

**New diagnostic and therapeutical
possibilities in the treatment of
glioblastoma multiforme**

**Új diagnosztikus és terápiás
lehetőségek a glioblastoma
multiforme kezelésében**

**Ph.D. Thesis
Ph.D Tézisek**

Dr. Bellyeiné Dr. Pozsgai Éva

**University of Pécs, Department of Clinical Chemistry and
Biochemistry**

Program leader/ Program vezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs

**Pécs
2011.**

Introduction

Malignant gliomas, such as glioblastoma multiforme, are the most frequent type of primary brain tumors. The standard approach of treatment is multimodal: surgical resection is followed by adjuvant radiotherapy and chemotherapy, with the alkylating agent temozolomide. Malignant gliomas can be typified by diffuse infiltration of the brain and increased resistance to conventional cancer therapies. Despite notable advancements in oncology, however, the early diagnosis and successful treatment of malignant gliomas continues to present a great challenge.

Heat shock proteins (Hsp) are a ubiquitous group of proteins found in all living organisms, that play an important role in cytoprotection and cell survival. Small Hsps (sHsp) have a molecular weight ranging between 2-43 kDa. Like other Hsp, small stress proteins also act as molecular chaperones and have also been found to be expressed at higher levels in different malignancies. Previously, our working group identified and characterized a novel small heat shock protein, Hsp 16.2. Preliminary studies indicated that Hsp16.2 is expressed in neuroectodermal tumors. Therefore, we began to study the expression of Hsp 16.2 in different types of brain tumors. Our aim was to examine whether Hsp16.2 plays a part in the development of various types of brain tumors and whether the level of its expression correlates with the malignancy of the tumor.

Growth hormone-releasing hormone (GHRH) induces growth hormone (GH) secretion after binding to pituitary-type GHRH receptors (pGHRH-R) in the anterior pituitary. The insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulated by GH, plays an important role in the mechanism of malignant transformation, metastasis and tumorigenesis in various cancers, including brain cancers. GHRH antagonists have been applied successfully for the treatment of different types of experimental tumors, including malignant gliomas. The effects of the GHRH antagonists' on cancer cell viability and cell signaling pathways have not yet been elucidated. In the present study, we investigated the mechanism of action of two new potent GHRH antagonists: JMR-132 and MIA-602. Our goal was to examine the signal transduction and cellular response of brain tumor cells to treatment with GHRH antagonists and to investigate the effectiveness of GHRH antagonist MIA-602 *in vivo*.

The inhibitory effects of GHRH antagonists on tumor growth, invasion and metastatic ability of various cancers *in vivo* have previously been investigated. In our *in vitro* study in three highly malignant cell lines including the glioblastoma cell line, DBTRG-05, it was our goal to demonstrate how MIA-602 affects the critical steps of malignant tumorigenesis, such

as cell proliferation, stimulation of angiogenesis, enhancement of cell motility, cellular invasion and the production of key proteins involved in metastasis development.

Taken together, the aims of my study were to determine the following:

1. Is Hsp 16.2 present in different types of brain tumors?
2. Can a correlation be found between the expression of Hsp 16.2 and the grades of different brain tumors?
3. Are the pGHRH receptor and its main splice variant, SV1, expressed in glioblastoma cell lines?
4. Do GHRH antagonists have an effect on the cell survival of glioblastoma cell lines?
5. Do GHRH antagonists have an effect on the cell signalling pathways of glioblastoma cell lines?
6. How do GHRH antagonists influence the mitochondrial membrane potential of glioblastoma cells?
7. Do GHRH antagonists decrease the rate of glioblastoma tumor growth in a nude mouse animal model?
8. Do GHRH antagonists have an effect on invasion and metastasis development *in vitro*?
9. Could GHRH antagonists be a possible therapeutic tool for the treatment of malignant gliomas?

General conclusions

1. Hsp 16.2 was detected in different types and grades of brain tumors, however, the level of expression varied according to the type and grade of the tumor. All ninety-one tumor samples were labeled equally intra-nuclearly; they varied in their cytoplasmic labeling of Hsp 16.2.
2. Hsp 16.2 could not be detected in a significant quantity in normal brain tissue, it was only present in tumor cells in significant quantity and its level increased with the increase of cell anaplasia. The cytoplasmic expression of Hsp 16.2 correlates directly with the grade of the different types of brain tumors. Based on our findings, Hsp16.2 could become a valuable marker for primary brain tumor diagnosis and the anti-apoptotic activity of sHsp16.2 could become the target of drug therapy.
3. Both the pGHRH receptor and its main splice variant, SV1, were detected on the two glioblastoma cell lines, DBTRG-05 and U-87MG, pGHRH-R at 60 kDa and SV1 at 39.5 kDa.
4. GHRH antagonists, JMR-132 and MIA-602, decreased the cell viability of both DBTRG-05 and U-87MG glioblastoma cancer cell lines.
5. GHRH antagonists affect cell death through the following key pro-apoptotic pathways: the reduction of phosphorylated Akt, GSK3 β and ERK 1/2, the cleavage of PARP and caspase-3 and through the intracellular translocation of proteins AIF, EndoG and cyt c.
6. GHRH antagonists abolish mitochondrial membrane integrity, through the depolarization of the mitochondrial membrane potential, thus leading to the release of pro-apoptotic signals from the mitochondrial inter-membrane space.
7. The treatment of experimental glioblastoma *in vivo* with the GHRH antagonist, MIA-602, resulted in the considerable (69%) reduction of tumor growth, demonstrating a significant inhibitory effect of this GHRH antagonist.

8. The new GHRH antagonist, MIA-602 decreased the proliferation, migration, invasion and MMP production in three cancer cell lines representing three different cancers (brain, ovarian, breast cancers) *in vitro*. Exposure to MIA-602 upregulated the expression of caveolin-1 and E-cadherin, and led to the powerful downregulation of β -catenin and NF- κ B.

9. The current investigation indicates that GHRH antagonists, such as MIA-602, might be useful for the treatment of patients suffering from malignant brain cancer by the reduction of tumor growth and through the inhibition of cancer cell metastasis.

Bevezetés

A malignus gliomák, mint a glioblastoma multiforme, a leggyakrabban előforduló primer agydaganatok. A daganatok standard kezelése multimodális: sebészi rezekciót követően adjuváns sugárterápiában és leggyakrabban temozolomid-alapú kemoterápiában részesül a beteg. A malignus agydaganatokra jellemző a diffúz infiltráció az agyszövetbe és az emelkedett rezisztencia a hagyományos daganat terápiákkal szemben. Az utóbbi években elért jelentős terápiás fejlődés ellenére a malignus gliomák korai diagnosztizálása és sikeres kezelése továbbra is nagy kihívást jelent.

A Hő sokk fehérjék (Hsp), a fehérjék egy olyan speciális ubikviter csoportját képezik, melyek a sejttúlélésben játszanak nagy szerepet. A kis molekulású hű sokk fehérjék molsúlya 2-43 kDa és hasonlóan a többi Hsp-hez, molekuláris chaperone-ként működnek valamint magas fokban expresszálódnak különböző rosszindulatú daganatokban. A munkacsoportunk az elmúlt években fedezett fel és jellemzett egy új kis molekulású Hsp-t, a Hsp 16.2-t. Mivel az előzetes kísérletek arra utaltak, hogy a Hsp 16.2 megjelenik neuroectodermális daganatokban, ezért megvizsgáltuk, hogy a Hsp 16.2 expresszióját különböző típusú agydaganatokban. Az volt a célunk, hogy kiderítsük, van-e szerepe a Hsp16.2-nek a daganat kialakulásában, illetve, hogy a fehérje expressziója és a tumor malignitása között van-e összefüggés.

A hypothalamusban termelődő növekedési hormont serkentő hormon (GHRH) kötődik a hypophysis-típusú GHRH receptorokhoz (pGHRH-R) és növekedési hormon (GH) szekréciót indít el a hypophysisben. A GH stimulálja az inzulin-típusú növekedési faktor-I (IGF-I)-et, mely utóbbi fontos szerepet játszik a malignus transzformáció, metasztázis és tumorigenezis folyamataiban különböző daganatokban, beleértve az agydaganatokat is. Sikeresen alkalmazták a GHRH antagonistákat különféle daganat modellekben, mint pl. malignus gliomákban. A GHRH antagonisták hatását korábban nem vizsgálták a daganat sejttúlélésre és a sejt jelátviteli útvonalaira. A jelen tanulmányban két új potens GHRH antagonistát, a JMR-132 és MIA-602, hatásmechanizmusát vizsgáltuk meg. Célunk volt, hogy megvizsgáljuk az agydaganat sejtek GHRH antagonistára adott szignál transzdukciós válaszát illetve, hogy felderítsük a MIA-602 *in vivo* hatásosságát.

A GHRH antagonisták *in vivo* daganat növekedésre, invázió és metasztázis képződésre kifejtett gátló hatását korábbi tanulmányok bizonyították. *In vitro* kísérletekkel vizsgáltuk a MIA-602 hatását a sejt proliferációra, motilitásra, invázióra, angiogenezisre

valamint metasztázis képződéssel járó fehérje expresszióra három tumor sejtvonalon, például a DBTRG-05 glioblastoma sejteken.

A vizsgálatok céljai a következők kiderítése volt:

1. Jelen van-e a Hsp 16.2 a különböző típusú agydaganatokban?
2. Van-e összefüggés a Hsp 16.2 expressziója és az agydaganatok grádusa között?
3. Kifejeződik-e a pGHRH receptor és fő splice variánsa, az SV1, a glioblastoma sejtvonalakon?
4. Milyen módon befolyásolják a sejttúlélést a GHRH antagonisták?
5. Van-e hatásuk a GHRH antagonistáknak a fő jelátviteli útvonalakra a glioblastoma sejtvonalakon?
6. Miként befolyásolják a GHRH antagonisták a glioblastoma sejtek mitokondriális membrán potenciálját?
7. Csökkentik-e a GHRH antagonisták a glioblastoma daganat növekedését kísérletes állatmodellben?
8. Van-e a GHRH antagonistáknak in vitro hatásuk az invázió és metasztázis képződésre?
9. Alkalmasak lehetnek-e a GHRH antagonisták malignus gliomák kezelésére?

Eredmények és konklúziók

1. Hsp 16.2 kifejeződést találtunk a különféle agydaganatokban, az expresszió mértéke azonban különbözött a daganat típusa és grádusa szerint. Mind a 91 tumor mintában közel azonos intranukleáris jelölés volt látható, a különbség a citoplazmatikus festődésben mutatkozott.
2. A Hsp 16.2 csak a daganat sejtekben volt jelen szignifikáns mennyiségben, ép sejtkben alig, és a Hsp 16.2 mennyisége arányos volt a sejt anapláziájának mértékével. A citoplazmatikus Hsp 16.2 expresszió mértéke egyenesen arányos a különféle daganatok grádusával. Eredményeink alapján a Hsp 16.2

értékes markerként szolgálhat a primér agydaganatok diagnosztikájában valamint a Hsp 16.2 antiapoptotikus aktivitása daganatellenes terápiás célpontja is lehet.

3. A pGHRH receptor és fő splice variánsa, az SV1, is megtalálhatóak a DBTRG-05 és U-87MG glioblastoma sejtvonalakon. A pGHRH-R 60, az SV1 39,5 kDa-nál.
4. A GHRH antagonisták, JMR-132 és MIA-602, csökkentették a sejttúlélést mindkét glioblastoma sejtvonalon.
5. A GHRH antagonisták sejtthalált a következő proapoptotikus útvonalakon indukálnak: a foszforilált Akt, GSK3 β és ERK 1/2 csökkentése, a PARP és kaszpáz-3 hasítása és az intracelluláris fehérje (AIF, EndoG és Cyt C) transzlokációja révén.
6. A GHRH antagonisták megszüntetik a mitokondriális membrán integritását, mivel a mitokondriális membrán depolarizációját és ezáltal a proapoptotikus jelátvivő molekulák intermembrán térből történő kiszabadulását segítik elő.
7. *In vivo*, GHRH antagonista kezelésre a kísérletes glioblastoma jelentősen megkisebbedett (69%), mely a GHRH antagonista hatásosságát bizonyítja.
8. Az új GHRH antagonista, MIA-602 csökkentette a sejtek proliferációját, migrációját, invázióját és MMP produkcióját 3 különböző daganatos sejtvonalnál (agy, petefészek és emlődaganat). MIA-602 kezelés hatására megnőtt a caveolin-1 és E-cadherin expressziója, míg jelentősen csökkent a β -catenin és NF- κ B szintje.
9. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a GHRH antagonisták, mint például a MIA-602, a malignus agydaganatban szenvedőknél a daganatellenes terápia része lehet, mivel daganatnövekedés gátló hatásúak, és gátolják az áttétképződést.

Publications in the topic/ Publikációk a témában:

1: **Pozsgai E**, Schally AV, Zarandi M, Varga JL, Vidaurre I, Bellyei S. The effect of GHRH antagonists on human glioblastomas and their mechanism of action. *Int J Cancer*. 2010 Nov 15;127(10):2313-22. PubMed PMID: 20162575.

IF: 4.91

2: **Pozsgai E**, Schally AV, Halmos G, Rick F, Bellyei S. The inhibitory effect of a novel cytotoxic somatostatin analogue AN-162 on experimental glioblastoma. *Horm Metab Res*. 2010 Oct;42(11):781-6. Epub 2010 Jul 27. PubMed PMID: 20665426.

IF: 2.685

3: Kovács M, Schally AV, Hohla F, Rick FG, **Pozsgai E**, Szalontay L, Varga JL, Zarándi M. A correlation of endocrine and anticancer effects of some antagonists of GHRH. *Peptides*. 2010 Oct;31(10):1839-46. Epub 2010 Jul 13. PubMed PMID: 20633588.

IF: 2.705

4: Bellyei S, Schally AV, Zarandi M, Varga JL, Vidaurre I, **Pozsgai E**. GHRH antagonists reduce the invasive and metastatic potential of human cancer cell lines in vitro. *Cancer Lett*. 2010 Jul 1;293(1):31-40. Epub 2010 Jan 12. PubMed PMID: 20064686.

IF: 4.89

5: **Pozsgai E**, Gomori E, Szigeti A, Boronkai A, Gallyas F Jr, Sumegi B, Bellyei S. Correlation between the progressive cytoplasmic expression of a novel small heat shock protein (Hsp16.2) and malignancy in brain tumors. *BMC Cancer*. 2007 Dec 21;7:233. PubMed PMID: 18154656; PubMed Central PMCID: PMC2234428.

IF: 2.709

6: Bellyei S, Szigeti A, **Pozsgai E**, Boronkai A, Gomori E, Hocsak E, Farkas R, Sumegi B, Gallyas F Jr. Preventing apoptotic cell death by a novel small heat shock protein. *Eur J Cell Biol*. 2007 Mar;86(3):161-71. Epub 2007 Feb 1. PubMed PMID: 17275951.

IF: 3.224

7: Bellyei S, Szigeti A, Boronkai A, **Pozsgai E**, Gomori E, Melegh B, Janaky T, Bogнар Z, Hocsak E, Sumegi B, Gallyas F Jr. Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock protein predominantly via Hsp90 mediated lipid rafts stabilization and Akt activation pathway. *Apoptosis*. 2007 Jan;12(1):97-112. PubMed PMID: 17136496.

PubMed PMID: 17136496.

IF: 3.043

8: Sz Bellyei, **E Pozsgai**, B. Sumegi: Hsp16.2 in Cancers
Book Chapter in: *Small Stress Proteins and Human Diseases*, Protein Science and Engineering, Nova Science Publisher, New York, 2010

IF in the topic/ Témához kapcsolódó IF: 23.841

Additional publications/ Egyéb publikációk:

1: Hocsak E, Racz B, Szabo A, **Pozsgai E**, Szigeti A, Szigeti E, Gallyas F Jr, Sumegi B, Javor S, Bellyei S. TIP47 confers resistance to taxol-induced cell death by preventing the nuclear translocation of AIF and Endonuclease G. Eur J Cell Biol. 2010 Nov;89(11):853-61. Epub 2010 Aug 12. PubMed PMID: 20708296.

IF: 3.314

2: Hocsak E, Racz B, Szabo A, Mester L, Rapolti E, **Pozsgai E**, Javor S, Bellyei S, Gallyas F Jr, Sumegi B, Szigeti A. TIP47 protects mitochondrial membrane integrity and inhibits oxidative-stress-induced cell death. FEBS Lett. 2010 Jul 2;584(13):2953-60. PubMed PMID: 20556887.

IF: 3.541

3: Papp A, Cseke L, Farkas R, Pavlovics G, Horvath G, Varga G, Szigeti A, Bellyei S, Marton S, Poto L, Kalmar K, Vereczkei A, **Pozsgai E**, Horvath OP. Chemo-radiotherapy in locally advanced squamous cell oesophageal cancer--are upper third tumours more responsive? Pathol Oncol Res. 2010 Jun;16(2):193-200. Epub 2009 Sep 17. PubMed PMID: 19760123.

IF: 1.152

4: Szigeti A, Hocsak E, Rapolti E, Racz B, Boronkai A, **Pozsgai E**, Debreceni B, Bogнар Z, Bellyei S, Sumegi B, Gallyas F Jr. Facilitation of mitochondrial outer and inner membrane permeabilization and cell death in oxidative stress by a novel Bcl-2 homology 3 domain protein. J Biol Chem. 2010 Jan 15;285(3):2140-51. Epub 2009 Nov 9. PubMed PMID: 19901022; PubMed Central PMCID: PMC2804370.

IF: 5.520

5: Boronkai A, Bellyei S, Szigeti A, **Pozsgai E**, Bogнар Z, Sumegi B, Gallyas F Jr. Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by galectin-13 overexpression via activation of Ask-1-p38-MAP kinase and JNK/SAPK pathways and suppression of Akt and ERK1/2 activation in U-937 human macrophage cells. Eur J Cell Biol. 2009 Dec;88(12):753-63. Epub 2009 Aug 31. PubMed PMID: 19717209.

IF: 3.955

6: Szigeti A, Minik O, Hocsak E, **Pozsgai E**, Boronkai A, Farkas R, Balint A, Bodis J, Sumegi B, Bellyei S. Preliminary study of TIP47 as a possible new biomarker of cervical dysplasia and invasive carcinoma. Anticancer Res. 2009 Feb;29(2):717-24. PubMed PMID: 19331227.

IF: 1.390

7: Szapary L, Bagoly E, Kover F, Feher G, **Pozsgai E**, Koltai K, Hanto K, Komoly S, Doczi T, Toth K. The effect of carotid stenting on rheological parameters, free radical production and platelet aggregation. Clin Hemorheol Microcirc. 2009;43(3):209-17. PubMed PMID: 19847055.

8: Fehér G, Bagoly E, Kövér F, Koltai K, Hantó K, **Pozsgai E**, Komoly S, Dóczi T, Tóth K, Szapary L. [The effect of carotid stenting on rheological parameters, free radical production and platelet aggregation]. Orv Hetil. 2007 Dec 16;148(50):2365-70. Hungarian. PubMed PMID: 18055360.

IF: 18.872

Total IF: 42.713