

Pharmakologische Untersuchungen
an der TGF- β -Signalkaskade

6 Pharmakologische Untersuchungen an der TGF- β -Signalkaskade

An aus juvenilem Vorhautgewebe isolierten Keratinozyten, wurden zwei ausgewählte Verbindungen (**62** und **69**, Tab. 6.1) auf ihre Wirkung an der TGF- β -Signalkaskade untersucht.

6.1 Testsysteme

In Migrationsexperimenten wurde der Einfluss der Verbindungen auf die durch TGF- β bzw. 10 % FCS vermittelte Stimulierung der Migration durch Polycarbonatmembranfilter untersucht. Des Weiteren wurde die Zytotoxizität an Keratinozyten im MTT-Test bestimmt und der Einfluss auf den Thymidineinbau, der durch Zugabe von TGF- β gehemmt wurde, bestimmt.

6.1.1 Migrations-Assay

TGF- β und andere peptidische Wachstumsfaktoren zeigen u. a. Effekte auf die Zellbeweglichkeit und Migration verschiedener Zelltypen (Kapitel 1.2, Seite 17). Diese chemotaktische Steigerung der Migrationsfähigkeit von Zellen kann durch ein Testsystem überprüft werden [Tong, 125]. Dazu werden Zellen in die obere Kammer eines Polycarbonatfilters gegeben. In die untere Kammer wird TGF- β haltiges Medium gegeben, welches die Zellen stimuliert aus der oberen Kammer durch die Poren der Filter zu wandern. Nach einer Inkubation von sechs Stunden werden die Zellen an der Unterseite des Filters gezählt (Kapitel 8.4.3.2, Seite 204).

Um zu bestimmen, ob die Hemmung der Migration durch Wirkstoffe spezifisch am TGF- β bzw. seiner Signalkaskade stattfindet oder eher allgemeiner Natur ist, wurde die Zellmigration auch mit fetalem Kälberserum (FCS) stimuliert. FCS enthält neben TGF- β andere Faktoren, die in der Lage sind die Migration der Zellen zu fördern. Dadurch kann man erkennen, ob eine generelle Hemmung der Migration vorliegt oder nur die durch TGF- β induzierte Migration gehemmt wird.

Für Verbindungen, die die Migration der Keratinozyten hemmen, lässt sich ein IC_{50} -Wert bestimmen, der analog zum IC_{50} der antagonistischen Wirkung am ER (Kapitel 5.1.2.3, Seite 98) ermittelt wird. Dieser Wert sagt aus, durch welche Konzentration der Testverbindung die Migration der Zellen um 50 % reduziert werden kann.

6.1.2 Hemmung des Thymidineinbaus

TGF- β ist auch ein potenter Wachstumsinhibitor vieler Zelltypen (Kapitel 1.2, Seite 17). Diese Wachstumshemmung beruht auf einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus [Alexandrow, 194]. Verbindungen, die die Wirkung von TGF- β inhibieren, können diese Wachstumshemmung aufheben.

Die Wachstumshemmung von Zellen lässt sich bestimmen, in dem man den Thymidineinbau verfolgt (Kapitel 8.4.3.3, Seite 206). Proliferierende Zellen benötigen das Nukleotid Thymidin als Bestandteil der DNA. Durch Zugabe von radioaktiv markiertem [3H]-Thymidin zu Zellkulturen und Aufarbeitung der Zellen nach 24 h Inkubation kann der Einbau des radioaktiven Thymidins als Parameter für das Wachstum der Zellen herangezogen werden. Stark proliferierende Zellen bauen dabei mehr Thymidin ein als im Wachstum gehemmte Zellen.

6.1.3 MTT-Test

Der Einfluss der Testverbindungen auf die Viabilität der Keratinozyten wurde mittels MTT-Test ermittelt (Kapitel 8.4.3.4, Seite 207). Dabei erfolgt in lebenden Zellen eine Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalses MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu violetten Formazan-Kristallen. Die Menge an gebildetem Formazan wird über die optische Dichte bei 540 nm bestimmt und korreliert mit der Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen.

6.2 Testergebnisse

Die Konzentrations-Wirkungskurven der beiden ausgewählten Tetrahydropyrroloimidazole **62** und **90** sind im Anhang abgebildet (Kapitel 9.3, Seite 222).

6.2.1 Migrations-Assay

Im Migrations-Assay sind beide Verbindungen in der Lage, die durch TGF- β induzierte Stimulation der Migration zu inhibieren. Die methoxygeschützte Verbindung **62** zeigt dabei eine deutliche stärkere Wirkung (Tab. 6.1). Bereits in einer Konzentration von 10^{-6} M wird die Migration der Keratinozyten fast komplett unterdrückt (Abb. 6.1). Der IC_{50} -Wert dieser Verbindung liegt bei $75 \cdot 10^{-9}$ M.

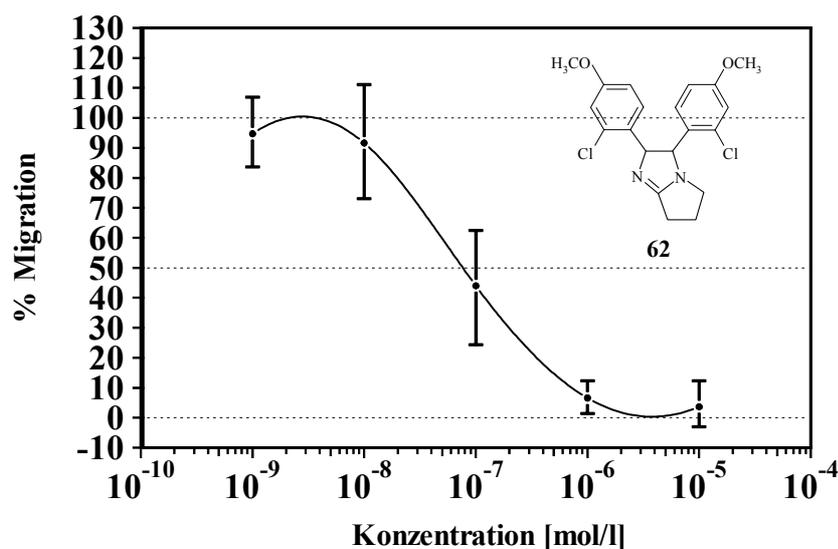
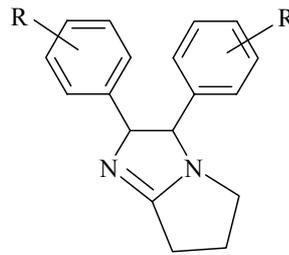


Abb. 6.1: Konzentrationsabhängige Hemmung der Migration von Keratinozyten durch das Tetrahydropyrroloimidazol **62**.



Verbindung	R	rel. Migration bei 10^{-6} M [%]	IC ₅₀ [10^{-9} M]
62	2-Cl, 4-OCH ₃	7	75
90	2-Cl, 4-OH	68	2000

Tab. 6.1: Einfluss der Tetrahydropyrroloimidazole **62** und **90** auf die relative Migration von Keratinozyten im Migrations-Assay (Stimulation der Migration mit 2 ng/ml TGF- β).

Setzt man nicht TGF- β sondern 10 % FCS zur Stimulation der Migration ein, zeigen beide Verbindungen im getesteten Konzentrationsbereich von 10^{-8} M bis 10^{-5} M keinen hemmenden Effekt auf die Migration der Keratinozyten.

6.2.2 Hemmung des Thymidineinbaus

Die Hemmung des Thymidineinbaus, die durch TGF- β ausgelöst wurde, wird von den Verbindungen **62** und **90** nicht aufgehoben. Über den gesamten Konzentrationsbereich (10^{-9} M bis 10^{-5} M) kann bei beiden Diaryltetrahydropyrroloimidazolen keine Zunahme des Thymidineinbaus beobachtet werden.

6.2.3 MTT-Test

Die beiden Diaryltetrahydropyrroloimidazole **62** und **90** zeigen im MTT-Test an Keratinozyten auch in hohen Konzentrationen (10^{-5} M) keine zytotoxischen Eigenschaften. Eine Abnahme der Migration aufgrund von zytotoxischen Effekten der Verbindungen kann somit ausgeschlossen werden.

6.3 Diskussion der Testergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen am TGF- β -Rezeptor zeigen für die beiden Diaryltetrahydropyrroloimidazole eine eindeutige Hemmung der durch TGF- β stimulierten Migration, ohne dass für die Verbindungen zytotoxische Eigenschaften nachgewiesen wurden. Dabei ist die lipophilere Verbindung **62** um Faktor 25 wirksamer. Auf die durch 10 % FCS stimulierte Migration haben beide Strukturen dagegen keinen Einfluss. Eine weitere Wirkung von TGF- β , die Hemmung des Thymidineinbaus, wird durch die Verbindungen nicht aufgehoben. Bisher ist die Migrationshemmung die einzige bekannte Wirkung der Diaryltetrahydropyrroloimidazole an der TGF- β -Signalkaskade.

Um Aussagen über den Wirkmechanismus machen zu können, reichen die durchgeführten Versuche nicht aus. Dazu werden in der Arbeitsgruppe Gust weitere Verbindungen mit ähnlicher Struktur (z. B. 2-Imidazoline, Diarylimidazopyridine) im Migrationsexperiment untersucht, wobei neben TGF- β und FCS weitere Migrationsstimulatoren (z. B. Sphingosinmonophosphat, SPP) eingesetzt werden. Außerdem wird untersucht, ob die beobachtete Migrationshemmung nur an Keratinozyten auftritt oder ob auch die Migration anderer Zellen (z. B. MCF-7 Zellen, dendritische Zellen) gehemmt wird. Mit weiteren Testmodellen wird versucht, den Wirkmechanismus genauer aufzuklären. Dadurch sollte u. a. geklärt werden, ob die hier beschriebenen Verbindungen, genauso wie die Verbindungen von Callahan [121] (Kapitel 1.2, Seite 17), am TGF- β -Typ-I-Rezeptor inhibitorisch wirken oder ob andere Faktoren der Signalkaskade (z. B. Phosphorylierung der Smad-Proteine) beeinflusst werden.