

Aus der Klinik für Innere Medizin,
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Thomas M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Klinische Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie
Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Lankat-Buttgereit
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

Die Wirkung von Pioglitazon auf das Proteom einer humanen neuroendokrinen Pankreaskarzinom- Zelllinie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Sabine Müller
aus Miltenberg

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 15. Februar 2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Brigitte Lankat-Buttgereit

1. Korreferent: Prof. Dr. Andreas Burchert

Zusammenfassung

Neuroendokrine Tumore stellen auch heute noch sowohl ein diagnostisches als auch therapeutisches Problem dar, weswegen weiterhin intensive Forschung notwendig ist, um Patienten mit dieser Erkrankung eine höhere Chance auf Heilung zu bieten. PPAR γ -Agonisten wie Pioglitazon werden klinisch bereits in der Diabetes-Therapie eingesetzt. Es gibt allerdings Daten, die sowohl auf antikanzerogene als auch auf kanzerogene Effekte dieser Wirkstoffgruppe hinweisen. Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Pioglitazon auf das Proteom von Bon-1-Zellen untersucht, einer humanen neuroendokrinen Pankreaskarzinom-Zelllinie.

Es zeigte sich, dass Pioglitazon-Behandlung in Bon-1-Zellen zu einer vermehrten Spaltung von HSP 90 führt. HSP 90 ist ein molekulares Chaperon, das eine Schlüsselrolle in vielen Zell-Signalwegen spielt und so den Eintritt der Zelle in die Apoptose verhindern kann. Ebenso ist es maßgeblich an der Entwicklung und Aufrechterhaltung derjenigen Eigenschaften von Tumorzellen beteiligt, die zu malignem Wachstum führen. Es musste jedoch festgestellt werden, dass die vermehrte Spaltung von HSP 90 anscheinend nicht zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtmenge an HSP 90 führt, und deswegen keine Regulation von Proteinen in HSP-90-beeinflussten Signalwegen nachgewiesen werden konnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von Bon-1-Zellen mit Pioglitazon zu einer Verminderung der intrazellulären Menge an CgA und SgII führt. Dieser Effekt wird nicht durch eine verminderte Expression, sondern durch eine verstärkte Sekretion erzielt. Der gleiche Effekt wurde durch Lankat-Buttgereit et al. in einer mit Pdc4-si-RNA-transfizierten Bon-1-Zelllinie nachgewiesen. In beiden Fällen schien die gesteigerte Sekretion sowohl durch eine vermehrte Expression der Proprotein-Convertase 1 (PC1) als auch durch eine vermehrte Aktivierung der Kinase Akt, reguliert über den PI3-Kinase-Weg, bedingt zu sein. Übereinstimmend hiermit wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass Pioglitazon in Bon-1-Zellen zu erniedrigten Pdc4-Spiegeln und infolgedessen zur Aktivierung von Akt, zu gesteigerter PC1-Expression und hierdurch zu vermehrter CgA- und SgII-Sekretion führt. CgA dient als Serummarker für neuroendokrine Tumore und PC1 ist in erhöhten Mengen in verschiedenen Tumorarten zu finden. SgII ist das Vorläuferprotein von Secretoneurin

(SN) und wird durch PC1 zu diesem prozessiert. SN spielt eine Rolle bei der Hypoxie-induzierten Neovaskularisation in ischämischen Erkrankungen und soliden Tumoren. Erhöhte PC1-Spiegel unter Pioglitazon-Behandlung mögen jedoch auch zur antidiabetischen Wirkung von Pioglitazon beitragen, indem es zu einer vermehrten Prozessierung von Proinsulin und Proglucagon zu Insulin und dem insulinotrop wirkenden Glucagon-like-Peptide-1 (GLP-1) kommt. Die erzielten Ergebnisse geben weiteren Anlass zu der Auffassung, dass der klinische Einsatz von Pioglitazon erneut reevaluiert werden sollte.

Abstract

Neuroendocrine Tumors still represent a diagnostic as well as therapeutic problem. That's why further intensive research is necessary to offer patients a better chance of healing. PPAR γ -Agonists like Pioglitazone are already used in diabetes-therapy. But there is data that they may also have anti-carcinogenic as well as carcinogenic effects. Therefore, in this work the effect of Pioglitazone on the proteom of Bon-1-cells, a human neuro-endocrine cell line, was examined.

Pioglitazone leads to an increased splitting of HSP 90. This is a molecular chaperone that plays a key-role in many cell-signaling-pathways and thus can prevent entering of the cell into apoptosis. Further HSP 90 is involved in developement and maintenance of those features in carcinoma cells, which lead to malignant growth. However, the increased splitting of HSP 90 doesn't lead to a significant decrease in the total amount of HSP 90 with the result that it wasn't possible to detect a regulation of proteins in HSP 90-influenced pathways.

It was further shown that treatment of Bon-1-cells with Pioglitazone leads to a reduction of the intracellular amount of CgA and SgII. This effect isn't achieved by decreased expression but by an increased secretion. The same effect was shown by Lankat-Buttgereit et al. in a Bon-1-cell-line transfected with Pcd4-si-RNA. In both cases the increased secretion appeared to be caused by an increased expression of Proprotein Convertase 1 (PC 1) as well as by an increased activation of Akt regulated by the PI3-Kinase-pathway. Consistent with this data it could be shown that treatment with Pioglitazone of Bon-1-cells leads to a reduction of Pcd4-levels and consequently to an activation of Akt, to increased expression of PC 1 and as a result to increased secretion of CgA and SgII. CgA serves as a serum-marker for neuroendocrine tumors. PC 1 can be found in increased amounts in different carcinomas. SgII is the proprotein of Secretoneurin (SN) and is processed by PC 1. SN plays a role in neovascularisation induced by hypoxia in ischemic diseases and solid tumors. Increased PC-1-levels may contribute to the anti-diabetic effect of Pioglitazone by amplifying the processing of proinsulin and proglucagon to insulin and glucagon-like-peptide-1. However, the achieved results however give rise to the opinion that the clinical use of Pioglitazone should be reevaluated.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Neuroendokrine Tumore - ein diagnostisches und therapeutisches Problem.....	4
1.1.1 Lokalisation und Symptomatik.....	5
1.1.2 Diagnostische Möglichkeiten.....	6
1.1.3 Therapeutische Möglichkeiten.....	6
1.2 Pioglitazon.....	7
1.2.1 PPAR γ	8
1.2.2 Wirkung von TZDs auf den Lipid- und Glucosestoffwechsel.....	10
1.2.3 Wirkung von TZDs auf atherosklerotisch bedingte Krankheiten.....	10
1.2.4 Wirkung von TZDs auf Karzinogenese und Malignome.....	12
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	13
2 Materialien.....	15
2.1 Zellkultur.....	15
2.2 Gesamtproteinextrakt-Herstellung und Proteinbestimmung.....	16
2.3 2D-Gelelektrophorese und Western-Blotting.....	16
2.4 Antikörper.....	17
2.5 MTT-Assay.....	18
2.6 Sonstige Chemikalien und Reagenzien.....	18

Inhaltsverzeichnis	2
3 Methoden	19
3.1 Zellkultur	19
3.2 Pioglitazon-Behandlung der Bon-1-Zellen	19
3.3 Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten	19
3.4 2D-Gelelektrophorese	20
3.4.1 Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF)	21
3.4.2 Zweite Dimension – SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
3.4.3 Anfärbung der Proteinpunkte	25
3.5 Western Blot	27
3.6 MTT-Versuch	32
4 Ergebnisse	34
4.1 Pioglitazon-Behandlung führt in Bon-1-Zellen zu einer Spaltung von HSP 90	34
4.2 Pioglitazon-Behandlung führt in Bon-1-Zellen zu einer gesteigerten Sekretion von CgA und SgII, einem Verlust von Pcd4 und einer Zunahme von pAkt und PC1	39
5 Diskussion	45
5.1 Pioglitazon-induzierte vermehrte Spaltung von HSP 90 in Bon-1-Zellen	45
5.2 Pioglitazon-induzierte gesteigerte Sekretion von CgA und SgII, Zunahme von pAkt und PC1 und Pioglitazon-induzierter Verlust von Pcd4 in Bon-1-Zellen	47
6 Literaturverzeichnis	54
7 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	66

8 Danksagung.....67

1 Einleitung

1.1 Neuroendokrine Tumore - ein diagnostisches und therapeutisches Problem

Tumore des diffusen neuroendokrinen Systems (neuroendokrine Tumore, NET), welches aus einzelnen Zellen und Zellverbänden besteht, die im gesamten Gastrointestinaltrakt, im bronchopulmonalen System und im Urogenitaltrakt verteilt sind, sind mit einer Inzidenz von ca. 3/100.000 Einwohner/Jahr und einem Anteil von 1,25 % (im Jahr 2004) an allen Malignomen eine eher seltene Entität maligner Erkrankungen (Gustafsson et al. 2008, Szczeblowska 2007). Jedoch war in den vergangenen Jahren eine um jährlich ca. 6 % zunehmende Inzidenz zu verzeichnen, die wahrscheinlich vor allem auf verbesserten diagnostischen Möglichkeiten und einer Sensibilisierung der Ärzte für diese Krankheit beruht.

Die einzige Möglichkeit, neuroendokrine Tumore kurativ zu behandeln, besteht immer noch in der radikalen operativen Therapie, welche jedoch nur in einem frühen nicht-metastasierten Stadium möglich ist. Da aber die Tumore erst im fortgeschrittenen Stadium symptomatisch werden und deswegen diagnostiziert werden, ist der Großteil der Patienten mit NET nicht mehr mit kurativer Intention zu behandeln. Die Behandlung muss sich dann auf die Reduktion der Tumormasse und die medikamentöse Behandlung der Symptome beschränken. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung sowohl weiterer diagnostischer Mittel, um NET schon in Frühstadien zu diagnostizieren, als auch neuer therapeutischer Ansätze, um auch Patienten mit fortgeschrittener Krankheit eine längere Überlebenszeit zu ermöglichen, oder sie gar kurativ behandeln zu können (Gustafsson et al. 2008).

1.1.1 Lokalisation und Symptomatik

Die meisten NET (66 %) finden sich im Verdauungssystem: im Magen-Darm-Trakt, im Pankreas und im hepatobiliären System. Am zweithäufigsten (31 %) kommen NET im bronchopulmonalen System vor (Gustafsson et al 2008). Besonderes Charakteristikum und verantwortlich für die oft typische Symptomatik ist die Eigenschaft der NET, Peptidhormone und biogene Amine zu produzieren, zu speichern und freizusetzen, wobei für Tumore im Pfortaderabflussgebiet gilt, dass die durch die Hormone hervorgerufene Symptomatik erst dann manifest wird, wenn Lebermetastasen vorliegen, und die Hormone nicht mehr dem hepatischen Abbau unterliegen. Nur ein kleiner Anteil, so genannte „hormon-inaktive Tumore“, ist nicht zur Hormonproduktion in der Lage (Gustafsson et al. 2008, Szczeblowska 2007). Das „Carcinoid-Syndrom“ ist typisch für Serotonin-produzierende Tumore. Es umfasst den Symptomenkomplex Flush, Diarrhoe, Rechtsherzendokardfibrose mit konsekutiven Klappenvitien und Bronchokonstriktion. Gastrin-produzierende Neoplasien hingegen führen zum „Zollinger-Ellison-Syndrom“ mit Gastritis, Diarrhoe, Malabsorption und multiplen, oft an atypischen Stellen lokalisierten gastrointestinalen Ulcera. Insulinome verursachen durch unkontrollierte Insulin-Produktion und -Sekretion Spontanhypoglykämien mit Heißhungerattacken, welche zu irreversiblen Schäden am ZNS führen können. Das „Verner-Morrison-Syndrom“ ist mit der Überproduktion von Vasointestinalem Polypeptid (VIP) assoziiert und bezeichnet die Kombination aus massiver Diarrhoe, Hypokaliämie und Achlorhydrie. Glucagonome führen zu diabetischer Stoffwechsellage, Anämie, Gewichtsverlust, thrombembolischen Ereignissen und einem typischen necrolytischen migratorischen Exzem (Öberg 1996).

Neben diesen speziellen Syndromen führen NET aber wesentlich häufiger zu unspezifischen Beschwerden wie gastrointestinale Blutungen, Schmerzen und Minderung des Allgemeinbefindens, was einen Grund für die oft späte Diagnosestellung darstellt. Im Verdauungstrakt lokalisierte Tumore können zudem Obstipationen verursachen, wohingegen bronchopulmonal lokalisierte Tumore zu Husten, Hämoptysen und Pneumonien führen können (Björn et al. 2008).

1.1.2 Diagnostische Möglichkeiten

Besteht der Verdacht auf einen NET, gibt es bisher die im Folgenden aufgeführten diagnostischen Möglichkeiten.

Im Serum bzw. im Urin der Patienten können einige biochemische Marker bestimmt werden, die bei Erhöhung den Verdacht auf einen NET bestärken können, und bei denen in manchen Fällen die Höhe des Wertes auch mit der Prognose des Patienten korreliert. Zu diesen Markern gehören 5-Hydroxyindolessigsäure im Urin (ein Abbauprodukt von Serotonin) und Chromogranin A, welches in sekretorischen Granula von NET gespeichert wird. Neuerdings als relevant betrachtete Marker sind zudem die Alkalische Phosphatase und Neurokinin A. Durch Bestimmung der entsprechenden Peptidhormone und biogenen Amine kann auf die Hormonaktivität des Tumors geschlossen werden. Postoperative histochemische Bestimmung der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Tumorsuppressors p53 geben weitere Hinweise auf die Prognose. An invasiv-bildgebender Diagnostik werden folgende Verfahren angewandt: Gastroduodenoskopie sowie Rektokoloskopie, endoskopischer Ultraschall, Kapselendoskopie und Doppelballonendoskopie zur Beurteilung des Magen-Darm-Trakts. Bronchopulmonale NET sind am sensitivsten mit der flexiblen fiberoptischen Bronchoskopie zu diagnostizieren. Radiologisch-bildgebende Verfahren umfassen CT, MRT, PET und Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie, welche auch eine Aussage über den potentiellen Erfolg einer symptomatischen Therapie mit Somatostatin-Analoga oder einer Radiotherapie mit radioaktiv-markierten Somatostatin-Analoga erlaubt (Gustafsson et al. 2008).

1.1.3 Therapeutische Möglichkeiten

Wie schon erwähnt, ist die endoskopische oder konventionelle operative Therapie die einzig mögliche kurative Therapieform. Sie wird allerdings auch palliativ zur Tumormassenreduktion eingesetzt (Gustafsson et al. 2008). Bei nicht mehr radikal operablen Patienten steht die Verlängerung der Überlebenszeit und die Beherrschung

der Symptome im Vordergrund. Somatostatin-Analoga wie Octreotid können meist erfolgreich zur symptomatischen Behandlung eingesetzt werden und führen außerdem in vielen Fällen zur Eindämmung des Tumorwachstums, selten sogar zur Tumormassenreduktion (Nikou et al. 2005). γ -Interferone haben einen ähnlichen Effekt, jedoch erheblichere Nebenwirkungen (Gustafsson et al. 2008).

Weiterhin kann Diazoxid die Insulin-Sekretion bei Insulinomen regulieren. Protonenpumpeninhibitoren können die Überproduktion von Magensäure bei Gastrinomen hemmen (Arnold 2007). Der Nutzen konventioneller Chemotherapie ist beschränkt, meist überwiegen hier die Nebenwirkungen deutlich gegenüber dem Nutzen für die Patienten.

In neueren Studien wird die Wirkung von neuen Medikamenten wie Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, Endothelial-Growth-Factor-Receptor (EGFR)-Inhibitoren, Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor (PDGFR)-Inhibitoren, Mammalian-Target-Of-Rapamycin (mTOR)-Inhibitoren und Antikörpern gegen den Vascular-Endothelial-Growth-Factor A (VEGF A) mit teilweise recht erfolversprechenden Ergebnissen untersucht. Auch die recht neue Methode der Peptid-Rezeptor-Radiotherapie, bei der mit Radionukliden gekoppelte Somatostatin-Analoga eingesetzt werden und so speziell die Rezeptor-tragenden Tumorzellen erreicht werden können, eröffnet neue Möglichkeiten in der Behandlung von NET (Gustafsson et al. 2008).

1.2 Pioglitazon

Der Wirkstoff Pioglitazon gehört, ebenso wie Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon, zur Wirkstoffgruppe der Thiazolidinedione (TZDs). TZDs sind synthetische PPAR γ -Liganden und werden in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II seit 1997 als Insulin-Sensitizer eingesetzt. (Sertznig et al. 2007, Quinn et al. 2008). Jedoch sind auch andere Eigenschaften der TZDs mittlerweile Gegenstand intensiver Forschung.

1.2.1 PPAR γ

Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptors (PPARs) sind Liganden-bindende Transkriptionsfaktoren und gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren für Steroide, Schilddrüsenhormone und Retinoide (Han et al. 2007, Sertznig et al. 2007). Es wurden drei verschiedene Subtypen von PPARs identifiziert: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ . PPARs spielen unter anderem eine Rolle in der Regulation des Lipid- und Glucosestoffwechsels, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose (Sertznig et al. 2007) und damit auch in der Entwicklung verschiedenster Krankheitsbilder wie Adipositas, Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs (Lehrke et al. 2005). PPARs bilden mit dem Retinoid-X-Receptor (RXR) ein Heterodimer, an welches dann andere transkriptionale Koaktivatoren oder Korepressoren binden können (Han et al. 2007). Bindung des Liganden an die PPARs führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und damit zum Lösen der Korepressoren und verstärkter Bindung von Koaktivatoren an das Heterodimer (Yu et al. 2007). Die PPARs regulieren die Gen-Transkription, indem sie an bestimmte DNA-Sequenzen in der Promotor-Region ihrer Zielgene binden, welche Peroxisome-Proliferator-Response-Elements (PPREs) genannt werden (Palmer et al. 1995) (Abbildung 1).

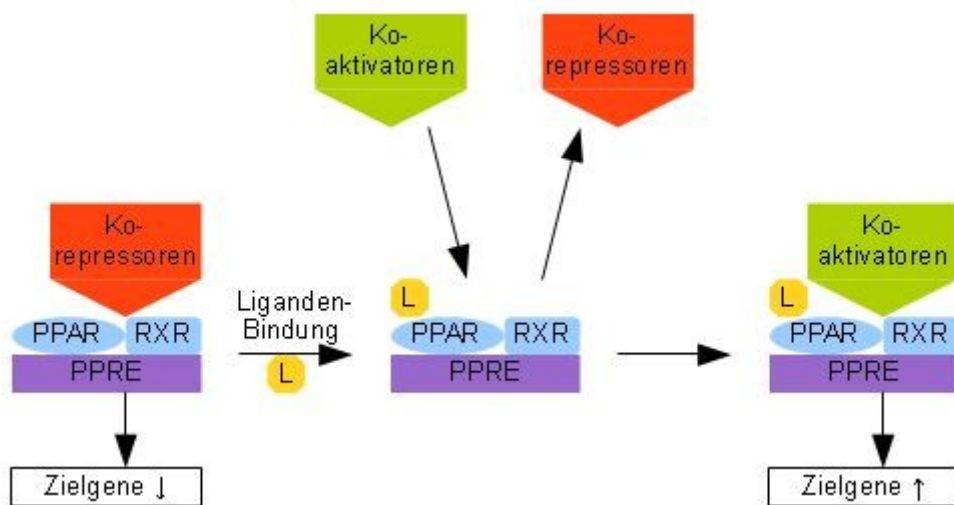


Abbildung 1: PPARs bilden mit dem Retinoid-X-Receptor (RXR) ein Heterodimer, welches an Peroxisome-Proliferator-Response-Elementen (PPREs) ihrer Zielgene bindet. In Abwesenheit von PPAR-Liganden binden Korepressoren an das Heterodimer und die Gen-Transkription wird unterdrückt. Nach Bindung eines Liganden bewirkt eine Konformationsänderung das Lösen der Korepressoren und eine verstärkte Bindung von Koaktivatoren, wodurch es zu einer Aktivierung der Gen-Transkription kommt. (Abbildung modifiziert nach Hamblin et al. 2009, Takano und Komuro 2009)

Physiologische Liganden von PPAR γ sind z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Eicosanoide (Nemenoff et al. 2008). Zu den synthetischen Aktivatoren von PPAR γ gehören die TZDs sowie Nichtsteroidale Antirheumatika (NSARs), letztere allerdings erst in höheren Konzentrationen als für die Cyclooxygenase-Hemmung benötigt werden (Lehmann et al. 1997). Neben der Aktivierung von PPAR γ können all diese Stoffe jedoch auch noch PPAR γ -unabhängige Stoffwechsel- und Signalwege aktivieren, welche ihre therapeutische Wirkung, als auch das Spektrum der unerwünschten Nebenwirkungen beeinflussen (Nemenoff 2007). Weiterhin muss erwähnt werden, dass PPAR γ selbst an andere Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder Sp1 binden kann, was das Spektrum an Genen, die von PPAR γ reguliert werden können, erheblich erweitert (Chen et al. 2003, Argmann et al. 2005).

1.2.2 Wirkung von TZDs auf den Lipid- und Glucosestoffwechsel

Die Wirkung von TZDs als Insulin-Sensitizer wird vor allem durch ihre Bindung an den PPAR γ -Rezeptor im Fettgewebe erreicht (Berger et al. 2005), wodurch die Expression von Genen des Lipidstoffwechsels verändert und so die Aufnahme von Fettsäuren und deren Speicherung im Fettgewebe gefördert wird (Quinn et al. 2008). Im Tierversuch führt die Aktivierung von PPAR γ zu einer Zunahme von kleinen Fettzellen, die noch fähig sind, freie Fettsäuren aufzunehmen. Dies geschieht auf Kosten der Anzahl hypertrophierter Fettzellen, die Fettsäuren in den Blutkreislauf abgeben (Okuno et al. 1998). Das Enzym Fettsäure-Translokase, welches freie Fettsäuren in Fettzellen transportiert, ist unter TZDs hochreguliert (Teboul et al. 2001). Diese Faktoren bewirken die Abnahme freier Fettsäuren im Serum und schützen so andere Insulin-sensitive Organe, wie etwa Muskulatur und Leber, vor den schädigenden metabolischen Effekten erhöhter freier Fettsäuren, die zur Insulin-Resistenz dieser Organe führen (Yki-Jarvinen 2004). In Fettgewebe, welches mit PPAR γ -Agonisten kultiviert wurde, ist die Expression von IRS-2, einem Protein, welches den Insulin-Signalweg fördert, erhöht (Smith et al. 2001). Durch Erniedrigung des Fettgehalts und damit verminderter „Lipotoxizität“ in pankreatischen β -Zellen unter TZDs wird eine verminderte β -Zell-Apoptose, erhöhte β -Zell-Anzahl und konsekutiv verbesserte Insulin-Sekretion in Typ II-Diabetikern erreicht (Bays et al. 2004). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Rosiglitazon und Pioglitazon, gegeben in der Maximaldosis, fähig sind, den HbA1c-Wert, ein Laborwert, welcher zur Kontrolle der Langzeit-Einstellung des Blutzuckers herangezogen wird, um im Mittel 1-1,5 % (absolut) senken können (Yki-Jarvinen 2004).

1.2.3 Wirkung von TZDs auf atherosklerotisch bedingte Krankheiten

PPAR γ -Agonisten greifen auch in Signalwege ein, die Atherosklerose und kardiovaskuläre Ereignisse fördern (Rios-Vazquez et al. 2006). So erhöhen PPAR γ -Agonisten die Produktion von Adiponektin in Fettgewebe (Iwaki et al. 2003). Adiponektin scheint vor Atherosklerose zu schützen, indem es die TNF α -induzierte

Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und dadurch die Bildung von Schaumzellen und die Proliferation glatter Muskelzellen verhindert (Blaschke et al. 2006). Weiterhin stimuliert Adiponektin die NO-Produktion, was zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt, und senkt die Apoptoserate in Endothelzellen (Chen et al. 2003).

Desweiteren werden durch PPAR γ -Aktivierung einige Nukleäre und Transkriptionsfaktoren gehemmt, die in der Entwicklung von Atherosklerose eine Rolle spielen. Darunter auch NF- κ B, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Gene kontrolliert, die an der Immun- und Entzündungsreaktion teilhaben (Barnes und Karin, 1997). Dadurch werden proinflammatorische Gene herunterreguliert, die an der Bildung atheromatöser Plaques beteiligt sind (Castrillo et al. 2000).

Darüber hinaus hemmen PPAR γ -Aktivatoren durch eine Verminderung der Thromboxan-A₂-Produktion die Plättchen-Aggregation (Hamberg et al. 1975), sowie das vasokonstriktorisch wirkende, mit KHK assoziierte Peptid Endothelin1 (Salomone et al. 1996). Trotz dieser vielversprechenden Daten wurde kürzlich die Sicherheit des TZDs Rosiglitazon im Rahmen einer Meta-Analyse angezweifelt, da die Einnahme dieses Medikaments im Vergleich zu einem Placebo oder anderem oralen Antidiabetikum mit einem signifikant erhöhten Herzinfarkttrisiko einherging (Nissen und Wolski 2007).

Im Gegensatz dazu ergab sich für Pioglitazon in der PROactive (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events) -Studie (Dormandy et al. 2005) kein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse. Der primäre Endpunkt dieser Studie zeigte eine nicht-signifikante Reduktion um 10 % unter Pioglitazon, wohingegen der definierte kardiovaskuläre Endpunkt signifikant um 16 % reduziert war. Hiermit liefert diese Studie einen Hinweis, dass bestimmte Glitazone das Potential besitzen, makrovaskuläre Ereignisse zu reduzieren (Walcher et al. 2006).

1.2.4 Wirkung von TZDs auf Karzinogenese und Malignome

Wurde lange Zeit geglaubt, in TZDs eine neue Wirkstoffgruppe mit antikanzerogenen Effekten entdeckt zu haben, zeigt sich in letzter Zeit zunehmend, dass TZDs auch entgegengesetzte, prokanzerogene Wirkung entfalten können. Die antikanzerogene Wirkung wurde in vitro an vielen Zelllinien nachgewiesen, unter anderem in Zellen von Kolon-Karzinomen (Chang et al. 2006), Bronchial-Karzinomen (Nemenoff et al. 2008), Schilddrüsen-Karzinomen (Martelli et al. 2002), Hepatocellulären Karzinomen (Yu et al. 2006) und Phäochromozytomen (Kim et al. 2008). Von den vielfachen Mechanismen, durch die TZDs in Tumorzellen proapoptotisch und antiproliferativ wirken sollen, können hier nur einige beispielhaft aufgeführt werden.

Es wurde gezeigt, dass die Apoptose-induzierende Wirkung von TZDs assoziiert ist mit einer gesteigerten Caspase-3-Aktivierung, ebenso wie mit einer verminderten Expression anti-apoptotischer Proteine wie BCL-2 und BCL-X (Elstner et al. 1998, Chattopadhyay et al. 2000). In mit TZDs behandelten Tumorzellen wurden PPAR γ -Zielgene unter solchen Proteinen gefunden, die an Signalwegen der Wachstumsregulation beteiligt sind (Vignati et al. 2006). TZDs induzieren einen Stopp im Zellzyklus in der G0/G1-Phase und die Apoptose in malignen Zellen. Dies geschieht, indem sie unter anderem die Expression Zellzyklus-regulierender Proteine wie etwa p21Waf1 und p27Kip1, beides Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren, erhöhen (Elstner et al. 1998, Elnemr et al. 2000, Radhakrishnan u. Gartel 2005). Außerdem wurde nachgewiesen, dass durch TZDs der Tumorsuppressor p53 hochreguliert wird, welcher an der Regulation des Zellzyklus, aber auch an der Kontrolle von DNA-Reparatursystemen und der Apoptose beteiligt ist (Liu et al. 2006). Eine retrospektive Studie an Patienten mit Diabetes mellitus erbrachte das beeindruckende Ergebnis einer 33 %igen Reduktion des Risikos an Lungenkrebs zu erkranken für Patienten, die mit dem TZD Rosiglitazon behandelt wurden, gegenüber solchen, die mit anderen Antidiabetika behandelt wurden (Govindajaran et al. 2007).

Wie schon erwähnt gibt es aber auch Daten, die weniger auf einen positiven Effekt einer TZD-Behandlung und damit erhöhten PPAR γ -Aktivität auf Krebserkrankungen hinweisen. So wurde etwa in Schilddrüsen- (Galusca et al. 2004) und Prostata-

Karzinomen (Segawa et al. 2002) eine im Vergleich zu entsprechendem Normalgewebe erhöhte PPAR γ -Expression gefunden. Das gleiche Phänomen zeigte sich auch in Zelllinien von Ösophagus-Karzinomen und Hepatozellulären Karzinomen. Behandlung dieser Zelllinien mit PPAR γ -Antagonisten oder Verringerung der PPAR γ -Spiegel mittels siRNA, d.h. geringere PPAR γ -Aktivität, führte zu reduziertem invasiven Wachstum, geringerer Adhärenz an die extrazelluläre Matrix oder zu Proliferationshemmung infolge verminderter Phosphorylierung Proliferations- und Malignitäts-fördernder Kinasen wie FAK, MEK und ERK (Takahashi et al. 2006, Schaefer et al. 2005). Desweiteren konnte vor allem für Pioglitazon eine proangiogenetische Wirkung nachgewiesen werden (Gensch et al. 2007), die in der Behandlung vaskulärer Erkrankungen durchaus erwünscht wäre, aber auch in Tumorgewebe zu verbesserter Bildung von Gefäßen führen könnte (Burgermeister und Seger, 2008). In einer klinischen Studie mit dem Ziel, die Sicherheit von TZDs zu evaluieren, konnte außerdem eine signifikante Assoziation zwischen einem gesteigerten Krebsrisiko von Frauen und Behandlung mit TZDs nachgewiesen werden (Ramos-Nino et al. 2007).

All diese Daten verdeutlichen, dass die komplexe Wirkung von PPAR γ -Agonisten auf Zellsignalwege und Proteinexpression einer weiteren intensiven Aufklärung bedürfen

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, die Wirkung des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon aus der Familie der TZDs auf das Proteom von Bon-1-Zellen, einer humanen neuroendokrinen Pankreaskarzinom-Zelllinie, zu untersuchen. Hierzu wurden Kulturen von Bon-1-Zellen mit Pioglitazon behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Kulturen verwendet. Zunächst sollten durch Vergleich von 2D-Gelelektrophoresen der Gesamtproteinextrakte von mit Pioglitazon behandelten und Kontroll-Bon-1-Zellen und anschließender MALDI-TOF-Analyse solche Proteine identifiziert werden, die unter Pioglitazon-Behandlung reguliert werden. Aus diesen reguliert gefundenen Proteinen sollten dann diejenigen ausgesucht werden, die in wichtige Zell-Signalwege eingebunden oder in anderer Weise wichtig für Funktion oder Proliferation der Zelle sind. Nach Verifizierung

der in der 2D-Gelelektrophorese gefundenen Regulation in mehreren unabhängig voneinander angelegten Bon-1-Kulturen im Western-Blot, sollte dann in weiterführenden Versuchen gezielt der Einfluss der gefundenen Regulation solcher Proteine auf wichtige Zell-Signalwege und -Funktionen untersucht werden

2 Materialien

2.1 Zellkultur

Von PAA Laboratories, Pasching, Österreich, kamen:

- DMEM Ham's F-12 - Medium
- Fötale Kälberserum (FBS)

Von PAA Laboratories, Linz, Österreich, kam:

- Gentamicin

Von Biowest, Nuaille, Frankreich, kamen:

- Mc Coy's 5A – Medium
- Trypsin-EDTA 1x in PBS

Von GIBCO, invitrogen, Paisley, UK, kam

- DPBS

Von Takeda Chemical Industries, Osaka, Japan, kam

- Pioglitazone

Die Zellkultur-Platten und –Flaschen wurden von den Firmen Nunc A/S, Roskilde, Dänemark und Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland bezogen.

2.2 Gesamtproteinextrakt-Herstellung und Proteinbestimmung

Von G-Biosciences, USA, kam:

- Protease-Arrest 100x

Von Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA, kam:

- Bio-Rad Protein Assay

2.3 2D-Gelelektrophorese und Western-Blotting

Von SERVA Electrophoreses, Heidelberg, Deutschland, kamen:

- Ampholyte ‚Servalyt 4-7‘ und ‚Servalyt 3-10‘

Von Roth, Karlsruhe, Deutschland, kamen

- 30%ige Acrylamid-Lösung ‚Rotiphorese® Gel 30‘
- für die Coomassie-Färbung ‚Roti®-Blue‘

Von Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland, kamen:

- Reinforced Cellulose Nitrate Membrane 0,45µm und 0,2µm

Von Amersham Biosciences, UK, kamen:

- Enhanced Chemoluminescence Systeme ECL, ECL+ und ECLadvanced

2.4 Antikörper

Von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, kamen:

- Chromogranin A ,Chr-A'
- Secretogranin II ,SgII'
- Caspase-9
- pAkt 1/2/3
- BID
- p21
- Actin HRP
- donkey anti-goat IgG-HRP
- goat anti-rat IgG-HRP
- bovine anti-chicken IgY-HRP

Von Cell Signaling Technology, Danvers, USA, kamen:

- Caspase-3
- BID
- Caspase-8
- cdc2
- Anti-Rabbit HRP-linked
- Anti-Mouse HRP-linked

Von Stressgen Bioreagents, Michigan, USA, kamen:

- Rabbit Anti-HSP90 α
- Rat Anti-HSP90 α

Von BD Biosciences, San Jose, USA, kam:

- STRAP

2.5 MTT-Assay

Das Thiazolylblau stammte von Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.6 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Alle anderen verwendeten und hier nicht im Einzelnen aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, Deutschland, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland, oder Roth, Karlsruhe, Deutschland, bezogen.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Es wurde die Wirkung von Pioglitazon auf Bon-1-Zellen, einer humanen neuroendokrinen Pankreaskarzinom-Zelllinie, untersucht.

Die Bon-1-Zellen werden in DMEM/HAM's F12-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS) und 5 µg/ml Gentamicin bei 37 °C unter 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert und zweimal wöchentlich passagiert.

3.2 Pioglitazon-Behandlung der Bon-1-Zellen

Von einer zu ca. 70 % bewachsenen Zellkulturplatte (Durchmesser 15 cm) wird das Medium abgesaugt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Dann wird eine entsprechende Menge an Pioglitazon-Lösung (10 mM Pioglitazon in Dimethylsulfoxid (DMSO)) bzw. als Kontroll-Ansatz an DMSO zupipettiert und durch Schwenken der Platte mit dem Medium gemischt.

Die Bon-1-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h mit Konzentrationen von 20 µM, 30 µM und 40 µM Pioglitazon (entsprechend 20 µl, 30 µl und 40 µl der 10 mM Pioglitazon-Lösung in 10 ml Medium) im Medium inkubiert.

3.3 Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten

Für die Analyse des Proteoms einer Zelllinie ist es notwendig, ein Extrakt aller Proteine

dieser Zellen mit bekannter Protein-Konzentration zu gewinnen.

Die adhärenen Zellen werden mit einem Spatel vom Boden der Zellkulturplatten abgekratzt. Dann wird das Medium mitsamt der Zellen in ein Röhrchen pipettiert und bei 1200 Umdrehungen/min für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Um die im Medium enthaltenen Proteine zu entfernen, wird das Zell-Pellet einmal mit 5 ml und zweimal mit 2 ml PBS-Puffer (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄ x H₂O, 0,2 g/l KH₂PO₄, pH = 7,4) suspendiert, abzentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Daraufhin wird das Pellet je nach Größe in 200 - 500 µl einer Protease-Arrest-Lösung (nach Hersteller-Protokoll 1fach Protease-Arrest aus einer 100fach-Lösung, 0,5 mM EDTA in PBS-Puffer) suspendiert, die Suspension in ein Eppendorf-Cup überführt und auf Eis gelagert. Durch Ultraschall werden dann die Zellmembranen zerstört und die Proteine extrahiert. Die Protein-Konzentration der so erhaltenen Gesamtprotein-Extrakte wird mit einem Protein-Konzentrations-Bestimmungs-Kit nach Hersteller-Protokoll (BioRad) bestimmt. Hierbei wird die je nach Protein-Konzentration unterschiedlich intensive Farbreaktion des Reagenz photometrisch bestimmt und anhand des Vergleichs mit der Reaktion einer Standard-Proteinlösung die Konzentration bestimmt.

3.4 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach Isoelektrischem Punkt und Proteingröße. Dies wird erreicht durch die Kombination zweier elektrophoretischer Verfahren, die senkrecht zueinander durchgeführt werden. Die einzelnen Proteine liegen danach in Form von runden oder ovalen Punkten im Gel der 2. Dimension vor. Anhand der Größe der Punkte kann auf den Anteil eines Proteins im Gesamtproteinextrakt rückgeschlossen werden.

Das Gesamtproteinextrakt von mit Pioglitazon behandelten Bon-1-Zellen wurde jeweils mit dem Gesamtproteinextrakt der entsprechenden Kontroll-Zellen auf korrespondierende, sich in ihrer Größe unterscheidende und damit unter dem Einfluss

von Pioglitazon regulierte Proteinpunkte hin verglichen.

3.4.1 Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Während der Isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine aus einem Gesamtproteinextrakt nach ihrem Isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Der isoelektrische Punkt eines Proteins entspricht dem pH-Wert, an dem die Gesamtladung des Proteins gleich Null ist. Die Auftrennung wird erreicht, indem dem IEF-Gelansatz eine Mischung aus Ampholyten zugesetzt wird, die bewirkt, dass sich bei Anlegen eines elektrischen Feldes im Gel ein pH-Gradient aufbaut. Die Proteine verbleiben dann an der Stelle im Gel, an der der pH-Wert gleich ihrem Isoelektrischen Punkt, also ihre Gesamtladung gleich Null, ist, und das elektrische Feld nicht mehr auf sie einwirken kann.

Herstellung der IEF-Gele

Die fertigen IEF-Gele können bis zu einer Woche aufbewahrt werden. Sollen mehrere 2D-Gelelektrophoresen durchgeführt werden, empfiehlt sich deswegen die Herstellung gleich mehrerer Gele. Im Folgenden wird die Herstellung von vier Gelen beschrieben.

Zunächst werden die Glasröhrchen, in denen die Gele gegossen werden, vorbereitet, indem deren unteres Ende mit Parafilm umwickelt und so abgedichtet wird. An jedem Röhrchen wird, um die Höhe des Gels festzulegen, 12,5 cm vom unteren Ende entfernt eine Markierung angebracht. Dann werden die Röhrchen stabil in Eppendorf-Cups gestellt, die in einen entsprechenden Ständer gesteckt wurden.

Für den Gelansatz werden in einem Becherglas 1,87 g Harnstoff in 1,375 ml H₂O, 412,5 µl Ampholyte des pH-Bereichs 4 -7, 104,5 µl Ampholyte des pH-Bereichs 3 - 10, 550 µl Acrylamid-Stammlösung (28,4 % Acrylamid, 1,6 % N', N'-Methylen-Diacrylamid, entionisiert) und 412,5 µl 20 %iger CHAPS-Lösung durch vorsichtiges Schwenken gelöst. Dann werden 30 µl 10 %ige Ammonium-Peroxid-Disulfat (APS)-Lösung als

Radikal-Starter und 3 μl Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Radikalfänger zugegeben und durch kurzes Schwenken des Becherglases mit dem Gelansatz vermischt. Die Gellösung wird mit einer Pasteur-Pipette, auf deren Spitze ein etwa 10 cm langer dünner Schlauch aufgesetzt ist, luftblasenfrei bis zur Markierung in die Röhren gefüllt und sofort mit jeweils 130 μl 6,5 M Harnstoff-Lösung überschichtet. Zum Auftragen von Lösungen auf das Gel empfiehlt sich jeweils die Verwendung einer Kapillar-Pipettenspitze. Nun wird auch das obere Ende der Röhren mit Parafilm verschlossen. Die Gele sollen so bei 4 °C mindestens eine Nacht und können bis zu einer Woche gelagert werden.

Probenbeladung und Durchführung der IEF

Die Harnstofflösung wird mit einer Pipette abgesaugt und die Gele jeweils mit 100 μl Lysis-Puffer (9,5 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 10 mM DTT, 2 % Ampholyte des pH-Bereichs 4 - 7, 0,5 % Ampholyte des pH-Bereichs 3 - 10 in wässriger Lösung) überschichtet. Dieser wird wiederum vorsichtig mit Wasser überschichtet und die Gele so für etwa eine Stunde stehen gelassen. In der Zwischenzeit wird der Anodenpuffer (0,01 M H_3PO_4 , d.h. 670 ml 85 %ige H_3PO_4 auf 1 l H_2O) und der Kathodenpuffer (0,02 M NaOH, d.h. 0,8 g NaOH auf 1 l H_2O) vorbereitet und ein Stück Dialyseschlauch so zugeschnitten, dass etwa 3 cm x 3 cm große Quadrate entstehen. Diese werden in einem Becherglas mit Anodenpuffer benässt. Nachdem das Wasser und der Lysis-Puffer dann wieder von oben her (d. h. erst das Wasser, dann der Lysis-Puffer) vom Gel abgesaugt worden ist, wird vom unteren Ende des Röhrens der Parafilm entfernt, auf das untere Ende des Gels ein Tropfen Anodenpuffer aufgeschichtet und hierauf eines der mit Anodenpuffer benässen Quadrate aus Dialysemembran gelegt. Dieses wird mit einem Dichtungsring entsprechender Größe am Röhren fixiert, wobei darauf zu achten ist, dass sich keine Luftblasen unter der Dialysemembran befinden. Die Röhren werden nun in der dafür vorgesehenen Vorrichtung der Elektrophoresekammer fixiert und die nicht benötigten Löcher der Kammer mit den zugehörigen Gummi-Stopfen verschlossen.

Aus den zu analysierenden Gesamtproteinextrakten wird dann je nach Konzentration die

gewünschte Menge entnommen (es wurden jeweils 30 µg Protein eingesetzt) und im Eppendorf-Cup mit Lysis-Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Nach einer 15minütigen Inkubation werden die Proben fünf Minuten zentrifugiert, auf das Gel aufgetragen und mit 20 µl einer wässrigen Lösung mit 7 M Harnstoff, 0,8 % Ampholyte des pH-Bereichs 4 - 7 und 0,2 % Ampholyte des pH-Bereichs 3 - 10 überschichtet. Die Haltevorrichtung wird dann in die mit Anodenpuffer befüllte Elektrophoresekammer gesetzt und die Röhren bis zum oberen Rand mit Kathodenpuffer befüllt. Dann wird Kathodenpuffer in die gesamte obere Kammer gegeben und das System geschlossen.

Die IEF wird im Cold-Lab bei 4 °C durchgeführt und nacheinander folgende Spannungen angelegt: 200 V für eine halbe Stunde, 500 V für 18 Stunden, 800 V und 1000 V für jeweils eine Stunde.

3.4.2 Zweite Dimension – SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die nun nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennten Proteine werden dann während der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ihrer Größe nach getrennt. Das Prinzip entspricht dem der elektrophoretischen Auftrennung beim Western Blot (siehe dort). Vorher muss jedoch die Äquilibration erfolgen, deren Ziel es ist, die im IEF-Gel enthaltenen Proteine zu denaturieren und durch Zugabe von SDS die Proteinladungen zu neutralisieren.

Äquilibration der IEF-Gele

Die Gele werden aus dem Röhren geholt, indem auf das obere Ende des Gels mit Wasser Druck ausgeübt wird. Dies geschieht mit Hilfe einer 10 ml-Spritze, auf der als Aufsatz ein Gummischlauch angebracht ist, der genau auf ein Röhren passt. Die Gele werden in vorher beschriftete Petri-Schalen gegeben und das obere Ende mit einem Tropfen Bromphenolblau markiert. Das Wasser, welches mit in die Petri-Schale geflossen ist, sowie überschüssiges Bromphenolblau werden abpipettiert. Die

Äquilibrierung erfolgt dann in zwei Schritten, für die zwei unterschiedliche Äquilibrierungspuffer benötigt werden (Äquilibrierungspuffer I: 0,05 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,25 % DTT, 4 % SDS, 15 % Glycerin in wässriger Lösung; Äquilibrierungspuffer II: 0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 25 mM Iod-Acetamid, 30 % Glycerin, 6 M Harnstoff in wässriger Lösung). Je 20 ml beider Puffer werden vorher im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und dann zu dem IEF-Gel in die Petri-Schale gegeben. Die Inkubation erfolgt jeweils für 25 Minuten bei 37 °C auf einem langsam eingestellten Schüttler.

Herstellung der Gele für die SDS-PAGE

Zunächst werden die Glasplatten für die Gele der 2. Dimension in den entsprechenden Gelgießstand gesetzt. Eine der Platten ist am oberen Rand konisch geschliffen, um genügend Platz für das IEF-Gel zu schaffen.

Der Ansatz für zwei Gele besteht aus 20 ml 1 M Tris-HCl-Lösung (pH 8,8), 400 µl 10 %iger SDS-Lösung und - bei den verwendeten Gelen – 25 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung und 5 ml H₂O für etwa 13 %ige Gele bzw. 17 ml 30 %ige Acrylamidlösung und 13 ml H₂O für etwa 10 %ige Gele. Für das Abdichtgel, das verhindert, dass das eigentliche Trenngel später vor der Polymerisation aus den Platten herausläuft, werden hiervon 5 ml abgenommen und in ein Becherglas überführt. Nach Zugabe von 200 µl 10 %iger APS-Lösung und 20 µl TEMED werden mit Hilfe einer Pipette je 2,5 ml hiervon seitlich zwischen die Glasplatten laufen gelassen und durch leichtes Schwenken gleichmäßig auf dem Boden verteilt. Nach Polymerisation des Abdichtgels werden nach Zugabe von 400 µl 10 %iger APS-Lösung und 40 µl TEMED je 21 ml des Gelansatzes zwischen die Glasplatten pipettiert und sofort mit 1 ml 70 %igem Ethanol überschichtet, welcher nach Abschluss der Polymerisation wieder abgegossen wird. Um eine Tasche für die Proteinstandard-Lösung im Sammelgel zu gewinnen, wird rechts zwischen die Glasplatten jeweils ein Kammzinke geschoben. Der Ansatz für zwei Sammelgele besteht aus 1,4 ml 1 M Tris-HCl-Lösung (pH 6,8), 1,1 ml 30 %iger Acrylamid-Lösung, 7,5 ml H₂O, 40 µl TEMED, 200 µl 10% ige APS-Lösung und 20 µl TEMED. Das Sammelgel wird bis zum unteren Rand des konischen Schliffs eingefüllt.

Beladung mit dem IEF-Gel und Durchführung der SDS-PAGE

Das IEF-Gel wird mit Hilfe zweier Agarose-Lösungen, die im Wasserbad auf 60 °C erwärmt und somit verflüssigt wurden, auf dem Elektrophorese-Gel fixiert.

Als Unterlage für das IEF-Gel wird eine 0,5 %ige Agarose-Lösung in Sammelgelpuffer auf das Elektrophorese-Gel getropft, auf die man dann das IEF-Gel gleiten lässt. Dies geschieht mit Hilfe eines etwa 15 cm langen Stückes Parafilm, das der Länge nach geknickt wurde, um eine Mulde für das IEF-Gel zu schaffen. Das IEF-Gel wird dann mit einer 0,5 %igen Agarose-Lösung in Elektrophoresepuffer (siehe oben) überschichtet. Nach Abkühlen und Erhärten der Agarose-Lösungen wird die Kammzinke für den Proteinstandard entfernt und die Gele in der entsprechenden Halterung in die mit 1 l Elektrophoresepuffer befüllte Elektrophorese-Kammer gesetzt. Dann wird vorsichtig der Raum zwischen den zwei Gelen mit Elektrophoresepuffer befüllt und 80 µl Proteinstandard in die dafür vorgesehene Tasche pipettiert. Durch Anlegen eines Stromes von 30 mA pro Gel, also für zwei Gele 60 mA, für eine halbe Stunde, laufen die Proteine in das Sammelgel ein. Die Auftrennung im Trenngel erfolgt dann bei einer Stromstärke von 60 mA pro Gel, also 120 mA für zwei Gele, für etwa zwei bis drei Stunden. Das Ende der SDS-PAGE kann anhand des Proteinstandards abgeschätzt werden, dessen untere Bande dann das Ende des Trenngels erreicht hat.

3.4.3 Anfärbung der Proteinpunkte

Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine äußerst empfindliche Methode, um Proteine nach einer SDS-PAGE anzufärben. Sie beruht darauf, dass an Proteine angelagerte Silberionen durch alkalisches Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert werden.

Zunächst werden die Gele nach Abtrennung des Sammel- und des Abdichtgels und

vorsichtigem Überführen in Glasschalen für etwa eine halbe Stunde in einem Fixierbad aus 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure in wässriger Lösung bei Raumtemperatur auf einem langsam eingestellten Schüttler belassen. Nach der Hälfte der Zeit sollte die Fixierlösung einmal ausgetauscht werden. Anschließend werden die Gele in eine Thiosulfat-Lösung (0,4 g Natriumthiosulfat in 200 ml einer wässrigen Lösung mit 0,1 M Natriumacetat und 30 % Ethanol) gegeben und in dieser auf einem Schüttler bei Raumtemperatur über Nacht belassen. Nach Absaugen der Thiosulfat-Lösung werden die Gele drei mal für zehn Minuten mit Wasser gewaschen und danach für 25 Minuten in eine 0,1 %ige Silbernitrat-Lösung (0,2 g Silbernitrat in 200 ml H₂O und 50 µl Formaldehyd) gegeben, jeweils auf dem Schüttler. Nach Absaugen der Silbernitrat-Lösung wird erneut einmal mit Wasser gewaschen. Die Entwicklung der Gele erfolgt mit einer Entwickler-Lösung aus 10 g Natriumcarbonat in 400 ml H₂O und 200 µl Formaldehyd. Hierzu gibt man zuerst 50 ml der Entwickler-Lösung zum Gel, schwenkt kurz bis ein erster Grauschleier auftritt und saugt die Lösung wieder ab. Nach erneuter Zugabe von 50 ml Entwickler-Lösung saugt man erst ab, wenn erste Proteinpunkte sichtbar geworden sind. Als letztes verwendet man 100 ml Entwickler-Lösung und stoppt die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Eisessig dann ab, wenn sich der Hintergrund der Gele zu verfärben beginnt. Ist die Reaktion zwischen Formaldehyd und Eisessig beendet (erkennbar am Sistieren der Blasenbildung), wird das Gel wieder drei mal mit Wasser gewaschen und dann für etwa eine Stunde in eine Gel-Fixier-Lösung (50 % Ethanol, 2 % Glycerin in wässriger Lösung) eingelegt. Anschließend erfolgt die Trocknung des Gels unter Vakuum bei 75 °C für zwei Stunden.

Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde zur Anfärbung der Proteine in präparativen Gelen verwendet, die zur MALDI-TOF-Analyse eingeschickt werden sollten. Coomassie Brilliant Blau G250 ist ein Farbstoff, der sich an Proteine anlagert und sie so unspezifisch anfärbt.

Die Coomassie-Färbung mit Roti®-Blue der Firma Roth wurde entsprechend der Hersteller-Angaben durchgeführt.

3.5 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteingemische elektrophoretisch der Proteingröße nach aufgetrennt und nach der anschließenden Übertragung auf eine Trägermembran mit Hilfe spezifischer Antikörper einzelne Proteine detektiert.

Der Western Blot diente zur Bestätigung der in der 2D-Gelelektrophorese gefundenen Regulation der durch die MALDI-TOF-Analyse identifizierten Proteine.

Herstellung von Elektrophorese-Auftragsmischungen aus Gesamtprotein-Extrakten

Die Proteine werden für die elektrophoretische Auftrennung in einem speziellen Auftragspuffer gelöst. Das in diesem enthaltene Dithiotreitol (DTT) bricht Schwefelbrücken auf, während Sodium-Dodicyl-Sulfat (SDS) die Ladungen der Proteine neutralisiert, so dass diese später während der elektrophoretischen Auftrennung nicht ins Gewicht fallen.

Der Auftragspuffer wird hergestellt, indem eine Lösung mit 65 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 30 % Glycerin und einer Spatelspitze Bromphenolblau in H₂O im Verhältniss 3:2 mit einer 1 M DTT-Lösung gemischt wird. Entsprechend der gewünschten Protein-Konzentration in der Auftragsmischung (es wurden Protein-Konzentrationen von 1,0 µg/µl und 1,5 µg/µl verwendet) wird dann, nach Mischen des Gesamtprotein-Extrakts auf dem Vortex, eine bestimmte Menge des Extrakts entnommen und in ein Eppendorf-Cup überführt. Diesem wird dann Auftragspuffer und eine je nach Menge des Extrakts variable Menge H₂O zupipettiert, so dass das Verhältnis Auftragspuffer zu Protein-Extrakt-H₂O-Mischung 2 : 3 beträgt. Die in der Mischung enthaltenen Proteine werden dann durch Inkubation im Heizblock bei 90 – 95 °C für zwei bis drei Minuten denaturiert, danach die Mischung kurz auf Eis gestellt und wenige Sekunden anzentrifugiert.

Herstellung von Elektrophorese-Auftragsmischungen aus Zellkulturmedium

Um zu unterscheiden, ob eine in den Gesamtproteinextrakten gefundene Verminderung von sekretorischen Proteinen auf einer Down-Regulation oder auf einer vermehrten Sekretion beruht, wurden Western Blots mit Zellkulturmedien durchgeführt.

Hierzu werden Zellkulturmedium und Auftragspuffer im Verhältnis 3:2 im Eppendorf-Cup gemischt, für zwei bis drei Minuten in einen auf 90 - 95 °C erhitzten Heizblock gestellt, kurz auf Eis gegeben und wenige Sekunden an zentrifugiert.

Von dieser Mischung wurden jeweils 3 µl in der Elektrophorese eingesetzt.

Herstellung der Polyacrylamid-Elektrophorese-Gele

Je nach Größe der zu detektierenden Proteine werden Gele mit unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration und damit unterschiedlicher Porengröße verwendet.

Zunächst werden die Glasscheiben für die Elektrophoresegele zusammengesetzt und in einem Gelgießstand befestigt.

Für etwa 10 ml Gel-Ansatz werden im Becherglas 4 ml 1 M Tris-HCl-Lösung (pH 8,8) mit 80 µl 10 %iger SDS-Lösung und je nach gewünschter Dichte des Gels entsprechenden Mengen 30 %iger Acrylamid-Lösung und H₂O gemischt - für die verwendeten 10 %igen und 12 %igen Gele also 3,5 ml bzw. 4 ml Acrylamid-Lösung und 2,5 ml bzw. 2 ml H₂O. Von diesem Ansatz werden für das Abdichtgel 250 µl abgenommen, in ein kleines Becherglas überführt, mit 10 µl 10 %iger APS-Lösung und 1 µl TEMED versetzt, sofort zwischen die Gelscheiben gegossen und durch leichtes Schwenken über den ganzen Gel-Boden verteilt. Nachdem das Abdichtgel polymerisiert ist, werden 100 µl der 10 %igen APS-Lösung und 10 µl TEMED zum Rest des Gelansatzes gegeben, dieser dann sofort bis etwa 1,5 cm unter den Oberrand der vorderen Glasscheibe auf das Abdichtgel gegossen und, um eine glatte Oberfläche zu erreichen, mit 70 %igem Ethanol überschichtet. Ist die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen, kann der Ethanol abgegossen und Reste mit einem Zellstofftuch entfernt

werden. Abschließend wird das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Taschen für die zu analysierenden Proben werden hierbei durch Einsatz eines Kammes mit entsprechend der Probenzahl gewünschter Anzahl von Zacken freigehalten. Der Ansatz für ein Sammelgel besteht aus 280 µl 1 M Tris-HCl-Lösung (pH 6,8), 220 µl 30 %ige Acrylamid-Lösung, 1,5 ml H₂O, 8 µl 10 %ige SDS-Lösung, 40 µl 10 %ige APS-Lösung und 4 µl TEMED. Ist auch das Sammelgel vollständig polymerisiert, kann das Gel für die Elektrophorese verwendet werden.

Elektrophoretische Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Während der Elektrophorese wandern die Proteine entlang eines elektrischen Feldes durch das Trenngel und werden nach ihrer jeweiligen Molekülmasse aufgetrennt. Kleinere Moleküle werden durch die Poren des Gels weniger gebremst, wandern also schneller und finden sich am Ende der Elektrophorese weiter unten im Gel als größere Moleküle.

Das vorbereitete Gel wird in eine Elektrophorese-Kammer eingesetzt und diese soweit mit Elektrophorese-Puffer befüllt, dass dieser auch die Taschen des Sammelgels füllt. Der Elektrophoresepuffer wird durch Verdünnung aus einer 5fach Stammlösung (15,1 g Tris-Base, 72 g Glycin, 5 g SDS in 1 l wässriger Lösung) gewonnen. Mit einer feinen Pipettenspitze werden nun der Proteinstandard und die zu analysierenden Auftragsmischungen in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Das einzusetzende Volumen richtet sich hierbei nach der Protein-Konzentration in der Auftragsmischung und dem Anteil der später zu detektierenden Proteine im entsprechenden Gesamtprotein-Extrakt. Nach Aufsetzen des Deckels auf die Elektrophorese-Kammer wird eine Spannung von 150 V angelegt. Sind die Proben dann vollständig ins Sammelgel eingelaufen, was durch die durch Zugabe von Bromphenolblau erreichte Blaufärbung gut erkennbar ist, wird die Spannung auf 200 V erhöht. Haben die blau gefärbten Banden das Abdichtgel erreicht, kann die Elektrophorese beendet werden.

Blotting der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden beim Blotting durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf die Nitrocellulose-Membran transferiert.

Nach der Elektrophorese wird das Gel vorsichtig aus den Platten gelöst und, nachdem das Sammel- und das Abdichtgel abgetrennt wurde, für einige Minuten in ein Bad mit Transferpuffer gelegt. Der Transferpuffer wird durch Verdünnung aus einer 10fach Stammlösung (1,92 M Glycin, 250 mM Tris-Base in wässriger Lösung, pH 8,2) gewonnen, in dem 1 Teil dieser Stammlösung mit 7 Teilen H₂O und 2 Teilen Methanol versetzt wird. Dann wird eine Nitrocellulose-Membran der Porengröße 0,2 µm bzw. 0,45 µm, wiederum abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine, die das Gel vollständig bedeckt, mit Transferpuffer gut durchtränkt und auf das Gel gelegt. Gel und Membran werden dann zwischen ebenfalls mit Transferpuffer getränkte Pads gelegt, wobei auf jeder Seite innen ein dünnes Pad aus Pappe und außen ein dickeres Pad aus speziellem Gewebe verwendet wird. Dieser Aufbau wird dann in die zur Tauchblot-Kammer gehörige Vorrichtung geklemmt und diese dann so in die Kammer eingesetzt, dass die Nitrocellulose-Membran der positiven Elektrode zugewandt ist. Dann wird für eine Stunde ein Strom der Stärke 300 mA angelegt. Nach dieser Zeit sind die Proteine entsprechend des Musters der elektrophoretischen Auftrennung auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran kann jetzt weiter bearbeitet werden.

Ponceau-S-Färbung

Um einen ersten Eindruck über die Gleichmäßigkeit der aufgetragenen Protein-Mengen zu gewinnen, werden die auf der Membran gebundenen Proteine mit Ponceau S angefärbt, einer roten Lösung, die reversibel Proteine anfärbt.

Hierzu wird die Membran mit der Protein-beladenen Seite nach oben in eine Schale mit Ponceau S eingelegt und einige Minuten darin auf dem Schüttler belassen. Die

Membran wird dann einige Male mit Wasser gewaschen, so dass nur noch die Proteinbanden rot gefärbt bleiben. Danach wird die Membran zweimal für 15 Minuten auf einem schnell eingestellten Schüttler mit TBST (Tris-Buffered Saline Tween 20) gewaschen. TBST wird aus einer 10fach TBS-Stammlösung (1,5 M NaCl, 0,1 M Tris-Base in wässriger Lösung, pH 7,5) gewonnen, indem 100 ml 10fach TBS-Stammlösung mit 5 ml 20 %igem Triton X-100 vermischt und mit H₂O auf 1 l aufgefüllt werden.

Blocken der Nitrocellulose-Membran

Die Behandlung der Nitrocellulose-Membran mit einem Blocking-Puffer soll verhindern, dass die Antikörper später unspezifisch an die Membran binden.

Für die weitere Behandlung wird die Membran mit der Protein-beladenen Seite nach oben in eine kleine Schale gelegt. Als Blocking-Puffer dient eine Lösung von 5 % Magermilchpulver in TBST. Die Membran wird für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem sich langsam bewegenden Schüttler in den Blocking-Puffer gelegt und danach wiederum zweimal mit TBST gewaschen.

Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper

Es werden gegen das gesuchte Protein gerichtete spezifische Antikörper eingesetzt, die an das auf der Nitrocellulose-Membran gebundene Protein binden. Diese dann an das Protein gebundenen Antikörper werden wiederum mit einem Zweit-Antikörper detektiert, der gegen die Struktur des Erst-Antikörpers gerichtet und mit einem Enzym, der Horseradish-Peroxidase (HRP), gekoppelt ist. In wenigen Fällen sind schon die Erst-Antikörper HRP-gekoppelt, was die Verwendung eines Zweit-Antikörpers überflüssig macht. In einem weiteren Schritt wird dieses Enzym mit einem Substrat inkubiert, das dadurch zur Chemolumineszenz angeregt wird, die auf Röntgenfilmen, dann in Form der Proteinbande, nachweisbar ist. Dieses Substrat ist als fertiges Enhanced-Chemo-Luminiscence-Kit (ECL bzw. ECL+, welches sensitiver ist) erhältlich.

Eine nach Hersteller-Angaben entsprechende Menge Erst-Antikörper wird in 10 ml Blocking-Puffer gegeben und die Membran dann in diesem über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Zweit-Antikörper, wiederum in 10 ml Blocking-Puffer, wird für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran belassen. Die Inkubation mit einem Antikörper erfolgt jeweils auf einem langsam eingestellten Schüttler. Die Membran muss danach jeweils dreimal für 15 Minuten mit TBST gewaschen werden, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach erfolgt die Sichtbarmachung der Protein-Banden mit einem ECL- bzw. ECL+-Kit auf einem Röntgenfilm nach Hersteller-Angaben.

3.6 MTT-Versuch

Der MTT-Versuch beruht darauf, dass ein gelber Farbstoff (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid = MTT) durch lebende Zellen aufgenommen und in den Zellen zu einem blau-violetten Farbstoff reduziert wird. Nach Lyse der Zellen und Übergang des Farbstoffs in eine definierte Menge Waschlösung kann nach photometrischer Absorptionsmessung auf den relativen Anteil lebender Zellen in verschiedenen Zellkulturen geschlossen werden.

Anhand des MTT-Versuchs wurde nach einem, zwei und drei Tagen das Überleben und die Proliferation von Bon-1-Zellen, jeweils im Vergleich mit Kontroll-Zellen (8 µl DMSO in 2 ml Medium), untersucht, die mit drei unterschiedlichen Konzentrationen Pioglitazon im Nährmedium (20 µM, 30 µM und 40 µM entsprechend 4 µl, 6 µl und 8 µl einer 10 mM Pioglitazon-Lösung in 2 ml Medium) behandelt wurden.

Es werden 6-Loch-Zellkultur-Platten mit Zellen besät und ein bis zwei Tage im Brutschrank belassen, bis die Zellen die gewünschte Dichte erreicht haben. Pro Tag benötigt man für jede Pioglitazon-Konzentration und die Kontrolle jeweils drei Vertiefungen, also zwei 6-Loch-Platten. Dann erfolgt die Behandlung mit Pioglitazon bzw. DMSO und Inkubation im Brutschrank über den gewünschten Zeitraum. Nach Beendigung der Inkubation wird in jede Vertiefung 100 µl MTT-Reagenz (5 mg MTT

pro 1 ml PBS) gegeben und eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Da sich die adhärennten Bon-1-Zellen vor der Apoptose vom Boden lösen und in der Nährlösung schwimmen, ist es notwendig, um alle noch lebenden Zellen zu erfassen, die Überstände danach in einzelne Röhrchen zu pipettieren, die der entsprechenden Vertiefung zugeordnet werden. Die Röhrchen werden dann für drei Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nach Zugabe von 500 µl pro Vertiefung und 150 µl pro Röhrchen einer Waschlösung (10 % Triton X-100, 0,1 M HCl in Isopropanol) werden diese 20 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Danach wird die Lösung aus jeder Vertiefung zu der Lösung im zugehörigen Röhrchen pipettiert. Aus dieser Mischung werden jeweils 100 µl zur photometrischen Messung (bei 570 nm) in einer Mikrotiterplatte eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Pioglitazon-Behandlung führt in Bon-1-Zellen zu einer Spaltung von HSP 90

Es wurden Bon-1-Zellen jeweils 48 Stunden mit einer Konzentration von 40 μM Pioglitazon im Medium inkubiert und über den gleichen Zeitraum als Kontrolle Zellen kultiviert, denen lediglich eine entsprechende Menge DMSO im Medium zugesetzt wurde. Bezüglich der gewählten Pioglitazon-Konzentration sei erwähnt, dass die Serumkonzentration von mit Pioglitazon in üblicher Dosierung behandelter Patienten zwar mit 0,5 – 5 μM zwar viel geringer ist, die Konzentration in den Zielgeweben jedoch etwa 10 – 20fach höher liegen kann (Seto-Young et al. 2007). Aus diesem Grund werden in Zellkulturen höhere Pioglitazon-Konzentrationen angewandt, und bisher publizierte Studien mit Pioglitazon in Zellkulturen wurden in einem Konzentrationsbereich von 10 – 100 μM durchgeführt. Die Gesamtproteinextrakte von mit Pioglitazon behandelten und Kontroll-Zellen wurden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Gele der 2. Dimension mit der Silberfärbung angefärbt. Die resultierenden Muster der Proteinpunkte wurden vergleichend auf korrelierende Proteinpunkte hin untersucht, die sich in ihrer Größe unterscheiden. Nach erneuter 2D-Gelelektrophorese mit erhöhtem Proteineinsatz und Coomassie-Färbung der Gele der 2. Dimension wurden die reguliert gefundenen Proteinpunkte aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine durch MALDI/TOF-Analyse identifiziert.

Ein in der 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteinextrakte der Pioglitazon-behandelten Zellen deutlich verstärkter Punkt bei etwa 40 kD wurde nach Ausschneiden und Trypsin-Verdau des Proteins und anschließender MALDI/TOF-Analyse als ein N-terminales Bruchstück des Chaperons HSP 90 identifiziert (Abbildung 2). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass HSP 90 unter Pioglitazon-Behandlung in Bon-1-Zellen einer Spaltung unterliegt.

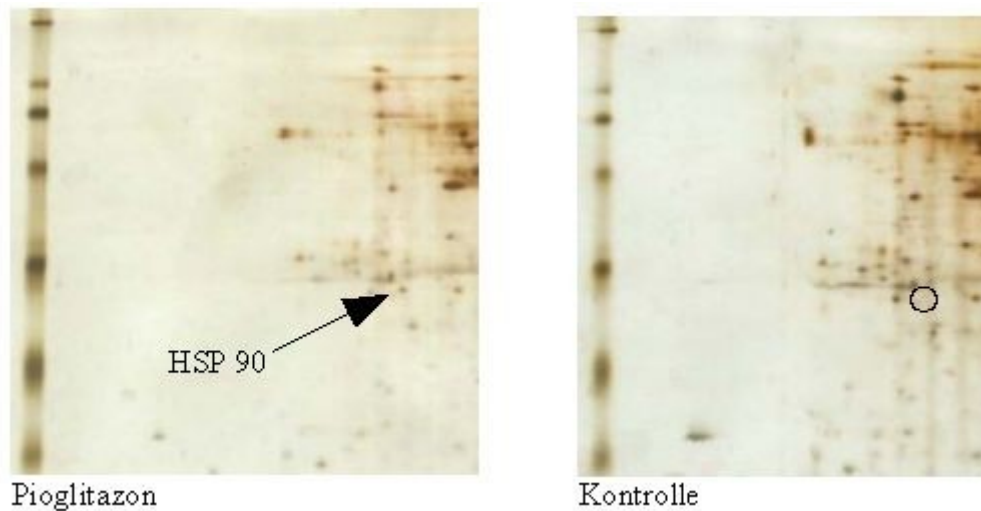


Abbildung 2: 2D-Gelelektrophoresen zweier Gesamtproteinextrakte von Bon-1-Zellen, die über 48 h mit 40 μ M Pioglitazon bzw. (im Fall der Kontroll-Zellen) mit einer entsprechenden Konzentration DMSO im Medium inkubiert wurden. In der Analyse der Pioglitazon-behandelten Zellen zeigt sich ein deutlich hochregulierter Punkt bei etwa 40 kD, der als ein N-terminales Bruchstück des Chaperons HSP 90 identifiziert wurde.

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen wurde dann versucht, dieses Bruchstück von HSP 90 nachzuweisen. Hierzu wurden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt: ein Antikörper, der sowohl das intakte HSP 90 als auch Bruchstücke detektieren soll, sowie ein Antikörper, der spezifisch gegen den N-Terminus von HSP 90 gerichtet ist. Mit keinem dieser Antikörper war es möglich, das gefundene Bruchstück von 40 kD nachzuweisen. Jedoch fand sich mit dem erstgenannten Antikörper ein starkes Signal auf Höhe von 90 kD, welches keine wesentliche Regulation aufwies, als auch ein Signal in Höhe von etwa 60 kD, welches in den Western Blot-Analysen der Gesamtproteinextrakte der Pioglitazon-behandelten Zellen sehr stark, in denen der Kontroll-Zellen aber nahezu gar nicht nachzuweisen war (Abbildung 3).

Wenn auch das in den 2D-Gelelektrophoresen gefundene Bruchstück im Western Blot nicht nachzuweisen war, konnte durch Nachweis eines größeren Bruchstücks von HSP 90 die vermehrte Spaltung des Chaperons HSP 90 in Bon-1-Zellen unter Behandlung mit Pioglitazon nachgewiesen werden.

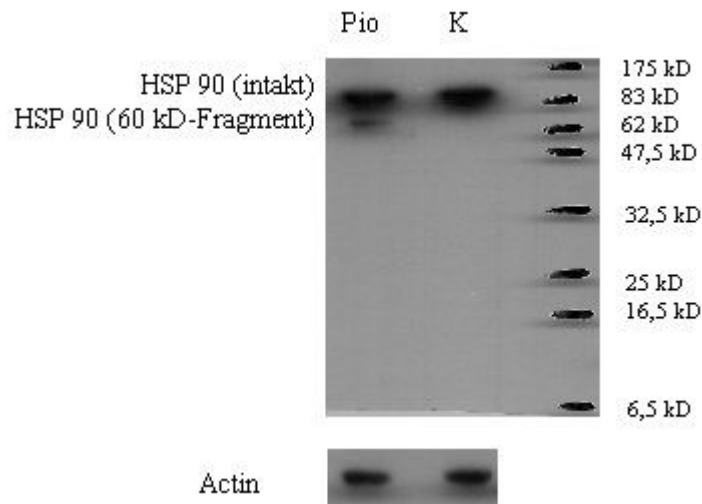


Abbildung 3: Western-Blot-Analyse von Gesamtproteinextrakten Pioglitazon-behandelter und Kontroll-Bon-1-Zellen. Bei etwa 60 kD findet sich in der Analyse des Gesamtproteinextraktes der Pioglitazon-behandelten Zellen eine Bande, welche in der Analyse der Kontroll-Bon-1-Zellen nahezu nicht nachzuweisen ist. Unten angefügt der entsprechende Actin-Blot zur Verifizierung gleicher Proteinbeladung.

Zentrale Komponente des Apoptose-Systems von Zellen sind Proteasen, die „Caspasen“ genannt werden. Diese werden durch eine Kaskade aktiviert, die durch ein Apoptose-Signal ausgelöst wird, und es resultiert die Degradation der Zelle durch die Spaltung bestimmter Proteine (Thornberry et al. 1998). So führt die Bindung von TNF α an den TNF α -Rezeptor über mehrere Schritte zur Aktivierung von Caspase 8. Diese kann dann auf zweierlei Wegen die Apoptose der Zelle verursachen. Einmal durch direkte Aktivierung von Caspase 3, sowie durch Spaltung von Bid. Dessen C-terminales Bruchstück (tBid) transloziert dann zu den Mitochondrien und löst dort die Ausschüttung von Cytochrom C aus, welches zusammen mit dem Apoptosis-activating-factor-1 (Apaf-1) die Caspase 9 aktiviert. Diese ist dann wiederum zur Aktivierung von Caspase 3 fähig. HSP 90 kann diese Kaskade durch zwei Mechanismen unterbrechen. Einmal verhindert es durch direkte Interaktion mit Bid dessen Spaltung durch die Caspase 8 und infolgedessen die durch tBid ausgelöste Cytochrom C-Ausschüttung und konsekutive Aktivierung von Caspase 3. Außerdem bildet es mit Apaf-1 einen cytosolischen Komplex und verhindert so dessen durch Cytochrom C induzierte Oligomerisation und infolge hiervon die Aktivierung von Caspase 9 (Zhao und Wang.

2004) (Abbildung 4).

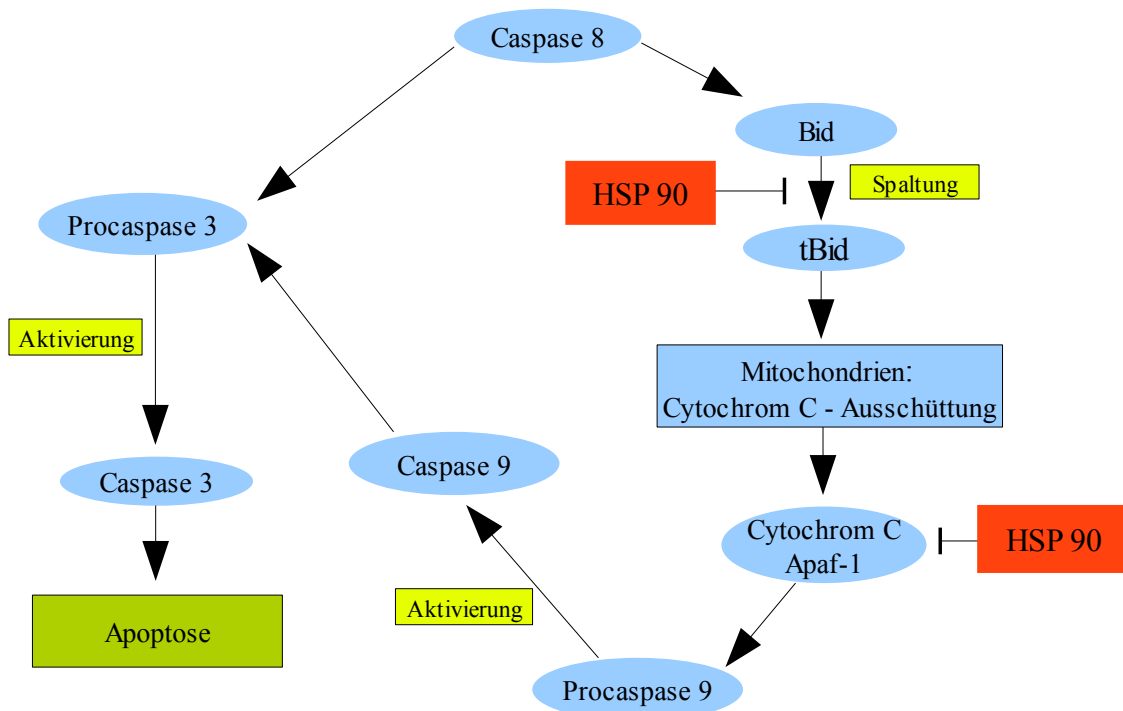


Abbildung 4: Initiierung der Apoptose über zwei Wege ausgehend von Caspase 8. HSP 90 kann diese Kaskade an zwei Stellen unterbrechen.

Da HSP 90 unter Behandlung mit Pioglitazon vermehrt gespalten wird und deswegen zu vermuten ist, dass es einen Teil seiner Funktion verlieren wird, konnte man aufgrund der oben beschriebenen Zusammenhänge folgende weitere Auswirkungen auf das Proteom der Zellen erwarten:

Die Aktivierung von Procaspase 8 erfolgt upstream der beschriebenen durch HSP 90 verursachten Effekte. Deswegen sollte sich hier kein Unterschied zwischen Pioglitazon-behandelten und Kontroll-Zellen zeigen. Bid sollte in den behandelten Zellen vermehrt gespalten werden, was bedeutet, dass die Menge an ungespaltenem Bid abnehmen, die an gespaltenem Bid (tBid) zunehmen sollte. Apaf-1 sollte in den behandelten Zellen verstärkt zusammen mit Cytochrom C die Procaspase 9 aktivieren können, was zu einer Abnahme von Procaspase 9 und zu einer Zunahme der aktiven Form Caspase 9 führen sollte. Die beiden letztgenannten Punkte sollten zu einer vermehrten Aktivierung von

Procaspase 3 führen, weswegen die Menge der inaktiven Form Procaspase 3 abnehmen, die der aktiven Form Caspase 3 zunehmen sollte.

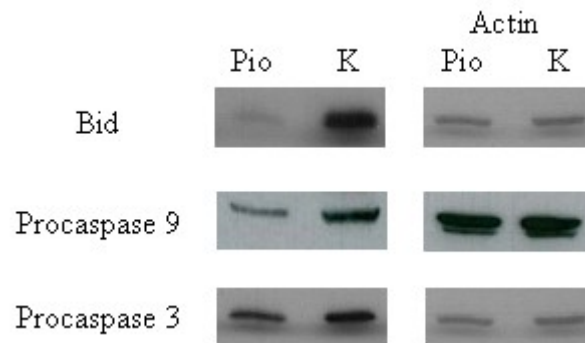


Abbildung 5: Western-Blot-Analysen von Gesamtproteinextrakten Pioglitazon-behandelter und Kontroll-Bon-1-Zellen. In den Analysen der Gesamtproteinextrakte der Pioglitazon-behandelten Zellen findet sich eine Abnahme von Bid, Procaspase 9 und Procaspase 3. Nebenstehend die entsprechenden Actin-Blots zur Verifizierung gleicher Proteinbeladung.

Im Western Blot wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Wie erwartet zeigte sich keine Regulation der Procaspase 8 in mit Pioglitazon behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Daten nicht dargestellt). Auch war die Menge an ungespaltenem Bid in den mit Pioglitazon behandelten Zellen deutlich herabgesetzt. Allerdings war es nicht möglich, tBid zu detektieren. Es zeigte sich ebenso eine deutliche Verminderung der Procaspase 9 in den mit Pioglitazon behandelten Zellen, jedoch war es nicht möglich, die aktive Form Caspase 9 nachzuweisen. Gleiches gilt für den Nachweis der Procaspase und Caspase 3. Auch hier zeigte sich in den mit Pioglitazon behandelten Zellen eine deutliche Abnahme der Procaspase 3, es gelang jedoch nicht, die aktive Form Caspase 3 sicher zu detektieren (Abbildung 5).

4.2 Pioglitazon-Behandlung führt in Bon-1-Zellen zu einer gesteigerten Sekretion von CgA und SgII, einem Verlust von Pcd4 und einer Zunahme von pAkt und PC1

Zwei in der 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteinextrakte der Pioglitazon-behandelten Bon-1-Zellen deutlich abgeschwächte Punkte wurden in der MALDI/TOF-Analyse als Chromogranin A (CgA) und Sekretogranin II (SgII) identifiziert. Die Verminderung dieser Proteine durch Pioglitazon-Behandlung über 48 h wurde mittels Western-Blot-Analyse verifiziert. Lankat-Buttgereit et al. beobachteten in Bon-1-Zellen, die stabil mit Pcd4-siRNA transfiziert wurden, ebenfalls eine deutliche Reduktion des cytosolischen CgA und SgII (Lankat-Buttgereit et al. 2008). Aufgrund der gleichartigen Regulation von CgA und SgII wurden in dieser Arbeit Gesamtproteinextrakte der Pioglitazon-behandelten und der Kontroll-Zellen auf die Menge an Pcd4 hin untersucht. Es zeigte sich in der Western-Blot-Analyse eine deutliche Abnahme an Pcd4 in den mit Pioglitazon behandelten Zellen (Abbildung 6). Dieses Ergebnis gab Anlass zu überprüfen, ob die von Lankat-Buttgereit et al. in Pcd4-siRNA-transfizierten Bon-1-Zellen modifiziert gefundenen, die CgA-Sekretion verstärkenden Signalwege auch in mit Pioglitazon behandelten Bon-1-Zellen in gleicher Weise beeinflusst werden.

Die vermehrte CgA-Sekretion in den Pcd4-siRNA-transfizierten Bon-1-Zellen scheint unter anderem auf einer Aktivierung der Protein-Kinase Akt, auch PKB oder Rac genannt, zu phosphoryliertem Akt (pAkt) zu beruhen, welche ein Substrat der PI3 Kinase ist, die wiederum unter anderem durch Insulin-like-Growth-Factor 1 (IGF-1) aktiviert werden kann (Lankat-Buttgereit et al. 2008). Behandlung mit IGF-1 führt in Bon-1-Zellen zu einer vermehrten CgA-Sekretion (von Wichert et al. 2000). Auch in den mit Pioglitazon behandelten Bon-1-Zellen zeigte sich im Vergleich zu den Kontroll-Zellen in der Western-Blot-Analyse eine deutliche Zunahme an pAkt sowohl nach 48 h als auch schon nach 24 h Behandlung mit Pioglitazon (Abbildung 6). Die Gesamtmenge an Akt blieb unverändert (persönliche Mitteilung Lankat-Buttgereit).

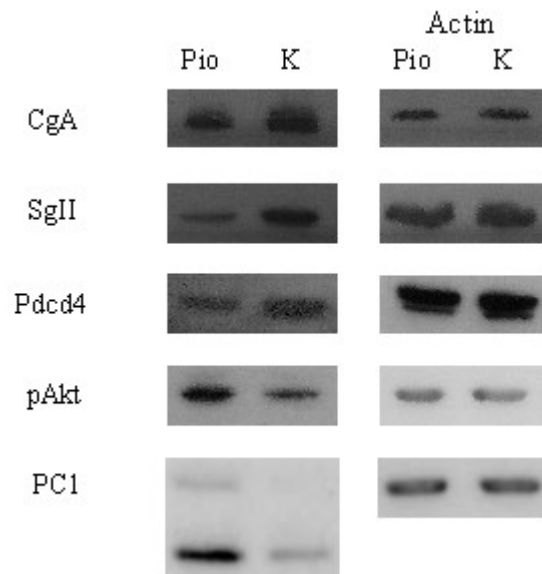


Abbildung 6: Western-Blot-Analysen von Gesamtproteinextrakten Pioglitazon-behandelter (nach 48 h) und Kontroll-Bon-1-Zellen. Es zeigt sich eine durch die Pioglitazon-Behandlung ausgelöste Verminderung an intrazellulärem CgA und SgII. In mit Pdc4-siRNA transfizierten Bon-1-Zellen wurde nachgewiesen, dass eine in diesen Zellen vermehrte CgA-Sekretion unter anderem auf einer vermehrten Aktivierung von Akt zu pAkt, sowie auf einer verstärkten Expression von PC1 beruht (Lankat-Buttgereit et al. 2008). Es zeigt sich übereinstimmend hiermit eine durch die Pioglitazon-Behandlung ausgelöste Verminderung an Pdc4, sowie eine Vermehrung von pAkt und PC1. Nebstehend die entsprechenden Actin-Blots zur Verifizierung gleicher Proteinbeladung.

Ein weiterer Weg, der in Pdc4-siRNA-transfizierten Bon-1-Zellen zu einer stark erhöhten CgA-Sekretion beizutragen scheint, ist die vermehrte Expression der Präproprotein Convertase 1 (PC1, welche identisch ist mit der Präproprotein Convertase 3, PC3), nicht jedoch der Präproprotein Convertase 2 (PC2). Sowohl die Vorläufer-Form als auch die reife Form (87 kD bzw. 66 kD) wurde in diesen Zellen stark vermehrt gefunden. Diese vermehrte PC1-Expression scheint zumindest teilweise, wie durch RT-PCR gezeigt wurde, durch eine erhöhte Transkription bedingt zu sein (Lankat-Buttgereit et al. 2008). Dieser Regulationsweg der CgA-Sekretion wurde vorher in einer hypophysären corticotropen Zelllinie der Maus beschrieben (Eskeland et al. 1996).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in Bon-1-Zellen, die 24 h bzw. 48 h mit Pioglitazon behandelt wurden, im Vergleich mit unbehandelten Kontroll-Zellen in Western-Blot-Analysen eine deutliche Erhöhung der Menge an PC1 gefunden. Ebenso fand sich kein Unterschied in der Menge an PC2 (Daten nicht dargestellt) (Abbildung 6).

Um zu zeigen, dass auch in den mit Pioglitazon behandelten Bon-1-Zellen der Grund für die intrazellulär erniedrigten CgA- und SgII-Konzentrationen nicht eine verminderte Expression, sondern eine vermehrte Sekretion ist, und um eine eventuelle Dosis- und Inkubationszeit-Abhängigkeit dieses Effekts nachzuweisen, wurden gleiche Mengen an Zellen für 24 h, 48 h und 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pioglitazon behandelt (20 μM , 30 μM und 40 μM). Die noch vorhandene Menge an lebenden Zellen nach Ablauf dieser Zeit wurde dann mit Hilfe von MTT-Versuchen bestimmt. In den Überständen wurde jeweils mittels Western-Blot-Analysen die Menge an CgA und SgII bestimmt.

Eine deutliche Vermehrung extrazellulären CgAs ergab sich hierbei nach 24 h Pioglitazon-Behandlung nur bei den mit der höchsten Konzentration Pioglitazon (40 μM) behandelten Bon-1-Zellen. Nach 48 h war diese Erhöhung dann auch deutlich in den Überständen der mit 30 μM bzw. 20 μM Pioglitazon behandelten Zellen zu beobachten. Nach 72 h sind mit Pioglitazon behandelte Bon-1-Zellen zum größten Teil abgestorben, wodurch sich der nicht mehr vorhandene Unterschied zwischen extrazellulärem CgA in den Überständen Pioglitazon-behandelter und Kontroll-Zellen erklären könnte (Abbildung 7).

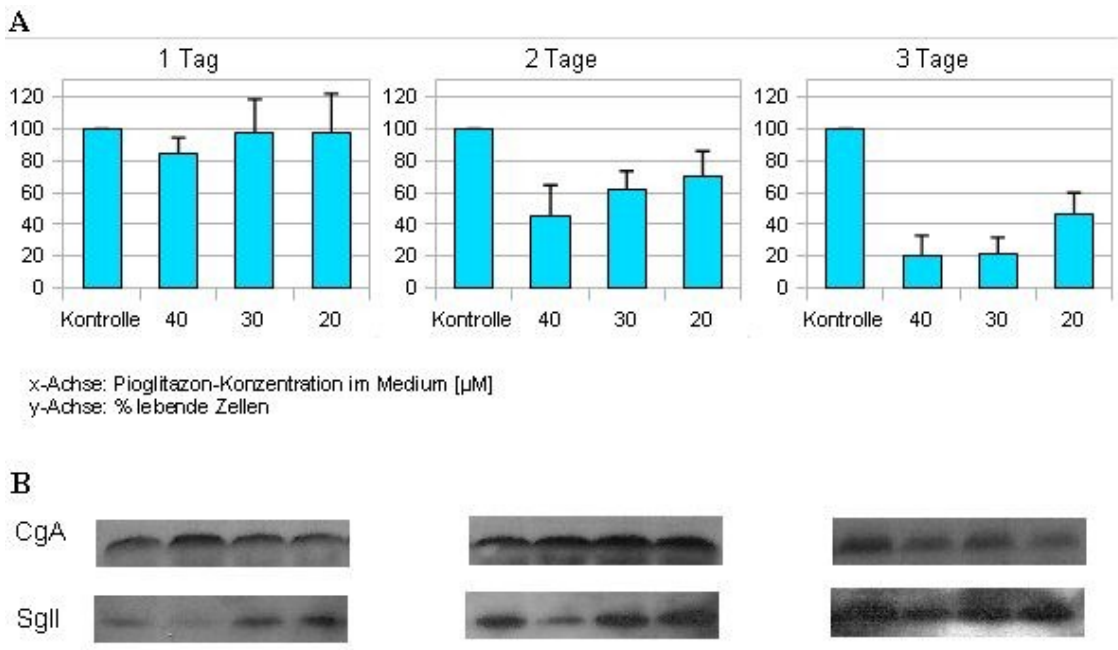


Abbildung 7: CgA- und SgII-Sekretion in Bon-1-Zellen, welche mit Pioglitazon behandelt wurden. Die Pioglitazon-Behandlung erfolgte mit Konzentrationen von 20, 30 und 40 μM Pioglitazon im Medium über 1, 2 und 3 Tage. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

A: MTT-Versuch zur Bestimmung des Anteils an lebenden Zellen in der Kultur. Nach 3 Tagen zeigt sich bei allen Pioglitazon-Konzentrationen eine deutliche Abnahme an lebenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken entsprechen einer Standardabweichung.

B: Western Blot der Überstände der mit Pioglitazon behandelten Bon-1-Kulturen. Es wurden jeweils gleiche Mengen Überstände aufgetragen und dies mittels Ponceau-S-Färbung verifiziert. Sowohl die CgA- als auch die SgII-Sekretion wird durch die Behandlung mit Pioglitazon gesteigert. (Abbildung modifiziert nach Lankat-Buttgereit et al. 2008)

Scannt man jedoch die in der Western-Blot-Analyse erhaltenen Signal-Banden digital und setzt die erhaltenen Signalstärken in Bezug zu den im MTT-Versuch erhaltenen Zellzahlen, die ja bei den mit Pioglitazon behandelten Zellen deutlich niedriger sind, erkennt man auch in den über 72 h behandelten Zellen eine Steigerung der CgA-Sekretion in den mit Pioglitazon behandelten Zellen, die bei der höchsten Pioglitazon-Konzentration am deutlichsten ist. Dieser Effekt wird dann auch in den über 24 h und

48 h behandelten Zellen noch eindrucksvoller (Abbildung 8).

Im Gegensatz hierzu ist nach 24 h, 48 h als auch nach 72 h Pioglitazon-Behandlung eine deutliche Vermehrung extrazellulären SgIIs vor allem in den Überständen der mit der niedrigsten Konzentration Pioglitazon (20 μM) behandelten Bon-1-Zellen, geringer auch der mit 30 μM behandelten Zellen zu beobachten, jedoch nicht in den Überständen der mit 40 μM behandelten Zellen (Abbildung 7). Scannt man auch diese in der Western-Blot-Analyse erhaltenen Signal-Banden digital und setzt die Signalstärken in Bezug zu den noch vorhandenen Zellzahlen, ergibt sich für die mit 40 μM Pioglitazon behandelten Zellen erst nach 72 h eine im Vergleich zu den Kontroll-Zellen deutlich erhöhte SgII-Sekretion (Abbildung 8).

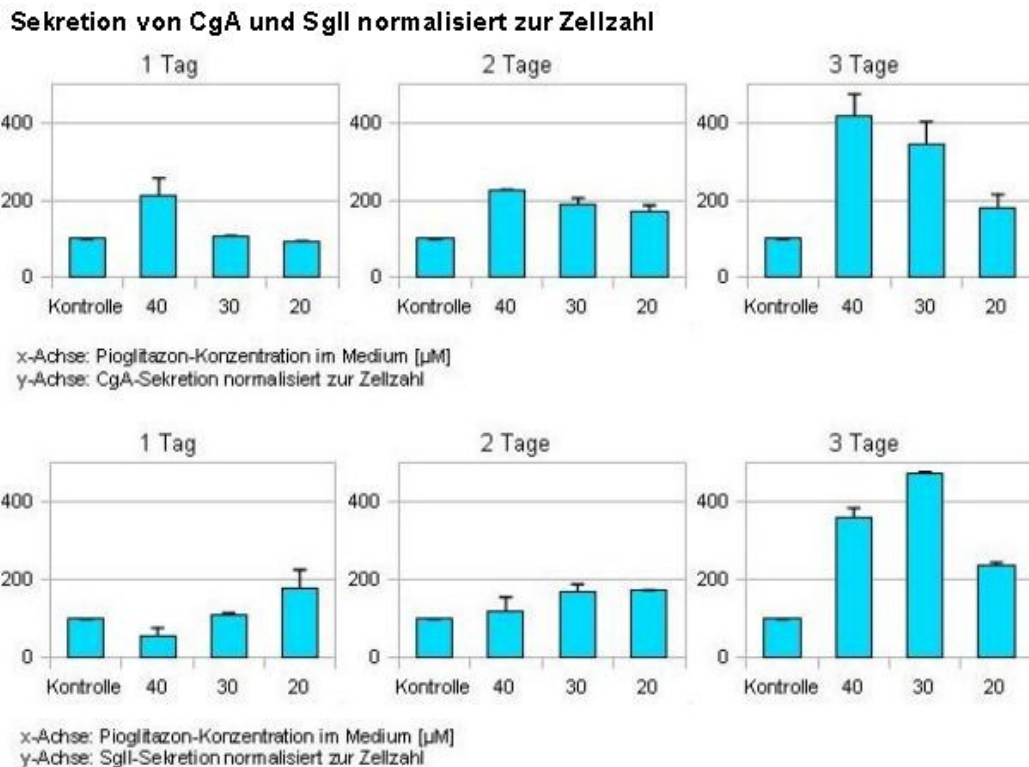


Abbildung 8: Durch digitales Scannen der im Western Blot erhaltenen Signal-Banden und Normalisierung der so erhaltenen Signalstärken zur noch vorhandenen Zahl lebender Zellen wird der Effekt verstärkter CgA- bzw. SgII-Sekretion durch Pioglitazon-Behandlung noch eindrucksvoller. Die zur Zellzahl normalisierte Sekretion der Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken entsprechen einer Standardabweichung. (Abbildung modifiziert nach Lankat-Buttgereit et al. 2008)

Es wurde also gezeigt, dass die Behandlung von Bon-1-Zellen mit Pioglitazon dosisabhängig zu einer vermehrten CgA- und SgII-Sekretion durch die Zellen führt, wobei die CgA-Sekretion eher durch höhere, die SgII-Sekretion dahingegen zunächst eher durch niedrigere Konzentrationen Pioglitazon gesteigert wird. Diese Effekte können zumindest teilweise durch eine in mit Pioglitazon behandelten Bon-1-Zellen verminderte Menge an Pcd4 und dadurch erhöhte Mengen an aktiviertem Akt (pAkt) und PC1 erklärt werden.

5 Diskussion

Neuroendokrine Tumore sind, wie oben schon beschrieben wurde, für gewöhnlich resistent gegenüber den gängigen therapeutischen Möglichkeiten wie Bestrahlung oder Chemotherapie. Umso bedeutsamer ist es, die Mechanismen, die diese Tumore so resistent machen, zu verstehen und auf diesem Wege mögliche alternative Therapieansätze zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurden Bon-1-Zellen als Modell einer neuroendokrinen Tumor-Zelllinie verwendet und diese mit dem TZD Pioglitazon behandelt, ein Wirkstoff, der bereits klinisch in der antidiabetischen Therapie eingesetzt wird.

5.1 Pioglitazon-induzierte vermehrte Spaltung von HSP 90 in Bon-1-Zellen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es unter Pioglitazon-Behandlung in Bon-1-Zellen zu einer vermehrten Spaltung des Chaperons HSP 90 kommt.

Heat-Shock-Proteine (HSPs) spielen eine essentielle Rolle als molekulare Chaperone. „Chaperon“ bedeutet im Englischen „Anstandsdame“ - diese Bezeichnung wurde gewählt, da Chaperone unter anderem neu synthetisierte Proteine „vor falschen Kontakten bewahren“, das heißt, sie bewahren sie davor, sich falsch zu falten. HSPs greifen außerdem physiologischerweise an multiplen Punkten des Apoptose-Signalweges ein und sorgen hier dafür, dass eine Stress-induzierte Schädigung nicht inadäquaterweise zum Zelltod führt (Schmitt et al. 2007).

In Tumorzellen ist die HSP-90-Expression verglichen mit der Expression in den nicht maligne entarteten Gegenstücken der Tumorzellen um das 2 – 10fache gesteigert, und HSP 90 macht dann etwa 1 – 2 % des gesamten Proteingehalts der Zelle aus (Ferrarini et al. 1992). HSP 90 spielt hier durch Chaperonisierung multipler Schlüsselproteine eine

ausschlaggebende Rolle in der Erlangung und Aufrechterhaltung aller sechs Eigenschaften, die charakteristisch für nahezu alle Arten von Karzinomen sind: 1.) Unabhängigkeit von Wachstumssignalen 2.) Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstums-Signalen 3.) Fähigkeit, die Apoptose zu umgehen 4.) unbegrenztes Replikationspotential 5.) anhaltende Angiogenese 6.) Fähigkeit zur Metastasierung und Gewebeeinfiltration (Hanahan und Weinberg 2000, Neckers 2007). Es verwundert also kaum, dass eine Überexpression von HSP 90 beispielsweise in Brustkrebs mit einer schlechten Prognose korreliert (Yano et al. 1996). Gleichzeitig stellt aber HSP 90 gerade aufgrund seiner zentralen Rolle in maligne entarteten Zellen einen interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Krebs-Therapien dar. So wird der HSP-90-Inhibitor 17-AAG mittlerweile in klinischen Phase-III-Studien getestet (Usmani et al. 2009). Krebszellen sind häufig extremen Bedingungen wie Hypoxie, Azidose oder auch exogen zugeführten Stressfaktoren wie Chemotherapie und Bestrahlung ausgesetzt und dementsprechend abhängig von der Funktion molekularer Chaperone – ein Grund für die relativ selektive Wirkung von HSP-90-Inhibitoren auf Krebszellen und die geringe Wirkung in gesunden Zellen (Whitesell et al. 2003). Ein weiterer Grund hierfür mag sein, dass viele Onkoproteine in Tumoren in mutierter Form gebildet werden, und deswegen wesentlich abhängiger von Chaperonen sind als ihre nicht mutierten Gegenstücke in gesunden Zellen (Pearl et al. 2008).

Aus dem gerade Aufgeführten wird ersichtlich, warum die Feststellung, dass HSP 90 unter Pioglitazon-Behandlung in Bon-1-Zellen vermehrt gespalten wird, zu weiteren Experimenten motivierte, um herauszufinden, ob diese vermehrte Spaltung auch einen Einfluss auf Signalwege hat, die HSP-90-abhängig sind. Beispielhaft wurde hier der Einfluss der HSP-90-Spaltung auf den Death-Receptor-Signalweg untersucht. Es musste jedoch festgestellt werden, dass der erwartete Einfluss auf die in diesen Signalweg involvierten untersuchten Proteine (Caspase 3, Caspase 9 und Bid) so nicht nachzuweisen war. Es zeigte sich zwar eine Reduktion der Proformen Procaspase 3 und 9 sowie Bid, der Nachweis der aktiven Formen Caspase 3, Caspase 9 und tBid gelang jedoch nicht. Ursächlich hierfür mag sein, dass HSP 90 unter Pioglitazon-Einfluss zwar vermehrt gespalten wird, diese Spaltung aber aufgrund der in Bon-1-Zellen vorliegenden großen Menge an HSP 90 zu keiner signifikanten Verminderung des intakten HSP 90 führt. Die Verminderung der Proformen könnte dann evtl. nicht durch

eine vermehrte Aktivierung infolge einer geringeren Menge an intaktem HSP 90 erklärt werden, sondern durch eine geringere Expression oder vermehrte Degradation der Proformen infolge der Pioglitazon-Behandlung. Dies wäre erneut ein Hinweis auf eine procancerogene Wirkung von Pioglitazon.

5.2 Pioglitazon-induzierte gesteigerte Sekretion von CgA und SgII, Zunahme von pAkt und PC1 und Pioglitazon-induzierter Verlust von Pdcd4 in Bon-1-Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter Pioglitazon-Behandlung in Bon-1-Zellen zu einer gesteigerten Sekretion von CgA und SgII ins Medium kommt, welche nicht durch ein unterschiedliches Zellwachstum bedingt ist.

Dieses Ergebnis verdient besondere Aufmerksamkeit, da CgA im Serum als diagnostischer Marker für neuroendokrine Tumore verwendet wird (Review: Taupenot et al 2003). In vielen Fällen neuroendokriner Tumore kann von der Höhe des CgA-Spiegels im Serum auf die Tumormasse und damit auf das Krankheitsstadium rückgeschlossen werden. Häufig kann auch anhand des Serum-CgA-Spiegels eine Aussage über den potentiellen Erfolg bestimmter Therapeutika getroffen werden. In Prostata-Karzinom-Zellen hemmen Antikörper gegen CgA das Zellwachstum und führen zur Induktion von Apoptose (Yu et al. 2003).

Für SgII hingegen gilt, dass es das Vorläufer-Protein von Secretoneurin (SN) ist. Dieses erregte in letzter Zeit verstärkte Aufmerksamkeit, da es eine Rolle in der (Hypoxie-bedingten) Induktion von Neovaskularisationen bei ischämischen Erkrankungen (wie z.B. pAVK, KHK, diabetische Retinopathie) und in soliden Tumoren, in denen durch exzessives Zellwachstum ebenso eine relative Hypoxie herrscht, zu spielen scheint (Fischer-Colbrie et al. 2005). So konnte in vivo in einem Cornea-Neovaskularisations-Versuch gezeigt werden, dass SN zur Induktion von Angiogenese führt, also zur Aussprossung neuer Gefäße aus bereits existierenden. In vitro induziert SN Dosis-

abhängig die Bildung von Kapillaren in einem Matrigel Assay (Kirchmair et al. 2004 a). Darüber hinaus kommt es durch SN auch zur Chemotaxis endothelialer Vorläufer-Zellen an Orte, an denen Neovaskularisation, also eine de-novo-Formation von Gefäßen aus Endothelialen Vorläufer-Zellen, stattfindet. Systemische Injektion von SN führt zu einer Erhöhung der Zahl endothelialer Vorläufer-Zellen im Blut und zu einer Vermehrung von Stammzellen im Knochenmark (Kirchmair et al. 2004 b). Es wurde in dieser Arbeit zwar nur die unter Pioglitazon-Behandlung vermehrte Sekretion des Vorläufers SgII durch Bon-1-Zellen nachgewiesen, die Vermutung liegt jedoch nahe, dass es auch zu vermehrter Sekretion von SN kommt, da die Spaltung von SgII zu SN durch PC1 stattfindet (Hoflehner et al. 1995). Auch für PC1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie unter Pioglitazon-Behandlung in Bon-1-Zellen vermehrt exprimiert wird.

Da in siPcd4-RNA-transfizierten Zellen ebenfalls eine vermehrte Sekretion von SgII und CgA nachgewiesen wurde, die zumindest teilweise durch eine erhöhte PI3-Kinase-Aktivität und konsekutiv vermehrter Aktivierung von Akt zu pAkt, sowie durch eine vermehrte Expression von PC1 zu erklären ist (Lankat-Buttgereit et al. 2008), wurde im nächsten Schritt die Expression von Pcd4 in mit Pioglitazon behandelten Bon-1-Zellen untersucht und eine deutliche Verminderung im Vergleich mit der Menge an Pcd4 in Kontroll-Zellen festgestellt. Diese Tatsache ist bereits bemerkenswert, da in den letzten Jahren die Funktion von Pcd4 als Tumorsuppressorgen bekannt wurde. In einigen Tumorarten, wie etwa Glia-, Lungen- und Nieren-Tumoren (Jansen et al. 2004), Zungen-Tumoren (Carinci et al. 2005) und hepatozellulären Karzinomen (Zhang et al. 2006), konnte eine deutliche Reduktion zellulären Pcd4s nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass Pcd4 mit dem eukaryoten Translations-Initiations-Faktor eIF4A interagiert (Göke et al. 2002) und so die Translation behindert (Yang et al. 2003). Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, dass die Translation von Carboanhydrase Typ II in Pcd4-überexprimierenden Carcinoid-Zellen (u.a. Bon-1-Zellen) gehemmt ist und es in Folge davon zu vermindertem Zellwachstum kommt (Lankat-Buttgereit et al. 2004). Desweiteren wurde an transgenen Mäusen, die eine vermehrte Pcd4-Expression in der Epidermis aufweisen, nachgewiesen, dass es unter dem Hautkrebs-erzeugenden Agenz 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) zu einer im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen stark gehemmten Aktivator-Protein-1-(AP-1) abhängigen Transkription kommt, ein Vorgang, welcher für die Tumorgenese notwendig

ist (Jansen et al. 2005).

Ein wichtiger positiver Regulator der CgA-Sekretion in neuroendokrinen Tumoren ist der Insulin-like-Growth-Factor-1 (IGF-1), dessen Wirkung vor allem über eine Erhöhung der PI3-Kinase-Aktivität erzielt wird (von Wichert et al. 2000), deren Substrat unter anderem Akt ist. In den mit siPdc4-RNA-transfizierten Bon-1-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass ein Weg, über den die Sekretion von CgA reguliert wird, der über eine erhöhte PI3-Kinase-Aktivität und konsekutiv vermehrter Phosphorylierung von Akt zur aktiven Form pAkt ist. Dieses Ergebnis konnte durch den Nachweis verminderten pAkt in Pdc4-überexprimierenden Zellen noch bestätigt werden (Lankat-Buttgereit et al. 2008). Übereinstimmend mit diesen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit auch in mit Pioglitazon behandelten Bon-1-Zellen eine deutliche Zunahme an pAkt verglichen mit Kontroll-Zellen nachgewiesen.

Akt ist das humane Homolog zum viralen Onkoprotein v-Akt, welches verantwortlich für einen bestimmten Leukämie-Typ in Mäusen ist (Staal 1987). Eine Überexpression von Akt wurde u.a. in Karzinomen der Brust, des Colons, des Ovars, des Pankreas, der Prostata und der Gallenwege beschrieben. In diesen Karzinomen konnte auch eine vermehrte Aktivierung von Akt zu pAkt nachgewiesen werden. Interessanterweise korreliert das Vorhandensein von aktiviertem Akt in vielen menschlichen Krebsarten mit Chemo- und Radiotherapie-Resistenz und mit einer schlechten Prognose (Tanno et al. 2004, Pérez-Tenorio and Stal 2002). pAkt moduliert die Funktion vieler Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus teilhaben, wie z. B. P21/Waf1/Cip1, P27/Kip2 und den Tuberous-Sclerosis-Complex 2 (TSC2) und verhindert so deren antiproliferative und Wachstums-hemmende Effekte. Desweiteren übt pAkt in vielen Zelltypen antiapoptotische Effekte aus, indem es proapoptotische Faktoren phosphoryliert und damit inaktiviert (z. B. Bad und die Forkhead Familie der Transkriptionsfaktoren) bzw. antiapoptotische Faktoren phosphoryliert und damit aktiviert (z. B. I κ B-Kinase α) (Review: siehe Osaki et al 2004). Interessanterweise ist auch Pdc4 ein Substrat von pAkt und wird von diesem phosphoryliert, was einerseits zu einer Translokation von Pdc4 in den Nukleus führt, andererseits Pdc4 in seiner Funktion als Inhibitor der AP-1-abhängigen, für die Tumorgenese benötigten, Transkription hemmt (Palamarchuk et al. 2005).

Für die Hemmung des PI3-Kinase/Akt-Weges mit Hilfe des PI3-Kinase-Inhibitors Wortmannin in Bon-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese - wie erwartet - zu einer Hemmung der CgA-Sekretion führte. Sie hatte aber auch eine Vermehrung des intrazellulären Pdc4 zur Folge. Da umgekehrt eine Pdc4-Überexpression eine erhöhte PI3-Kinase-Aktivität mit konsekutiv vermehrtem pAkt nach sich zieht, scheint hier eine Art Feedback-Mechanismus vorzuliegen (Lankat-Buttgereit et al. 2008). Da die Hemmung der PI3-Kinase-Aktivität vielfach als ein neuer Ansatz der Krebstherapie diskutiert wird (Review: siehe Vivanco und Sawyers 2002; Chen et al. 2005), erscheint es möglich, dass Pdc4 als ein neuer Ansatzpunkt zur Regulierung dieses Weges dienen könnte (Lankat-Buttgereit et al. 2008). Weiterhin gibt es Daten, die auch auf eine SN-bedingte Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Weges hinweisen. So führt SN in Humanen Umbilical-Venen-Endothel-Zellen (HUVEC) zur Neubildung von Kapillaren sowie zu gesteigerter Proliferation und übt antiapoptotische Effekte aus. Es wurde neben der Aktivierung des Mitogen-activated-protein-(MAP)-Kinase-Weges eine SN-bedingte Aktivierung des PI3/Akt-Kinase-Weges nachgewiesen. Entsprechend kam es zu vermehrter Aktivierung von Akt, ein Effekt, der durch Wortmannin zu unterbinden war (Kirchmair et al. 2004).

Wie schon erwähnt, zeigte sich in siPdc4-transfizierten Bon-1-Zellen eine deutliche Vermehrung sowohl der PC1-mRNA als auch des Proteins an sich, wohingegen sich in Pdc4-überexprimierenden Zellen eine Reduktion von PC1 zeigte (Lankat-Buttgereit et al. 2008). Aufgrund von Daten, die zeigten, dass es durch die Transfektion von hypophysären corticotropen Maus-Zellen mit antisense-PC1-RNA zur Aufhebung der regulierten Sekretion von CgA kommt (Eskeland et al. 1996), wurde hier ein weiterer Weg der CgA-Sekretions-Regulation durch Pdc4 vermutet. In Übereinstimmung hiermit wurde in der vorliegenden Arbeit auch in mit Pioglitazon behandelten und somit vermindert Pdc4-exprimierenden Bon-1-Zellen eine deutliche Vermehrung des intrazellulären PC1 nachgewiesen. Eine exzellente Methode, viel über die Funktion eines Proteins zu erfahren, sind knockout-Modelle. So sind PC1-knockout-Mäuse zwar lebensfähig, jedoch deutlich wachstumsretardiert und zeigen multiple Defekte in der Reifung von Prohormonen (unter anderem von GHRH, Proinsulin und Proglucagon) zur aktiven Form der Hormone. Interessanterweise werden diese Mäuse nach Glucose-Injektion nicht hyperglykäm. Die Hyperproinsulinämie scheint also nicht die

Glucosehomöostase zu beeinträchtigen (Zhu et al. 2002). Im Gegensatz dazu war in zwei Fällen von Frauen mit einem Defekt der Prohormon Convertase 1/3 eine deutliche Adipositas und eine mit einer gestörten Glucosehomöostase einhergehende Hyperproinsulinämie zu verzeichnen (Jackson et al. 1997, Jackson et al. 2003). Da in mit Pioglitazon behandelten Zellen eine vermehrte PC1-Expression nachzuweisen ist, könnte daraus geschlossen werden, dass es durch Pioglitazon nicht nur zu einer verminderten peripheren Insulinresistenz kommt, sondern ebenso zu einer verbesserten Insulinbildung und -Sekretion der β -Zellen des Pankreas.

Wie bereits erwähnt spielt PC1 auch eine wichtige Rolle in der Prozessierung von Proglucagon in seine aktiven Abkömmlinge. Im Gegensatz zu PC2, welches die Bildung von Glucagon, ein den Serum-Glucose-Spiegel erhöhendes Hormon, katalysiert, führt PC1 zur Bildung von Glucagon-like-Peptide-1 (GLP-1), ein insulinotropes, den Serum-Glucose-Spiegel senkendes Hormon. Normalerweise wird in intestinalen L-Zellen bevorzugt PC1 exprimiert, wohingegen in den α -Inselzellen des Pankreas fast ausschließlich PC2 und kaum PC1 exprimiert wird (Orskov et al. 1992; Scopsi et al. 1995; Steiner et al. 1996; Steiner et al. 1998). Eine Möglichkeit, in Ratten einen Diabetes zu induzieren, ist die intraperitoneale Behandlung mit Streptozotocin (STZ), welche zu einem Untergang von β -Inselzellen führt. Bemerkenswert ist nun, dass in den α -Zellen dieser diabetischen Ratten sowohl PC2 als auch PC1 in größeren Mengen exprimiert wird, und es konnte gezeigt werden, dass dies zu einer vermehrten Bildung und Sekretion von parakrin auf die β -Inselzellen wirkendem GLP-1 sowie zu einem erhöhten Serum-Spiegel von GLP-1 führt. Es wurde diskutiert, dass die ebenfalls erhöhte PC2-Expression und Glucagon-Produktion lediglich ein Nebeneffekt der durch die Hyperglykämie stimulierten Proglucagon-Bildung mit der primären Intention der GLP-1-Bildung ist (Nie et al. 2000). Hingegen führt Glucose in gesunden Pankreasinseln von Ratten zu einer deutlichen Stimulation der PC1-, nicht jedoch der PC2-Synthese (Alarcon et al. 1993).

Da es auch in mit Pioglitazon behandelten β -Zellen zu einer vermehrten Expression von PC1, nicht aber von PC2 kommt, mag spekuliert werden, ob eine Pioglitazon-Behandlung über eine Verminderung der Pcdcd4-Expression die Wirkung einer Hyperglykämie nachahmt bzw. verstärkt und so konsekutiv den Serum-Glucose-

Spiegel senkt. Es sollte jedoch Beachtung finden, dass es in mit STZ behandelten diabetischen Ratten auch in der Milz zu einer vermehrten Expression von PC1 kommt. Es wird angenommen, dass diese zu einer verstärkten Aktivierung vieler immunmodulierender Hormone führt und mit der erhöhten Infektanfälligkeit diabetischer Patienten in Verbindung gebracht werden kann (Nakashima et al. 2001).

Im Menschen wurde eine vermehrte PC1-Expression in einigen Neoplasien nachgewiesen, u.a. in Hypophysen-Adenomen, Mamma-Karzinomen, Karzinoiden der Bronchien, des Rektums, der Gallengänge, medullären Schilddrüsen-Karzinomen (Tzimas et al. 2005; Review: Khatib et al. 2002). Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen und deren Lebermetastasen zeigten eine deutlich erhöhte PC1- und PC2-Expression in den Metastasen, aber nur in einem Teil der primären Karzinome, weswegen hier ein Selektionsprozess vermutet wurde (Tzimas et al. 2005). Übereinstimmend hiermit konnte gezeigt werden, dass Kolonkarzinom-Zellen, die den PC-Inhibitor α 1-Antitrypsin Portland (α 1-PDX) überexprimieren, eine verminderte Produktion von TNF α und IL-1 α aufweisen (Scamuffa et al. 2008). Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der initialen Adhäsion zirkulierender Karzinomzellen in der Leber (Khatib et al. 1999; Khatib et al. 2002 a; Khatib et al. 2005, Kitakata et al. 2002). Werden diese α 1-PDX überexprimierenden Kolon-Karzinomzellen in die Portal-Vene von Mäusen injiziert, zeigen sie eine signifikant reduzierte Fähigkeit zur Lebermetastasen-Bildung (Scamuffa et al. 2008). In der Arbeit von Scamuffa et al. wurde die PC1-Aktivität in den α 1-PDX-überexprimierenden Kolonkarzinom-Zellen leider nicht untersucht. In einer anderen Arbeit wurde aber eine Hemmung von PC1 durch eine α 1-PDX-Überexpression in mehreren Zelllinien nachgewiesen (Benjannet et al. 1997). Es könnte also durchaus ein Zusammenhang zwischen einer Hemmung von PC1 durch α 1-PDX und der verminderten TNF α - und IL-1 α -Produktion bestehen. Wegen der aufgeführten Daten scheint es möglich, dass die Regulation der Expression von PC1 einen weiteren Weg der Tumorsuppression durch Pcd4 darstellt. Erhöhte CgA-Serum-Level könnten dann hinweisend auf eine erhöhte PC1-Expression eines Tumors sein (Lankat-Buttgereit et al. 2008).

Insgesamt wird ersichtlich, dass es durch Pioglitazon-Behandlung in Bon-1-Zellen zur Modifikation multipler Signalwege kommt, die die Aktivität oder die intra- und

extrazelluläre Konzentration vieler Schlüsselmoleküle wie Caspasen, CgA, SgII, Pdc4, pAkt und PC1 beeinflussen. Aufgrund der durch die Pioglitazon-Behandlung von Bon-1-Zellen erzielten vermehrten CgA-Sekretion, verminderten Expression von Pdc4 und vermehrten Bildung von pAkt und PC1, alles Vorgänge, die in vielen Tumoren mit einer erhöhten Malignität und schlechteren Prognose einhergehen, scheint es notwendig, die Anwendung von Pioglitazon am Menschen zu reevaluieren.

6 Literaturverzeichnis

Alarcon C, Lincoln B, Rhodes CJ (1993) The biosynthesis of the subtilisin-related proprotein convertase PC3, but not that of the PC2 convertase, is regulated by glucose in parallel to proinsulin biosynthesis in rat pancreatic islets. *J Biol Chem* 268:4276–80

Argmann CA, Cock TA, Auwerx J (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor γ : the more the merrier? *Eur J Clin Invest* 35(2):82-92

Arnold C (2007) Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Praxis (Bern 1994)* 96(1-2):19-28. Review. German.

Barnes PJ, Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066-71

Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA (2004) Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89:436-78

Benjannet S, Savaria D, Laslop A, Munzer JS, Chrétien M, Marcinkiewicz M, Seidah NG (1997) Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 272(42):26210-8

Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT (2005) PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 26:244-51

Blaschke F, Spanheimer R, Khan M, Law RE (2006) Vascular effects of TZDs: New implications. *Vascul Pharmacol* 45:3-18

Burgermeister E, Seger R (2008) PPAR γ and MEK Interactions in Cancer. *PPAR γ Research*, 2008:309469

Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, Rubini C, Chiesa F, Ionna F, Palmieri A, Maiorano E, Pastore A, Laino G, Dolci M, Pezzetti F (2005) Potential markers of tongue tumor progression selected by cDNA microarray. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18(3):513-24

Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, Bosca L (2000) Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* 20:1692-98

Chang AJ, Song DH, Wolfe MM (2006) Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mediates gastrin-stimulated colorectal cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 281:14700-10

Chattopadhyay N, Singh DP, Heese O, Godbole MM, Sinohara T, Black PM, Brown EM (2000) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in human astrocytic cells: PPAR gamma agonists as inducers of apoptosis. *J Neurosci Res* 61:67-74

Chen F, Wang M, O'Connor JP, He M, Tripathi T, Harrison LE (2003) Phosphorylation of PPAR γ via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF- κ B. *J Cell Biochem* 90(4):732-44

Chen YL, Law PY, Loh HH (2005) Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5(6):575-89

Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefèbvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Korányi L, Laakso M, Mokán M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J, PROactive investigators (2005) Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial in macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 366:1279-89

Elnemr A, Ohta T, Iwata K, Ninomia I, Fushida S, Nishimura G, Kitagawa H, Kayahara

M, Yamamoto M, Terada T, Miwa K (2000) PPAR gamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 17:1157-64

Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP (1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXH mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8806-11

Eskeland NL, Zhou A, Dinh TQ, Wu H, Parmer RJ, Mains RE, O'Connor DT (1996) Chromogranin A processing and secretion: specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway. *J Clin Invest* 98(1):148-56

Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C (1992) Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 19;51(4):613-9.

Fischer-Colbrrie R, Kirchmair R, Kähler CM, Wiedermann CJ, Saria A (2005) Secretoneurin: a new player in angiogenesis and chemotaxis linking nerves, blood vessels and the immune system. *Curr Protein Pept Sci* 6(4):373-85

Galusca B., Dumollard JM, Chambonniere M, Germain N, Prades JM, Péoc'h M, Estour B (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma immunohistochemical expression in human papillary thyroid carcinoma tissues. Possible relationship to lymph node metastasis. *Anticancer Res* 24:1993-1997

Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U (2007) The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 192:67-74

Göke A, Göke R, Knolle A, Trusheim H, Schmidt H, Wilmen A, Carmody R, Göke B, Chen YH (2002) DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem Biophys Res Commun* 297(1):78-82

Govindarajan R, Ratnasinghe L, Simmons DL, Siegel ER, Midathada MV, Kim L, Kim PJ, Owens RJ, Lang NP (2007) Thiazolidinediones and the risk of lung, prostate, and

colon cancer in patients with diabetes. *J Clin Oncol* 25(2):57-8

Gustafsson BI, Kidd M, Modlin IM (2008) Neuroendocrine tumors of the diffuse neuroendocrine system. *Curr Opin Oncol* 20(1):1-12

Han S, Roman J (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? *Anticancer Drugs* 18(3):237-44

Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975) Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2994-98

Hamblin M, Chang L, Fan Y, Zhang J, Chen YE (2009): PPARs and the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal* 11(6):1415-52

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70. Review.

Hoflehner J, Eder U, Laslop A, Seidah NG, Fischer-Colbrie R, Winkler H (1995) Processing of secretogranin II by prohormone convertases: importance of PC1 in generation of secretoneurin. *FEBS Lett* 60(3):294-8

Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I (2003) „Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52(7):1655-63

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT., Hutton JC, O’Rahilly S (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 16:303–6

Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson M, Varro A, Dockray GJ, Holst JJ, Brubaker PL, Corvol P, Polonsky KS (2003) Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest* 112:1550–60

Jansen AP, Camalier CE, Stark C, Colburn NH (2004) Characterization of programmed

cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. *Mol Cancer Ther* 3(2):103-10

Jansen AP, Camalier CE, Colburn NH (2005) Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis. *Cancer Res* 65(14):6034-41

Khatib AM, Kontogianna M, Fallavollita L, Jamison B, Meterissian S, Brodt P (1999) Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res* 59(6):1356-61

Khatib AM, Fallavollita L, Wancewicz EV, Monia BP, Brodt P (2002 a) Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. *Cancer Res* 62(19):5393-8

Khatib AM, Siegfried G, Chrétien M, Metrakos P, Seidah NG (2002 b) Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol* 160(6):1921-35

Khatib AM, Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Samani A, Kontogianna M, Meterissian S, Brodt P (2005) Charakterisierung der host proinflammatorischen Antwort auf Tumorzellen während der initialen Stadien der Lebermetastase. *Am J Pathol* 167(3):749-59

Kim SW, Choi OK, Chang MS, Shin CS, Park KS, Kim SY (2008) Thiazolidinedione inhibits the growth of PC12 cells both in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 371(2):197-202

Kirchmair R, Egger M, Walter DH, Eisterer W, Niederwanger A, Woell E, Nagl M, Pedrini M, Murayama T, Frauscher S, Hanley A, Silver M, Brodmann M, Sturm W, Fischer-Colbrie R, Losordo DW, Patsch JR, Schratzberger P (2004 a) Secretoneurin, an angiogenic neuropeptide, induces postnatal vasculogenesis. *Circulation* 110:1121-7

Kirchmair R, Gander R, Egger M, Hanley A, Silver M, Ritsch A, Murayama T, Kaneider N, Sturm W, Kearny M, Fischer-Colbrie R, Kircher B, Gaenger H, Wiedermann CJ, Ropper AH, Losordo DW, Patsch JR, Schratzberger P (2004 b) The

neuropeptide secretoneurin acts as a direct angiogenic cytokine in vitro and in vivo. *Circulation* 109(6):777-83

Kitakata H, Nemoto-Sasaki Y, Takahashi Y, Kondo T, Mai M, Mukaida N (2002) Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of colon 26 cells. *Cancer Res* 62(22):6682-7

Lankat-Buttgereit B, Gregel C, Knolle A, Hasilik A, Arnold R, Göke R (2004) Pcd4 inhibits growth of tumor cells by suppression of carbonic anhydrase type II. *Mol Cell Endocrinol* 214(1-2):149-53

Lankat-Buttgereit B, Müller S, Schmidt H, Parhofer KG, Gress TM, Göke R (2008) Knockdown of Pcd4 results in induction of proprotein convertase 1/3 and potent secretion of chromogranin A and secretogranin II in a neuroendocrine cell line. *Biol Cell* 100(12):703-15

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*,272(6):3406-410

Lehrke M, Lazar MA (2005) The many faces of PPAR γ . *Cell* 123(6):993-99

Liu Y, Meng Y, Liu H, Li J, Fu J, Chen X (2006) Growth inhibition and differentiation induced by peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand rosiglitazone in human melanoma cell line a375. *Med Oncol* 23:393-402

Martelli ML, Iuliano R, Le Pera I, Sama I, Monaco C, Cammarota S, Kroll T, Chiariotti L, Santoro M, Fusco A (2002) Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4728-35

Nakashima M, Nie Y, Li QL, Friedmann TC (2001) Up-regulation of splenic prohormone convertases PC1 and PC2 in diabetic rats. *Regul Pept* 102(2-3):135-45

Neckers L (2007) Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci* 32(3):517-30. Review.

Nemenoff RA (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ in lung cancer: defining specific versus „off-target“ effectors. *J Thorac Oncol* 2(11):989-92

Nemenoff RA, Weiser-Evans M, Winn RA (2008) Activation and Molecular Targets of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Ligands in Lung Cancer. *PPAR Res* 2008:156875

Nie Y, Nakashima M, Brubaker PL, Li QL, Perfetti R, Jansen E, Zambre Y, Pipeleers D, Friedman TC (2000) Regulation of pancreatic PC1 and PC2 associated with increased glucagon-like peptide 1 in diabetic rats. *J Clin Invest* 105(7):955-65

Nikou GC, Lygidakis NJ, Toubanakis C, Pavlatos S, Tseleni-Balafouta S, Giannatou E, Mallas E, Safioleas M (2005) Current diagnosis and treatment of gastrointestinal carcinoids in a series of 101 patients: the significance of serum chromogranin-A, somatostatin receptor scintigraphy and somatostatin analogues. *Hepatogastroenterology* 52(63):731-41

Nissen SE, Wolski K (2007) Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356:2457-71

Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T (1998) Troglitazone increases the number of small adipocytes without change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101:1354-61

Orskov C (1992) Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia*. 35:701–711

Osaki M, Oshimura M, Ito H (2004) PI3K-Akt pathway: Its function and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9: 667-76

Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Aqeilan RI, Croce CM, Pekarsky Y (2005) Akt phosphorylates and regulates Pcd4 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 65(24):11282-6

Palmer CNA, Hsu MH, Griffin KJ, Johnson EF (1995) Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J Biol Chem* 270(27):16114-121

Pearl LH, Prodromou C, Workman P (2008) The hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* 410(3):439-53. Review.

Pérez-Tenorio G, Stål O; Southeast Sweden Breast Cancer Group (2002) Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer* 12;86(4):540-5

Quinn CE, Hamilton PK, Lockhart CJ, McVeigh GE (2008) Thiazolidinediones: effects on insulin resistance and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 153:636-45

Radhakrishnan SK, Gartel AL (2005) The PPAR-gamma agonist pioglitazone post-transcriptionally induces p21 in PC3 prostate cancer but not in other cell lines. *Cell Cycle* 4:582-4

Ramos-Nino ME, MacLean CD, Littenberg B (2007) Association between cancer Prevalence and use of thiazolidinediones: results from the Vermont Diabetes Information System. *BMC Med* 5: 17

Rios-Vazquez R, Marzoa-Rivas R, Gil-Ortega I, Kaski JC (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists for management and prevention of vascular disease in patients with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiovasc Drugs* 6:231-42

Salomone OA, Elliot PM, Calvino R, Holt D, Kaski JC (1996) Plasma immunoreactive endothelin concentration correlates with severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris and normal ventricular function. *J Am Coll Cardiol* 28:14-19

Scamuffa N, Siegfried G, Bontemps Y, Ma L, Basak A, Cherel G, Calvo F, Seidah NG, Khatib AM (2008) Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *Clin Invest* 118(1):352-63

Schaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsuhashi N, Ohnishi S, Wolfe MM, Turner JR,

Nakajima A, Borkan SC, Saubermann LJ (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 65:2251-2259

Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C (2007) Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussion in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 81(1):15-27. Epub 2006 Aug 24. Review.

Scopsi L, Gullo M, Rilke F, Martin S, Steiner DF (1995) Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* 80:294–301

Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, Nakatani T, Wada S, Kawahito Y, Kishimoto T, Sano H (2002) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate* 51:108-116

Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichsrath J (2007) Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. *J Cell Physiol* 212(1):1-12

Seto-Young D, Avtanski D, Strizhevsky M, Parikh G, Patel P, Kaplun J, Holcomb K, Rosenwaks Z, Poretsky L (2007) Interactions among peroxisome proliferator activated receptor-gamma, insulin signaling pathways, and steroidogenic acute regulatory protein in human ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(6):2232-9

Smith U, Gogg S, Johansson A, Olausson T, Rotter V, Svalstadt B (2001) Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPAR-alpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *FASEB J* 15:215-20

Staal SP (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(14):5034-7

Steiner DF (1998) The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 2:31–9

Steiner DF, Rouille Y, Gong Q, Martin S, Carroll R, Chan SJ (1996) The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab* 22:94–104

Szczeblowska D (2007) Diagnostics and treatment of neuroendocrine tumors of the digestive tract in the light of the present standards. *Pol Merkur Lekarski* 22(131):437-41. Review. Polish.

Takahashi H, Fujita K, Fujisawa T, Yonemitsu K, Tomimoto A, Ikeda I, Yoneda M, Masuda T, Schaefer K, Saubermann LJ, Shimamura T, Saitoh S, Tachibana M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A (2006) Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of invasive properties. *Cancer Sci* 97:854-860

Takano H, Komuro I (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J* 73(2):214-20

Tanno S, Yanagawa N, Habiro A, Koizumi K, Nakano Y, Osanai M, Mizukami Y, Okumura T, Testa JR, Kohgo Y (2004) Serine/threonine kinase AKT is frequently activated in human bile duct cancer and is associated with increased radioresistance. *Cancer Res* 64(10):3486-90

Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348(12):1134-49

Teboul L, Febbraio M, Gaillard D, Amri EZ, Silverstein R, Grimaldi PA (2001) Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *J Biochem* 360:305-12

Tzimas GN, Chevet E, Jenna S, Nguyễn DT, Khatib AM, Marcus V, Zhang Y, Chrétien M, Seidah N, Metrakos P (2005) Abnormal expression and processing of the proprotein convertases PC1 and PC2 in human colorectal liver metastases. *BMC Cancer* 17(5):149

Usmani SZ, Bona R, Li Z (2009) 17 AAG for HSP 90 inhibition in cancer – from bench to bedside. *Curr Mol Med* 9(5):654-64. Review.

Vignati S, Albertini V, Rinaldi A, Kwee I, Riva C, Oldrini R, Capella C, Bertoni F, Carbone GM, Catapano CV (2006) Cellular and molecular consequences of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in ovarian cancer cells. *Neoplasia* 8:851-61

Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinasas AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7):489-501

Walcher D, Marx N (2006) Glitazone 2006 – ein Update. *Journal für Kardiologie* 13:140-143

Whitesell L, Bagatell R, Falsey R (2003) The stress response: implications for the clinical development of hsp90 inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets* 3(5):349-58. Review.

von Wichert G, Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedenmann B, Boehm BO, Adler G, Seufferlein T (2000) Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuronendocrine tumor cells. *Cancer Res* 60(16):4573-81.

Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, Lockett SJ, Sonenberg N, Colburn NH (2003) The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol* 23(1):26-37

Yano M, Naito Z, Tanaka S, Asano G (1996) Expression and roles of heat shock proteins in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 87(9):908-15

Yki-Jarvinen H (2004) Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 351:1106-18

Yu DS, Hsieh DS, Chang SY (2003) Modulation of prostate carcinoma cell growth and apoptosis by chromogranin A. *J Urol* 170(5):2031-5

Yu J, Qiao L, Zimmermann L, Ebert MP, Zhang H, Lin W, Rocken C, Malfertheimer P, Farrell GC (2006) Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in

vitro and in vivo. *Hepatology* 43:134-43

Yu S, Reddy JK (2007) Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771(8):936-51

Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Hamajima H, Yasutake T, Eguchi Y, Ideguchi H, Yamamoto K, Matsuhashi S. (2006) Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 25(45):6101-12

Zhao C, Wang E (2004) Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Signal* 16(3):313-21

Zhu X, Zhou A, Dey A, Norrbom C, Carroll R, Zhang C, Laurent V, Lindberg I, Ugleholdt R, Holst J J, Steiner DF (2002) Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10293–8

Zhu X., Orci L, Carroll R, Norrbom C, Ravazzola M, Steiner DF (2002) Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lacking prohormone convertase 1/3. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10299–304

7 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Basler, Baum, Boudriot, Elsässer, Feuser, Frenking, Gerdes, Göke, Gromes, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Jungclas, Kirchner, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Mueller, Mutters, Radsak, Renz, Richter, Röhm, Röper, Schäfer, Schmidt, Schmidt, Schrader, Seitz, Sundermeyer, Vogelmeier, Weihe, Westermann, Wulf

8 Danksagung

Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Lankat-Buttgereit danke ich sehr für die Überlassung des Themas und die Unterstützung dieser Arbeit. Ebenso gilt ihr mein besonderer Dank für die Einweisung in die von mir angewandten Methoden und in das wissenschaftliche Arbeiten. Indem sie diese Arbeit begleitet und mir stets mit gutem Rat bei der Lösung von Problemen zur Seite stand, hat sie ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzlicher Dank geht auch an Frau D. Bonorden und Herrn H. Schmidt, welche mir ebenso stets unterstützend und mit einem offenen Ohr bei der Lösung anfallender Probleme zur Seite standen.