

## **1 Einleitung**

### **1.1 Der periphere Benzodiazepinrezeptor: Struktur, Expression und Funktion**

Der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR) wurde erstmals als Bindungsstelle für Diazepam in Rattennieren nachgewiesen (Braestrup and Squires, 1977), was zu seiner Benennung führte. Der PBR unterscheidet sich jedoch sowohl in seiner Struktur als auch pharmakologisch von den zentralen Benzodiazepin-Bindungsstellen, den GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Braestrup and Squires, 1977). Außerdem wird er nicht nur von peripheren Geweben sondern auch im Gehirn exprimiert. Der PBR wurde in nahezu ubiquitär vorhanden, jedoch in recht unterschiedlichen Mengen. In steroidbildenden Geweben wie Ovarien, Hoden, Plazenta oder Nebenniere wird er stark exprimiert (Beurdeley-Thomas et al., 2000; Gavish et al., 1999), während er im Skelettmuskel, im Gastrointestinaltrakt und in großen Teilen des Gehirns nur in kleinen Mengen nachweisbar ist (Verma and Snyder, 1989; Gavish et al., 1992). In Tumoren ist der PBR häufig überexprimiert. Eine erhöhte PBR-Ligandenbindung oder eine gesteigerte mRNA Expression wurde in Karzinomen des Dickdarms, des Gehirns, der Brust, der Ovarien und der Leber gefunden (Katz et al., 1990b; Cornu et al., 1992; Carmel et al., 1999; Hardwick et al., 1999; Batra and Iosif, 1998; Katz et al., 1990a; Venturini et al., 1998). Eine Überexpression des PBR-Proteins wurde allerdings bislang nur bei Astrozytomen (Miettinen et al., 1995), bei Brust- und Prostatakarzinomen (Galiegue et al., 2004; Han et al., 2003) gezeigt. Innerhalb der Zelle ist der PBR meist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Anholt et al., 1986), wurde jedoch auch in der Plasmamembran (Garnier et al., 1993) und in oder um den Zellkern (Hardwick et al., 1999) nachgewiesen.



Cholesterolbindungsstelle und befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite. Der N-Terminus ragt in den Intermembranraum (Culty et al., 1999).

Basierend auf seiner Struktur sowie aufgrund der subzellulären Verteilung des PBR werden dem PBR eine Reihe von Funktionen zugeschrieben. Am besten untersucht ist seine Rolle in der Steroidsynthese. Er ist an dem Transport von Cholesterol in die Mitochondrien beteiligt, wo Cholesterol in Pregnenolon umgewandelt wird. Der Transport stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Steroidsynthese dar (Papadopoulos et al., 1992; Papadopoulos, 1993; Papadopoulos et al., 1997). Des Weiteren wurde eine funktionelle Bedeutung des PBR bei der Immunantwort (Torres et al., 1999), der Insulinsekretion (Marchetti et al., 1996c), der Mitochondrienatmung (Hirsch et al., 1989; Krueger, 1995), der zellulären Differenzierung (Canat et al., 1993) und bei der Zellproliferation (Beurdeley-Thomas et al., 2000) nachgewiesen. Auf Grund seiner Überexpression in verschiedenen Tumoren werden dem PBR Apoptose-protective bzw. proliferationsfördernde Eigenschaften zugeschrieben.

## **1.2 Die Bedeutung des peripheren Benzodiazepinrezeptors beim Tumorwachstum**

Die Überexpression von PBR bei einer Vielzahl von Tumorentitäten lässt eine wichtige Rolle des PBR bei der Tumorgenese und -progression vermuten. So wurde gezeigt, dass die PBR-Expression mit der Malignität von Gliomen korreliert (Miettinen et al., 1995). In Mammakarzinomzelllinien korrelierte die PBR-Expression mit kurzen Generationszeiten, hoher Wachstumsfraktion und einer negativen Östrogenrezeptor-Expression (Beinlich et al., 2000). Außerdem stellt eine hohe PBR Überexpression einen negativen prognostischen Faktor bei Lymphknoten-negativen Brustkrebspatienten dar (Galiegue et al., 2004). Beim Brustkrebs scheint neben der Expression die subzelluläre Verteilung des PBR von Bedeutung zu sein. Es wurde gezeigt, dass die Aggressivität von Brustkrebszellen mit dem Ausmaß einer nukleären Lokalisation des PBR korreliert (Hardwick et al., 1999). Eine

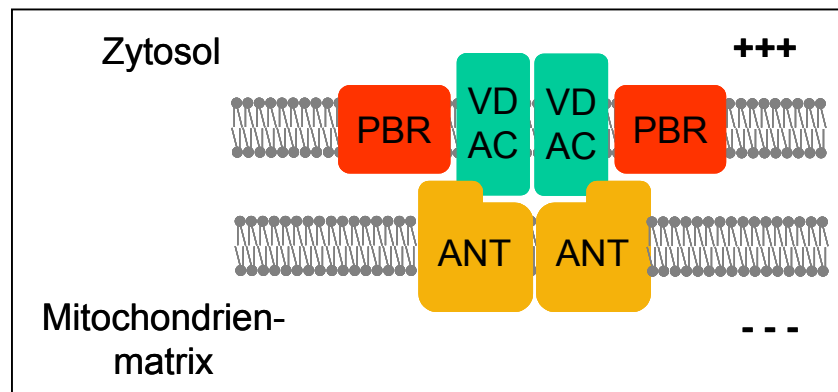
Assoziation der PBR-Expression mit klinischen Parametern von kolorektalen Tumorpatienten wird in dieser Arbeit untersucht.

Die Überexpression von PBR im Tumorgewebe wurde bereits in der Diagnostik und für erste tumorspezifische Therapieansätze genutzt. In der Positronen-Emissionstomografie (PET) wurden mittels radioaktiv markierter PBR-Liganden Gliome lokalisiert (Pappata et al., 1991; Junck et al., 1989; Matarrese et al., 2001). Aus therapeutischer Sicht könnte sich der PBR möglicherweise als Zielprotein für eine tumorzellspezifische Aufnahme bzw. Retention antineoplastischer Substanzen eignen. Dieser Ansatz wurde mit einem Konjugat aus PBR-Ligand und Chemotherapeutikum in einem Gliom-Xenograft-Modell verfolgt (Guo et al., 2001). Außerdem wurde der PBR als Zielprotein bei der photodynamischen Therapie beschrieben (Kessel et al., 2001; Mesenholler and Matthews, 2000; Verma et al., 1998). Eine direkte Wirkung von spezifischen exogenen PBR-Liganden wurde für eine Reihe von Tumorentitäten beschrieben. Antiproliferative Effekte der PBR-Liganden Ro5-4864 und PK 11195 in mikromolaren Konzentrationen sind z.B. bei Brustkrebs (Carmel et al., 1999; Beinlich et al., 1999), Melanomen (Landau et al., 1998), Hodenkrebs (Garnier et al., 1993) und Gehirntumoren (Neary et al., 1995; Pawlikowski et al., 1988) nachgewiesen. In verschiedenen Zelllinien wurde für den PBR-spezifischen Liganden FGIN-1-27 eine potenzierende Wirkung auf die TNF-induzierte Zytotoxizität (Pastorino et al., 1996) und Effekte auf die Steroidsynthese (Deshpande et al., 2001; Snyder and Van Antwerpen, 1998; Korneyev et al., 1993) gezeigt. In dieser Arbeit wird der Einfluss der spezifischen PBR Liganden auf das Wachstum verschiedener gastrointestinaler Tumore untersucht. Es werden sowohl direkte wachstumsinhibitorische Wirkungen der PBR Liganden als auch sensitivierende Effekte gegenüber etablierten Chemotherapeutika dargestellt. Die Mechanismen, wie exogene PBR-Liganden das Tumorzellwachstum beeinflussen, sind bisher erst wenig bekannt. Eine Beteiligung des PBR an der Regulation von Apoptose und Zellzyklus wird diskutiert (siehe 1.3).

### 1.3 Die Bedeutung des peripheren Benzodiazepinrezeptors bei der Regulation von Apoptose und Zellzyklus

Die Bedeutung des Mitochondriums für die Initiation der Apoptose gewinnt immer mehr Beachtung (Marchetti et al., 1996a; Bernardi et al., 1999; Costantini et al., 2000). Der PBR ist meist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Anholt et al., 1986). Dort bildet er mit anderen Proteinen wie dem Porin (= *voltage dependent anion channel*, VDAC) und dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) eine Pore, die sogenannte *permeability transition pore* (Fennell et al., 2001) (Abbildung 2). Dieser Pore wird eine wichtige Rolle bei der Initiation der Apoptose zugeschrieben. Wirken apoptotische Signale wie z.B. zytotoxische Substanzen auf die Zelle, so öffnet sich die Pore, das Mitochondrium schwillt an und lösliche Faktoren wie Cytochrom C und der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) werden freigesetzt (Zorov, 1996). Cytochrom C kann aber auch unabhängig von dem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials freigesetzt werden und Apoptose vermitteln (Bossy-Wetzel et al., 1998). Im Zytosol aktivieren Cytochrom C und AIF Caspasen, die ihrerseits Enzyme wie Endonukleasen aktivieren, die die Apoptose-assoziierten morphologischen Veränderungen der Zelle bewirken. Eine Beteiligung von PBR an der Apoptoseregulation wurde bereits gezeigt, wobei die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind. Dem PBR-Protein selbst wird eine Apoptose-protective Funktion zugeschrieben. Die PBR-Transfektion in Jurkat-Zellen führt zu einem Schutz vor UV-induzierter Apoptose (Stoebner et al., 2001). Diese protective Wirkung des PBR kann durch PBR-spezifische exogene Liganden antagonisiert werden. So wurde bereits gezeigt, dass spezifische PBR-Liganden die Induktion von Apoptose durch verschiedene antineoplastische Wirkstoffe wie Etoposid, Doxorubicin, Arsenit oder Londamin erleichtern, indem sie die zytoprotektive Wirkung von Bcl-2 entgegen wirken (Hirsch et al., 1998; Larochette et al., 1999; Ravagnan et al., 1999). Darüber hinaus wurde eine direkte Apoptose-induzierende Wirkung der PBR-spezifischen Liganden gezeigt

(Marchetti et al., 1996b; Tanimoto et al., 1999).(Fischer et al., 2001; Larochette et al., 1999; Ravagnan et al., 1999) Proteine der Bcl-2 Familie können durch Bindung an die *permeability transition pore* das mitochondriale Membranpotential und die Freisetzung von Cytochrom C während der Apoptose regulieren (Shimizu et al., 1999). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Bcl-2 Proteinen und PBR wird daher diskutiert.



**Abbildung 2: Assoziation des PBR mit der *permeability transition pore***

Der PBR ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und dort mit dem Porin (VDAC, *voltage-dependent anion channel*) und dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) assoziiert. Diese Proteine sind Bestandteil der *permeability transition pore*, die eine wichtige Rolle bei der mitochondrienabhängigen Apoptose spielt. Die genaue stöchiometrische Zusammensetzung der Pore ist bisher noch nicht bekannt.

Neben einer gestörten Apoptoseregulation ist die unkontrollierte Zellteilung ein Charakteristikum von Tumorzellen. Spezifische PBR-Liganden können nicht nur Apoptose auslösen, darüber hinaus wurde eine Zellzyklus-arretierende Wirkung gezeigt. In Mammakarzinomzellen bewirken PBR-Liganden einen Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase und der G2/M-Phase (Carmel et al., 1999; Landau et al., 1998). Das Benzazepin BBL22, ebenfalls ein PBR-spezifischer Ligand, arretiert hämatopoetische und epitheliale Tumorzelllinien in der G2/M-Phase (Xia et al., 2000). In dieser Arbeit wird die funktionelle Bedeutung des PBR bei der Regulation von Apoptose und Zellteilung bei gastrointestinalen Tumoren untersucht.

#### 1.4 Endogene und exogene Liganden des PBR

Der wichtigste endogene Ligand des PBR ist Cholesterol, welches mit hoher Affinität an PBR bindet und so zur Steroidsynthese oder zum Membranaufbau ins Mitochondrium transportiert wird. Ein weiterer Ligand des PBR ist der Diazepam Binding Inhibitor (DBI). Dieses 11 kD große Peptid verhindert die Bindung von Diazepam sowohl an den PBR als auch an zentrale Benzodiazepinbindungsstellen. Seine Affinität ist jedoch wesentlich geringer als die von Cholesterol und liegt im mikromolaren Bereich (Guidotti et al., 1983). Ähnlich wie der PBR selbst wird DBI in hohem Maße in steroidbildenden Geweben exprimiert sowie im Gehirn. Elektrophysiologische und pharmakologische Studien ergaben, dass DBI die inhibitorische Wirkung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure unterdrückt und somit als inverser Agonist für Benzodiazepinrezeptoren gilt (Guidotti et al., 1978). In peripheren Geweben stimuliert DBI die Pregnenolonsynthese (Papadopoulos et al., 1992). Als weitere endogene PBR Liganden sind Porphyrine identifiziert. Vorstufen des Hämoglobins wie Protoporphyrin IX, Mesoporphyrin IX, Deuteroporphyrin IX und Hemin binden mit hoher Affinität an den PBR (Beurdeley-Thomas et al., 2000), was die Bedeutung des PBR in der Häm biosynthese unterstreicht.

Zur pharmakologischen Charakterisierung des PBR werden exogene Liganden verwendet. So binden nicht nur Benzodiazepine, sondern auch Moleküle anderer Stoffklassen an PBR. Die synthetischen Liganden PK 11195, ein Isoquinolincarboxamid, FGIN-1-27, ein Indolacetamid und das Benzodiazepin Ro5-4864 weisen eine hohe Affinität zum PBR auf, können jedoch an zentrale Benzodiazepin-Bindungsstellen kaum binden (Le Fur et al., 1983; Kozikowski et al., 1993). Im Gegensatz dazu bindet Clonazepam nur an zentrale Bindungsstellen (Wang et al., 1984). Für die PBR-spezifischen Liganden wurde gezeigt, dass sie in verschiedenen Tumorentitäten antiproliferative Wirkung erzielen. In dieser Arbeit werden die Wirkungen spezifischer PBR Liganden auf verschiedene

gastrointestinale Tumore untersucht sowie die zugrunde liegenden Mechanismen der proapoptischen und antiproliferativen Effekte von PBR-Liganden erforscht.

## 1.5 Gastrointestinale Tumore

### 1.5.1 Kolorektale Karzinome

Dickdarmkrebs ist in der westlichen Welt die häufigste Krebserkrankung bei Nichtrauchern (Neuhaus, 1998). Allein in Deutschland werden ca. 55.000 Neuerkrankungen und 30.000 Todesfälle pro Jahr registriert (Schmoll, 1997). Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit kolorektalen Karzinom ist stadienabhängig sehr unterschiedlich. Während die Überlebensrate von Patienten in frühen Erkrankungsstadien (UICC I – II) nach der operativen Entfernung des Tumors 83 – 93 % beträgt, liegt die Überlebensrate von Patienten mit lokalen Lymphknotenmetastasen (UICC III) bei 44 - 83 % (O'Connell et al., 2004). Wegen der unterschiedlichen Überlebensraten wird das Stadium III seit 2004 in 3 Untergruppen (IIIa – IIIc) aufgeteilt (O'Connell et al., 2004). Kolorektale Karzinompatienten mit rezidivierenden oder metastasierenden Tumoren weisen nur noch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 8 % auf. Die Karzinogenese kolorektaler Tumore ist ein gut untersuchter Prozess, bei dem eine typische Abfolge genetischer Alterationen mit morphologischen Veränderungen auftritt. Es wurde eine sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz definiert (Kinzler and Vogelstein, 1996; Hanski et al., 2000). Des weiteren ist seit langem bekannt, dass Patienten mit langjähriger (Pan)Colitis ulzerosa ein erhöhtes Risiko haben, Dysplasien und Adenokarzinome des Dickdarms zu entwickeln (Harpaz and Talbot, 1996). Das zeitlich regulierte Auftreten bestimmter prognostischer Markerproteine innerhalb dieser Sequenz legt nahe, dass diese



Proteine möglicherweise eine funktionelle Rolle für die Karzinogenese und Tumorprogression spielen.

### 1.5.2 Ösophaguskarzinome

Beim Ösophaguskarzinom existieren zwei histologische Typen: Das Plattenepithel- und das Adenokarzinom. In Deutschland sind etwa 80 % der Ösophaguskarzinome plattenepithelialen Ursprungs, etwa 10 – 15 % entstehen auf der Grundlage von zylindrischem Barrett-Epithel (Adenokarzinome). Das Adenokarzinom ist eine der am schnellsten zunehmenden Tumorentitäten in der westlichen Welt (Blot and McLaughlin, 1999), während die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms weitgehend konstant geblieben ist. Die meisten Ösophaguskarzinome werden aufgrund fehlender Frühsymptomatik erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (75% im UICC Stadium III und IV, (Bareiss et al., 2002). Da sich die Prognose vor allem nach dem Tumorstadium bei Beginn der Therapie richtet (Adachi et al., 1996; Li and Yao, 1997), ist die 5-Jahres-Überlebensrate aller diagnostizierten Fälle mit insgesamt < 10 % ungünstig.

Neuere tumorbiologische Untersuchungen zeigen, dass die maligne Transformation beim Adenokarzinom des Ösophagus, ähnlich wie beim Kolonkarzinom, mehrstufig erfolgt. Patienten mit chronischer Refluxkrankheit entwickeln häufig einen sogenannten Barrett-Ösophagus, bei dem sich das normale Plattenepithel des distalen Ösophagus in eine intestinale Metaplasie mit spezialisiertem Zylinderepithel umgewandelt hat. Aus der Metaplasie kann sich über die weiteren Schritte der gering- und hochgradigen Dysplasie ein Adenokarzinom der distalen Speiseröhre entwickeln (Shaheen and Ransohoff, 2002). Die Mechanismen, die zur malignen Transformation und Tumorprogression des Plattenepithelkarzinoms führen, sind bisher weniger verstanden. Chronische Irritation der Ösophagusschleimhaut durch chronischen Alkoholabusus, insbesondere mit

Nikotinabusus, stellen mit 90% den Hauptrisikofaktor für das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre dar (Brown et al., 2001).

### 1.5.3 Hepatozelluläre Karzinome

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt mit rund einer halben Million Sterbefälle pro Jahr die fünft häufigste Tumorerkrankung dar. Die Inzidenz nimmt in den U.S.A, Europa und Asien stark zu, was auf die zunehmende Prävalenz von Hepatitis B und C zurückgeführt wird (El Serag et al., 2003; McGlynn et al., 2001). HCC entwickelt sich in der Regel auf dem Boden einer langjährigen chronischen Inflammation des Leberparenchyms. Die sich daraus ergebende hepatische Funktionseinschränkung trägt neben der Ausdehnung und der Anzahl der Tumorherde wesentlich zur Limitation der therapeutischen Möglichkeiten bei. Für Patienten mit frühem HCC und geringer hepatischer Dekompensation stehen als Therapieoptionen Transplantation und chirurgische Resektion zur Verfügung (Befeler et al., 2005). Eine chirurgische Behandlung ist jedoch wegen Multizentrität und schlechter Leberfunktion nur bei ca. 20 % der HCC Patienten möglich (Johnson, 2002). Die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten beträgt 20 – 51 % (overall survival) bzw. 20 – 33 % (disease-free survival) (Jaeck et al., 2004). Bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium und fortgeschrittener Zirrhose werden zunehmend lokalablativ Therapieverfahren eingesetzt (Hilgard and Gerken, 2005), des weiteren stehen als primär palliative Behandlungsansätze Chemoembolisation oder systemische Chemotherapie zur Verfügung.