaltlich einer guten Verträglichkeit aller drei Substanzgruppen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit eine weitere Evaluation einer entsprechenden Dreifach-Kombination.