

4.3 Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Wirkmechanismen und Signaltransduktionswege der synthetischen PBR Liganden untersucht. Mittels cDNA Arrays wurde die differentielle Genexpression nach PBR Liganden Behandlung detektiert. Eine Modulation der Genexpression wurde durch semi-quantitative RT-PCR oder auf Proteinebene durch Western Blot Analyse gesichert. Für alle untersuchten Moleküle konnten die Genexpressionsanalysen mit einer der anderen Methoden bestätigt werden. Dies zeigt, dass die differentielle Genexpressionsanalyse mittels der cDNA Array Technologie eine geeignete Methode zur Bestimmung der molekularen Wirkmechanismen und Signalwege darstellt.

Zelluläre Prozesse werden jedoch nicht nur durch Expressionsmodulation reguliert. Häufig erfolgt die Signalweiterleitung durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung oder Stabilisation und Abbau der Signalmoleküle. Deshalb wurden in dieser Arbeit der Phosphorylierungsstatus und Proteinmenge bestimmter Signalmoleküle mittels Western Blot Analyse detektiert. Spezifische Inhibitoren und *knock-out* Zelllinien wurden eingesetzt, um die funktionelle Relevanz der involvierten Signalmoleküle zu bestimmen.

Die Signalwege, die zur PBR Liganden induzierten Apoptose und Zellzyklusarrest führen, sind in Abbildung 3 dargestellt. Die PBR Liganden-induzierte Apoptose wird durch Mitochondrien vermittelt. Dieses wird durch die Bcl-2, Bcl-X_L und Bax reguliert. Dabei sind die genauen Mechanismen Liganden-abhängig. Während die FGIN-1-27-induzierte Apoptose abhängig von einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials ist, verändert sich das mitochondriale Membranpotential bei Behandlung mit PK 11195 in kolorektalen und ösophagealen Karzinomzellen nicht. Apoptose wird dort vielmehr durch eine Induktion von ROS sowie eine Translokation und Dimerisierung von Bax in der mitochondrialen Membran vermittelt. Nachfolgend werden die Effektor-Caspase-9 und -3

aktiviert, was direkt oder indirekt über eine Aktivierung der p38MAPKinase und nachfolgender Induktion der gadd153 und 45 zur Apoptose führt.

Beim PBR Liganden induzierten Zellzyklusarrest sind drei (interagierende) Signalwege beteiligt. Der erste führt über eine Aktivierung der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} zu einer Verminderung von Cyclin D1 und nachfolgendem Arrest. Der zweite Weg beinhaltet die Induktion der gadd153 und 45. Außerdem könnte die Induktion des cdc16 eine Rolle spielen. Cdc16 ist als ein Kernprotein für die maximale Aktivität des *anaphase-promoting complex* (APC) verantwortlich. Dieser Komplex schützt die Zelle vor einem frühzeitigen Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus indem er Cycline wie das Cyclin B degradiert.

Die *up-stream* Regulatoren dieser Signalwege sind Gegenstand der derzeitigen Forschung.

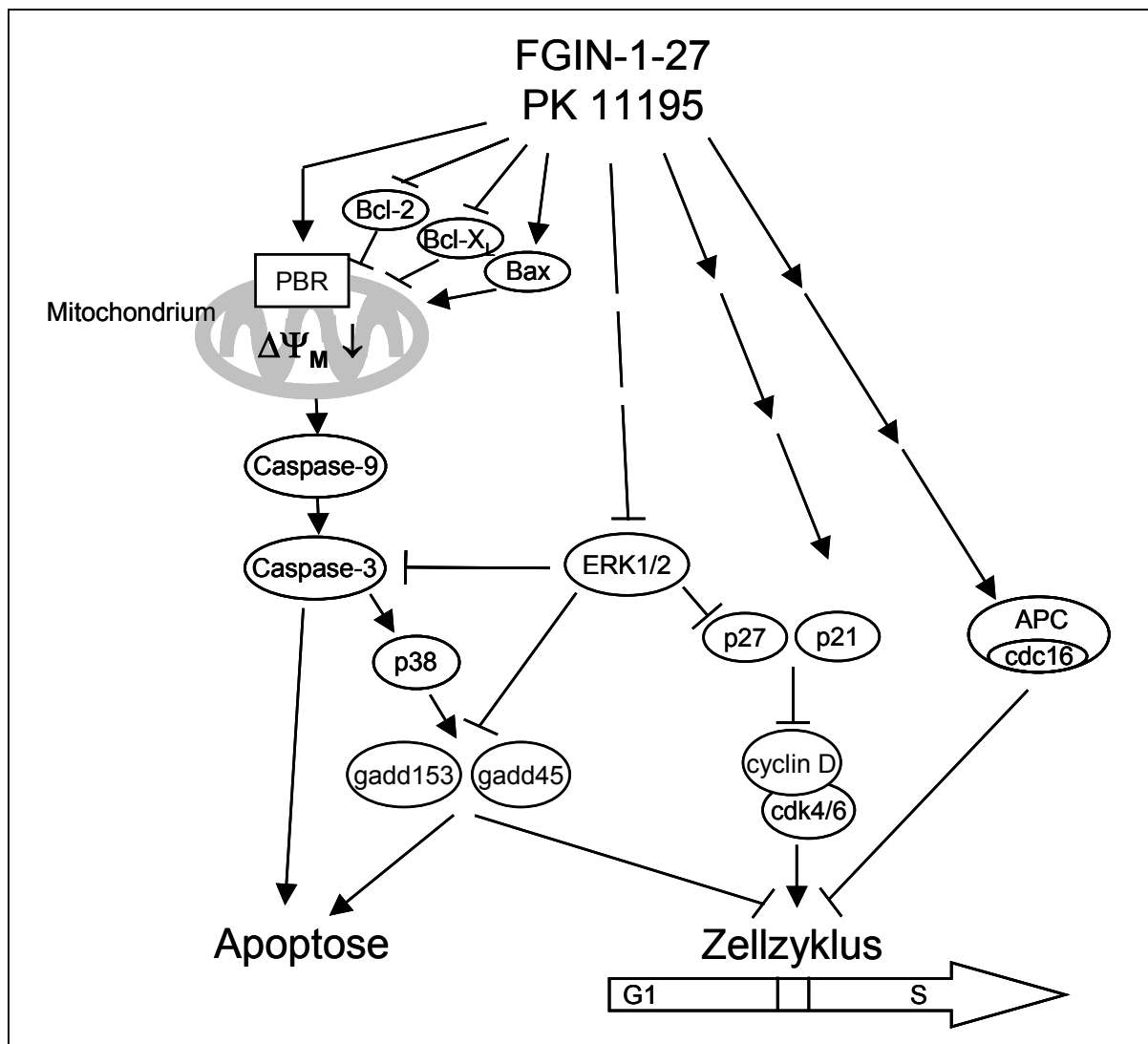


Abbildung 3: Signalwege der PBR Liganden induzierten Apoptose und des Zellzyklusarrests.

————> Aktivierung / Stimulation ————| Inaktivierung / Inhibition

Die zellulären Prozesse wie die Abnahme des mitochondriale Apoptose, die Aktivierung der Caspasen-9 und -3, die Induktion der *gadd's* und die Verminderung der Cycline wurden in allen untersuchten Tumorentitäten (Kolonrektum, Ösophagus, Leber) beobachtet. Dies lässt auf eine universelle PBR Liganden induzierte Signaltransduktion schließen. Ausnahme bildete die Modulation von ERK1/2. In kolorektalen Zellen führten PBR Liaganden wie in Abbildung 3 dargestellt zu einer Inaktivierung von ERK1/2, während ERK1/2 in Ösophaguszellen transient aktiviert wurde.

Die PBR Spezifität der exogenen PBR Liganden wurde mittels Strukturanaloga, die keine Affinität zu PBR aufwiesen, gezeigt. Diese Strukturanaloga zeigten keinen Einfluss auf die Regulation von Apoptose oder Zellzyklus. Trotzdem wird die Spezifität der PBR Liganden kontrovers diskutiert, da die Konzentrationen, die zur Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest notwendig sind, im mikromolaren Konzentrationsbereich liegen und somit die nanomolaren Bindungsaffinitäten weit übersteigen. verschiedene Faktoren wie die Metabolisierung der Liganden, Konkurrenz mit endogenen Liganden oder Absorption der Liganden durch das Nährmedium könnten für diese Konzentrationsdifferenz verantwortlich sein.