

Aus dem Institut für Anatomie II:
Experimentelle Morphologie im Zentrum
für Experimentelle Medizin
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)

**In vitro Untersuchungen zur Beeinflussung des
Proliferationsverhaltens von Neuroblastomen durch
PPAR- γ -Agonisten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Margarita Carlsson
aus Minsk

Hamburg, 2003

INHALT

1	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	3
2	Einleitung	3
3	Material und Methoden	9
	3.1 Zellkultur	9
	3.2 Zellproliferationstest	10
	3.3 Statistische Analyse	12
	3.4 Immunhistochemie	12
4	Befunde.....	14
	4.1 Zellproliferationstest	14
	4.2 Immunhistochemie	26
5	Diskussion.....	29
6	Zusammenfassung	37
7	Literaturliste	38
	Danksagung.....	41
	Lebenslauf	42
	Erklärung	43

In dieser Arbeit sollte der Einfluß von mehreren synthetischen PPAR- γ -Agonisten auf das Proliferationsverhalten von humanen Neuroblastomzelllinien in vitro getestet werden. Anschließend sollten die Neuroblastomzellen auf das Vorkommen des Rezeptors (PPAR- γ) immunhistochemisch analysiert werden. Dabei sollte festgestellt werden, ob eine unterschiedliche Ausprägung des PPAR- γ in sieben verschiedenen Neuroblastomzelllinien zu erkennen ist. Die Wirkung von drei PPAR- γ -Agonisten auf das Proliferationsverhalten von Neuroblastomzellen sollte mit den immunhistochemischen Untersuchungen korreliert werden, damit zu der Frage Stellung genommen werden kann, ob die immunhistochemisch nachgewiesenen PPAR- γ eine funktionelle Bedeutung besitzen.

Das Neuroblastom stellt in der pädiatrischen Onkologie ein besonderes klinisches Problem dar, da es sich um einen schwer therapierbaren Tumor handelt (siehe unten). Diese Tumorentität ist der zweithäufigste maligne solide Tumor im Kindesalter, die Inzidenz liegt bei 8,7 Erkrankungen auf 1 Million Kinder unter 15 Jahren. Wie der Name schon besagt, handelt es sich um einen Tumor, der sich aus den Zellen der Neuralleiste entwickelt.

Bei der Hälfte der betroffenen Kinder entsteht das Neuroblastom primär im Nebennierenmark, weitere Lokalisationen finden sich entlang des sympathischen Grenzstranges (zervikal, thorakal und abdominal). Dieser Tumor produziert Katecholamine, und die Konzentration der entsprechenden Abbauprodukte (Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure) können im Serum und Urin zur Diagnostik und Verlaufskontrolle bestimmt werden. In Abhängigkeit von Alter, Stadium und Risikofaktoren werden verschiedene Therapien durchgeführt: Tumorresektion, Chemotherapie, Bestrahlung und autologe Knochenmarkstransplantation.

Die Prognose eines Kindes mit Neuroblastom ist abhängig von seinem Alter, dem Tumorstadium, sowie der An- bzw. Abwesenheit der Amplifikation des

N-myc-Protoonkogens und des Verlustes von genetischem Material auf Chromosom 1p (Sitzmann et al. 2002).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei Säuglingen unabhängig vom Stadium etwa 85%, während sie bei Kindern über einem Jahr auf ungefähr 40% sinkt (Harnack et al. 2000). Um die Überlebensprognose für Kinder mit Neuroblastom zu verbessern, werden deshalb dringend neue therapeutische Ansätze gebraucht. Da es sich um einen Tumor aus embryonalem Gewebe handelt, wäre ein solcher möglicher neuer Therapieansatz die Induktion einer Differenzierung des Tumors, welche auch spontan vorkommen kann, wie es in einigen klinischen Fallberichten beschrieben wurde. Kelly et al. (1996) und Schmidt et al. (2000) zeigten, daß ein spontanes Ausreifen eines bösartigen Neuroblastoms zu einem gutartigen Ganglioneurom vorkommen kann und diese Ausreifung des Tumors führt zur einer besseren Prognose.

Differenzierungsvorgänge im normalen Gewebe wie auch in Tumoren können durch Rezeptoren vermittelt werden, die durch die Bindung eines Liganden aktiviert werden. Ein klinisch relevantes Beispiel für eine solche Differenzierung von Tumoren stellt die Differenzierungsinduktion von Liposarkomen durch die Aktivierung des nukleären Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors- γ (PPAR- γ) dar. Bei Liposarkomen konnte durch Gabe von Liganden dieses Rezeptors eine Ausdifferenzierung des Tumors induziert werden, die zu einer Einschmelzung der Tumormasse führte (Demetri et al. 1999).

Die Familie der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren sind nukleäre Rezeptoren, von denen bislang drei verschiedene Subtypen identifiziert wurden: α , β und γ (Abb.1).

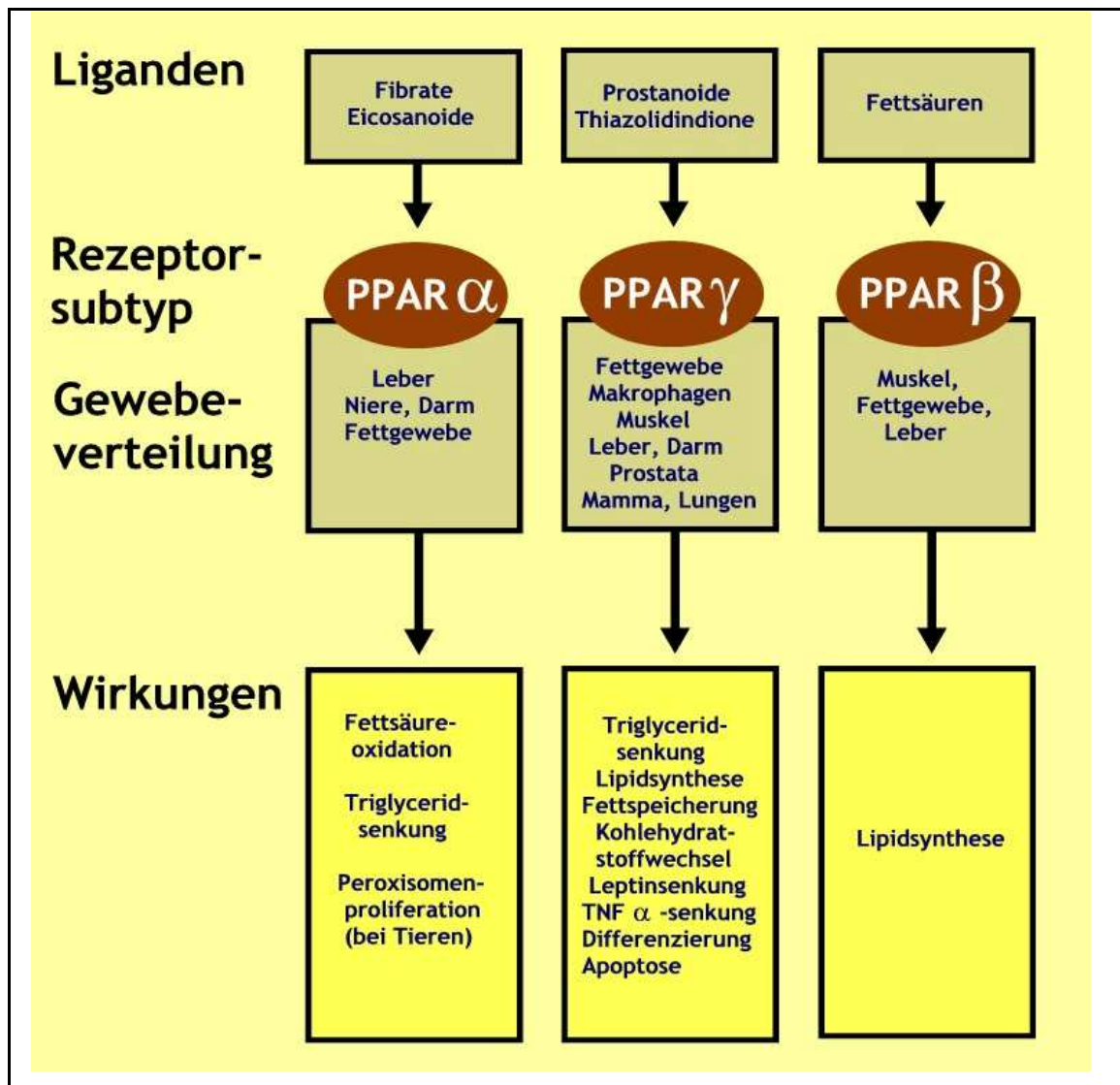


Abb. 1 Die PPAR-Familie nukleärer Rezeptoren. Liganden, Rezeptorart, Gewebeexpression und Wirkungen (modifiziert nach Matthaei, 2001)

Der PPAR- α wird in Leber, Fettgewebe und Nieren exprimiert und reguliert hauptsächlich den Lipidmetabolismus in diesen Geweben (Vamecq et al. 1999).

Zu den Liganden des PPAR- α gehören endogene physiologische Liganden, zu denen Fettsäuren, konjugierte (γ -Linolensäure) und oxidierte Fettsäuren sowie Eicosanoide zählen. Zu den synthetischen PPAR- α -Agonisten gehören hypolipidämisch wirkende Fibrate, welche für die Therapie kardiovaskulärer Krankheiten eingesetzt werden (Vamecq et al. 1999). Fibrate weisen dabei eine viel höhere Affinität zum PPAR- α auf als natürliche Liganden.

Die Funktion und die Liganden des PPAR- β sind zur Zeit nur unzureichend bekannt (Harris et al. 2001). PPAR- β wird in Fettgewebe, im Muskel und in der Leber exprimiert, die natürlichen Liganden des PPAR- β sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Phytansäuren.

Der PPAR- γ wird überwiegend im Fettgewebe exprimiert; seine Hauptfunktion ist die Regulation der Adipogenese. Geringe Mengen des PPAR- γ konnten bisher auch in anderen Zellen, wie z.B. Makrophagen, Epithelzellen des Darmes und der Mamma, Endothelzellen, Hepatozyten, in den glatten Muskelzellen der Gefäße, sowie in den Epithelien der Prostata und Lungen nachgewiesen werden (Shappell et al. 2001; Mueller et al. 1998; Tsubouchi et al. 2000; Vamecq et al. 1999).

Der PPAR- γ , an welchen vorwiegend Thiazolidindione binden, galt zunächst als verwaister (orphaner) Rezeptor, da die endogenen Liganden – Prostaglandin J₂ und andere Prostanoiden erst sehr viel später nach der Entdeckung des Rezeptors selbst identifiziert wurden (Matthaei et al. 2001).

Die ersten künstlichen PPAR- γ -Agonisten (Thiazolidindione) wurden Anfang der 80er-Jahre synthetisiert und wurden hauptsächlich für die orale Kombinationsbehandlung des Diabetes mellitus Typ-2 eingesetzt.

Der Wirkungsmechanismus von PPAR- γ -Agonisten wurde erst vor kurzem aufgeklärt (Abb. 2).

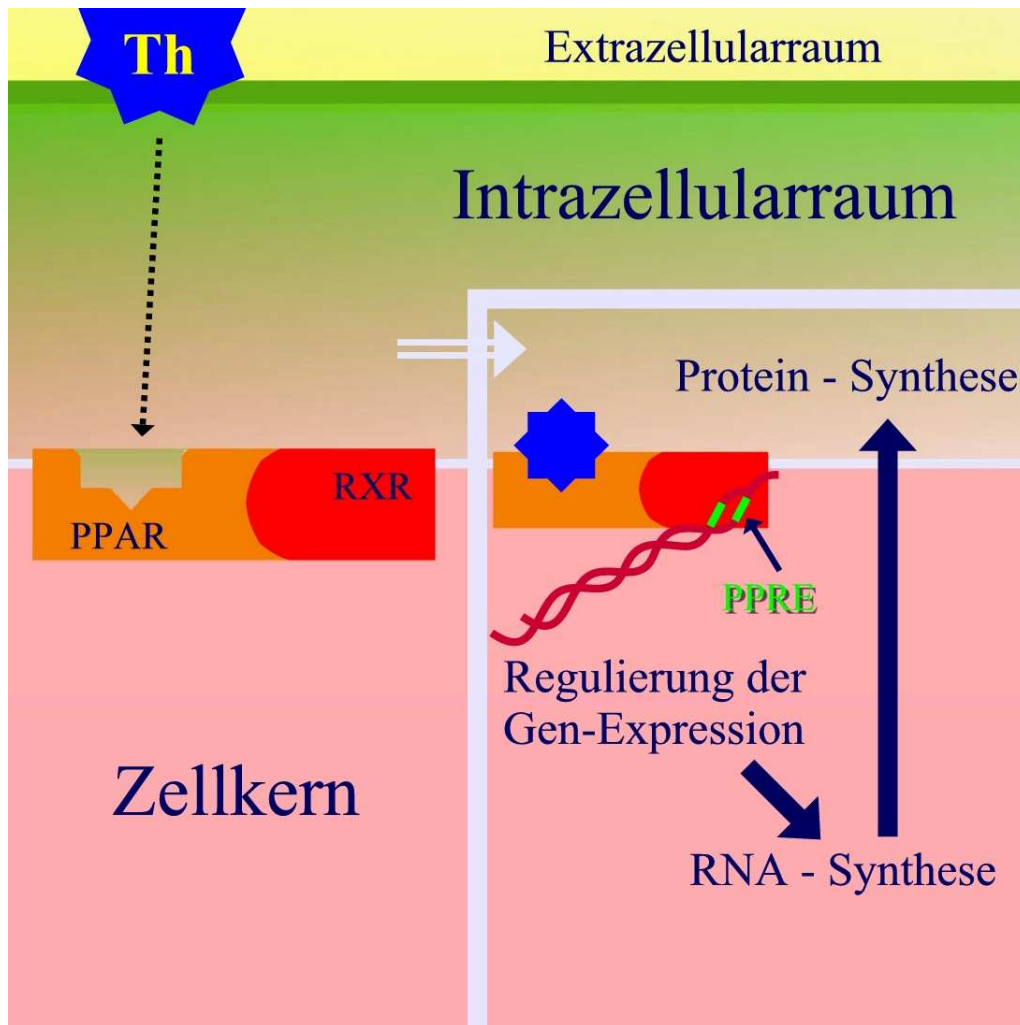


Abb. 2 Der Wirkungsmechanismus von PPAR- γ -Agonisten in der Zelle

PPAR- γ -Agonisten binden sich an den nukleären PPAR- γ , der mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) heterodimerisiert. Der so aktivierte Rezeptorkomplex interagiert mit spezifischen DNA-Sequenzen und steuert entweder direkt oder nach der Wechselwirkung mit hormonabhängigen Transkriptionsfaktoren die Expression von spezifischen PPAR- γ -abhängigen Genen (Matthaei et al. 2001).

Die daraufhin synthetisierten Proteine stellen in verschiedenen Geweben Schlüsselproteine dar. So werden zum Beispiel insulinabhängige Prozesse wie Glukosetransport, Glukogensynthese, Lipidsynthese und Glukoneogenese reguliert. Nach Gabe von PPAR- γ -Agonisten werden nicht nur bestimmte Stoffwechselwege aktiviert, sondern werden auch zusätzlich noch Zelldifferenzierungsprozesse beeinflusst. So zeigten Meng et al. (2001), daß Adipozyten sich nicht

ausdifferenzieren, wenn die Expression des PPAR- γ inhibiert wird. Dieser differenzierungsinduzierende Effekt der PPAR- γ -Agonisten wurde auch in der Tumorthherapie eingesetzt. So konnten undifferenzierte Tumore durch Gabe von PPAR- γ -Agonisten zur Differenzierung gebracht werden, was zu einer Wachstumshehmung dieser Tumoren führte.

Diese Differenzierungseffekte von PPAR- γ -Agonisten wurden beim Kolonkarzinom in vitro (Kitamura et al. 1999) und im Tierexperiment (Sarraf et al. 1998); beim Prostatakarzinom in vitro (Shappell et al. 2001), im Tierexperiment (Kubota et al. 1998) und in klinischen Studien (Mueller et al. 2000); beim Mammakarzinom in vitro (Mueller et al. 1998) und im Tierexperiment (Elstner et al. 1998) sowie beim Neuroblastom in vitro (Han et al. 2001) nachgewiesen.

Da PPAR- γ -Agonisten bei einigen Tumorarten durch eine Differenzierungsinduktion eine antiproliferative Wirkung hatten, soll in dieser Arbeit der Einfluß von mehreren synthetischen PPAR- γ -Agonisten auf das Proliferationsverhalten von humanen Neuroblastomzelllinien in vitro getestet werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

Als Zelllinien wurden die humanen Neuroblastomzelllinien Kelly, LAN-1, LAN-5, LS, IMR32, SK-N-SH und SH-SY5Y verwendet. Die Zelllinien Kelly, LAN-1, LAN-5, SK-N-SH und IMR32 stellte freundlicherweise Herr Prof. Erttmann (Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung. Die Zelllinien LS und SH-SY5Y wurden von Herrn Dr. Hildebrandt (Universität Stuttgart-Hohenheim, Deutschland) bezogen.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen (37°C, 100% relative Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂). Die Zellen wurden in RPMI Medium (Gibco, Paisley, Schottland) mit Zugabe von 10% hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS, Gibco), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin gezüchtet, im weiteren wird diese Mischung als Kulturmedium bezeichnet. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche. Wenn die Zellen konfluent waren, wurden sie passagiert. Hierzu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS gespült und danach für 5 Minuten mit je 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco, Paisley, Schottland) bei 37°C im Brutschrank inkubiert, so daß sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Um eine zu starke Schädigung der Zellen durch das Trypsin-EDTA-Gemisch zu verhindern und die Ablösungsreaktion zu beenden, wurde 5 ml Kulturmedium in jede Kulturflasche pipettiert, sobald sich die Zellen vom Kulturflaschenboden abgelöst hatten. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 Minuten bei 1.500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde teilweise auf neue Zellkulturflaschen verteilt und die Flaschen wurden auf je 50 ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Der andere Teil der Zellsuspension wurde nach der Bestimmung der Zellzahl in 96-Loch-Platten für die Zellproliferationsversuche ausgesät (siehe unten).

3.2 Zellproliferationstest

Um die Wirkung von PPAR- γ -Agonisten auf die Zellproliferation zu bestimmen, wurde das Wachstumsverhalten der Neuroblastomzellen mit und ohne Zugabe von PPAR- γ -Agonisten, sowie deren Lösungsmittel untersucht.

Um die Ergebnisse des Proliferationstests zu optimieren, wurde in einer Reihe von Voruntersuchungen mittels Eichkurve die optimale Zellzahl/ml, sowie die Inkubationsdauer mit XTT für jede einzelne Zelllinie bestimmt. Die optimale Zellzahl wurde so gewählt, daß sich die Zellen nach der entsprechenden Inkubationszeit in der log-Phase befanden.

Die Zellproliferation wurde mittels XTT-Test (Boehringer Mannheim, Deutschland) bestimmt. Dabei wurde die mitochondriale Enzymaktivität, welche mit der Zellzahl korreliert, gemessen. Wie für den Kulturflaschenwechsel beschrieben, wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums mit 5 ml PBS pro Zellkulturflasche gespült und für 5 Minuten mit 0,05% Trypsin/0,53 mM EDTA (Gibco) bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die Zellen vom Kulturflaschenboden zu lösen. Die entstandene Zellsuspension wurde in 30 ml Weißkappenröhrchen überführt, 5 Minuten bei 1.500 U/min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit jeweils 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sorgfältig durchmischt und die Zellzahl nach Herstellung einer 1:10-Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension (90 μ l/Loch) jeder Zelllinie wurde in 96-Loch Microtiterplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Nur die erste Kontrollreihe wurde mit 90 μ l/Loch RPMI aufgefüllt.

Die Neuroblastomzellen wurden in folgenden Konzentrationen ausgesät (Tabelle1):

Zelllinie	Zellzahl / ml
Kelly	8×10^3
LAN-1	5×10^4
LAN-5	5×10^4
LS	$3,5 \times 10^4$
IMR 32	$2,5 \times 10^5$
SK-N-SH	1×10^5
SH-SY5Y	5×10^4

Tabelle 1 Die ausgesäte Zellzahl/ml für jede Zelllinie.

Alle Zelllinien wurden initial für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen mit den PPAR- γ -Agonisten (10 μ l/Loch) hinzugegeben.

Als PPAR- γ -Agonisten wurden Ciglitazone (CALBIOCHEM, Schwalbach, Deutschland), Pioglitazone (TAKEDA Chemical Industries, Osaka, Japan) und Troglitazone (freundlicherweise von Frau Prof. M. Schachner, ZMNH, Hamburg, Deutschland, zur Verfügung gestellt) verwendet.

Ciglitazone und Troglitazone wurden in absolutem Ethanol, Pioglitazone in Methanol (MERCK, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Jede einzelne Substanz wurde als eine 10 mMol Stammlösung vorbereitet und im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt. Um die Effektivität der PPAR- γ -Agonisten richtig einzuschätzen und eine Wirkung des Lösungsmittels auszuschließen, wurden zusätzlich Kontrollen durchgeführt, welche die höchste Lösungsmittelkonzentration (1%) enthielten.

Die PPAR- γ -Agonisten wurden in sechs verschiedenen Konzentrationen getestet (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) und jede Konzentration wurde in einem Experiment vierfach geprüft. Dazu wurde eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt und jeweils 10 μ l der unterschiedlichen Verdünnungen wurden zu den 90 μ l Zellsuspension pipettiert. Die Kontrollzellen erhielten 90 μ l RPMI mit 10 μ l 0,1 M PBS, bzw. 10 μ l Lösungsmittel (10%) statt der PPAR- γ -Agonisten. Anschließend wurden die Kulturplatten für 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde in jedes Loch 50 μ l XTT-Lösung (Boehringer Mannheim) pipettiert. Die Kulturplatten wurden bei 37°C im Brutschrank entsprechend ihrer Proliferations-Geschwindigkeit – für Kelly, LAN-1, LAN-5, LS: 4 Stunden; für SK-N-SH und IMR32: 6 Stunden, sowie für SH-SY5Y: 20 Stunden – inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm in einem Dynatech MR 3.13 Microelisa Reader (Dynex Technologies, Ashford, UK) gemessen.

3.3 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Zellproliferationstests (XTT) geben den Mittelwert $\pm$ der Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten wieder. Die Lösungsmittelkontrollen wurden als 100% festgelegt und die Zellproliferationsergebnisse unter Zugabe der PPAR- γ -Agonisten zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt. Sie stellen somit die prozentuale Wachstumsverminderung im Vergleich zur Kontrolle dar. Die Ergebnisse beziehen sich auf jeweils mindestens zwölf untersuchte Einzelwerte.

Um statistische Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und den Kontrollen zu belegen, wurde der Student's-t-Test angewandt. Alle statistischen Tests wurden unter Nutzung der GraphPad PrismTM Software (GraphPadTM, San Diego, USA) durchgeführt.

P < 0,05 wurde als statistisch signifikantes Ergebnis angenommen.

2.4 Immunhistochemie

Für den immunhistochemischen Nachweis des PPAR- γ wurde jede Neuroblastomzelllinie auf 8-Kammer-Objektträger (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) ausgesät. Nach der Inkubation (48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂) wurden die Zellen zweimal mit 0,1 M PBS (pH 7,4) gespült und mit 3,7%igem Paraformaldehyd in 0,1 M PBS (pH 7,4) bei Raumtemperatur für 10 Minuten fixiert. Nach mehrfacher Spülung mit PBS wurden die Zellen 20 Minuten lang mit Saponin-Blockierungspuffer (3,8 ml Blockierungspuffer [0,1g BSA und 0,05g Saponin in 100 ml PBS] und 200 μ l normales Ziegen Serum (DAKO, Code Nr.X0907, Carpinteria, USA)) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären PPAR- γ Antikörper (mouse-anti-human PPAR- γ , Code Nr. sc-7273, Santa Cruz, USA) in einer Konzentration von 1:100 eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Als Verdünnungspuffer für den primären und sekundären Antikörper wurde 1% BSA in RPMI-Medium benutzt. Nach mehrfacher Spülung mit PBS folgte eine 30-Minuten-Inkubation mit dem 1:50 verdünnten sekundären Antikörper (Kaninchen-anti-Maus, biotinyliert, DAKO, Code Nr. E0464, Carpinteria, USA) bei Raumtemperatur. Nach mehrfacher Spülung der

Zellen wurden diese mit APAAP-Maus (DAKO, Code Nr. 0651, Carpinteria, USA) in Verdünnung 1:50 bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Nach einer anschliessenden mehrfachen Spülung folgte eine weitere Inkubation mit Streptavidin alkalischer Phosphatase Komplex Vectastain Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Zellen wurden mehrfach mit PBS gespült und anschließend wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit Neufuchsin (Aldrich, Code Nr.22931-8) nachgewiesen: 7,5 ml einer 4%igen Natriumnitritlösung wurden mit 300 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g Neufuchsin in 100 ml 2 n HCL) vermischt. Anschließend wurden sofort 30 mg Naphthol-AS-Biphosphat in 750 µl Dimethylformamid (DMF) gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Die Präparate wurden in dieser Lösung 20 Minuten unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur belassen. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser (10 Minuten) gestoppt.

Die Spezifität der Immunreaktion wurde durch die Anfertigung von Kontrollen, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde, gewährleistet. Keine der Kontrollen zeigte eine Immunmarkierung. Nach dem Spülen wurden die Präparate mit Crystal/Mount (Biomedica Corp., Foster City, USA) beschichtet und anschließend mit Hilfe von Permanent Mounting Media (Clarion, Biomedica, Code Nr. M05, Foster City, USA) mit einem Deckglas versehen. Zur Auswertung der Färbung wurden 500 Zellen von jeder Zelllinie ausgezählt und verglichen, dabei wurden Zellkernreaktivität und Zytoplasmareaktivität getrennt ausgezählt.

4 BEFUNDE

4.1 Zellproliferationstest

Die Wirkung von drei synthetischen PPAR- γ -Agonisten (Ciglitazone, Pioglitazone, Troglitazone) auf sieben Neuroblastomzelllinien (Kelly, LS, LAN-1, LAN-5, IMR32, SK-N-SH, SH-SY5Y) wurde quantitativ durch die Messung der Absorption im XTT-Zellproliferationstest untersucht. Die Absorptionswerte wurden als prozentuales Verhältnis zur Kontrolle (100%) dargestellt.

Ciglitazone

Ciglitazone zeigt eine dosisabhängige starke Wachstumsinhibierung bei allen untersuchten Neuroblastomzelllinien (Abb. 3.1.1).

Bei der Zelllinie Kelly macht sich ab 1 μ M Ciglitazone-Lösung ein leichter Abfall des Zellwachstums bemerkbar ($p < 0,011$); 89% der Kontrolle werden noch erreicht. Ab 10 μ M setzt eine starke Hemmung der Zellproliferation ein ($p < 0,0001$); die Zellzahl erreicht nur noch 23% des Kontrollwachstums. Bei 100 μ M Ciglitazone-Lösung ist ein rasanter Abfall des Zellwachstums zu beobachten: die Proliferation wird um 94% vermindert ($p < 0,0001$).

Bei der Zelllinie LAN-5 setzt die inhibitorische Wirkung bei 100 nM Ciglitazone-Lösung ein: Die Zellzahl erreicht 89% ($p < 0,003$) des Kontrollwertes. Bei 1 μ M und 10 μ M verbleibt das Zellwachstum entsprechend bei 91% ($p < 0,0136$) und 90% ($p < 0,0389$). Bei 100 μ M Ciglitazone-Lösung zeigt sich eindrucksvoll ein Abfall des Zellwachstums bis auf 2% des Kontrollwertes ($p < 0,0001$).

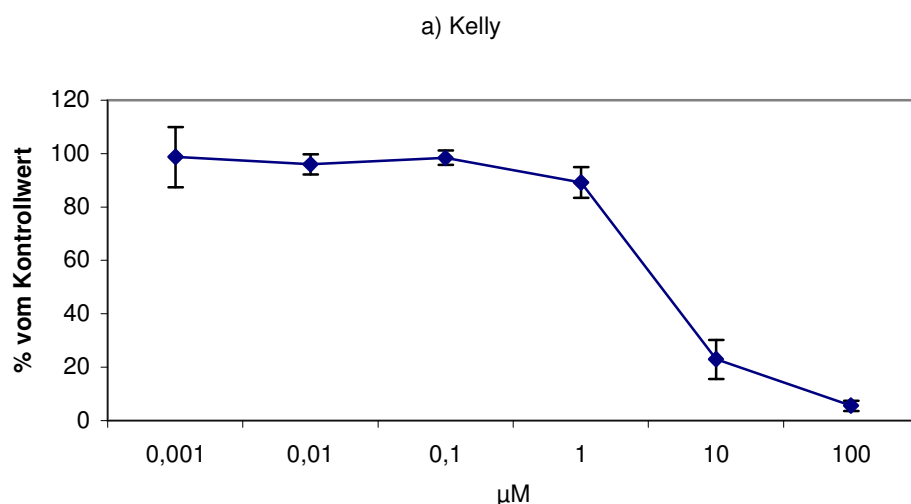
Bei der Zelllinie LAN-1 zeigt sich eine statistisch signifikante Änderung ($p < 0,0002$) der Zellzahl ab 10 μ M Ciglitazone-Lösung; das Zellwachstum erreicht noch 78% des Kontrollwachstums. Bei 100 μ M Ciglitazone-Lösung zeigt sich ein rasanter Abfall des Zellwachstums bis auf 2% des Kontrollwertes ($p < 0,0001$). Innerhalb der Versuche treten deutliche Schwankungen auf: bei 10 μ M Ciglitazone-Lösung liegen die Ergebnisse der einzelnen Versuche zwischen 47% und 108%, wodurch sich die hohe Standardabweichung dieser Versuchsserie ergibt.

Bei der Zelllinie LS macht sich ein leichter Abfall der Zellzahl ab 100 nM Ciglitazone-Lösung bemerkbar; das Wachstum erreicht noch 92% der Kontrolle ($p < 0,0042$).

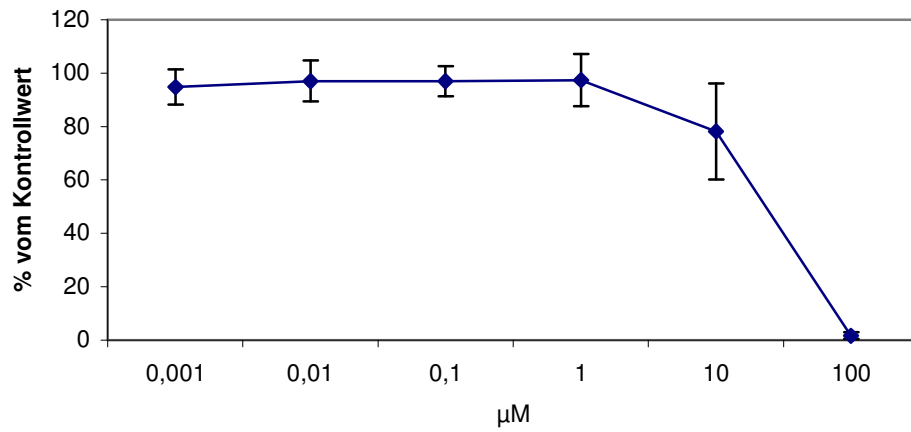
Bei 1 μM verbleibt das Zellwachstum bei 84% ($p < 0,0025$) und sinkt dann weiter kontinuierlich auf 64% ($p < 0,0001$) bei 10 μM Ciglitazone-Lösung. Bei 100 μM erreicht die Zellzahl nur noch 2% ($p < 0,0001$) des Kontrollwachstums. Bei 10 μM Ciglitazone-Lösung treten zum Teil deutliche Schwankungen innerhalb der Ergebnisse der einzelnen Versuche auf: die Werte schwanken zwischen einem Minimum von 39% und einem Maximum von 90%.

Bei den Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-SH zeigt sich eine statistisch signifikante Änderung ($p < 0,0001$) der Zellzahl ab 10 μM Ciglitazone-Lösung: das Zellwachstum sinkt bis auf 55% des Kontrollwertes bei SH-SY5Y und bis auf 26% bei SK-N-SH ab. Bei 100 μM Ciglitazone-Lösung erreicht die Zellzahl noch 15% des Kontrollwachstums bei SH-SY5Y ($p < 0,0001$), und nur noch 3% der Kontrolle bei SK-N-SH ($p < 0,0001$). Bei 10 μM Ciglitazone-Lösung liegen die Ergebnisse der einzelnen Versuche für SH-SY5Y zwischen 23% und 88%, wodurch sich die hohe Standardabweichung dieser Versuchsserie ergibt.

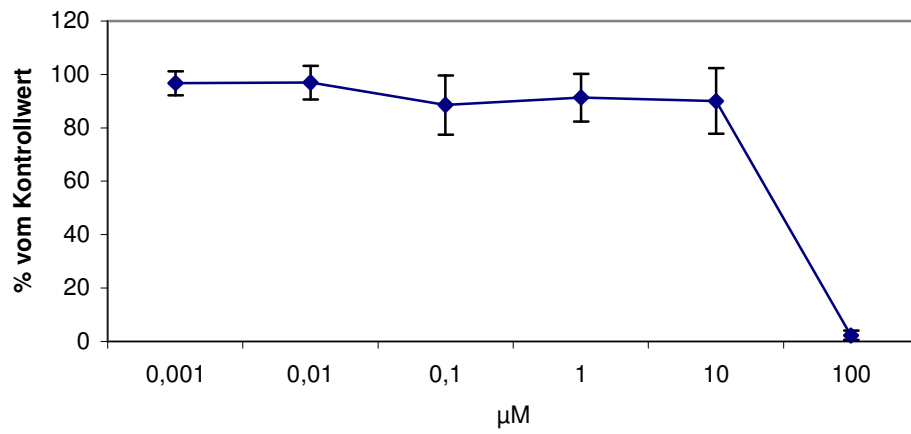
Bei den Zelllinien IMR32 setzt eine ausgeprägte statistisch signifikante Wachstumshemmung bei 10 μM Ciglitazone-Lösung ein: die Zellzahl sinkt bis auf 25% des Kontrollwertes ($p < 0,0001$) ab. Bei 100 μM verbleibt das Zellwachstum nur noch bei 11% ($p < 0,0001$). Bei 10 μM Ciglitazone-Lösung treten deutliche Schwankungen innerhalb der Versuche auf. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche liegen zwischen 9% und 54%.



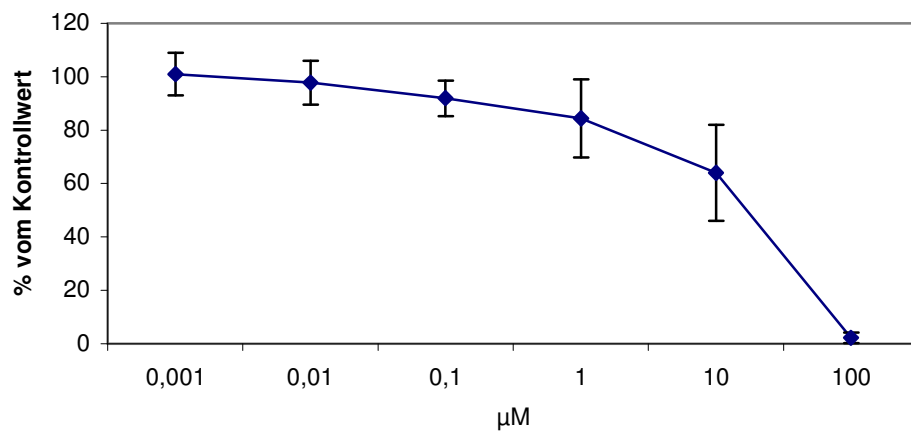
b) LAN-1



c) LAN-5



d) LS



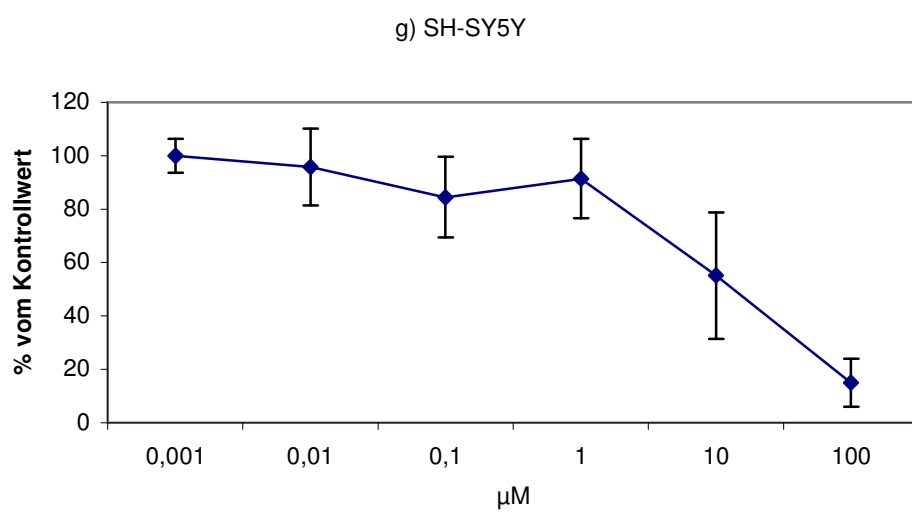
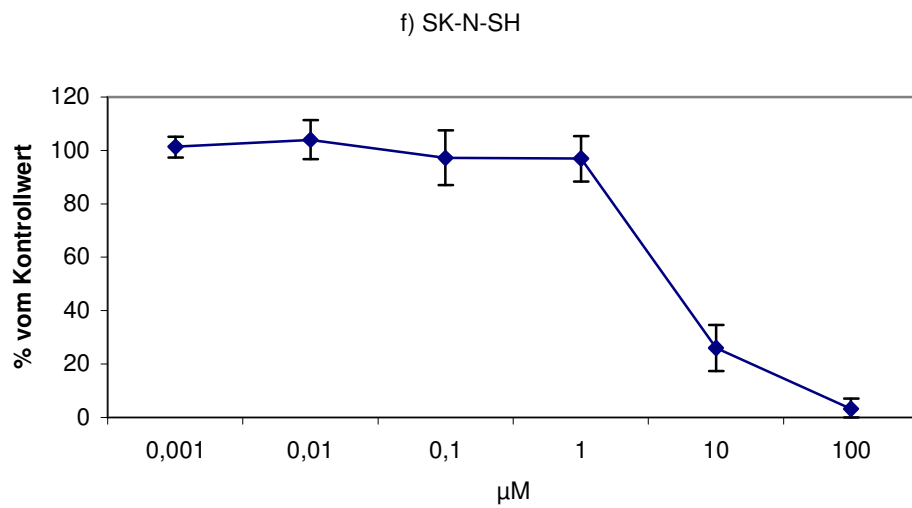
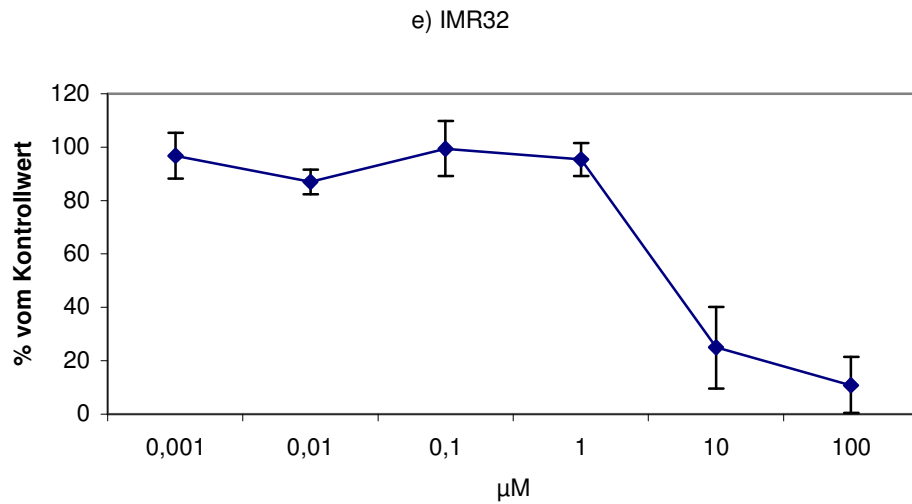


Abbildung 4.1.1 Die Wirkung von Ciglitazone auf die Proliferation der humanen Neuroblastomzelllinien a) Kelly, b) LAN-1, c) LAN-5, d) LS, e) IMR32, f) SK-N-SH, g) SH-SY5Y

Troglitazone

Die Konzentrationen 1 nM – 1 μ M der Troglitazone-Lösungen zeigen keine statistisch relevante Wirkung auf das Proliferationsverhalten der Neuroblastomzelllinien Kelly, LAN-1 und SH-SY5Y.

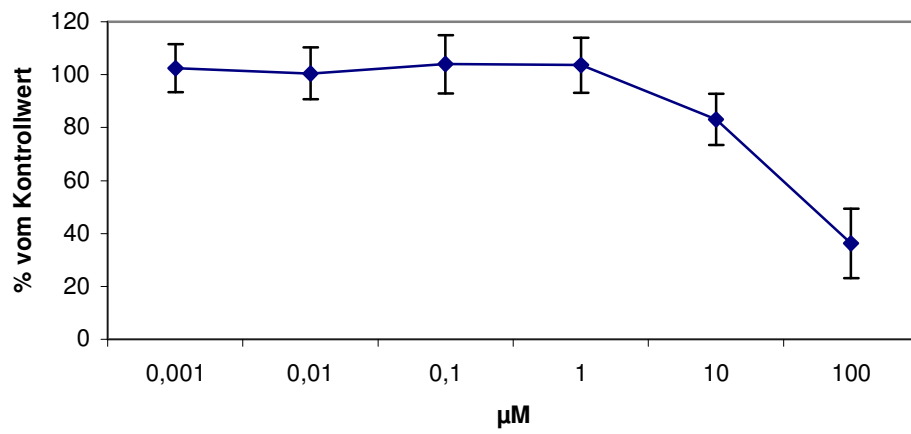
Ab 10 μ M Troglitazone-Lösung ist eine schwache wachstumshemmende Wirkung für diese Zelllinien zu beobachten. Die antiproliferative Wirkung vermindert die Anteile überlebender Zellen bei Kelly auf 83% ($p < 0,0002$), bei LAN-1 auf 88% ($p < 0,0101$) und bei SH-SY5Y auf 84% ($p < 0,0004$). Bei diesen Zelllinien sinkt das Zellwachstum kontinuierlich auf 36% ($p < 0,0001$) für Kelly, auf 53% ($p < 0,0001$) für LAN-1 und auf 57% ($p < 0,0001$) für SH-SY5Y bei 100 μ M Troglitazone.

Bei der Zelllinie LS macht sich ein leichter Abfall der Zellzahl ab 100 nM Troglitazone bemerkbar; das Wachstum erreicht noch 92% der Kontrolle ($p < 0,0053$) bei dieser Konzentration. Das Zellwachstum sinkt dann weiter auf 79% ($p < 0,0001$) bei 10 μ M, und bei 100 μ M Troglitazone-Lösung ist ein rasanter Abfall des Zellwachstums bis auf 19% ($p < 0,0001$) zu beobachten.

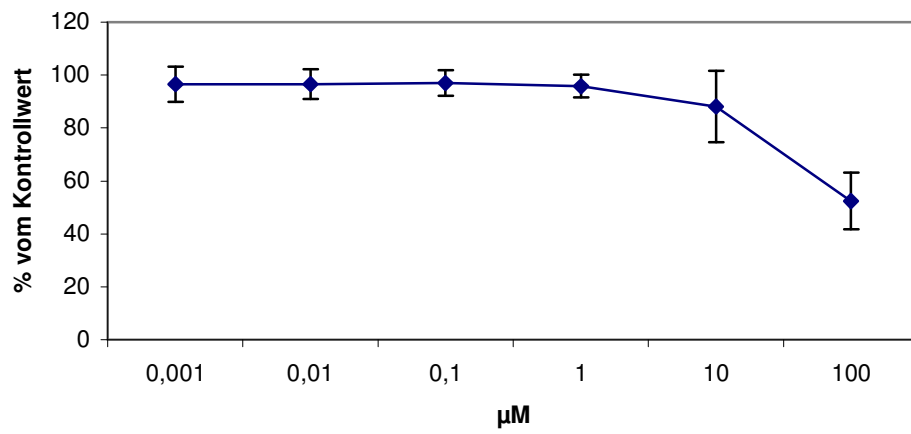
Bei der Zelllinie IMR32 zeigt sich eine unbedeutende Inhibierung der Zellproliferation bei 1 μ M Troglitazone; das Zellwachstum erreicht noch 93% des Kontrollwachstums ($p < 0,0041$). Im weiteren Verlauf zeigt sich bei steigenden Konzentrationen ein kontinuierlicher Abfall des Zellwachstums, bis schließlich bei 100 μ M nur noch 53% des Kontrollwachstums erreicht werden ($p < 0,0001$). Bei 100 μ M Troglitazone-Lösung liegen die Ergebnisse der einzelnen Versuche zwischen 36% und 80%, wodurch sich die hohe Standardabweichung dieser Versuchsserie ergibt.

Bei den Zelllinien SK-N-SH und LAN-5 ist eine statistisch signifikante antiproliferative Wirkung nur bei 100 μ M Troglitazone zu beobachten: Die Zellzahlen erreichen 80% ($p < 0,001$) bei SK-N-SH und 64% ($p < 0,0001$) bei LAN-5. Bei 100 μ M Troglitazone-Lösung liegen die Ergebnisse der einzelnen Versuche für SK-N-SH zwischen 53% und 102%, wodurch sich die hohe Standardabweichung dieser Versuchsserie ergibt.

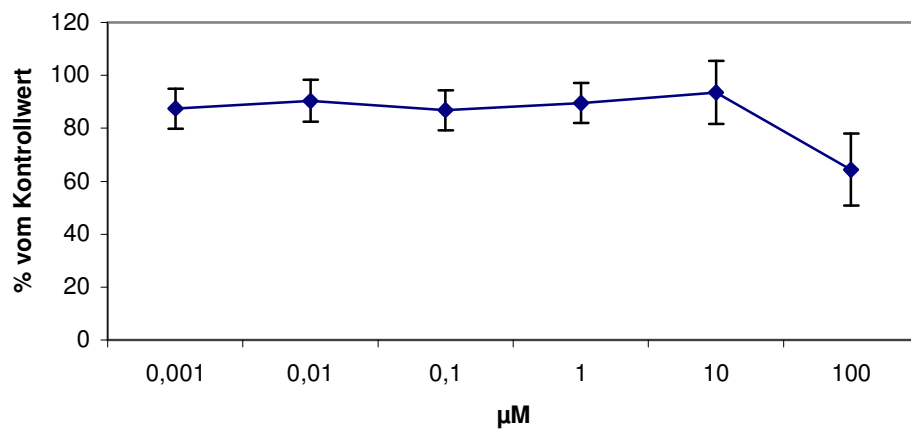
a) Kelly



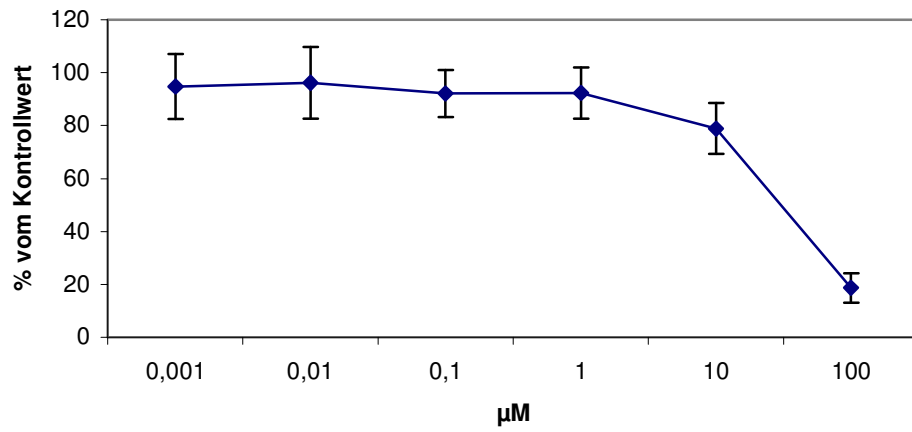
b) LAN-1



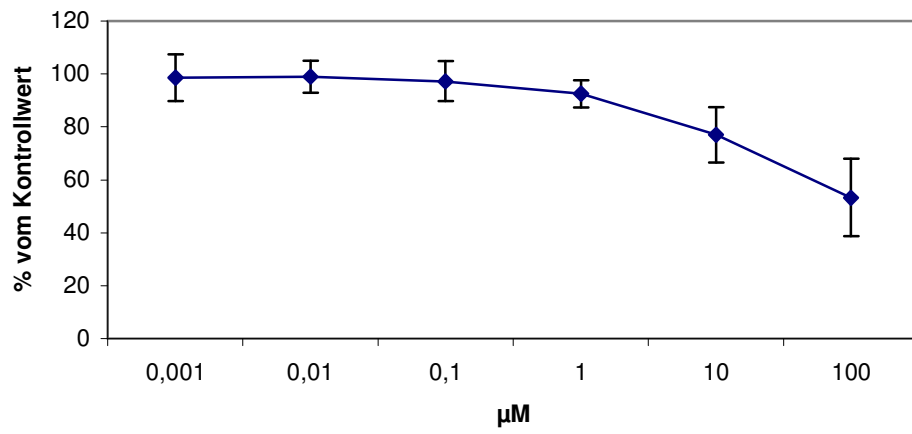
c) LAN-5



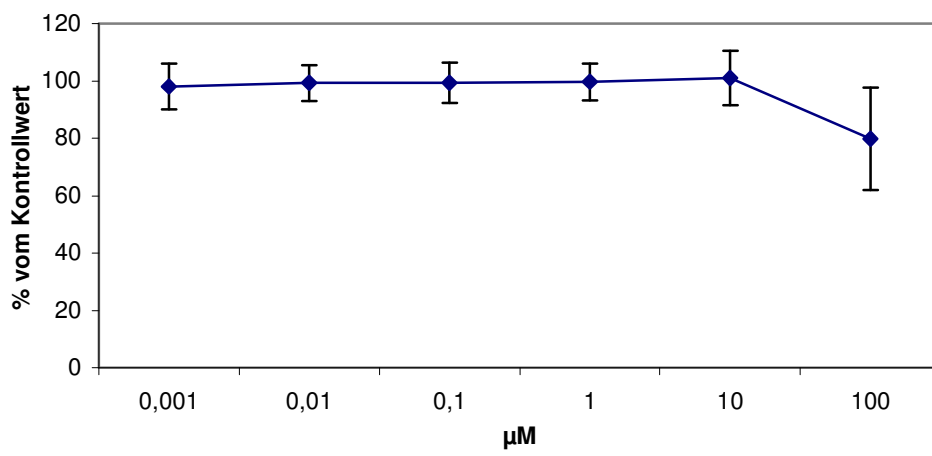
d) LS



e) IMR32



f) SK-N-SH



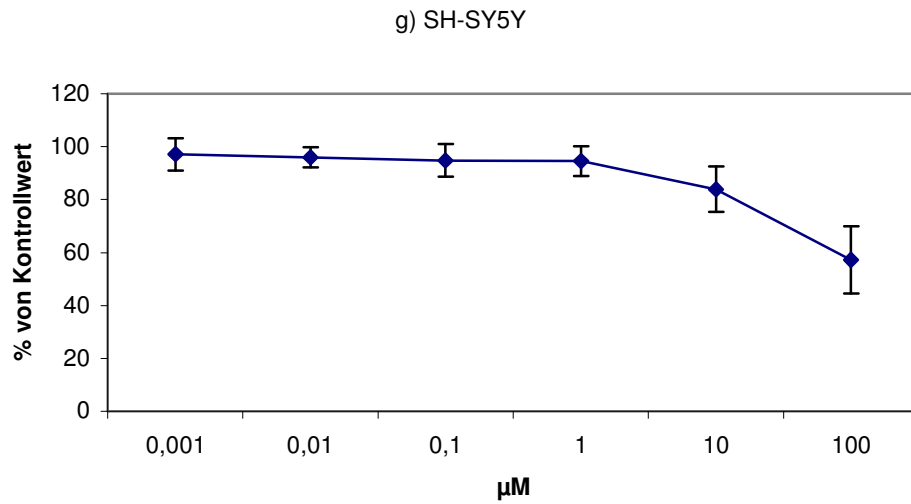


Abbildung 4.1.2 Die Wirkung von Troglitazone auf die Proliferation der humanen Neuroblastomzelllinien a) Kelly, b) LAN-1, c) LAN-5, d) LS, e) IMR32, f) SK-N-SH, g) SH-SY5Y.

Pioglitazone

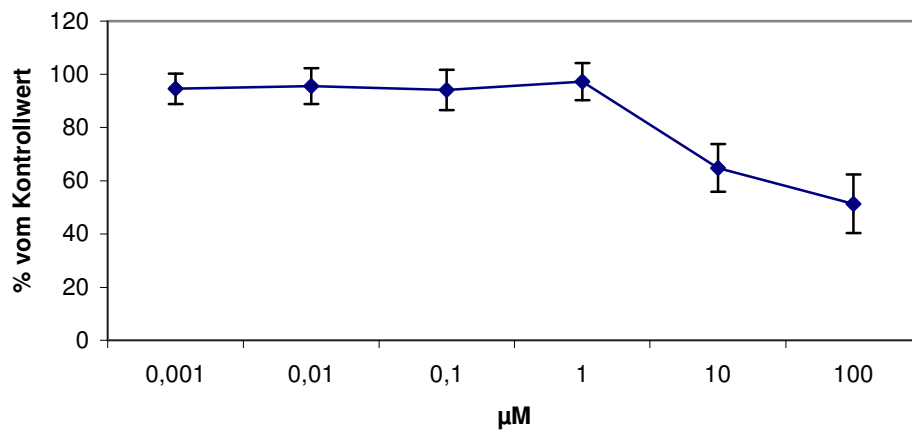
Im Vergleich mit Ciglitazone und Troglitazone zeigt Pioglitazone generell den geringsten Einfluß auf das Proliferationsverhalten von Neuroblastomzellen. Bei den Zelllinien LAN-1 und LS ist zwar bei den niedrigen Pioglitazonekonzentration von 1 nM bis 1 µM eine sehr geringe Hemmung des Zellwachstums auf Werte zwischen 88% und 95% zu beobachten. Eine deutliche inhibitorische Wirkung setzt aber erst bei 10 µM Pioglitazone-Lösung ein, LAN-1 erreicht nur noch 55% des Kontrollwertes ($p < 0,0001$) bei dieser Konzentration, während das Wachstum der Zelllinie LS auf 79% ($p < 0,0001$) des Kontrollwachstums zurückgeht. Dieser leichte Rückgang setzt sich noch weiter fort, bis schließlich bei 100 µM Pioglitazone-Lösung noch 50% der Kontrolle ($p < 0,0001$) bei LAN-1 und 62% ($p < 0,0001$) bei LS erreicht werden.

Bei den Zelllinien SH-SY5Y und LAN-5 stellt sich ab 1 µM Pioglitazone eine Hemmung des Zellwachstums ein. Es werden 77% ($p < 0,0001$) des Kontrollwachstums bei SH-SY5Y und 87% ($p < 0,0001$) der Kontrolle bei LAN-5 erreicht. Die Zellzahl sinkt dann weiter kontinuierlich bis auf 49% ($p < 0,0001$) bei SH-SY5Y und 77% ($p < 0,0001$) bei LAN-5 bei 100 µM Pioglitazone-Lösung.

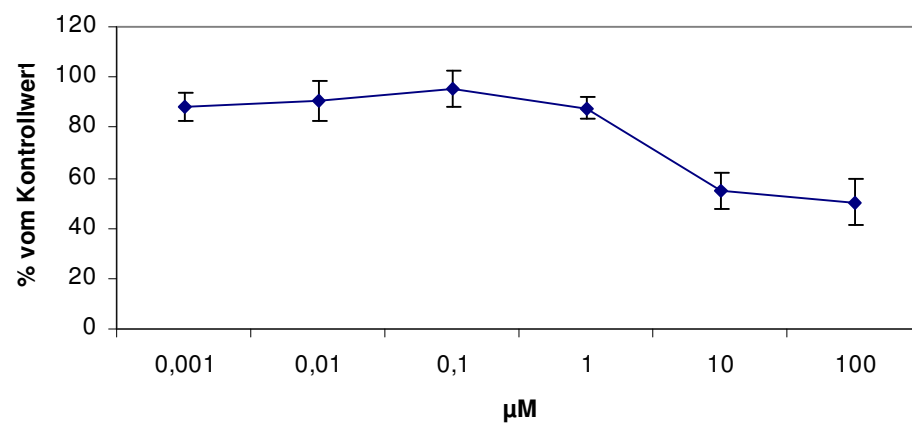
Bei der Zelllinie IMR32 ist ab 1 µM ist eine schwache proliferationshemmende Wirkung auf 86% des Kontrollwachstums ($p < 0,0001$) zu beobachten. Im weiteren Verlauf zeigt sich bei steigenden Konzentrationen ein kontinuierlicher Abfall des Zellwachstums, bis schließlich bei 100 µM noch 61% des Kontrollwachstums erreicht werden ($p < 0,0001$).

Bei den Zelllinien Kelly und SK-N-SH macht sich ein Abfall des Zellwachstums ab 10 µM Pioglitazone-Lösung bemerkbar. Bei Kelly werden 65% ($p < 0,0001$) und bei SK-N-SH werden 87% ($p < 0,0001$) der Kontrolle erreicht. Bei 100 µM sinken die Zellzahlen bei Kelly bis auf 51% ($p < 0,0001$) und bei SK-N-SH auf 68% ($p < 0,0001$).

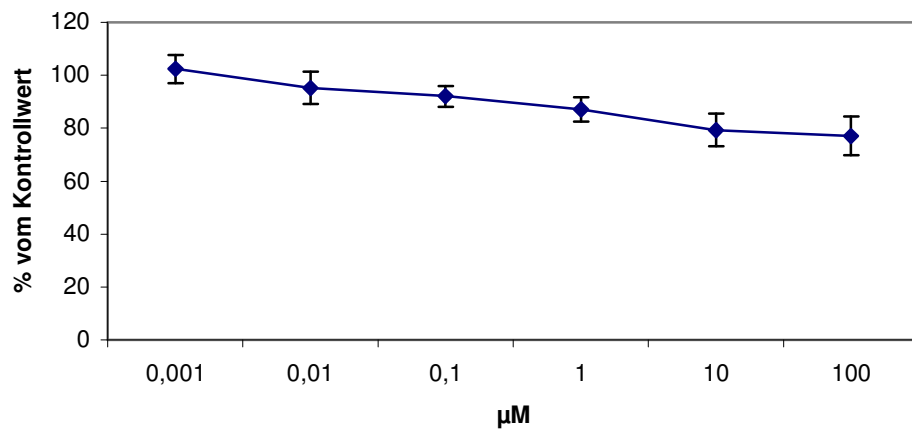
a) Kelly



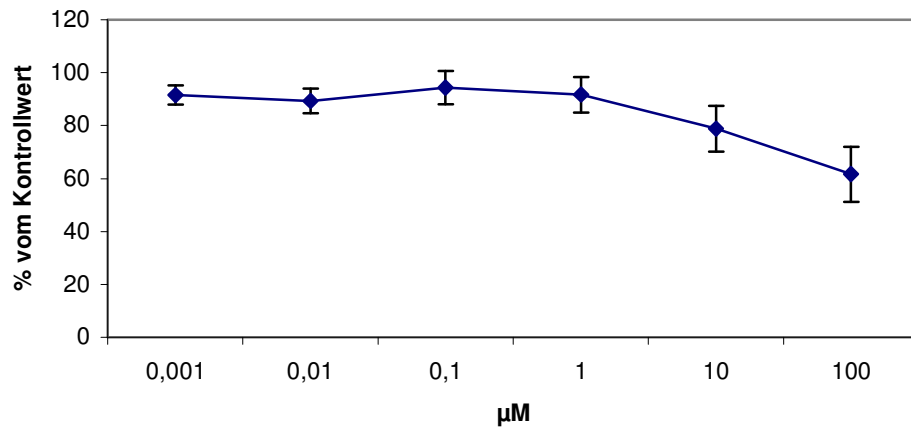
b) LAN-1



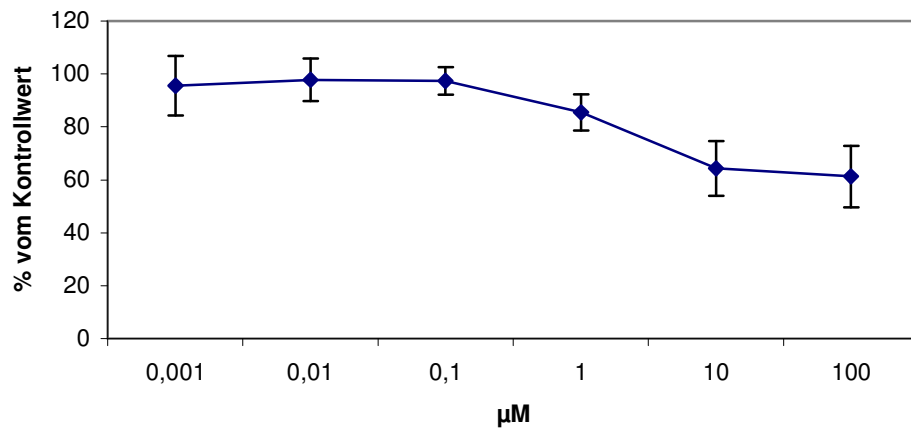
c) LAN-5



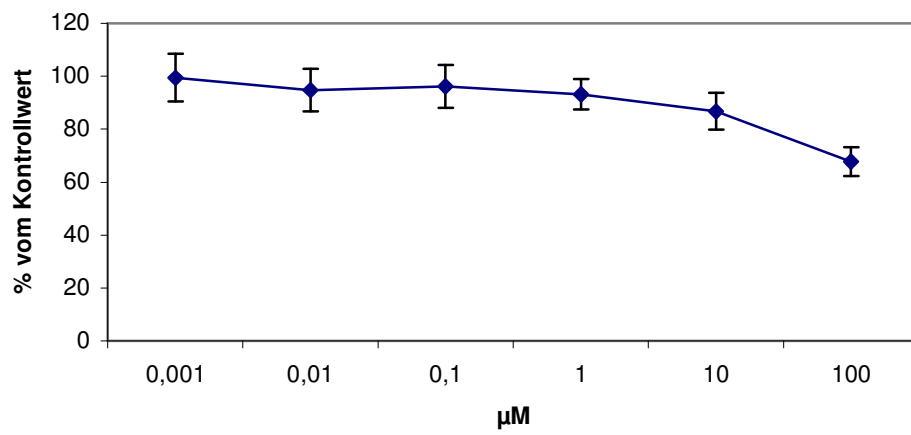
d) LS



e) IMR32



f) SK-N-SH



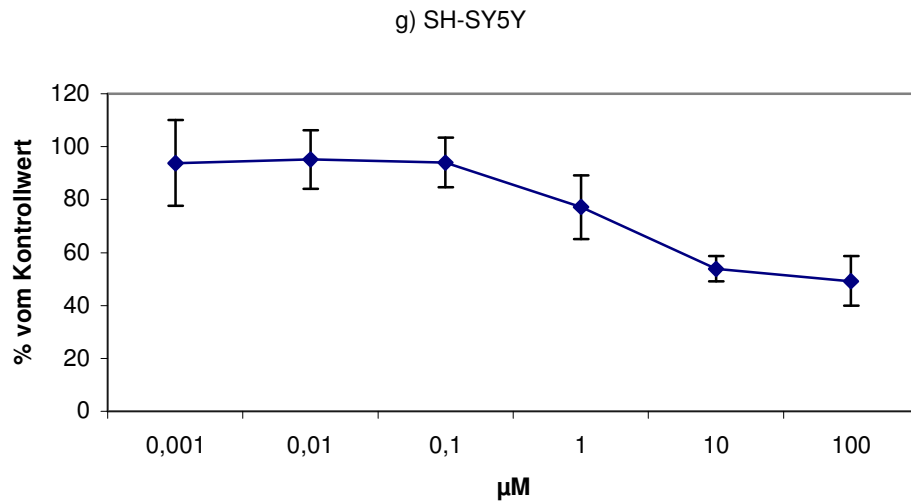


Abbildung 4.1.3 Die Wirkung von Pioglitazone auf die Proliferation der humanen Neuroblastomzelllinien a) Kelly, b) LAN-1, c) LAN-5, d) LS, e) IMR32, f) SK-N-SH, g) SH-SY5Y.

4.2 Immunhistochemie

Die Expression des PPAR- γ in den Neuroblastomzelllinien wurde immunhistochemisch mit Hilfe eines monoklonalen PPAR- γ -Antikörper (sc-7273, Santa Cruz, USA) nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst und zeigen, daß alle Neuroblastomzelllinien den PPAR- γ exprimieren. Die Stärke der Immunreaktivität weist allerdings deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien auf. Im allgemeinen zeigt sich eine eher diffuse Anfärbung des Zytoplasmas, während eine intensive Kernfärbung bei fünf der sieben Zelllinien bei weniger als 8% der Zellen zu erkennen ist. Bei den Zelllinien Kelly und LAN-1 liegt der Anteil der gefärbten Zellkerne mit ca. 15% etwas höher. Generell reagieren LAN-1 und LS von allen Neuroblastomzelllinien am stärksten mit dem PPAR- γ -Antikörper mit einem relativ homogenen zytoplasmatischen Färbemuster (Abb. 3.2.1). Der Anteil der intensiv gefärbten Kerne liegt bei den LAN-1 Zellen bei 15%, bei LS ist er < 5%. Die Färbung der LAN-5 Zellen ist inhomogen, 15% der Zellen zeigen eine starke, 85% der Zellen eine mäßige zytoplasmatische Anfärbung; 6% der Zellen haben eine deutliche Kernfärbung. IMR32 Zellen zeigen eine homogene mäßige bis intensive Reaktion des Zytoplasmas mit dem PPAR- γ -Antikörper, weniger als 1% der Zellkerne sind angefärbt. Die Zelllinie Kelly weist eine mäßige Immunmarkierung des Zytoplasmas auf; 16% der Zellen zeigen eine intensive Kernfärbung. Das Zytoplasma der SK-N-SH Zellen ist schwach bis mäßig angefärbt, eine Kernfärbung kann man bei 8% der Zellen erkennen. Am wenigsten reagieren SH-SY5Y Zellen mit dem PPAR- γ -Antikörper; diese Zelllinie zeigt insgesamt nur eine sehr schwache Färbung, eine deutliche Kernfärbung ist nur sehr vereinzelt (< 1%) nachzuweisen.

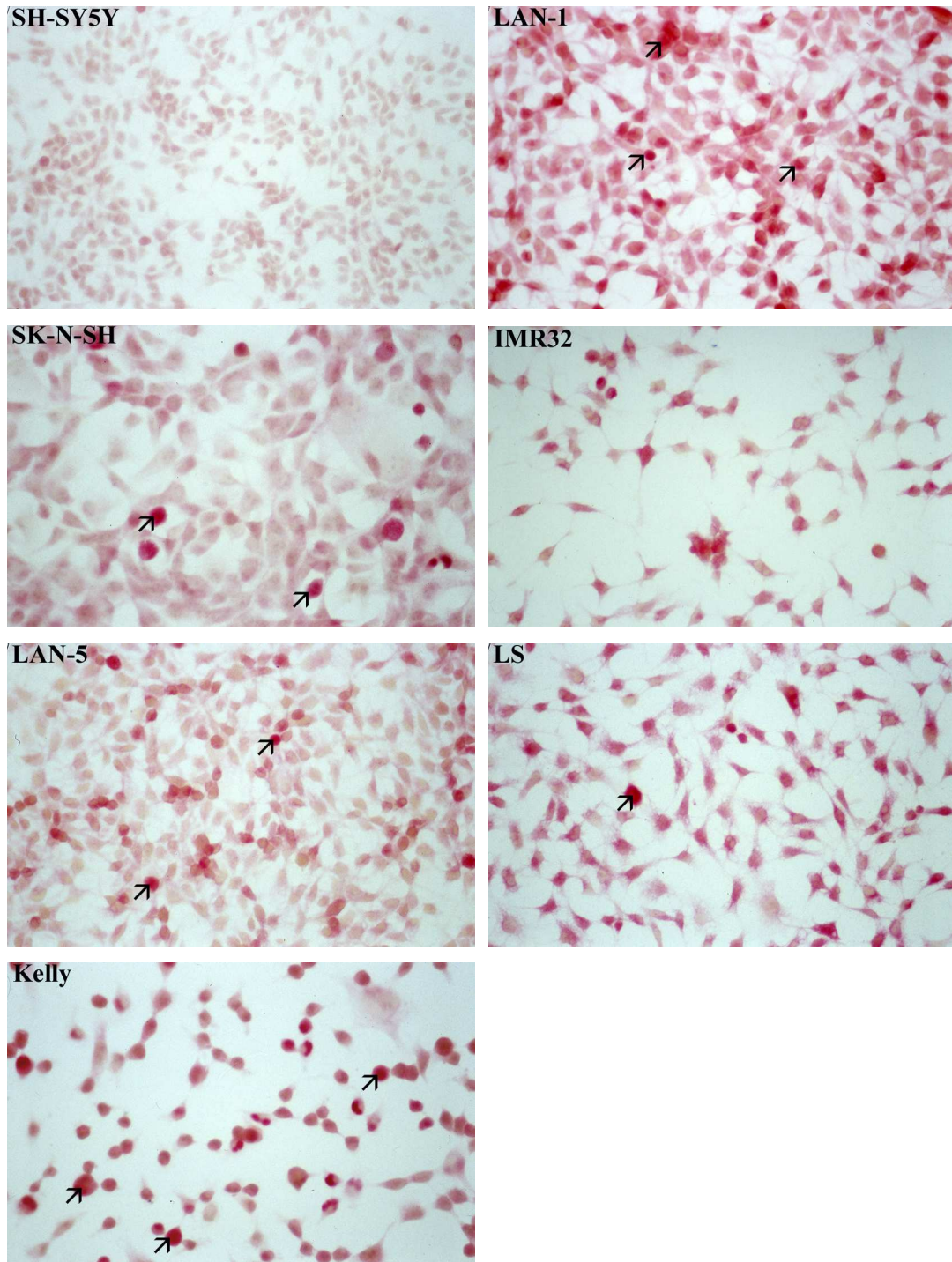
Alle Kontrollen zum Ausschluß einer unspezifischen Bindung sind negativ.

Tabelle 2 Immunhistochemische Ergebnisse von sieben Neuroblastomzelllinien mit einem monoklonalen PPAR- γ -Antikörper: (+) sehr schwache Färbung, + schwache Färbung, ++ mäßige Färbung, +++ intensive Färbung.

Zelllinie	SH-SY5Y	SK-N-SH	IMR32	LAN-5	LAN-1	LS	Kelly
Zytoplasma	100% +	100% ++	100% ++/+++	85% ++ 15% +++	100% +++	100% +++	100% ++
Kernfärbung +++	< 1%	8%	< 1%	6%	15%	4%	16%

Abb. 4.2.1 Immunhistochemische Darstellung der Expression des PPAR- γ von humanen Neuroblastomzelllinien mit dem monoklonalen PPAR- γ spezifischen Antikörper. Deutlich zu erkennen ist die schwache Immunreaktion des Zytoplasmas und der Kerne bei der Zelllinie SH-SY5Y im Vergleich mit der ausgeprägten Markierung des Zytoplasmas und der Kerne bei der Zelllinie LAN-1.

Die Pfeile (↗) weisen exemplarisch auf eine Kernfärbung hin. Vergr. 200 x



5 DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt um:

1. zu prüfen, ob verschiedene synthetische PPAR- γ -Agonisten einen Einfluß auf das Proliferationsverhalten von Neuroblastomzelllinien in vitro haben;
2. immunhistochemisch nachzuweisen, ob eine unterschiedliche Ausprägung des PPAR- γ in verschiedenen Neuroblastomzelllinien zu erkennen ist;
3. festzustellen, ob die antiproliferative Wirkung von PPAR- γ -Agonisten in vitro mit der immunhistochemisch feststellbaren PPAR- γ -Expression korreliert ist.

Die vorliegende Untersuchung zeigte, daß synthetische PPAR- γ -Agonisten prinzipiell in der Lage sind, die Proliferation von humanen Neuroblastomzelllinien in der Zellkultur zu hemmen. Bei diesen Versuchen wurde evident, daß ausgeprägte Wirkungsunterschiede zwischen den verschiedenen synthetischen PPAR- γ -Agonisten Ciglitazone, Pioglitazone und Troglitazone in Bezug auf die Inhibition der Proliferation existieren.

Ciglitazone zeigte in geringen Konzentrationen von 1 nM bis 1 μ M eine schwache antiproliferative Wirkung bei allen Neuroblastomzelllinien. Ab 10 μ M Ciglitazone setzte eine starke Hemmung der Zellproliferation ein und bei 100 μ M Ciglitazone-Lösung ist ein rasanter Abfall des Zellwachstums zu beobachten (bei fünf Zelllinien wurde die Proliferation sogar um mehr als 95% vermindert). Ein ähnliches Wirkungsspektrum von Ciglitazone haben Padilla et al. (2000) am Beispiel der B-Lymphom-Zelllinie CH31 beobachtet: Die geringeren Konzentrationen hatten nur wenig Einfluß auf das Zellwachstum, während 10 μ M Ciglitazone vollständig antiproliferativ auf die Zellen wirkte (siehe unten). Im Gegensatz dazu zeigte Ciglitazone in Untersuchungen von Kubota et al. (1998) einen geringeren Einfluß auf das Zellproliferationsverhalten im Vergleich mit Troglitazone: Bei der Zugabe 10 μ M Ciglitazone zur Prostatakarzinomzelllinie PC-3 wurde das Zellwachstum bis auf 70% gesenkt. Da die PPAR- γ wie oben dargelegt eine gewebespezifische Expression zeigen, könnten die Unterschiede durch die Herkunft der beiden Zelllinien (lymphatisches Gewebe, Prostata) bedingt sein.

In unserer Studie zeigte Troglitazone im Bereich von 10 μM bis 100 μM eine insgesamt mäßige bis starke proliferationsinhibierende Wirkung. Die Wirkung bei der höchsten Troglitazonekonzentration (100 μM) schwankte zwischen 19% des Kontrollwachstums bei der Zelllinie LS und 80% der Kontrolle bei der Zelllinie SK-N-SH. Diese Daten stimmen mit denen von anderen Studien überein. Die antiproliferative Wirkung von Troglitazone wurde zum Beispiel am Prostatakarzinom in vitro nachgewiesen (Kubota et al. 1998; Mueller et al. 2000). Nach der Zugabe von 10 μM Troglitazone überlebten 35% der Zellen der Prostatakarzinomzelllinie DU145, 40% der Zellen bei der Zelllinie PC3, und 75% der Zellen bei der Zelllinie LNCaP (Muller et al. 2000). Auch in der in vitro Studie von Kubota et al. (1998) überlebten bei 1 μM Troglitazone 40% der PC-3 Prostatakarzinomzellen, bei 10 μM Troglitazone 20% der Zellen.

Mehrere Studien (Mueller et al. 1998, Elstner et al. 1998) verwiesen auf die antiproliferative Wirkung von Troglitazone beim Mammakarzinom. In den Untersuchungen von Mueller et al. (1998) erreichte das Zellwachstum nach der Zugabe von 10 μM Troglitazone zu den 21PT und 21MT- Mammakarzinomzelllinien 60% des Kontrollwertes. Elstner et al. (1998) zeigten im Experiment in vitro, daß bei der Zugabe von 100 nM Troglitazone zur Mammakarzinomzelllinie MCF7 50% der Zellen überlebten, und daß bei der Zugabe von 10 μM Troglitazone eine absolute antiproliferative Wirkung zu beobachten war.

Auch für die humanen Bronchialkarzinomzelllinien H841, A549, PC14 wurde in vitro eine wachstumshemmende Wirkung von Troglitazone gezeigt (Tsubouchi et al. 2000). Bei der Zugabe von 10 μM bis 40 μM Troglitazone zu drei verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien wurde das Wachstum bis auf 30% vermindert.

Im Vergleich zu Ciglitazone und Troglitazone zeigte Pioglitazone in unserer Studie den geringsten Einfluß auf das Proliferationsverhalten von Neuroblastomzellen. Bei der höchsten Pioglitazonekonzentration (100 μM) war die maximale Wirkung bei der Zelllinie SH-SY5Y (49% des Kontrollwertes) und die minimale Wirkung bei der Zelllinie LAN-5 (77% des Kontrollwachstums) festzustellen. In den Untersuchungen von Mueller et al. (1998) wirkte Pioglitazone ähnlich wie Troglitazone: Nach der Zugabe von 10 μM Pioglitazone zu den 21PT und 21MT- Mammakarzinomzelllinien sank das Zellwachstum bis auf 60% der Kontrolle. Trotz seiner (im Vergleich mit Ciglitazone und Troglitazone) nicht so ausgeprägten antiproliferativen Wirkung

erscheint die Verwendung von Pioglitazone als antiproliferatives Medikament von klinisch-praktischem Interesse, da Pioglitazone bereits seit einigen Jahren als Medikament für die orale Kombinationsbehandlung des Typ-2-Diabetes verwendet wird und nur eine geringe systemtoxische Wirkung aufweist (Matthaei et al. 2001), so daß eine klinische Prüfung relativ leicht durchzuführen sein dürfte.

Die vorliegende Arbeit zeigte dabei auch, daß gleiche PPAR- γ -Agonisten das Proliferationsverhalten von verschiedenen Neuroblastomzelllinien unterschiedlich beeinflussen. Ciglitazone wirkte am stärksten auf die Zelllinien LAN-1, LS, Kelly, LAN-5 und SK-N-SH, Troglitazone hingegen auf LS und Kelly sowie Pioglitazone auf Kelly, SH-SY5Y und SK-N-SH.

Auch die zuvor durchgeführten in vitro Untersuchungen zeigten Sensibilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien innerhalb einer Tumorart. Nach der Zugabe von Troglitazone zu Prostatakarzinomzellen wurde eine antiproliferative Wirkung auf die Zelllinie PC-3 festgestellt, jedoch keine Wirkung auf die Zelllinien LNCaP und DU 145 (Kubota et al. 1998). Auch Muller et al. (1998) zeigten in vitro verschiedene Ansprechbarkeiten von verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien (siehe oben). Eine Erklärung dieser Befunde könnte mit den unterschiedlichen Ausprägungen der PPAR- γ -Expression im Kern verschiedener Zelllinien gefunden werden. Um diese Hypothese zu testen, wurden in unserer Studie die Neuroblastomzelllinien auf das Vorkommen des Rezeptors immunhistochemisch untersucht.

Weil PPAR- γ ein nukleärer Rezeptor ist, und seine Synthese in Zytoplasma stattfindet, wurde bei der Auswertung der Immunreaktion beides berücksichtigt: die Intensität der Kernmarkierung sowie der Zytoplasmamarkierung. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß nur geringe Anteile der Zellen (z.B. 17% bei der Zelllinie Kelly und 6% bei der Zelllinie LAN5) eine Kernmarkierung zeigten. Ähnliche Färbemuster konnten Tsubouchi et al. (2000) bei den humanen Bronchialkarzinomzelllinien H841, A549, PC14 und Harris et al. (2001) bei murinen T-Lymphozyten feststellen. Möglicherweise lokalisiert sich PPAR- γ , ähnlich wie andere Transkriptionsfaktoren, grundsätzlich im Zytoplasma, und nur nach der Aktivierung des PPAR- γ kommt es zu seiner Translokation in den Kern und zur folgenden Interaktion mit spezifischen DNA-Sequenzen. Ob die Aktivierung des PPAR- γ nach der Bindung mit PPAR- γ -Agonisten zur einer Translokation in den Kern führt, wurde von uns jedoch nicht überprüft.

Bei der immunhistochemischen Analyse wurde festgestellt, daß alle sieben Neuroblastomzelllinien Immunreaktionen unterschiedlicher Intensität aufwiesen. Eine ausgeprägte zytoplasmatische Markierung zeigten die Zelllinien LAN-1 und LS, eine starke bis mäßige die Zelllinie IMR32 und eine mäßige zytoplasmatische Markierung mit intensiver Kernfärbung die Zelllinie Kelly, eine mäßige bis schwache Färbung die Zelllinie SK-N-SH und eine schwache Färbung die Zelllinie SH-SY5Y.

Eine PPAR- γ -Expression bei der Neuroblastomzelllinie LAN-5 wurde bereits von Han et al. (2001) beschrieben. Auch in dieser Studie zeigte sich eine ausgeprägte Kernmarkierung bei ungefähr 10% Zellen, das Zytoplasma wurde inhomogen markiert. Die unterschiedlich starke Expression des PPAR- γ in jeder einzelnen Neuroblastomzelllinie dürfte für den Intensitätsunterschied der Immunreaktion verantwortlich sein. Da keine deutliche Korrelation zwischen der antiproliferativen Wirkung der synthetischen PPAR- γ -Agonisten und der Intensität der anti-PPAR- γ immunhistochemischen Färbung festzustellen war, kann die Genexpression des Rezeptors alleine nicht als Erklärung für die Wirksamkeit der PPAR- γ -Agonisten herangezogen werden, wenn man von der Spezifität des gekauften Antikörpers ausgeht. Somit stellt sich die Frage, ob PPAR- γ -Agonisten ihre antitumorale Wirkung durch die Aktivierung von PPAR- γ alleine realisieren oder der Einfluß auf die Zellproliferation einem anderen Wirkungsmechanismus unterliegt.

Eine Studie von Palakurthi et al. (2001) zeigte in vitro, daß ein antitumoraler Effekt von synthetischen PPAR- γ -Agonisten unabhängig von der Anwesenheit des PPAR- γ sein kann. Diese Forschungsgruppe untersuchte die antitumorale Wirkung synthetischer PPAR- γ -Agonisten (Troglitazone, Ciglitazone) auf humane Tumorzellen, die mit embryonalen Stammzellen mit dem PPAR- γ -Gen (PPAR- γ +/+) und ohne PPAR- γ -Gen (PPAR- γ -/-) der Maus transfiziert wurden. In einer Reihe von Experimenten wurde festgestellt, daß diese Substanzklasse einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase induziert, unabhängig davon, ob die Zellen mit dem PPAR- γ -Gen oder einem Kontrollgen transfiziert wurden. Da die PPAR- γ regulierte β -Oxydation und Peroxisomen Proliferation wesentliche Unterschiede bei Menschen und Tieren aufweisen (Vamecq et al. 1999), stellt sich allerdings die Frage, ob das Experiment mit den von Mäusen stammenden Genen für die Untersuchung des Wirkens der PPAR- γ -Agonisten beim Menschen überhaupt klinisch relevant ist.

Im Gegensatz dazu bestätigen die Untersuchungen von Takashima et al. (2001) die Hypothese, daß PPAR- γ -Agonisten ihre antitumorale Wirkung durch eine Wechselwirkung mit PPAR- γ entfalten. Diese Studie demonstrierte am Beispiel des humanen Ösophaguskarzinoms, daß die Expression von PPAR- γ -mRNA und PPAR- γ -Protein in der Adenokarzinomlinie (TE-7) jene in der Plattenepithelkarzinomlinie (TE-1) übersteigt. Dementsprechend inhibierten PPAR- γ -Agonisten (Troglitazone und 15d-PGJ2) das Zellwachstum der Zelllinie TE-7, zeigten aber keinen Effekt auf die Zelllinie TE-1. Diese Studie zeigte ferner, daß Troglitazone einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase verursachte und die Ornithin Decarboxylase-Aktivität der Zelllinie TE-7 reduzierte, jedoch nicht auf die Zelllinie TE-1 wirkte. Die Tatsache, daß PPAR- γ -Agonisten auf die Zellen mit der ausgeprägten PPAR- γ -Expression wirkten, ohne einen Einfluß auf die Zellen mit geringerer PPAR- γ -Expression zu zeigen, bestätigt zumindest die Hypothese, daß die antitumorale Wirkung der PPAR- γ -Agonisten auf das ösophageale Adenokarzinom durch einen PPAR- γ -vermittelten Mechanismus stattfindet.

Um die Frage über die funktionelle Bedeutung des PPAR- γ für die antitumorale Wirkung von PPAR- γ -Agonisten zu beantworten, sind weitere Studien in vitro und in vivo erforderlich.

Weiterhin stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen eine Aktivierung des PPAR- γ das Tumorstwachstum beeinflußt. So konnte gezeigt werden, daß eine Wechselwirkung mit PPAR- γ einerseits die Zelldifferenzierung induzieren und/oder eine Apoptose hervorrufen kann.

Padilla et al. (2000) und Harris et al. (2001) zeigten in vitro mittels Tunel-Test, daß synthetische und natürliche PPAR- γ -Agonisten eine Apoptose muriner normaler und maligner B-Zellen und muriner T-Lymphozyten induzierten. Dabei stellte sich heraus, daß Ciglitazone und Troglitazone in geringeren Konzentrationen kaum Einfluß auf das Proliferationsverhalten der Zellen hatten; ab 10 μ M Ciglitazone und ab 10 μ M Troglitazone konnte jedoch ein rasanter Abfall der Zellzahl bis auf 2% der Kontrolle beobachtet werden. Diese Befunde stimmen gut mit unseren Ergebnissen überein. In unserem Experiment haben wir ein ähnliches Wirkungsspektrum beobachtet: Lediglich die höheren Konzentrationen (10 μ M und 100 μ M) haben einen deutlichen Einfluß auf

das Proliferationsverhalten der Zellen. Ob eine antiproliferative Wirkung von synthetischen PPAR- γ -Agonisten auf die Neuroblastomzellen auch möglicherweise durch Apoptose bedingt ist, ist noch nicht endgültig geklärt. Weitere Untersuchungen des Wirkmechanismus von PPAR- γ -Agonisten auf die Neuroblastomzellen in vitro sind dazu erforderlich.

Auch die in vitro Untersuchungen von Tsubouchi et al. (2000) in vitro, wiesen darauf hin, daß die natürlichen und synthetischen PPAR- γ -Agonisten eine wachstumshemmende Wirkung auf die Bronchialkarzinomzelllinien H841, A549, PC14 haben, indem diese Substanzen die Apoptose der Tumorzellen induzierten.

Zum Wirkungsmechanismus von PPAR- γ -Agonisten auf humane Mammakarzinome gibt es zur Zeit einige Untersuchungen. Einerseits zeigte die Forschungsgruppe von Elstner et al. (1998) in vitro, daß die Zugabe von synthetischen PPAR- γ -Agonisten zu humanen Mammakarzinomzellen zu einer Senkung von bcl-2-Protein im Vergleich zu normalen epithelialen Mammazellen führt, was die Apoptoserate erhöht sowie die Sensibilität der Zellen gegenüber Bestrahlung und Cytostatika verbessert. Andererseits haben Mueller et al. (1998) in vitro festgestellt, daß synthetische PPAR- γ -Agonisten auf humane Mammakarzinomzellen antiproliferativ wirkten, indem sie eine Differenzierung der Tumorzellen induzierten. Dass die PPAR- γ -Agonisten die Zelldifferenzierung und Apoptose im Tumor parallel induzieren konnten, ist jedoch noch nicht endgültig nachgewiesen.

Demetri et al. (1999) untersuchten die Wirkung von Troglitazone (800 mg täglich, 6 Wochen) auf Liposarkome bei drei Patienten. Die Ergebnisse der histologischen und biochemischen Untersuchungen des Tumorbiopsiematerials vor und nach der Behandlung deuteten darauf hin, daß die Gabe von Troglitazone zur einer deutlichen Differenzierung der Tumorzellen und damit zu einer Abnahme der Tumorgroße führte. Shappell et al. (2001) konnten in vitro am Beispiel der Prostatakarzinomzelllinie PC3 feststellen, daß in Prostatakarzinomzellen der Gehalt des endogenen PPAR- γ -Agonist 15S-hydroxyeicosatetraenoic acid (15S-HETE) und der 15-Lipoxygenase (15-LOX) entsprechend des Grades der Tumordifferenzierung reduziert waren. Dabei ist bekannt, daß 15S-HETE aus der Arachidonsäure unter der 15-LOX-Katalyse gebildet wird. Eine Zugabe natürlicher PPAR- γ -Agonisten (10 μ M 15S-HETE) zur

Prostatakarzinomzelllinie PC3 führte zur Differenzierungsinduktion und zur Hemmung der Proliferation der Tumorzellen.

Die Untersuchung des Wirkens von PPAR- γ -Agonisten auf das Proliferationsverhalten von Kolonkarzinomen hat in mehreren Studien allerdings widersprüchliche Ergebnisse erbracht.

Kitamura et al. (1999) konnten in vitro am Beispiel sechs humaner Kolonkarzinomzelllinien zeigen, daß natürliche PPAR- γ -Agonisten (10 μ M 15dPGJ2) und synthetische PPAR- γ -Agonisten (100 μ M Troglitazone) die Proliferation von Tumorzellen inhibierten. Troglitazone induzierte die mRNA-Expression für Villin und für die intestinale alkalische Phosphatase, welche als Enterocyten-differenzierungsmarker bezeichnet werden. Diese Untersuchungen wiesen auf eine antitumorale differenzierungsstimulierende und damit antiproliferative Wirkung von PPAR- γ -Agonisten beim Kolonkarzinom hin.

Auch Sarraf et al. (1998) zeigten im Tierexperiment, daß die synthetischen PPAR- γ -Agonisten (Troglitazone und natürlichen PPAR- γ -Agonisten 15dPGJ2) das Wachstum der Kolonkarzinomzellen aufgrund einer Differenzierungsinduktion hemmten.

Im Gegensatz dazu zeigten Saetz et al. (1998) im Tierexperiment an APC Minus Mäusen, daß PPAR- γ -Agonisten die Entstehung von Kolonpolypen förderten. Im Experiment wurde APC Minus Mäusen (mit Prädisposition für die Entstehung von Kolonpolypen) Troglitazone in pharmakologischen Dosen verabreicht. Es wurde festgestellt, daß bei den APC Minus Mäusen nach der 5-wöchigen Zugabe von PPAR- γ -Agonisten die Zahl der entstandenen Polypen 2- bis 3-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe anstieg, dagegen wurde bei den Wildtyp-Mäusen keine Steigerung der Zahl der Kolonpolypen festgestellt. Daraufhin schlossen die Autoren, daß PPAR- γ -Agonisten die Tumorentstehung fördern könnten. Es ist fraglich, ob ein Experiment mit Mäusen klinisch relevant ist, da PPAR- γ bei Menschen und Tieren einige biochemische Prozesse unterschiedlich reguliert.

Eine differenzierungsinduzierende Wirkung von PPAR- γ -Agonisten (15d-PGJ2 und GW1929) auf Neuroblastomzellen wurde bereits von Han et al. (2001) beschrieben. Diese Studie zeigte in vitro am Beispiel der Neuroblastomzelllinie LAN-5, daß PPAR- γ -Agonisten eine Zelldifferenzierung stimulieren, indem sich die Morphologie und die funktionale Aktivität der Neuroblastomzellen entsprechend veränderten. Es wurde eine

dosisabhängige Inhibierung der Zellproliferation, der Erhöhung der biochemischen Neuroblastomzelldifferenzierungsmarker (AChE-Aktivität) sowie eine Reduktion der molekularen Differenzierungsmarker (N-myc-Expression) festgestellt. Die Untersuchungen von Han et al. (2001) geben keine Nachweise, ob parallel mit der Differenzierungsinduktion eine Apoptose stattgefunden hat. Weitere Untersuchungen des Mechanismus der Wachstumshemmung von PPAR- γ -Agonisten sind also erforderlich.

Die differenzierungsstimulierende Wirkung der PPAR- γ -Agonisten auf Krebszellen wäre besonders für eine Neuroblastomtherapie von Interesse. Klinische Studien (Kelly et al. 1996) belegten, daß die Aussichten für eine Tumorregression umso günstiger sind, je mehr differenzierte Zellen sich im gesamten Volumen des Neuroblastomtumors befinden. Wie oben schon erwähnt, haben Kinder unter einem Lebensjahr eine wesentlich bessere Prognose aufgrund einer spontanen Neuroblastomregression im Vergleich zu älteren Kindern, somit könnte eine Differenzierungstherapie ein Weg sein, die Prognose für Kinder über einem Lebensjahr zu verbessern. Ehe die Ergebnisse dieser Untersuchungen in die Klinik übertragen werden können, sollten geeignete in vivo Untersuchungen durchgeführt werden, um zu zeigen, daß es sich bei den gezeigten Hemmungen der Zellproliferation nicht um reine in vitro Effekte handelt.

Das Neuroblastom ist ein schwierig zu therapierender Tumor des Kindesalters; je weniger differenziert der Tumor ist, desto schlechter ist die Prognose für das Kind. Eine Differenzierungstherapie könnte deshalb neue Ansätze zu einer rationalen Therapie liefern. Als möglicher Angriffspunkt für eine solche Therapie wurde der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) γ gewählt.

Die Wirkung von drei synthetischen PPAR- γ -Agonisten (Ciglitazone, Pioglitazone, Troglitazone) auf die Zellproliferation wurde *in vitro* an sieben humanen Neuroblastomzelllinien (Kelly, LS, LAN-1, LAN-5, IMR32, SK-N-SH, SH-SY5Y) untersucht. Die Neuroblastomzellen wurden anschließend auf das Vorkommen des Rezeptors immunhistochemisch analysiert.

Die vorliegende Untersuchung zeigte, daß die getesteten synthetischen PPAR- γ -Agonisten alle eher im höheren Dosisbereich wirkten (10 μ M und 100 μ M); die absolute Wirkung von Ciglitazone, Pioglitazone und Troglitazone war allerdings sehr unterschiedlich. Ciglitazone zeigte eine ausgeprägte Wachstumsinhibierung im Bereich von 10 μ M bis 100 μ M für alle Neuroblastomzelllinien (weniger als 15% Zellen haben überlebt). Die antiproliferative Wirkung von Troglitazone war insgesamt schwächer und zeigte bei 100 μ M deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der getesteten Zelllinie (19% überlebende Zellen bei der Zelllinie LS, 80% bei SKNSH). Pioglitazone wirkte vergleichsweise am wenigsten antiproliferativ auf die Neuroblastome und reduzierte das Zellwachstum bei 100 μ M auf 49% bis 77% der Kontrolle je nach Zelllinie. Die vorliegende Arbeit zeigte auch, daß derselbe PPAR- γ -Agonist das Proliferationsverhalten bei verschiedenen Neuroblastomzelllinien unterschiedlich beeinflusst. So zeigte Ciglitazone den größten proliferationshemmenden Effekt auf die Zelllinien LAN-1, LS, Kelly, LAN-5 und SK-N-SH, Troglitazone auf LS und Kelly sowie Pioglitazone auf Kelly, SH-SY5Y und SK-N-SH.

Alle sieben Neuroblastomzelllinien zeigten eine Immunreaktion für den PPAR- γ in unterschiedlicher Intensität. Dabei konnte keine deutliche Korrelation zwischen der antiproliferativen Wirkung synthetischer PPAR- γ -Agonisten und der Ausprägung von PPAR- γ in den verschiedenen Neuroblastomzelllinien festgestellt werden. Es stellt sich deshalb die Frage, ob PPAR- γ -Agonisten ihre antitumorale Wirkung durch Aktivierung von PPAR- γ realisieren oder einen direkten Einfluß auf die Tumorzellen haben.

7 LITERATURLISTE

- Auwerx J (1999) PPAR- γ , The Ultimate Thrifty Gene. *Diabetologia* 42:1033-1049
- Colville-Nash PR, Qureshi SS, Willis D, Willoughby D A (1998) Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists: Correlation With Induction of Heme Oxygenase. *J Immunol* 161:978-984
- Demetri GD, Fletcher CDM, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N, Spiegelman BM, Singer S (1999) Induction of Solid Tumor Differentiation by The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Ligand Troglitazone in Patients With Liposarcoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:3951-3956
- Eltisner E, Muller C, Koshizuka K (1998) Ligands for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Retinoic Acid Receptor Inhibit Growth and Induce Apoptosis of Human Breast Cancer Cells in BNX Mice. *Proc Nat Acad Sci* 95:8806-8811
- Grossman S L, Lessem J (1997) Mechanisms and Clinical Effects of Thiazolidinediones. *Exp Opin Invest Drugs* 6:1025-1040
- Han Shou Wei, Greene Maria, Anne E, Pitts Joseph, Wada Randal K, Sidell Neil (2001) Novel Expression and Function of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) in Human Neuroblastoma Cells. *Clin Cancer Res Vol* 7:98-104
- Han Shou Wei, Wada Randal K, Sidell Neil (2001) Differentiation of Human Neuroblastoma by Phenylacetate is Mediated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . *Cancer Res* 61:3998 –4002
- Von Harnack G-A (2000) Neuroblastom. In : Koletzko S (Hrsg) *Kinderheilkunde*. Springer, Berlin Heidelberg New York (Handbuch der Kinderheilkunde, 11. Neubearb. Aufl.: 364 –365
- Harris SG, Phipps RP (2001) The Nuclear Receptor PPAR- γ is Expressed by Mouse T-Lymphocytes and PPAR- γ Agonists Induce Apoptosis. *Eur J Immunol* 31:1098 – 1105
- Herzog W (2000) Arylhydrocarbon-Rezeptor und PPAR als Angriffspunkte in der Behandlung des humanen Prostatakarzinoms. *Med. Dissertation. Universität Wien*
- Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR- γ Agonists Inhibit Production of Monocyte Inflammatory Cytokines. *Nature* 391:82-86
- Kelly DR, Goshi VV (1996) Neuroblastom And Related Tumors. *Pediatric Neoplasia* 7: 105-152

- Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, Kondo S, Kanayama S, Matsuzawa Y (1999) Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Induces Growth Arrest and Differentiation Markers of Human Colon Cancer Cells. *Jpn J Cancer Res* 90:75-90
- Kubota T, Koshuza K, Williamson EA (1998) Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (Troglitazone) Has Potent Antitumor Effect Against Human Prostate Cancer Both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58:3344-3352
- Latruffe N, Vamecq J (1997) Peroxisome Proliferators and Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) as Regulators of Lipid Metabolism. *Biochimie* 79:81-94
- Matthaei S, Stumvoll M, Häring H-U (2001) Thiazolidindione. *Deutsches Ärzteblatt* 14:912-918
- Meng Li, Jianfeng Zhou, Hironobu Sasano, Takashi Suzuki, Khaled M. Zeitoun, and Serdar E. Bulun (2001) Tumor Necrosis Factor α and Interleukin 11 Secreted by Malignant Breast Epithelial Cells Inhibit Adipocyte Differentiation by Selectively Down-Regulating CCAAT/Enhancer Binding Protein α and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ : Mechanism of Desmoplastic Reaction. *Cancer Res* 61:2250-2255
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C (1998) Terminal Differentiation of Human Breast Cancer Through PPAR-gamma. *Mol Cell* 1:465-470
- Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W (2000) Effects of Ligand Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Human Prostate Cancer. *Proc Nat Acad Sci* 26:10990-10995
- Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JGA, Tze Ming U, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM (1998) Activators of The Nuclear Receptor PPAR-gamma Enhance Colon Polyp Formation. *Nat Med* 4:1058-61
- Schmidt M.L., Lukens J.N., Seeger R.C., Brodeur G.M., Shimada H., Gerbing RB, Stram DO, Perez C, Haase GM, Matthay KK (2000) Biologic Factors Determine Prognosis in Infants With Stage IV Neuroblastoma: A Prospektive Childrens Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 18:1260-1268
- Schoonjans K, Martin G, Staels B, and Auwerx J (1997) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, Orphans with Ligands and Functions. *Curr Opin Lipidol* 8:159-166
- Shappell Scott B, Gupta Rajnish A, Manning Suzanne, Whitehead Robert, Boeglin William E, Schneider Claus, Case Tom, Price Yames, Jack Gregory S, Wheeler Thomas M, Matusik Robert J, Brash Alan R and DuBois Raymond N (2001) 15S-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Activates Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Inhibits Proliferation in PC3 Prostate Carcinoma Cells. *Cancer Res* 61:497-503

Sitzmann CF (2002) Neuroblastom. In: Pädiatrie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Neubearb. Aufl.: 502-506

Spencer CM, Markham A (1997) Troglitazone. *Drugs* 54:89-101

Padilla Josue, Kaur Kuljeet, Cao James H, Smith Terry J and Phipps Richard P (2000) Peroxisome Proliferator Activator Receptor- γ Agonists and 15-deoxy-Delta (12, 14) – PGJ(2) Induce Apoptosis in Normal and Malignant B-Lineage Cells. *J Immunol* 165:6941-6948

Palakurthi S, Aktas H, Grubissch LM, Mortensen RM, Halperin JA (2001) Anti-cancer Effects of Thiazolidinediones are Independent of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma and Mediated by Inhibition of Translation Initiation. *Cancer Res* 61:6213-6218

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone D, Spiegelman B, Mortensen RM (1999) PPAR-gamma is Required for the Differentiation of Adipose Tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617

Sarraf P, Mueller E, Jones D, King F (1998) Differentiation and Reversal of Malignant Changes in Colon Cancer through PPAR γ . *Nat Med* 4:1046-1052

Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, Chapelle A, Spiegelman BM, Eng C (1999) Loss-of-Function Mutations in PPAR-gamma Associated with Human Colon Cancer. *Mol Cell* 3:799-804

Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Hla T, Kondo M (2000) Inhibition of Human Lung Cancer Cell Growth by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Agonists through Induction of Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 270:400-405

Vamecq J, Latruffe N (1999) Medical Significance of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Lancet* 354:141-48

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2001 bis März 2003 in der Abteilung für Experimentelle Morphologie des Anatomischen Institutes der Universität Hamburg angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Schumacher für die freundliche Überlassung des Themas, für seine stets hilfreiche, geduldige Betreuung bei der Durchführung der Arbeit, sowie für zahllose Hinweise, von denen ich sehr profitieren konnte.

Frau Dr. U. Valentiner möchte ich für die Hilfe bei der Textkorrektur und statistischen Datenauswertung und Immunhistochemieauswertung, sowie für ihre Beratung bei der Durchführung der Versuche besonders herzlich danken. Ihre wertvollen Anregungen und Tipps waren mir stets eine große Hilfe.

Mein ganz spezieller Dank gilt Frau S. Feldhaus und Herrn Klaus Siebert für die Herstellung der Fotoarbeiten.

Für technische Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung von Laborarbeiten danke ich Frau Meike Ziesenitz.

Meinem Ehemann Sven-Olof möchte ich besonders herzlich dafür danken, daß er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mit seiner Hilfe bei der statistischen Datenbearbeitung und bei der Textkorrektur zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Meinen Kindern John Philip und Oscar Alexander danke ich für Ihre Geduld und ihr Verständnis.

Meinen Eltern möchte ich herzlich dafür danken, daß Sie mir diesen Weg ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

2.7.1969	geboren in Minsk (UdSSR) als Tochter des Ingenieur V. I. Kostarev und der Schullehrerin N. K. Kostareva, geb. Gwosd.
22.09.1995	Heirat, Umzug nach Hamburg
01.01.1996	Geburt meines Sohnes John Philip
16.04.1998	Geburt meines Sohnes Oscar Alexander
Schulbildung:	
01.09.76 – 26.06.86	Grund- und Mittelschule in Minsk
Studium:	
01.09.86– 23.06.92	Immatrikulation an der Fakultät für Kinderheilkunde am Medizinischen Institut Minsk
Mai - Juni 1992	Drei Ärztliche Staatliche Prüfungen
Berufserfahrung:	
01.08.92 – 01.07.93	Ärztin im Praktikum, Kinderpoliklinik Nr. 15 Minsk
01.08.93 – 30.09.95	Tätigkeit als Kinderärztin, Kinderpoliklinik Nr.1 Minsk
01.10.99 – 31.03.00	Arbeit als Weiterbildungsassistentin in der Kinderärztlichen Gemeinschaftspraxis Dres. Wübbena, Bönig, HH-Rahlstedt
09.10.00 – 20.10.00	Intensivpraktikum Molekularbiologie, Universität Hamburg
ab Januar 2001	Doktorarbeit in der Abteilung für Experimentelle Morphologie, Anatomisches Institut der Universität Hamburg
seit Januar 2003	Ärztin im AKK Hamburg

ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 7. Juli 2003

Margarita Carlsson

ABSTRACT

In dieser Arbeit haben wir den Einfluß mehrerer synthetischer PPAR- γ -Agonisten auf das Proliferationsverhalten von sieben Neuroblastom-Zelllinien (Kelly, LAN-1, LAN-5, LS, IMR32, SK-N-SH, SH-SY5Y) erforscht. Die PPAR- γ -Agonisten (Ciglitazone, Troglitazone und Pioglitazone) wurden jeweils in sechs verschiedenen Konzentrationen (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) getestet. Unsere Untersuchungen bestätigen eine antiproliferative Wirkung der PPAR- γ -Agonisten auf die Neuroblastomzelllinien in vitro. Es wurden wesentliche Wirkungsunterschiede zwischen den einzelnen synthetischen PPAR- γ -Agonisten auf die Neuroblastomzellen festgestellt. Auch die einzelnen Neuroblastom-Zelllinien sprechen unterschiedlich auf die verabreichten PPAR- γ -Agonisten an. Es hat sich herausgestellt, daß Ciglitazone die stärkste proliferationshemmende Wirkung bei allen Neuroblastomzelllinien besitzt; Troglitazone wirkte mässig und Pioglitazone zeigte den geringsten Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten keine Korrelation zwischen der Wirkung von PPAR- γ -Agonisten und der Ausprägung des PPAR- γ . Die Fragen, ob PPAR- γ -Agonisten ihre antitumorale Wirkung durch Aktivierung von PPAR- γ realisieren oder einen direkten Einfluß auf die Tumorzellen haben, sowie durch welchen Mechanismus (Zelldifferenzierung und/oder Apoptose) eine Wachstumshemmung realisiert wird, müssen deshalb noch weiter untersucht werden.

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg
am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

Margarita Carlsson, Hamburg. Postfach 73 02 65, 22122 Hamburg
Info@carlsson-web.de