

7 Zusammenfassung

Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste primäre Gehirntumor und gehört zu den aggressivsten Neoplasien des Menschen. Trotz multimodalen Therapieinterventionen liegt die mittlere Überlebenszeit nach Standardtherapie nur bei ca. 15 Monaten nach Diagnose. Eine Heilung ist bislang nicht möglich. Neben einer extensiven Proliferation und diffusen Gehirninfiltration stellen die tumorinduzierte Neurodegeneration und das tumorinduzierte Hirnödem pathognomische Kennzeichen und entscheidende Morbiditätsfaktoren der Erkrankung dar. GBM-Zellen sekretieren eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren (Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, immunsuppressive Faktoren u.a.), welche ihre eigene Tumorprogression fördern. Darunter sekretieren die Tumoren hohe Glutamatmengen, welche neurotoxisch wirken. Aufgrund dessen stellt die pharmakologische Inhibition der Freisetzung dieser tumorsekretierten Faktoren eine sehr vielversprechende Strategie für eine adjuvante GBM-Therapie dar.

In eigenen Vorstudien wurde gezeigt, dass der PPAR- γ Agonist und *Insulinsensitizer* Troglitazon (TRO), die Gehirninvasion und die Tumorprogression von GBM-Zellen in organotypischer Umgebung *ex vivo* blockiert. Die anti-Tumorwirksamkeit ist jedoch nicht durch den primären Zielrezeptor PPAR- γ vermittelt, sondern durch einen *off-target* Wirkmechanismus.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde $\Delta 2$ -Troglitazon ($\Delta 2$ -TRO), ein beschriebenes PPAR- γ inaktives Troglitazon-Derivat, als potentiell GBM-Therapeutikum im Vergleich zu TRO untersucht. *In vitro* wurde festgestellt, dass $\Delta 2$ -TRO die Menge des pro-migratorischen Zytokins TGF- β , welches in Bezug auf die Migration und die Invasion von GBM-Zellen eine zentrale Rolle einnimmt, bei einigen Testzelllinien vermindert. Die Analyse des molekularen Wirkmechanismus ergab, dass $\Delta 2$ -TRO nicht die TGF- β Genexpression, sondern die TGF- β Sekretion hemmt, was mit einer Erhöhung von intrazellulärem TGF- β Protein assoziierte. *In vitro* Analysen ergaben, dass $\Delta 2$ -TRO eine Akkumulation von sekretorischen Vesikeln bedingt. Für die anti-Tumorwirksamkeit von $\Delta 2$ -TRO wurde für alle *in vitro* Experimente eine FKS-Abhängigkeit festgestellt, wobei allgemein galt: Je geringer die FKS Konzentration desto höher der untersuchte Wirkeffekt. Die *in vitro* Ergebnisse deuten darauf hin, dass $\Delta 2$ -TRO den allgemeinen vesikulären Transport von GBM-Zellen beeinträchtigt. Dies lässt Spekulationen zu, dass $\Delta 2$ -TRO die exozytotische Aussschüttung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Faktoren potentiell hemmen könnte, welche z.B. die Proliferation, die Migration, die Invasivität, sowie die Angiogenese der Tumoren fördern. Gleichzeitig könnte die tumorvermittelte Sekretion von immunsuppressiv wirkenden Faktoren neben TGF- β reduziert werden und so eine körpereigene Immunabwehr gegen den

Tumor eingeleitet werden. Diese Hypothese ist auch eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass bereits eine niedrig-mikromolare $\Delta 2$ -TRO Konzentration (10 μM) in dem organotypischen GBM-Invasionsmodell die Tumorprogression und die Gehirnparenchyminvasion von Tumorzellen *ex vivo* blockierte. Die interessante anti-Tumorwirkung von $\Delta 2$ -TRO scheint dabei nur anteilig auf seinem anti-proliferativen Potential zu beruhen, welches unter Standard-Kulturbedingungen nur moderat ist. In dem *in vivo* GBM-Modell der Ratte wurde demonstriert, dass $\Delta 2$ -TRO die Blut-Hirn-Schranke passiert und dass effektive Wirkstoffkonzentrationen im Gehirn erreicht werden können, welche die Volumenzunahme des Tumors und des tumorvermittelten Hirnödems im Vergleich zu Kontrolltieren reduzieren. Jedoch wurde kein verlängertes Überleben von Versuchstieren unter $\Delta 2$ -TRO Behandlung festgestellt, wohl aber eine signifikante Gewichtsabnahme im Zeitverlauf gegenüber Kontrolltieren. Durch Ligandenbindungsstudien wurde $\Delta 2$ -TRO hier als ein PPAR- γ Ligand identifiziert. Die in dieser Arbeit beobachtete Toxizität von $\Delta 2$ -TRO mag daher anteilig auf einer Interferenz mit übergeordneten PPAR- γ -vermittelten Signalwegen beruhen. TRO wirkte bei allen voran genannten Experimenten in die gleiche Richtung wie $\Delta 2$ -TRO. Der Einfluss von TRO auf das Überleben von Versuchstieren konnte aufgrund experimenteller Unzulänglichkeiten allerdings nicht untersucht werden. Da $\Delta 2$ -TRO keinen Einfluss auf das Überleben der Versuchstiere zeigte, stellt es kein potentiell GBM-Adjuvanz dar. Der Wirkmechanismus von $\Delta 2$ -TRO, welcher die mögliche Freisetzung einer Vielzahl tumorförderlicher Faktoren bedingt und so vielseitig mit unterschiedlichen Funktionen der GBM-Pathophysiologie interferiert, erscheint allerdings vielversprechend. Die Entwicklung von PPAR- γ unabhängigen TRO-Derivaten und die Auffindung des Zielproteins bzw. der Zielproteine, welche diese pleiotropische anti-Tumoraktivität vermitteln, könnten neue innovative Optionen zur adjuvanten GBM-Therapie eröffnen.

GBM-Zellen sekretieren hohe Mengen des Neurotransmitters Glutamat, deren chronische Anwesenheit eine exzitatorische Degeneration peritumoraler Neurone induziert. Hier wurde der Glutamat/Cystin Antiporter System X_c^- als der Haupttransporter identifiziert, welcher für die Sekretion von Glutamat verantwortlich ist. Dennoch war unklar, auf welche Weise Glutamat die GBM-Progression fördert. Nach einer gängigen Hypothese sollen GBM-Zellen ionotrope Glutamatrezeptoren exprimieren, welche nach autokriner oder parakriner Aktivierung die GBM-Zellproliferation steigern sollen. Hierbei sollen besonders AMPA-Typ Glutamatrezeptoren eine übergeordnete Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass die Unterbrechung der Glutamatsekretion durch Interferenz mit der Aktivität von System X_c^- die *in vitro* GBM-Zellproliferation nur in Abhängigkeit von Cystin reduziert, während Glutamat selbst keine proliferationsförderliche Wirkung hat. Des Weiteren beeinflusste weder der Agonismus noch der Antagonismus mit AMPA-Rezeptoren die GBM-

Proliferation *in vitro*. In Übereinstimmung mit diesem Befund erklärt sich die AMPA Insensitivität auf molekularer Grundlage. Hier wurde eine substantielle Herunterregulation von AMPA-Rezeptor Untereinheiten oder Überexpression der voll Q/R-editierten *GluR2* Untereinheit detektiert, wobei beide Mechanismen die übergeordnete Rezeptoraktivität blockieren. *Ex vivo* führte die pharmakologische Inhibition der AMPA-Rezeptoraktivität bemerkenswerterweise zu einer enormen Reduktion der Tumorprogression und assoziierte mit einer verringerten Neurodegeneration. Dies lässt annehmen, dass die Fähigkeit von Glutamat die GBM-Zellproliferation zu steigern entscheidend von der Tumorumgebung abhängt. Im Tiermodell blieb das Tumolvolumen nach siRNA-vermittelter oder pharmakologischer Inhibition der System X_c^- Aktivität auf dem Niveau von kontrollbehandelten Tieren. Demgegenüber wurde die Glutamatsekretion und damit die tumorinduzierte Neurodegeneration und das tumorinduzierte Hirnödem vermindert. Dies führte zu einer signifikant verlängerten Überlebenszeit von Versuchstieren. Da Glutamat *in vitro* selbst keine mitogene Wirkung auf GBM-Zellen zeigte, scheint auf der eigenen Datengrundlage demnach die Glutamat-vermittelte exzitotoxische Schädigung des umliegenden Hirnparenchyms die GBM-Progression zu fördern.

System X_c^- stellt somit ein potentielles Ziel für eine adjuvante GBM-Therapie dar. Die Interferenz mit System X_c^- unterbricht gleich 2 wesentliche pathophysiologische Eigenschaften von GBM-Zellen: Erstens die tumorvermittelte Glutamatsekretion und damit die tumorinduzierte Neurodegeneration und zweitens die Fähigkeit zur Aufnahme von Cystin, welches für die Zellproliferation benötigt wird. Aktuell verfügbare System X_c^- Inhibitoren sind ungünstigerweise nicht System X_c^- spezifisch. Aufgrund der Datenlage erscheint die Weiterentwicklung spezifischer System X_c^- Inhibitoren vielversprechend und sollte auch im Hinblick auf die Wichtigkeit von System X_c^- für die Progression anderen Neoplasien neben GBM weiter vorangetrieben werden.

8 Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) represents the most common primary brain tumor and one of the most aggressive neoplasias in humans. Despite multimodal therapy regimes the median survival of patients using standard therapy is only around 15 month after diagnosis. To date, there is no cure. Besides extensive proliferation and diffuse brain tissue invasion, tumor-induced neurodegeneration and tumor-induced brain edema are the hallmarks and crucial morbidity factors of the disease. GBM cells secrete a variety of different factors (growth factors, hormones, cytokines, immune suppressive factors i.a.), thereby stimulating their own tumor progression. Among these factors tumor cells secrete high levels of glutamate, which act neurotoxic. Thus, reducing the release of these tumor secreted factors by terms of pharmacological inhibition is a promising strategy for adjuvant GBM therapy.

Own preliminary work showed that Troglitazone (TRO) a PPAR- γ agonist and insulin sensitizer blocks brain invasion and tumor progression *ex vivo* in an organotypic environment. However, the anti-tumor activities of TRO are not mediated by PPAR- γ but by an off-target mechanism.

In the present work a TRO derivative named $\Delta 2$ -Troglitazone ($\Delta 2$ -TRO), literally described to be PPAR- γ inactive, was analyzed as a potential GBM therapeutic by comparing it with TRO. *In vitro*, in some of the tested GBM cell lines, $\Delta 2$ -TRO caused a downregulation of TGF- β , a cytokine which plays a pivotal role for glioma cell migration and invasion. Analyzing the underlying molecular mechanism, it could be demonstrated that $\Delta 2$ -TRO does not inhibit TGF- β gene expression but rather the secretion of TGF- β , resulting in an increase of intracellular TGF- β protein levels. *In vitro* analyses showed that $\Delta 2$ -TRO caused an accumulation of secretory vesicles. Moreover, the anti-tumor activity of $\Delta 2$ -TRO was found to occur in an FKS dependent fashion. In general there was a higher drug response the lower the FKS concentration was. *In vitro* results implicate, that $\Delta 2$ -TRO impairs the general vesicular transport in GBM cells. This gives rise to speculation that $\Delta 2$ -TRO could potentially impede the exocytotic release of a variety of growth factors, cytokines and other factors, which stimulate e.g. proliferation, migration, invasion and angiogenesis of the tumors. Coincidentally the tumor-induced secretion of immune suppressive factors besides TGF- β could potentially be reduced, thereby activating the host immune defense. This hypothesis is a possible explanation for the observation that even a low micromolar dose of $\Delta 2$ -TRO (10 μ M) blocked tumor progression and brain parenchyma invasion *ex vivo* in an organotypic GBM invasion model. Apparently, the interesting anti-tumor properties of $\Delta 2$ -TRO are only partial based on its anti-proliferative actions, which were considered to be low under standard culture conditions. By applying $\Delta 2$ -TRO *in vivo* using a rat GBM model it was shown

that $\Delta 2$ -TRO passes the blood brain barrier and that effective drug doses were reached in the brain which reduced the volume increase of the tumor and of the tumor-induced brain edema compared to controls. However, no significant increase of survival was measured using $\Delta 2$ -TRO, whereas in time course $\Delta 2$ -TRO induced a significant reduction of body weight in comparison with controls. Here, by ligand binding assays $\Delta 2$ -TRO was found to be a PPAR- γ ligand. Accordingly, the toxicity of $\Delta 2$ -TRO, which was detected here, may be partially caused by interference with signal pathways controlled by PPAR- γ . In all aforementioned experiments TRO acted in the same direction as $\Delta 2$ -TRO. Due to experimental insufficiencies the effects of TRO on the survival of test animals could not be assayed. Though, since $\Delta 2$ -TRO did not affect the survival of test animals, it is not a potential candidate drug for adjuvant GBM therapy. The mode of action by which $\Delta 2$ -TRO potentially counteracts the release of a variety of tumor stimulating factors is promising, giving the possibility for a multiple interference with different pathofunctions of the disease. The development of PPAR- γ independent TRO derivatives and the discovery of the target protein(s), mediating this pleiotropic anti-tumor activity could open new innovative options for adjuvant GBM therapy.

GBM cells secrete high levels of the neurotransmitter glutamate, which leads in chronic presence to excitotoxic degeneration of peritumoral neurons. Here, the glutamate/cystine antiporter system X_c^- was identified as the main transporter responsible for the high secretion of glutamate. Nevertheless, it was not clear how glutamate triggers GBM-progression. A popular hypothesis states that GBM cells express ionotropic glutamate receptors, which shall increase GBM cell proliferation after autocrine or paracrine activation. Particularly, AMPA-type glutamate receptors have been proposed to take center stage. Here, it was shown that disrupting glutamate secretion by interfering with system X_c^- activity attenuates glioma cell proliferation solely cystine dependently, whereas glutamate itself does not augment glioma cell growth *in vitro*. Moreover, neither AMPA receptor agonism nor antagonism affected glioma proliferation *in vitro*. On a molecular level, AMPA insensitivity is concordant with a pronounced transcriptional downregulation of AMPA receptor subunits or overexpression of the fully Q/R-edited *GluR2* subunit, both of which block receptor activity. Strikingly, *ex vivo* AMPA receptor inhibition in tumor-implanted brain slices resulted in markedly reduced tumor progression associated with alleviated neuronal cell death, suggesting that the ability of glutamate to promote glioma progression strictly requires the tumor microenvironment. In a GBM animal model siRNA-mediated or pharmacological inhibition of system X_c^- activity leads to abrogated neurodegeneration, attenuated brain edema and prolonged survival *in vivo* as a cause of decreased glutamate secretion, while the tumor volume stayed the same compared with controls. By own findings and since glutamate itself showed no mitogen response on

GBM cells *in vitro*, the possible underlying cause why glutamate is promoting GBM cell growth is, that it mediates excitatory damage of surrounding brain parenchyma.

Concerning a potential pharmacotherapy, targeting system X_c^- activity disrupts two major pathophysiological properties of glioma cells, that is, the induction of excitotoxic neuronal cell death and incorporation of cystine required for proliferation. Currently available system X_c^- inhibitors are unfortunately not system X_c^- specific. Based on this data further development of more specific system X_c^- inhibitors are promising and should be promoted also in regard to the importance of system X_c^- for the progression of other neoplasias besides GBM.