

Sarah Gagiannis

Dr. med.

Die Rolle von Parathormon-related Peptid (PTHrP) in der Onkologie und des Parathormonrezeptors Typ 1 (PTH1R) in der Apoptose

Geboren am 05.09.1981 in Mainz

2. Ärztliche Prüfung am 23.06.2008 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. T. Schilling

Parathormon-related Protein (PTHrP) wird in nahezu jeder menschlichen Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt in Entwicklung, Differenzierung und Wachstum exprimiert und nimmt vielfältige Aufgaben als parakriner, autokriner oder auch intrakriner Wirkstoff wahr.

Durch seine N-terminale Homologie zu PTH kann PTHrP zudem durch Bindung an den Parathormonrezeptor Typ 1 als Kalziumregulator agieren. Aufgrund dieser endokrinen Wirkungsweise ist PTHrP vor allem als Effektor des paraneoplastischen Syndroms der Tumorhyperkalzämie bekannt geworden. Klinisch zeigen Patienten, die unter Tumorhyperkalzämie leiden, eine ausgeprägte Therapieresistenz und eine ungünstige Prognose. Neueste Forschungsergebnisse legen nahe, dass hierfür meist defiziente Apoptosesignalwege ursächlich sind. So konnte sowohl in früheren als auch aktuellen Untersuchungen ein antiapoptotischer Effekt von PTHrP gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals ein detailliertes Modell der Interferenz von PTHrP mit multiplen und zentralen Apoptosesignalwegen beschrieben und hierdurch das onkogene Potential von PTHrP definiert.

Humane Osteosarkomzellen exprimieren den Parathormonrezeptor Typ 1. In unseren Untersuchungen lösten wir gezielt den programmierten Zelltod aus. Dies erreichten wir durch chemotherapeutische Behandlung oder adenoviralen Transfer von p53-Familienmitgliedern, einer Gruppe wichtiger Tumorsuppressoren. Wir konnten zeigen, dass sowohl N-terminale als auch C-terminale Fragmente von PTHrP die Chemotherapie- sowie p53-induzierte Apoptose hemmen. Dies bedeutet, dass PTHrP in der Lage ist, über zwei verschiedene Wege zu agieren. Über N-terminale Interaktionsprozesse wirkt es PTH1-rezeptorabhängig,

während es dagegen über das C-terminale Fragment rezeptorunabhängig wirkt. Weiterhin befassten wir uns mit wichtigen Akteuren der apoptotischen Signalkaskade und der Fähigkeit des Parathormon-verwandten Proteins diese zu hemmen. Es zeigte sich, dass PTHrP sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptosesignalweg inhibieren kann.

1) PTHrP entfaltet seine antiapoptotische Wirkung durch Inhibition der Caspasen-2, -3, -6, -8 und der Caspase-9.

2) N- und C-PTHrP inhibieren die todesrezeptorvermittelte Apoptose hauptsächlich durch Beeinflussung der Signaltransduktion der Todesrezeptorsysteme TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R und CD95-R.

3) PTHrP nimmt deutlichen Einfluss auf den mitochondrialen Apoptosesignalweg. Einerseits mindert PTHrP eine mitochondriale Membranpotentialverschiebung, die wir durch unterschiedliche chemotherapeutische Behandlung hervorgerufen haben. Andererseits interferieren die Peptide mit Bcl-2 Familienmitgliedern. Hierbei bewirkt PTHrP eine Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichts zugunsten der antiapoptotischen Familienmitglieder. Beide Fragmente führen zu einer Hochregulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl sowie zu einer Herunterregulation der proapoptotischen Familienmitglieder PUMA und Bax. Weiterhin findet eine Verminderung der p53-/ p63- oder p73- stimulierten Bax-Genaktivierung sowie eine Hemmung der Translokation von Bax aus dem Cytosol in die Mitochondrien statt.

Unsere Daten liefern eine molekulare Begründung für die onkogenen Eigenschaften von PTHrP. Sie verdeutlichen, dass PTHrP in der Lage ist, fördernden Einfluss auf die Propagation, metastatische Kapazität und Therapieresistenz von Tumoren auszuüben. Unsere Ergebnisse verweisen somit auf den Benefit, der durch einen Antagonismus von PTHrP beziehungsweise seinen Effekten in zukünftigen Therapien erreicht werden kann.

Im zweiten Teil der Arbeit haben wir die Rolle des Parathormonrezeptors Typ 1 auf die Apoptose in embryonalen Zellen untersucht. Der Parathormonrezeptor Typ 1 (PTH1R) spielt eine wichtige Rolle in Entwicklung und Differenzierung. Er kann über verschiedenste Signalwege zahlreiche Gene regulieren. Auch der programmierte Zelltod gilt als bedeutender Regulator für Entwicklung und Differenzierung. Daher überprüften wir den Einfluss des PTH1R auf die Apoptosesensitivität von embryonalen Zellen. Mit Hilfe unserer Untersuchungen wurden erstmals die durch den PTH1R beeinflussten Apoptosesignalwege näher charakterisiert.

Humane embryonale Nierenzellen ohne PTH1R (HEK) wurden mit solchen verglichen, die den PTH1R (HP1R) stabil exprimieren. Nach Apoptoseinduktion durch p53 in Kombination mit Chemotherapie oder dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin zeigte sich eine deutlich gesteigerte Apoptosesensitivität in HP1R-Zellen. Diese gesteigerte Sensitivität muss somit PTH1R-abhängig sein. Folglich besitzt der Parathormonrezeptor Typ 1 in Embryonalzellen eine proapoptotische Wirkung. Die Expression des Rezeptors wirkt fördernd auf den extrinsischen und intrinsischen Signalweg. Zudem wurden apoptosesteigernde Effekte durch Aktivierung der Caspasen-2, -3, -6, -8 und -9 beobachtet.

Ligandenstimulationsexperimente der vorherrschenden Todesrezeptorsysteme CD95-R, TNF-R und TRAIL-R ergaben eine bemerkenswerte PTH1R-abhängige Steigerung der todesrezeptorvermittelten Apoptose ohne begleitende Hochregulation der Todesrezeptoren an der Zelloberfläche. Weiterhin zeigte sich eine signifikante, PTH1R-abhängig gesteigerte, mitochondriale Membranpotentialverschiebung. Dies bestätigt die Interferenz mit dem intrinsischen Apoptosesignalweg.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass der PTH1R direkt in die Apoptoseregulation eingreift und in embryonalen Nierenzellen, im Gegensatz zu adulten Zellen, die Apoptose stimuliert.