

**Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der
antikarzinogenen Wirkung nicht-steroidaler Antiphlogistika in
humanen Kolonkarzinomzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Thorsten Jürgen Maier
aus Frankfurt a.M.

Frankfurt am Main 2005

DF1

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger
Dr. Gerhard Fürstenberger

Datum der Disputation: 14.12.2005

III

*„Große Entdeckungen sind das Resultat der Befreiung
von der Routine des Denkens und Tuns“*

- nach Arthur Koestler -

meinen Eltern

1	Einleitung	1
1.1	Der Prostaglandinstoffwechsel als Angriffspunkt nicht-steroidaler Antiphlogistika	1
1.1.1	Prostaglandine: lokale Regulatoren physiologischer und pathophysiologischer Prozesse	1
1.1.2	Syntheseweg der Prostaglandine	1
1.1.3	Die Entwicklung COX-2-selektiver NSAIDs	4
1.1.4	Entdeckung der antikarzinogenen Wirkung von nicht-steroidalen Antiphlogistika	7
1.2	Dysregulation des Zellzyklus und des programmierten Zelltodes (Apoptose) als Ursache für die Entstehung des Kolonkarzinoms	9
1.2.1	Auftreten und Ursachen von Kolonkarzinomerkrankungen	9
1.2.2	Regulation von Zellwachstum und -teilung durch den Zellzyklus	9
1.2.3	Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose)	12
1.2.4	Entstehung von Kolonkarzinomen	15
1.3	Antineoplastische Effekte von NSAIDs durch Hemmung der Cyclooxygenase-2	18
1.3.1	Reduktion der antiapoptotischen und proliferationsfördernden Wirkung von PGE ₂ im Tumorgewebe durch NSAID-vermittelte Hemmung der COX	18
1.3.2	Antineoplastische Effekte von NSAIDs durch Hemmung der Angiogenese	18
1.3.3	Antikarzinogene Effekte durch Erhöhung der intrazellulären Ceramidkonzentration	19
1.4	Die Rolle COX-2-unabhängiger antikarzinogener Mechanismen von NSAIDs	20
1.4.1	Hinweise auf COX-2-unabhängige antikarzinogene Mechanismen von NSAIDs	20
1.4.2	Direkte, COX-2-unabhängige zelluläre Angriffspunkte von NSAIDs	21
1.4.3	Hemmung von cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen	21
1.4.4	Der NFκB-Signaltransduktionsweg als Angriffspunkt von NSAIDs	22
1.4.5	Beinflussung des PPAR-Signaltransduktionsweges durch NSAIDs	22
1.4.6	Weitere, direkte zelluläre Targets von NSAIDs	23
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Chemikalien	26
2.2	COX-2-selektive Inhibitoren	28
2.3	Eingesetzte Celecoxibkonzentrationen für die Zellkulturexperimente	28

2.4 Zelllinien	29
2.5 Bestimmung der freien Coxibkonzentration in Medium mit 10% FCS	29
2.6 Bestimmung der intrazellulären Coxibkonzentration in humanen Kolonkarzinom-Zellen	29
2.7 Stabile Transfektion von Caco-2-Zellen mit humaner COX-2-cDNA	31
2.8 Messung von Prostaglandin E₂ Konzentrationen im Medium mittels PGE₂-EIA (enzyme-linked immunoassay)	31
2.8.1 Messung von Prostaglandin E ₂ Konzentrationen im Medium der Caco-2-Klone	31
2.8.2 Messung von Prostaglandin E ₂ Konzentrationen im Medium von HCA-7-Zellen	31
2.9 RNA-Analytik	32
2.9.1 Prinzip der RNA-Extraktion	32
2.9.2 RNA-Extraktion aus humanen Kolonkarzinom-Zellen	32
2.9.3 Prinzip der Taqman [®] -RT-PCR	33
2.9.4 Durchführung der RT-PCR	33
2.9.5 Berechnung der relativen mRNA-Menge	35
2.10 Colony-forming-assay	36
2.11 WST-Proliferationstest	36
2.11.1 Prinzip des WST-Proliferationstests	36
2.11.2 Durchführung des WST-Proliferationstests	36
2.12 Darstellung der Induktion von Apoptose und Zellzyklusblockade mittels Durchflusszytometrie	37
2.12.1 Durchflusszytometrische Messung mit vorherigem Hungern der Zellen	37
2.12.2 Durchflusszytometrische Messung ohne vorherigem Hungern der Zellen	37
2.13 Proteinanalytik	38
2.13.1 Herstellung von löslichen Gesamtproteinextrakten und Membranextrakten	38
2.13.2 Herstellung von Kernextrakten	38
2.13.3 Herstellung von Zytosolextrakten	39
2.13.4 Messung der Proteinkonzentration	40
2.13.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
2.13.6 Western Blot der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran	42

2.13.7	Antikörper-Inkubation der Nitrozellulosemembran _____	42
2.13.8	Detektion der Peroxidase- und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper _____	43
2.14	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) _____	44
2.14.1	Messprinzip _____	44
2.14.2	Annealing der Oligonukleotide _____	44
2.14.3	Herstellung der radioaktiv-markierten Oligonukleotide _____	44
2.14.4	Auftrennung der Oligonukleotid-Protein-Komplexe mittels Gelelektrophorese _____	45
2.15	Immunzytochemie _____	47
2.16	Statistik _____	47
3	Ergebnisse _____	48
3.1	Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib in COX-2-transfizierten Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen _____	48
3.1.1	Ziel der durchgeführten Experimente _____	48
3.1.2	Expression und Aktivität der COX-2 in den transfizierten Caco-2-Zellen _____	48
3.1.3	Die Caco-2 Klone zeigen eine unterschiedliche Wachstumshemmung nach Behandlung mit Celecoxib _____	50
3.1.4	Die Apoptoserate in Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib ist abhängig von ihrem COX-2-Expressionsstatus _____	51
3.1.5	Die Induktion einer Zellzyklusblockade in den COX-2-transfizierten Caco-2-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib erfolgt COX-2-unabhängig _____	55
3.2	Der Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg als COX-2-unabhängiger Angriffspunkt von Celecoxib in humanen Kolonkarzinom-Zellen _____	57
3.2.1	Ziel der durchgeführten Experimente _____	57
3.2.2	Die Behandlung humaner Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen mit Celecoxib beeinflusst die Expression der Proteine Beta-Catenin und E-Cadherin _____	57
3.2.3	Die Behandlung von Caco-2-Zellen mit Celecoxib verursacht eine rapide Translokation von Beta-Catenin in den Zellkern _____	60
3.2.4	Die Behandlung der Caco-2-Zellen mit Celecoxib vermindert die Beta-Catenin/TCF/Lef- DNA-Bindungsaktivität _____	61
3.2.5	Der Anstieg der Beta-Catenin-Spiegel in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Behandlung von Caco-2-Zellen mit Celecoxib entsteht nicht durch Neusynthese ____	63

3.2.6	Die Behandlung mit Celecoxib beeinflusst die zelluläre Verteilung von Beta-Catenin in Caco-2-Zellen	64
3.2.7	Die durch Celecoxib verursachte Degradierung von Beta-Catenin erfolgt durch proteasomalen Abbau und durch Caspasen	66
3.2.8	Die Behandlung von Caco-2-Zellen mit Rofecoxib oder R-Flurbiprofen hat keinen Einfluss auf die Expression von Beta-Catenin	71
3.3	Vergleichende Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung COX-2-selektiver NSAIDs in COX-2-überexprimierenden und COX-2-defizienten Kolonkarzinom-Zellen	73
3.3.1	Ziel der durchgeführten Experimente	73
3.3.2	Expression und Aktivität der COX-2 in humanen HCT-116- und HCA-7-Kolonkarzinom-Zellen	73
3.3.3	Celecoxib und Methylcelecoxib verursachen im Proliferationstest deutlich stärkere wachstumshemmende Effekte in HCT-116- und HCA-7-Zellen als die anderen Coxibe	74
3.3.4	Die verschiedenen Coxibe lösen in unterschiedlichem Ausmaß eine Zellzyklusblockade und die Induktion von Apoptose in HCT-116- und HCA-7-Zellen aus	76
3.3.5	Darstellung der Induktion von Apoptose und Zellzyklusblockade mittels Western Blot-Analyse	78
3.3.5.1	Übersicht über die durchgeführten Experimente	78
3.3.5.2	Celecoxib, Methylcelecoxib und Valdecoxib beeinflussen unterschiedlich stark die Expression der Zellzyklus-Regulatorproteine Cyclin D1 und p27 in HCT-116- und HCA-7-Zellen	79
3.3.5.3	Celecoxib und Methylcelecoxib, nicht jedoch die anderen Coxibe, verursachen eine PARP-Spaltung in HCT-116 und HCA-7-Zellen	80
3.3.6	Der prozentuale Anteil an freiem Wirkstoff in Medium mit 10% FCS (fetal calf serum) ist bei den Coxiben unterschiedlich	82
3.3.7	Die intrazellulären Konzentrationen von Celecoxib und Methylcelecoxib in HCT-116- und HCA-7-Kolonkarzinom-Zellen sind deutlich höher als die freien Wirkstoffkonzentrationen in Medium mit 10% FCS	84
3.3.8	Untersuchung zur Aufnahme von Celecoxib in HCT-116-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Inkubationstemperatur	85
3.3.9	Die Bindung von Celecoxib an Mediumproteine hemmt dessen Aufnahme in HCT-116-Kolonkarzinom-Zellen	87
3.3.10	Kontrollexperimente zur Validierung der Methode zur Bestimmung intrazellulärer Coxibkonzentrationen	88

4	Diskussion	89
4.1	Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib in COX-2-transfizierten Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen	89
4.2	Der Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg als COX-2-unabhängiger Angriffspunkt von Celecoxib in humanen Kolonkarzinom-Zellen	93
4.3	Vergleichende Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung von selektiven COX-2-Inhibitoren in COX-2-überexprimierenden und COX-2-defizienten Kolonkarzinom-Zellen	99
5	Zusammenfassung	104
6	Abkürzungen	106
7	Literatur	108
8	Anhang	118
8.1	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit	118
8.2	Sonstige Veröffentlichungen	118
8.3	Förderung und Danksagung	119
8.3	Lebenslauf	120

1 Einleitung

1.1 Der Prostaglandinstoffwechsel als Angriffspunkt nicht-steroidaler Antiphlogistika

1.1.1 Prostaglandine: lokale Regulatoren physiologischer und pathophysiologischer Prozesse

Prostaglandine haben durch ihre Beteiligung an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in den letzten Jahrzehnten stetig an Bedeutung gewonnen. Der Name „Prostaglandine“ bezeichnet eine Gruppe von lokal wirkenden Gewebshormonen, die sich aus mehrfach ungesättigten C₂₀-Fettsäuren, überwiegend aus Arachidonsäure, ableiten. Neben Prostaglandinen werden auch das Thromboxan A₂, das Prostacyclin und Leukotriene aus diesen Vorstufen gebildet und zur Gruppe der Eicosanoide zusammengefasst. Prostaglandine sind nahezu in jedem Organsystem wichtige Regulatoren physiologischer Funktionen, beispielsweise bei der Immunantwort, der Fortpflanzung, der Gefäßtonusregulation und Angiogenese, von Nervenwachstum und Organentwicklung. Jedoch spielen Prostaglandine auch eine wichtige Rolle bei pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. bei Entzündungs- und Schmerzreaktionen sowie Tumorwachstum, wodurch der medikamentöse Angriff am Prostaglandin-Syntheseweg eine wichtige therapeutische Bedeutung erlangt hat.

1.1.2 Syntheseweg der Prostaglandine

Der erste Schritt in der Synthese von Prostaglandinen ist die Freisetzung von Eicosatetraensäure (Arachidonsäure) oder Eicosapentaensäure aus Membran-Glycerophospholipiden durch Phospholipasen, überwiegend Phospholipase A₂ (siehe Abbildung 1.1). Die Aktivität der Phospholipasen wird durch zahlreiche extrazelluläre Stimuli reguliert. Hierzu gehören u.a. Histamin, Bradykinin, Angiotensin, verschiedene Zytokine, z.B. Interleukine, Interferone und TNF α (tumor necrosis factor α) sowie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Diese Signalmediatoren binden an extrazelluläre Rezeptoren und aktivieren so Signalkaskaden, die letztendlich zur Aktivierung der Phospholipasen führen (Diaz and Arm, 2003).

Die freigesetzte Arachidonsäure wird nun durch das Enzym Cyclooxygenase (COX) an den zentralen fünf Kohlenstoffatomen oxidativ zyklisiert, wodurch das Intermediärprodukt Prostaglandin G₂ (PGG₂) entsteht. Die COX ist bifunktional und katalysiert mit ihrer Peroxidasefunktion auch die nachfolgende Reaktion zum ebenfalls instabilen Prostaglandin H₂ (PGH₂). PGH₂ wird durch verschiedene COX-assoziierte Prostaglandin-Synthasen zu den biologisch aktiven Prostaglandinen umgesetzt (Warner and Mitchell, 2004).

Seit 1990 wird im menschlichen Organismus zwischen zwei Isoformen der Cyclooxygenase, der COX-1 und COX-2, unterschieden (Fu et al., 1990). Beide Proteine sind in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, besitzen ein ähnliches Molekulargewicht von ca. 70 kDa und katalysieren mechanistisch die selbe Reaktion zur Bildung von PGH₂ aus Arachidonsäure.

Ein Unterschied zwischen beiden Isoformen besteht in ihrer zellulären Expressionsregulation. Während die Cyclooxygenase-1 in fast allen Geweben konstitutiv exprimiert wird und an der physiologischen Aufrechterhaltung der Körperhomöostase maßgeblich beteiligt ist, wird die Expression der Cyclooxygenase-2 vor allem bei Entzündungen und Schmerzen durch verschiedene Faktoren (IL-1, Hypoxie, TGF- β , TNF α) hochreguliert (Fosslien, 2000). Die Promotorregion des COX-2-Gens enthält dazu Bindungsstellen für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, darunter NF κ B (nuclear factor κ B) und CREB (cAMP response element binding protein), die eine schnelle Hochregulation der COX-2-Expression innerhalb von wenigen Stunden ermöglichen („immediate early gene“) (Appleby et al., 1994). Der COX-2 wurde daher zunächst ausschließlich pathophysiologische Bedeutung zugeschrieben (Seibert and Masferrer, 1994). Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass die COX-2 in verschiedenen Geweben auch konstitutiv exprimiert wird, wie z.B. in den Hinterwurzelganglien und der grauen Substanz des Rückenmarks sowie der Macula densa der Niere (Goppelt-Strube and Beiche, 1997; Warner and Mitchell, 2004). Interessanterweise wurden unter der Einnahme von selektiven Inhibitoren der COX-2 (siehe Kapitel 1.1.3) renale Dysfunktionen, u.a. gesteigerte Wasser- und Natriumretention (Rossat et al., 1999) und damit Ödembildungen und Blutdruckanstieg (Whelton, 2002; Whelton et al., 2002) beschrieben. Diese Beobachtungen deuten auf eine mögliche physiologische Rolle der COX-2 bei der renalen Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes hin.

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden COX-Isoformen besteht in der Struktur der Substratbindungsstelle. Beide Cyclooxygenasedomänen besitzen einen großen Substratbindungskanal, in den die Arachidonsäure sterisch optimal hineinpasst. Der Austausch der Aminosäure Isoleucin gegen Valin im Substratbindungskanal der COX-2 führt zur Bildung einer hydrophoben Seitentasche, die eine flexiblere Substratbindung und höhere Affinität der COX-2 zu Arachidonsäure im Vergleich zur COX-1 ermöglicht (Kurumbail et al., 1996).

Nach der Bildung von PGH₂ ist die Synthese der verschiedenen Prostaglandine im Wesentlichen von der Anwesenheit der nachgeschalteten PG-Synthasen abhängig. Je nach Erfordernis variiert die Expression der verschiedenen PG-Synthasen dabei stark in den verschiedenen Geweben und Organen. Neben der konstitutiv exprimierten und an die COX-1 gekoppelten zytoplasmatischen PGE-Synthase (cPGES) konnten zwei weitere induzierbare, Membran-assoziierte PGE-Synthasen (mPGES-1 und -2) identifiziert werden, die überwiegend COX-2-gekoppelt vorliegen und möglicherweise, wie auch die COX-2, an pathophysiologischen Prozessen, wie Schmerzen und Tumorwachstum, beteiligt sind (Kudo and Murakami, 1999; Murakami et al., 2003; Nakashima et al., 2003).

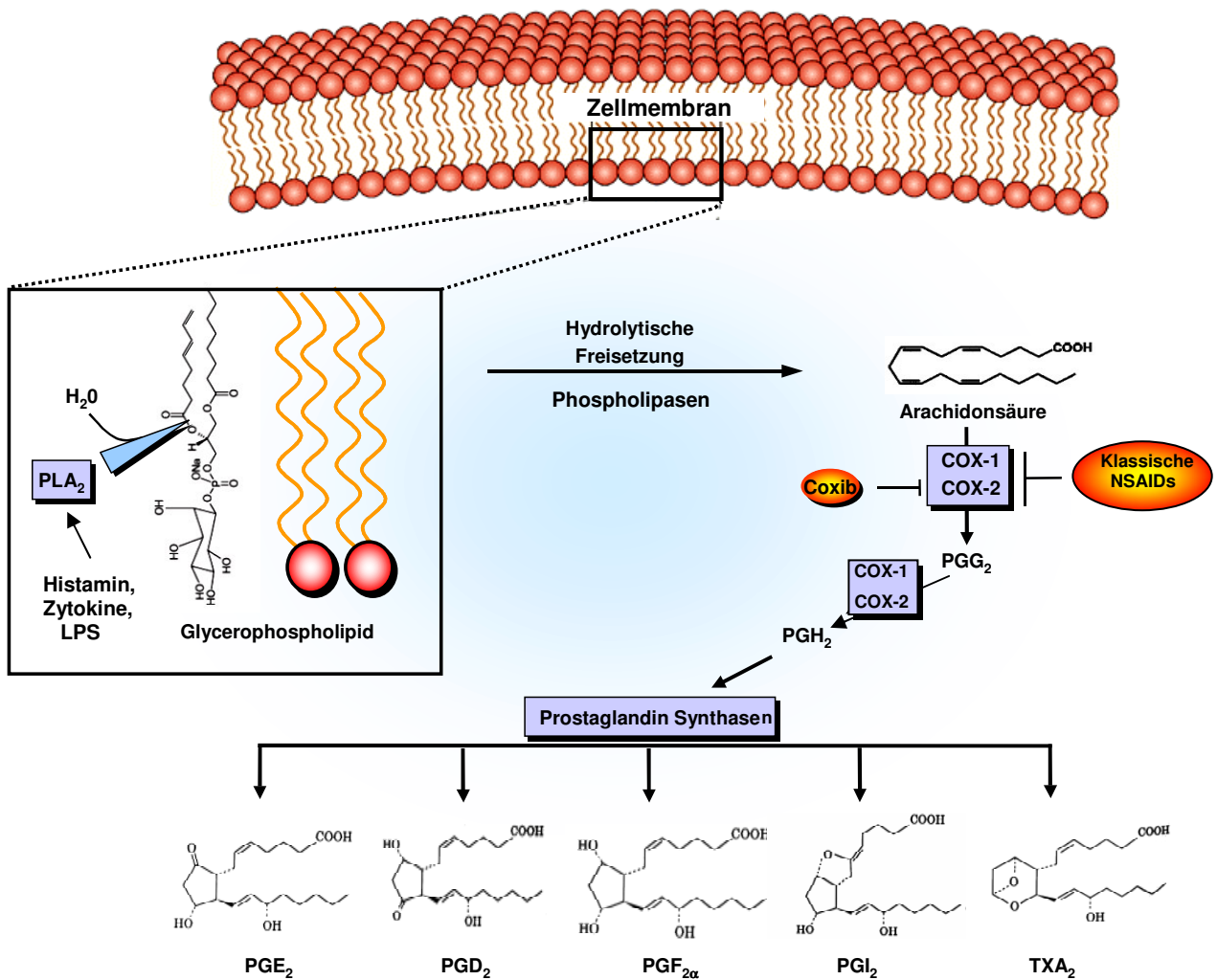


Abbildung 1.1: Syntheseweg von Prostaglandinen: Durch die Aktivität der Phospholipase wird Arachidonsäure aus Phospholipiden zellulärer Membranen freigesetzt. Die Cyclooxygenase-1 und -2 konvertieren Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂, das anschließend durch gekoppelte Synthasen zu den verschiedenen Prostaglandinen umgesetzt wird. Klassische nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) hemmen beide COX-Isoformen, während NSAIDs vom „Coxib“-Typ spezifisch die Cyclooxygenase-2 inhibieren. Für weitergehende Beschreibung siehe auch Kapitel 1.1.3. Abkürzungen: COX, Cyclooxygenase; LPS, Lipopolysaccharide; NSAIDs, nicht-steroidale Antiphlogistika; PG, Prostaglandin; PLA₂, Phospholipase A₂. Abbildung nach Gupta, R.A. & Dubois, R.N. (2001). *Nat Rev Cancer*, 1, 11-21.

Die Effekte der synthetisierten Prostaglandine werden überwiegend durch extrazelluläre, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder, wie im Falle des Prostaglandin J₂, durch intrazelluläre Rezeptoren vermittelt. Dabei wirken Prostaglandine entweder autokrin direkt auf die Zelle, in der sie synthetisiert wurden oder parakrin auf Zellen in direkter Nachbarschaft zur synthetisierenden Zelle. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Prostaglandin-Rezeptoren, deren Liganden und Rezeptor-vermittelte Effekte.

Rezeptor	Signalweg	Liganden	Beispiele für ausgelöste Effekte
DP	cAMP↑ Ca ²⁺ ↑	PGD ₂	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Erschlaffung der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes und Uterus, Stimulation der Ausschüttung von Zytokinen.
CRTH2	cAMP ↓ Ca ²⁺ ↑	PGD ₂	Stimulation der Chemotaxis von T-Helfer-Zellen und eosinophilen Granulozyten, Bronchokonstriktion.
EP ₁	IP ₃ ↑ Ca ²⁺ ↑	PGE, PGF	Kontraktion der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes und der Bronchien, Schmerzweiterleitung.
EP ₂	cAMP↑	PGE	Erschlaffung der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts, der Bronchien und Blutgefäße, Erhöhung der Zellproliferation.
EP ₃	cAMP↓ IP ₃ ↑	PGE	Hemmung der Säuresekretion des Magens, verstärkte Uteruskontraktion in der Schwangerschaft, Hemmung der Lipolyse und Transmitterfreisetzung, Schmerzweiterleitung.
EP ₄	cAMP↑	PGE	Vermehrte Schleimsekretion des Magens, Offenhaltung des ductus arteriosus botalli.
FP	IP ₃ ↑	PGF	Uteruskontraktion, Schmerzweiterleitung, Erhöhung der Zellproliferation.
IP	cAMP↑ IP ₃ ↑	PGI	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Reninfreisetzung und Natriuresis.
TP	IP ₃ ↑ cAMP ↑	TXA, PGD	Erhöhung der Thrombozytenaggregation, Vasokonstriktion, Bronchiokonstriktion, Modulation der T-Zell Aktivierung.

Tabelle 1.1: Prostanoid-Rezeptoren und Prostanoid-Effekte. Nach Mutschler, E. Arzneimittelwirkungen, WVG 2001 und Hata and Breyer, 2004.

1.1.3 Die Entwicklung COX-2-selektiver NSAIDs

Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) wirken antiphlogistisch, analgetisch und antipyretisch. Ihre entzündungshemmende Wirkung wird im Wesentlichen durch eine Hemmung der Prostaglandinsynthese über den Angriff an der Cyclooxygenase erklärt. NSAIDs werden hauptsächlich zur symptomatischen Behandlung von Schmerzen und entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis und Osteoarthritis eingesetzt. Zahlreiche Studien in den 90er Jahren konnten zeigen, dass klassische NSAIDs beide Isoformen der COX hemmen (Vane and Botting, 1998), wobei oft eine Tendenz zur COX-1-

Selektivität besteht. Aufgrund der protektiven Bedeutung der durch die COX-1 synthetisierten Prostaglandine für die Schleimhautintegrität des Magen-Darm-Trakts wurden die teils schwerwiegenden gastrointestinalen Nebenwirkungen, die bei einer NSAID-Langzeittherapie oftmals auftreten, auf die Hemmung der COX-1 zurückgeführt. Dies hat zur Entwicklung von selektiven Inhibitoren der COX-2 geführt. Die ersten Vertreter dieser NSAID Generation waren das Celecoxib (CelebrexTM) und Rofecoxib (VioxxTM). Es folgten weitere COX-2-selektive NSAIDs, wobei Lumiracoxib (PrexigeTM) der zur Zeit neueste und selektivste Inhibitor der COX-2 auf dem Markt ist (Coruzzi et al., 2004; DeWitt, 1999; Esser et al., 2005; Kalgutkar and Zhao, 2001; Riendeau et al., 2001; Scott et al., 2004a; Scott et al., 2004b). Ein Überblick über die zurzeit zugelassenen NSAIDs vom Coxib-Typ zeigt Tabelle 1.2. Der Mechanismus der COX-Hemmung ist innerhalb der Gruppe der NSAIDs teils sehr verschieden. Aspirin (COX-1-Präferenz) acetyliert einen Serin-Rest im aktiven Zentrum der COX-1 und COX-2, wodurch die Bindung der Arachidonsäure an die COX irreversibel gehemmt wird. Zu den reversiblen, kompetitiven Inhibitoren der COX gehört u.a. das Ibuprofen, das mit Arachidonsäure um die Bindung an die COX konkurriert. Flurbiprofen und Indomethacin bilden Ionenbindungen mit der COX aus und verändern so deren Proteinkonformation und Aktivität. Selektive COX-2-Hemmer vom Coxib-Typ interagieren hochaffin mit spezifischen Aminosäureresten in der Seitentasche der COX-2 und blockieren so die Bindung der Arachidonsäure (siehe Abbildung 1.2). Die IC₅₀-Werte für die Hemmung der COX-2 liegen bei diesen Wirkstoffen im nanomolaren Bereich. Da diese Seitentasche in der COX-1 fehlt, binden COX-2-selektive NSAIDs nur mit sehr niedriger Affinität an die COX-1 (IC₅₀-Werte im micromolaren Bereich) (Brown et al., 1998; Brune and Neubert, 2001; FitzGerald and Patrono, 2001; Gierse et al., 1999; Hawkey, 1999; Hinz and Brune, 2002).

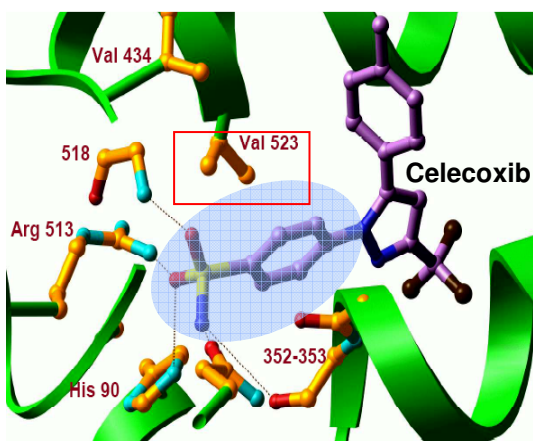


Abbildung 1.2: Wechselwirkung von Celecoxib in der aktiven Bindungstasche der Cyclooxygenase-2. Der Austausch von Iso⁵²³ (COX-1) zum kleineren Val⁵²³ (COX-2, roter Kasten) öffnet den Zugang zu einer hydrophoben Seitentasche (hellblau dargestellt), in die der Phenylsulfonamidrest von Celecoxib sterisch optimal hineinpasst. Die Sulfonamidgruppe kann so Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäuren in der Seitentasche der COX-2 ausbilden. Der so entstandene Komplex enthält zwar keine kovalenten Bindungen, dissoziiert jedoch sehr langsam.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Struktur, COX-Selektivität und wichtige Anwendungsgebiete der zurzeit zugelassenen COX-2-selektiven NSAIDs vom Coxib-Typ:

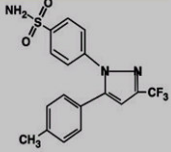
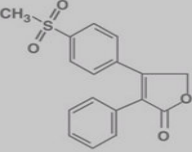
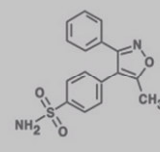
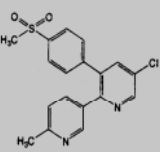
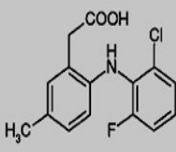
Substanz	Celecoxib	Rofecoxib #	Valdecoxib ##	Etoricoxib	Lumiracoxib ###
Struktur					
Hersteller Handelsname	Pfizer Celebrex™	Merck Vioox™	Pfizer Bextra™	Merck Arcoxia™	Novartis Prexige™
IC ₅₀ (COX-1)	6,7 µM	18,8 µM	26,1 µM	116 µM	67 µM
IC ₅₀ (COX-2)	0,87 µM	0,53 µM	0,87 µM	1,1 µM	0,13 µM
$\frac{IC_{50}(COX-1)}{IC_{50}(COX-2)}$	7.6*	35*	30*	106*	515**
Proteinbindung	97%*	85%*	98%*	92%*	> 99%**
Anwendungs- gebiete	Arthrose Arthritis Schmerzen FAP Leiden	Arthrose Arthritis Schmerzen	Arthrose Arthritis Schmerzen	Arthrose Arthritis Schmerzen	Arthrose Arthritis Schmerzen

Tabelle 1.2: Übersicht über pharmakologische Eigenschaften COX-2-selektiver NSAIDs vom Coxib-Typ. * nach Rindeau, D. et al. 2001; ** nach Esser, R et al. 2005. # Rofecoxib wurde im September 2004 weltweit vom Markt genommen. ## Valdecoxib wurde im April 2005 vom Markt genommen. ### Lumiracoxib ist in Deutschland noch nicht verfügbar.

Verminderte gastrointestinale Nebenwirkungen bei der Behandlung mit COX-2-selektiven NSAIDs gegenüber den klassischen NSAIDs konnten zunächst in mehreren Tier- und Patientenstudien gezeigt werden (Hawkey et al., 2001; Masferrer et al., 1999; Masferrer et al., 1994; Silverstein et al., 2000). Eine höhere Wirksamkeit der COX-2-selektiven Inhibitoren gegenüber klassischen NSAIDs bei der Behandlung arthritischer Erkrankungen wurde jedoch nicht beobachtet (Bingham, 2002). Es existieren jedoch Studien, die das niedrigere ulzerogene Potential von COX-2-selektiven NSAIDs wieder in Diskussion bringen (Bjarnason and Rainsford, 2001; Rainsford, 2001). Diese Studien wurden zudem durch Untersuchungen unterstützt, die Hinweise auf eine physiologische Funktion der COX-2 beim Erhalt der Schleimhautintegrität und bei der Heilung von Schleimhautläsionen und Ulzera im Magen erbringen konnten (Mitchell and Warner, 1999; Smith et al., 2000). In Langzeitstudien zur Behandlung von Arthritis-Patienten mit Rofecoxib wurde ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen, vor allem Myokardinfarkte und Apoplexien, beobachtet (Bombardier et al., 2000; Mukherjee et al., 2001). Zurzeit wird diskutiert, ob diese beobachteten kardiovaskulären Nebenwirkungen eine direkte Folge der COX-2-Hemmung sind, oder nur spezifisch unter Behandlung mit Rofecoxib auftreten.

1.1.4 Entdeckung der antikarzinogenen Wirkung von nicht-steroidalen Antiphlogistika

Seit mehr als 20 Jahren ist bekannt, dass die langfristige und regelmäßige Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) sowohl prophylaktische, als auch therapeutische Bedeutung bei der Behandlung des Kolonkarzinoms besitzt. Neuere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass NSAIDs wahrscheinlich auch das Tumorwachstum anderer Krebstypen hemmen. Derartige Studien existieren unter anderem bereits für das Magenkarzinom (Uefuji et al., 2000), das Speiseröhrenkarzinom (Souza et al., 2000), das Pankreaskarzinom (Molina et al., 1999) und das Lungenkarzinom (Tsubouchi et al., 2000).

Ein Mechanismus der antikarzinogenen Wirkung von NSAIDs beruht auf einer Hemmung der Synthese von Prostaglandinen, die in vielen Tumorgeweben in hohen Konzentrationen infolge einer Überexpression der COX-2 vorkommen und das Tumorwachstum fördern.

Die mechanistische Aufklärung der antineoplastischen Wirkungsweise von NSAIDs begann unbewusst im Jahre 1968 mit der Entdeckung, dass in Tumorgewebe und Blut von Patienten mit Schilddrüsenkrebs signifikant erhöhte Konzentrationen an Prostaglandin E_2 und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ vorherrschen (Williams et al., 1968). In den frühen 70er Jahren wurde dann erstmals von Vane die Hemmung der Prostaglandinsynthese als Mechanismus von NSAIDs postuliert (Vane, 1971). Zehn Jahre später wurde erstmals eine Verknüpfung zwischen diesen beiden Entdeckungen hergestellt. Im Jahre 1980 konnten Waddell und Gerner (Waddell and Gerner, 1980) eine antineoplastische Wirksamkeit von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) in Menschen zeigen. Sie behandelten damals einen Patienten mit mediastinalen Desmoid-Tumoren aufgrund einer schweren Begleitperikarditis mit Indomethacin. Überraschend stellten sie nach 4 Monaten Indomethacinbehandlung eine komplette Regression des Tumors fest. Im selben Jahr konnte auch die Prostaglandin H_2 Synthase als Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese und Angriffspunkt von NSAIDs identifiziert werden. Drei Jahre später konnte gezeigt werden, dass auch Sulindac bei kolorektalen Adenomen eine antineoplastische Wirkung besitzt (Waddell and Loughry, 1983). Ein weiterer Fortschritt gelang Kune et al. (Kune et al., 1988) mit der Entdeckung, dass die reguläre Einnahme von NSAIDs mit einem um ca. 40-50% verminderten Risiko für die Entstehung von Dickdarmkrebs korreliert und somit auch prophylaktische Bedeutung besitzt. Zahlreiche nachfolgende Studien an Patienten mit kolorektalen Tumoren oder einem erhöhtem Risiko für die Entstehung von Darmkrebs konnten die therapeutische und prophylaktische Wirksamkeit dieser Medikamente bestätigen, jedoch erwies sich die totale Kolektomie (operative Entfernung des Tumorgewebes) nach wie vor als Therapie erster Wahl (Thun et al., 2002). Einen Durchbruch in der Erforschung der antikarzinogenen Wirkungsweise von NSAIDs stellte die Beobachtung dar, dass die COX-2 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Kolonkarzinomen spielt. Rigas et al. beobachteten signifikant erhöhte Konzentrationen an Prostaglandin E_2 in kolorektalem Tumorgewebe von 21 Patienten, nicht jedoch in Gewebeproben von gesunden Probanden (Rigas et al., 1993). 1994 konnte schließlich gezeigt werden, dass bis zu 90% aller sporadischen (nicht erblich bedingten) Karzinome eine signifikante Erhöhung der COX-2-Expression im Vergleich zu normalem Epithelgewebe aufweisen (Eberhart et al., 1994; Fujita et al., 1998). Die Bedeutung der COX-2-Expression für das kolorektale

Tumorwachstum konnte in zahlreichen nachfolgenden Studien bestätigt werden. Oshima et al. beobachteten eine 80-90%ige Reduktion der Zahl von intestinalen Polypen in APC-knockout-Mäusen (analoges Tiermodell zur FAP-Erkrankung beim Menschen), in denen die COX-2 durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurde (Oshima et al., 1996). Reddy et al. berichteten von einer 40%igen Reduktion der Kryptenbildung in Karzinogen-behandelten Mäusen, denen der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib (SC-58635) verabreicht wurde (Reddy et al., 1996). Die prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit von Celecoxib bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP, siehe Kapitel 1.2.1) konnte schließlich in einer klinischen Studie von Steinbach et al. gezeigt werden (Steinbach et al., 2000). Celecoxib ist zurzeit das einzige NSAID, das von der FDA (Food and Drug Administration) zur adjuvanten Behandlung von FAP-Patienten zugelassen wurde. Neuere Studien postulieren zudem einen möglichen therapeutischen Nutzen von NSAIDs bei der Behandlung anderer Tumorerkrankungen, so zum Beispiel beim Leber-, Brust-, Blasen- und Prostatakarzinom (Subongkot et al., 2003).

Die molekularen Mechanismen, die für die antikarzinogene Wirkung von NSAIDs verantwortlich sind, bleiben jedoch bis heute noch unklar. Die Hemmung der COX-2-Aktivität wird als wichtiger chemopräventiver und tumorregressiver Mechanismus diskutiert, jedoch scheinen auch COX-2-unabhängige Mechanismen eine wichtige Rolle zu spielen (siehe Kapitel 1.4). Den Karzinomzellen ist gemeinsam, dass zentrale Regulationsmechanismen zur Kontrolle des Zellzyklus oder programmierten Zelltodes (Apoptose) häufig aufgrund von Mutationen wichtiger Regulatorproteine nicht oder nur bedingt funktionieren. Klassische chemotherapeutische Wirkstoffe zielen daher auf Zellen mit solch einer hohen und oft unbegrenzten Teilungsrate, wobei das Medikament nicht spezifisch zwischen Tumor-Zellen und gesunden Zellen mit physiologisch hoher Teilungsrate (zum Beispiel Haar- und Haut-Zellen) unterscheiden kann. Dies bedingt die bei der klassischen Chemotherapie auftretenden starken Nebenwirkungen. NSAIDs dagegen greifen wahrscheinlich direkt an defekte zelluläre Signaltransduktionswege der Tumor-Zelle an und verursachen so die Induktion einer Zellzyklusblockade und Apoptose. Kenntnisse über Signaltransduktionswege, die regulatorisch den Zellzyklus und die Apoptose beeinflussen, besitzen daher für das mechanistische Verständnis der antineoplastischen Wirkungsweise von NSAIDs eine wichtige Bedeutung und sollen im folgenden Kapitel kurz vermittelt werden.

1.2 Dysregulation des Zellzyklus und des programmierten Zelltodes (Apoptose) als Ursache für die Entstehung des Kolonkarzinoms

1.2.1 Auftreten und Ursachen von Kolonkarzinomerkrankungen

Das kolorektale Karzinom ist nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Tumorart in Europa und den Vereinigten Staaten. Weltweit gesehen ist kolorektaler Krebs die häufigste Todesursache im Bezug auf sämtliche Tumorerkrankungen (Niitsu et al., 2004). In Deutschland erkranken jährlich etwa 50.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom. Betroffen sind vor allem ältere Menschen, da das Risiko ab dem 50. Lebensjahr deutlich ansteigt. In Deutschland gibt es ca. 30.000 Todesfällen pro Jahr durch Dickdarmkrebs. Die Ursachen für die Entstehung eines Kolonkarzinoms sind bisher nur teilweise verstanden, jedoch spielen genetische Prädispositionen sowie Ernährungsgewohnheiten eine wichtige Rolle. Näherungsweise 95% aller Kolonkarzinome entstehen sporadisch, d.h. ohne familiäre Vorbelastung. Neben den sporadisch auftretenden Mutationen in somatischen Zellen können Gen-Mutationen auch über die Keimzellen familiär weitervererbt werden und so eine Kolonkarzinomerkrankung auslösen (Courtney et al., 2004). Ein Beispiel hierfür ist die FAP-Erkrankung (Familiäre Adenomatöse Polyposis, 1% der Kolonkarzinomerkrankungen), die durch eine erbliche Mutation im APC-Gen (siehe Kapitel 1.2.4) entsteht und eine nahezu 100%ige Inzidenz der Kolonkarzinomerkrankung bedingt (Kinzler and Vogelstein, 1996).

1.2.2 Regulation von Zellwachstum und -teilung durch den Zellzyklus

Ein erwachsener Mensch besteht aus näherungsweise 100 000 Milliarden Zellen, die aus einer einzigen Zelle, der befruchteten Eizelle, entstanden sind. Auch beim ausgewachsenen Organismus teilen sich die Zellen ständig, um abgestorbene oder überalterte Zellen zu ersetzen. Voraussetzung für die korrekte Zellteilung ist ein vorangegangenes Größenwachstum, Duplikation der Erbmasse und die exakte Verteilung des Zellmaterials auf die beiden Tochterzellen. Dieser hochkomplexe Prozess wird im so genannten Zellzyklus koordiniert.

Der Zellzyklus gliedert sich in vier Phasen, die mit G_1 , S, G_2 und M bezeichnet werden und zeitlich nacheinander ablaufen (siehe Abbildung 1.3). In der mitotischen oder M-Phase erfolgt die Verteilung des Zellmaterials auf die beiden Tochterzellen. In der Synthese- oder S-Phase wird die DNA verdoppelt. S- und M-Phase werden durch zwei Zeitintervalle, die mit G_1 und G_2 bezeichnet werden, voneinander getrennt. Nach der erfolgten Mitose dient die G_1 -Phase der Zelle zur Neusynthese von Ribonukleinsäuren, Proteinen und sonstigen Zellbestandteilen. Ausdifferenzierung oder ungünstige Wachstumsbedingungen können auch einen Übergang der Zelle aus der G_1 -Phase in die G_0 -Phase bewirken. Die G_0 -Phase ist ein stoffwechselminimierter Ruhezustand ohne Teilungsaktivität, aus dem die Zelle durch diverse Stimuli, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, wieder austreten kann (Malumbres and Barbacid, 2001). In der G_2 -Phase wird die Mitosefähigkeit der Zelle überprüft und die bevorstehende Mitose vorbereitet.

Die Transitionskontrolle durch die Zellzyklusphasen erfolgt durch vier wichtige Regulatorproteine: Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK), CDK-aktivierende Kinasen (CAK) und CDK-inhibierende Proteine (CDKI). Nach der Komplexierung eines Cyclins an eine CDK und nach aktivierender Phosphorylierung durch eine CAK wird die Kinaseaktivität des Cyclin/CDK-Komplexes hochreguliert (Morgan, 1997; Norbury and Nurse, 1992). Die Substrate dieser Kinase-Komplexe sind Schlüsselenzyme, die den Übergang in die nachfolgende Zellzyklusphase, aber auch zelluläre Vorgänge innerhalb der Zellzyklusphase selbst kontrollieren. Der Eintritt in die nachfolgende Zellzyklusphase wird auf vier verschiedenen Ebenen reguliert: Zum einen wird die Expression der einzelnen Cycline durch Neusynthese und proteasomale Degradierung streng phasenabhängig reguliert, wobei jeder Transition bzw. jeder Zellzyklusphase spezifische Cyclin/CDK-Komplexe zugeordnet werden. Die Expression der CDK-Proteine hingegen bleibt während der verschiedenen Zellzyklusphasen annähernd konstant (Murray, 1995; Murray, 2004).

Auf zweiter Ebene erfordert eine komplette Aktivierung des Cyclin/CDK-Komplexes eine Phosphorylierung der CDK, die durch eine CAK (CDK-aktivierende Kinase) durchgeführt wird. Weiterhin kann die CDK-Aktivität durch Angriff assoziierter Phosphatasen (z.B. CDC25) oder Kinasen (z.B. WEE1) an anderen Aminosäureresten gehemmt werden (O'Connor et al., 1994). Auf letzter Ebene können kleine inhibitorische Untereinheiten (z.B. p21, p27, p16, p19) an die Cyclin/CDK-Komplexe binden und sie auf diese Weise hemmen (Morgan, 1995; Sherr and Roberts, 1995).

Bei der Transition von der G₁- in die S-Phase ist etwa 3 Stunden vor Beginn der S-Phase der so genannte R- (Restriktions)-Punkt beschrieben worden. Beim Durchschreiten dieses Restriktions-Kontrollpunktes kann der Durchlauf durch die Synthese-Phase nicht mehr aufgehalten werden. Ein zentraler Regulationsmechanismus innerhalb des R-Punktes besteht in der stufenweisen Phosphorylierung/Aktivierung des Rb-Proteins (Retinoblastom). Durch diese Modifikationen werden an Rb gebundene Transkriptionsfaktoren freigesetzt, wandern in den Zellkern und führen durch Bindung an Promotorregionen von S-Phase-spezifischen Genen zu gesteigerter Expression. Dieser Vorgang steuert wesentlich den Übergang von der G₁- in die S-Phase und teilweise auch Prozesse innerhalb der S-Phase. Die erste Phase der Rb-Phosphorylierung wird durch den Cyclin D/CDK4 oder Cyclin D/CDK6 Komplex gesteuert, nachdem dieser durch eine CAK (Komplex aus Cyclin H mit CDK7) aktiviert wurde. Die zweite Phase der Phosphorylierung des Rb-Proteins erfolgt durch den Cyclin E/CDK2-Komplex (Weinberg, 1995). Eine „Feinregulation“ dieses Prozesses wird durch die Aktivität von CDKI-Proteinen erreicht. Nach der Substratspezifität werden zwei Klassen von CDKI-Proteinen unterschieden: Die Proteine p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} hemmen verschiedene Cyclin/CDK-Komplexe und CAK-Proteine, während die Proteine p16^{INK4}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D} spezifisch die Entstehung und Aktivität des Cyclin D/CDK4/6-Komplexes hemmen (Hannon and Beach, 1994; Harper et al., 1993; Toyoshima and Hunter, 1994).

Im Vergleich zum G₁/S-Übergang ist über die Regulation der G₂/M-Transition wenig bekannt. Zentrale Regulatoren hierbei sind phosphorylierte Komplexe aus Cyclin A, Cyclin B und CDK1, die durch eine CDC25-Phosphatase dephosphoryliert und aktiviert werden und somit die Transition in die Mitose einleiten (Nurse, 1990).

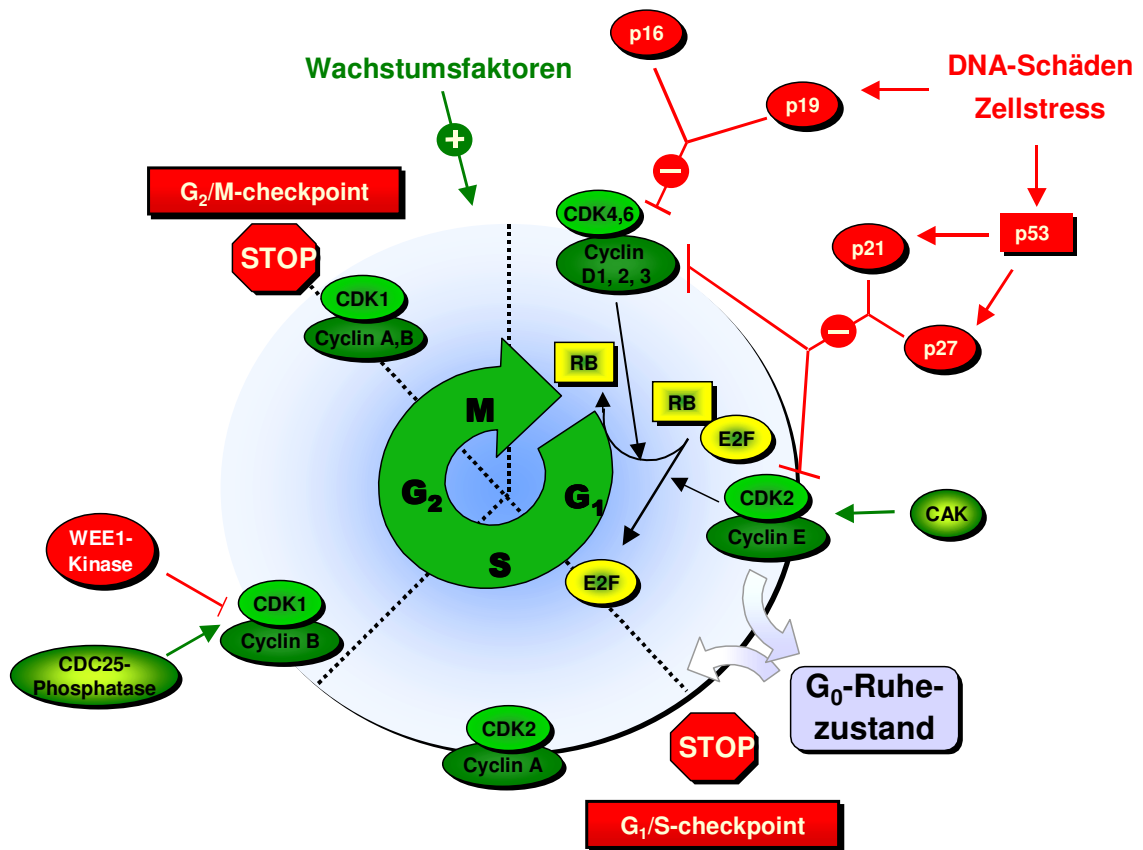


Abbildung 1.3: Schema der Regulation des Zellzyklus. Der Zellzyklus gliedert sich in vier Phasen, die mit G₁, S, G₂ und M bezeichnet werden. Die Transition durch die Phasen wird durch das Zusammenspiel zahlreicher Regulatorproteine gesteuert, darunter Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK). Die Cyclin/CDK-Komplexe phosphorylieren verschiedene zelluläre Substrate, die den Zellzyklusfortschritt steuern, z.B. das Retinoblastom-Protein. Die Expression der einzelnen Cycline wird durch Neusynthese und Abbau streng phasenabhängig reguliert. Außerdem wird die Aktivität des Cyclin/CDK-Komplexes durch übergeordnete Kinasen und Phosphatasen feingesteuert. Über diese übergeordneten Regulatorproteine, aber auch über die direkte hemmende Wirkung von induzierbaren Inhibitorproteinen, z.B. p21 und p27, können intra- und extrazelluläre Signale (z.B. DNA-Schäden, Zellstress) den Zellzyklus beeinflussen. Für weitergehende Beschreibung siehe auch Kapitel 1.2.2.

Die Transition durch die verschiedenen Zellzyklusphasen unterliegt einer äußerst komplexen Regulation. So ist eine komplett abgeschlossene DNA Duplikation in der S-Phase essentielle Voraussetzung für den Eintritt in die G₂-Phase. Die mitotische Zellteilung erfolgt erst, wenn die Zellmasse am Ende der G₂-Phase ausreichend vermehrt wurde. Das komplexe Zusammenspiel der Kontrollmechanismen vor einer Transition in die folgende Zellzyklusphase wird als „checkpoint“ bezeichnet. Wichtige checkpoints liegen in der Nähe des Restriktionspunktes der späten G₁-Phase sowie in der späten G₂-Phase kurz vor dem Eintritt in die M-Phase. Ferner wurden solche Kontrollpunkte in der S- und M-Phase beschrieben (Hartwell and Weinert, 1989; Murray, 1992). Die Entscheidung für die Passage durch diese checkpoints wird auf mehreren Ebenen getroffen.

Neben zellmorphologischen Voraussetzungen und dem Vorhandensein der verschiedenen Regulatorproteine (s.o.) spielen auch intrazelluläre (z.B. DNA-Schäden mit p53-Aktivierung) und extrazelluläre Signale (z.B. Zytokine, Nahrungsmangel und Temperaturwechsel) eine wichtige Rolle. So können DNA-Schäden über die Aktivierung von p53 zur transkriptionellen Induktion von p21 oder p27 führen, die wiederum über die Hemmung von CDK/Cyclin-Komplexen einen G₁-Zellzyklusblock einleiten (Enoch and Norbury, 1995).

1.2.3 Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose)

Der programmierte Zelltod (Apoptose) stellt eine sehr komplex organisierte Form des aktiven Zelluntergangs dar, der als Folge von Zellalterung im Rahmen der entwicklungsbiologischen Gewebserneuerung oder aufgrund von extrazellulären Stimuli oder diversen Zellschädigungen auftritt. Man unterscheidet zwei apoptotische Hauptkaskaden, die Todes-Rezeptor- (death receptor) vermittelte Apoptose und die Apoptosekaskade unter Beteiligung der Mitochondrien (Hengartner, 2000) (siehe Abbildung 1.4). Bei beiden Kaskaden spielt die Aktivierung von s.g. Caspasen (Cysteinyln-Aspartasen) eine zentrale Rolle. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden (Earnshaw et al., 1999). Die kaskadenartig angeordneten Caspasen triggern einerseits apoptotische Signale, andererseits fungieren sie als direkte Exekutoren des Zelltods durch Spaltung diverser zellulärer Substrate (Stroh and Schulze-Osthoff, 1998). Die Rezeptor-vermittelte Apoptose beginnt mit der Bindung von extrazellulären Liganden, z.B. TNF α oder FAS-Ligand an entsprechende Rezeptoren (TNFR und CD95) (Nagata, 1998; Smith et al., 1994). Zytokine vom TNF-Typ werden vorwiegend von Phagozyten und Lymphozyten produziert, in das Blut oder Gewebe sezerniert und binden dort zur Induktion von Apoptose an Rezeptoren viral oder bakteriell infizierter Zellen. Danach kommt es zu einer Aggregation der Rezeptoren, wodurch eine Bindung von mehreren Procaspase-8-Molekülen an FADD-Adaptormoleküle (FAS-associated death domain) des Rezeptorkomplexes ermöglicht wird. Nach heutigem Wissensstand aktivieren sich die Caspase-8-Enzyme durch gegenseitige proteolytische Abspaltung bestimmter Proteindomänen. Aktive Caspase-8 aktiviert dann proteolytisch Mitglieder der Caspase-3-Familie, zu den u.a. Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 gehören (Smith et al., 1994). Diese Caspasen werden auch als terminale Effektorcaspasen bezeichnet, da sie eine große Anzahl von zellulären Substraten spalten, darunter das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase), Zytoskelettproteine, wie z.B. Gelsolin, oder verschiedene Kernmembranproteine vom Typ der Lamine (Stroh and Schulze-Osthoff, 1998). Die proteolytische Spaltung dieser Substrate verleiht der Zelle ihre typische apoptotische Morphologie.

Die mitochondriale Apoptosekaskade kann durch eine Vielzahl intrazellulärer Stresstimuli ausgelöst werden, darunter stark erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen, reaktive Sauerstoffverbindungen, Sphingolipide, genotoxischer Stress unter Einbeziehung einer p53-Aktivierung sowie Entzug von Wachstumsfaktoren (Hajnoczky et al., 2003; Rich et al., 2000). Durch diese Stimuli kommt es auf noch unklare Weise zu einer Aktivierung von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (dazu gehören u.a. die

B-Proteine Bax, Bad und Bak) an der äußeren mitochondrialen Membran. Der Mechanismus dieser Aktivierung ist komplex und umfasst je nach B-Protein Phosphorylierungen, Dephosphorylierungen, Translokationen zwischen Zytosol und Mitochondrium sowie Neusynthese und Abbau. Die proapoptotischen B-Proteine verursachen durch Aktivierung membrandurchspannender mitochondrialer Poren die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Zwischenmembranraum des Mitochondriums in das Zytosol. Verschiedene antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie (darunter Bcl-2 und Bcl-x_L) wiederum erniedrigen die Permeabilität der mitochondrialen Membran für Cytochrom C, indem sie inhibitorisch an proapoptotische B-Proteine binden oder direkt an den mitochondrialen Poren antagonistisch wirken (Scorrano and Korsmeyer, 2003; Shimizu et al., 1999; van Gurp et al., 2003). Das freigesetzte Cytochrom C bindet nun an Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und Apaf-3 (Procaspase-9), wodurch Caspase-9 aktiviert wird. Der so entstehende Komplex, auch Apoptosom genannt, aktiviert nun weitere Proteasen der Caspase-3-Familie (Rodriguez and Lazebnik, 1999). Neben Cytochrom C werden bei der Induktion von Apoptose noch weitere proapoptotische Faktoren aus dem Mitochondrium freigesetzt, darunter der Caspase-unabhängige AIF (apoptosis-inducing factor) sowie Smac/DIABOLO-Proteine, die wiederum anti-apoptotische IAP-Proteine (inhibitors of apoptosis) hemmen. IAP-Proteine (z.B. das Survivin) ermöglichen eine antiapoptotische Gegenreaktion der Zelle, in dem sie die Aktivität des Apoptosoms hemmen (Du et al., 2000; Marusawa et al., 2003; Verhagen et al., 2000). Eine Verbindung zwischen der Todes-Rezeptor- und der mitochondrialen Apoptosekaskade wird durch Bid, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass Caspase-8 Bid spaltet und aktiviert und es so zur mitochondrialen Membran dirigiert. Dort fördert Bid die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma (Gross et al., 1999). Untersuchungen an Caspase-8- und Caspase-9-defizienten Mäusen konnten interessanterweise zeigen, dass neben den oben beschriebenen Kaskaden sehr wahrscheinlich noch weitere, bisher unbekannte apoptotische Signaltransduktionswege eine Rolle spielen (Wang and Lenardo, 2000). Es existieren auch Verbindungen zwischen apoptotischen Kaskaden und Regulatorproteinen des Zellzyklus. So konnte gezeigt werden, dass das p53 Protein neben der Suppression der Zellzyklusprogression auch über eine starke transkriptionelle Aktivierung der Bax-Expression an der Induktion von Apoptose beteiligt ist (Bates and Vousden, 1999; Haffner and Oren, 1995).

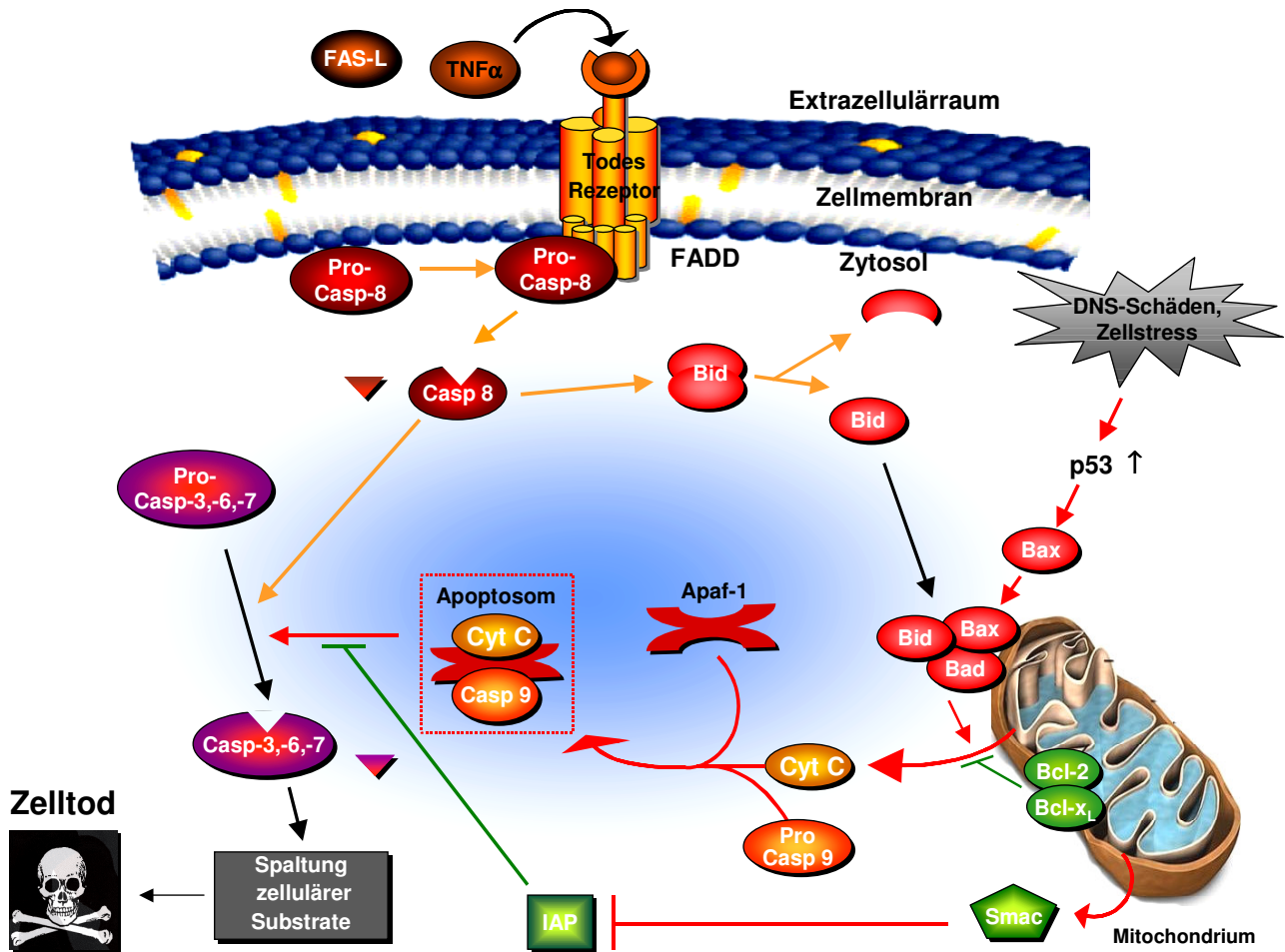


Abbildung 1.4: Regulation der Apoptose. Durch extra- ($\text{TNF}\alpha$, FAS-L) oder intrazelluläre Signale (z.B. DNA-Schäden oder Zellstress) kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung von zelleigenen Proteasen, den Caspasen. Extrazelluläre, Rezeptor-gekoppelte Signale führen überwiegend zur Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges unter Beteiligung von Caspase-8. Intrazelluläre, apoptotische Signale werden zumeist über den mitochondrialen Signaltransduktionsweg unter Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und der Aktivierung von Caspase-9 weitergeleitet. Beide Wege führen zur Aktivierung der terminalen Effektorcaspasen-3, -6, und -7, die verschiedenste zelluläre Substrate spalten und so den Zelltod aktiv herbeiführen. Für weitergehende Beschreibung siehe auch Kapitel 1.2.3. Abkürzungen: AIF, apoptosis-inhibiting factor; Apaf, apoptotic protease-activating factor; Casp, Cysteiny-Aspartase; Cyt C, Cytochrom C; FADD, FAS-associated death domain; IAP, apoptosis-inhibiting protein; $\text{TNF}\alpha$, tumor necrosis factor alpha; — Receptor-vermittelte Apoptosekaskade; — mitochondriale Apoptosekaskade. Abbildung nach Hengartner, M.O. (2000). *Nature*, 407, 770-6.

1.2.4 Entstehung von Kolonkarzinomen

Wie bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt, kommt es in Kolonkarzinom-Zellen häufig aufgrund von Proteinmutationen zu Dysregulationen in den Kontrollmechanismen für den Zellzyklus oder den programmierten Zelltod. Daraus resultiert eine hohe und oft unbegrenzte Teilungsaktivität der Tumor-Zellen. Die Entwicklung von normalen Kolonepithelzellen zu einem kolorektalen Karzinom ist eine Konsequenz mehrerer histopathologischer und biochemischer Veränderungen des Gewebes (Chung, 2000).

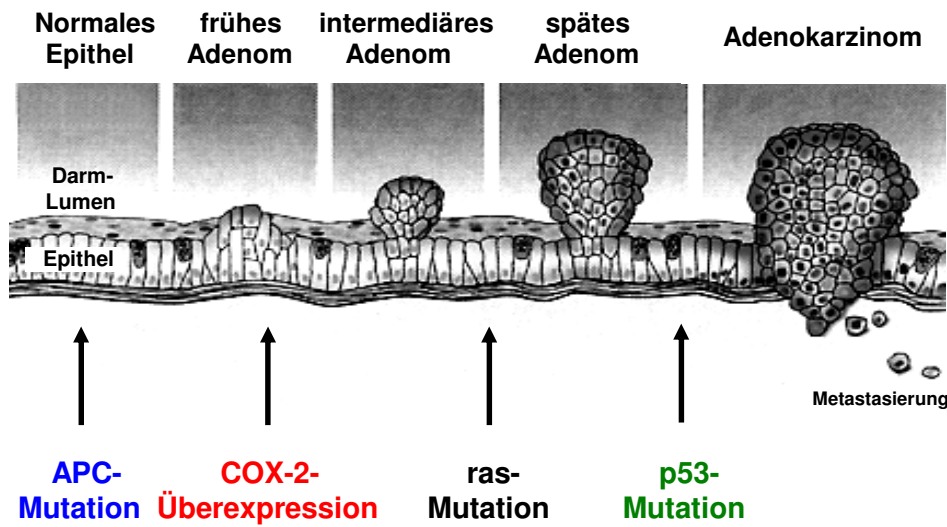


Abbildung 1.5: Verschiedene Entwicklungsstadien der malignen Transformation von gesundem Epithelgewebe zum kolorektalen Karzinom. Für weitergehende Erläuterung siehe auch Kapitel 1.2.4.

Am Anfang der malignen Transformation von Kolonepithelzellen stehen oft Mutationen in Proteinen, die das Wachstum und die Zellteilung regulieren. Sehr häufige Mutationen (ca. 85% aller sporadischen Karzinome) betreffen das APC- (adenomatous polyposis coli) oder Beta-Catenin-Gen, die beide zu einer Überexpression des Beta-Catenin-Proteins führen (Ilyas et al., 1997). Eine Überexpression von Beta-Catenin wird wiederum eng mit der Entstehung von adenomatösen Polypen, einer Vorstufe des Kolonkarzinoms, in Verbindung gebracht. Adenome sind primär gutartige Neoplasien (Gewebsneubildungen) und zeigen (im Gegensatz zum Karzinom) zunächst noch keine Infiltration in benachbarte Gewebsschichten oder eine Metastasierung. Näherungsweise 95% aller Kolonkarzinome entstehen über solche Polypenvorstufen, daher spielen Dysregulationen innerhalb des Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweges bei der Entstehung des Kolonkarzinoms eine zentrale Rolle (Bienz and Clevers, 2000; Kolligs et al., 2002; Polakis, 2000). In den letzten Jahren ist dieser Signaltransduktionsweg zunehmend Gegenstand intensiver Forschung geworden, da er einen interessanten Angriffspunkt für chemopräventive und tumorregressive Wirkstoffe zur Behandlung von Kolonkarzinomerkkrankungen darstellt.

Abbildung 1.6 zeigt schematisch die Regulation des Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweges, wie sie in Säugetieren und Menschen stattfindet. Das Beta-Catenin Protein unterliegt einem permanenten

proteasomalen Abbau, der durch kontinuierliche Neusynthese kompensiert wird (high turnover protein). Extra- und intrazelluläre Signale, die den Abbau oder die Neusynthese beeinflussen, können daher effektiv und schnell die Expression oder die zelluläre Verteilung von Beta-Catenin regulieren. Nach der Neusynthese wird freies, zytosolisches Beta-Catenin durch die CKI (casein kinase-I) zunächst an Serin-45 phosphoryliert (Amit et al., 2002). An das so phosphorylierte Beta-Catenin lagern sich nun weitere Proteine an, darunter Axin, das APC-Protein und die GSK-3 β (Glykogensynthase-Kinase-3- β) (Rubinfeld et al., 1996). In diesem Komplex phosphoryliert GSK-3 β zunächst Axin und APC und stabilisiert so die gegenseitige Bindung. Dies ermöglicht weitere Phosphorylierungen von Beta-Catenin an Thr-41, Ser-37 und Ser-33 durch die GSK-3 β . Das vierfach phosphorylierte Beta-Catenin wird nun durch die β -Trcp-Ubiquitin-Ligase gebunden, ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt (Kikuchi, 2000; Rubinfeld et al., 1996). Die Bindung von WNT-Glykoproteinen, von denen in Säugetieren mindestens 16 verschiedene Isoformen existieren, an Frizzled-Rezeptoren führt zur Phosphorylierung des zytoplasmatischen Proteins Dishevelled (Dsh). Aktiviertes Dsh bindet nun an Axin und verhindert so die GSK-3 β -abhängige Phosphorylierung von Beta-Catenin (Papkoff and Aikawa, 1998). Die GSK-3 β -Aktivität kann auch direkt durch verschiedene Proteine gehemmt werden, darunter durch Frat-1, die Akt/PBK (Proteinkinase B) und Proteinkinase-C- β II (Cross et al., 1994; Murray et al., 1999). Durch den so inhibierten proteasomalen Abbau akkumuliert freies, unphosphoryliertes Beta-Catenin im Zytoplasma und transloziert nun entweder in den Zellkern oder wird in die Zellmembran eingebaut. In der Zellmembran komplexiert es mit dem Zell-Adhäsionsprotein E-Cadherin und auch mit α -Catenin, das wiederum am Zytoskelett verankert ist. Das Gleichgewicht zwischen Membrangebundenem und freiem zytoplasmatischem Beta-Catenin wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen reguliert (Nelson and Nusse, 2004).

Im Zellkern bindet unphosphoryliertes Beta-Catenin an Transkriptionsfaktoren der T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor (TCF/Lef)-Familie und aktiviert so die Transkription spezifischer Zielgene, darunter COX-2, Cyclin D1, MMP (Matrixmetalloproteinasen) und c-Myc. Für diese Genprodukte konnte eine fördernde Wirkung auf das Tumorwachstum gezeigt werden (Howe et al., 1999; Kolligs et al., 2002; Mann et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999; Wong and Pignatelli, 2002). COX-2 und Cyclin D1 beispielsweise steigern direkt die Zellteilungsrate und Matrixmetalloproteinasen sind über den Abbau der extrazellulären Matrix an der Metastasierung beteiligt.

Mutationen im APC-Protein oder in Beta-Catenin selbst, die einen proteasomalen Abbau von Beta-Catenin verhindern, führen über die Erhöhung der zyto- und nukleoplasmatischen Spiegel von unphosphoryliertem Beta-Catenin zur gesteigerten Expression von Beta-Catenin-Zielgenen, die wiederum das Tumorwachstum fördern.

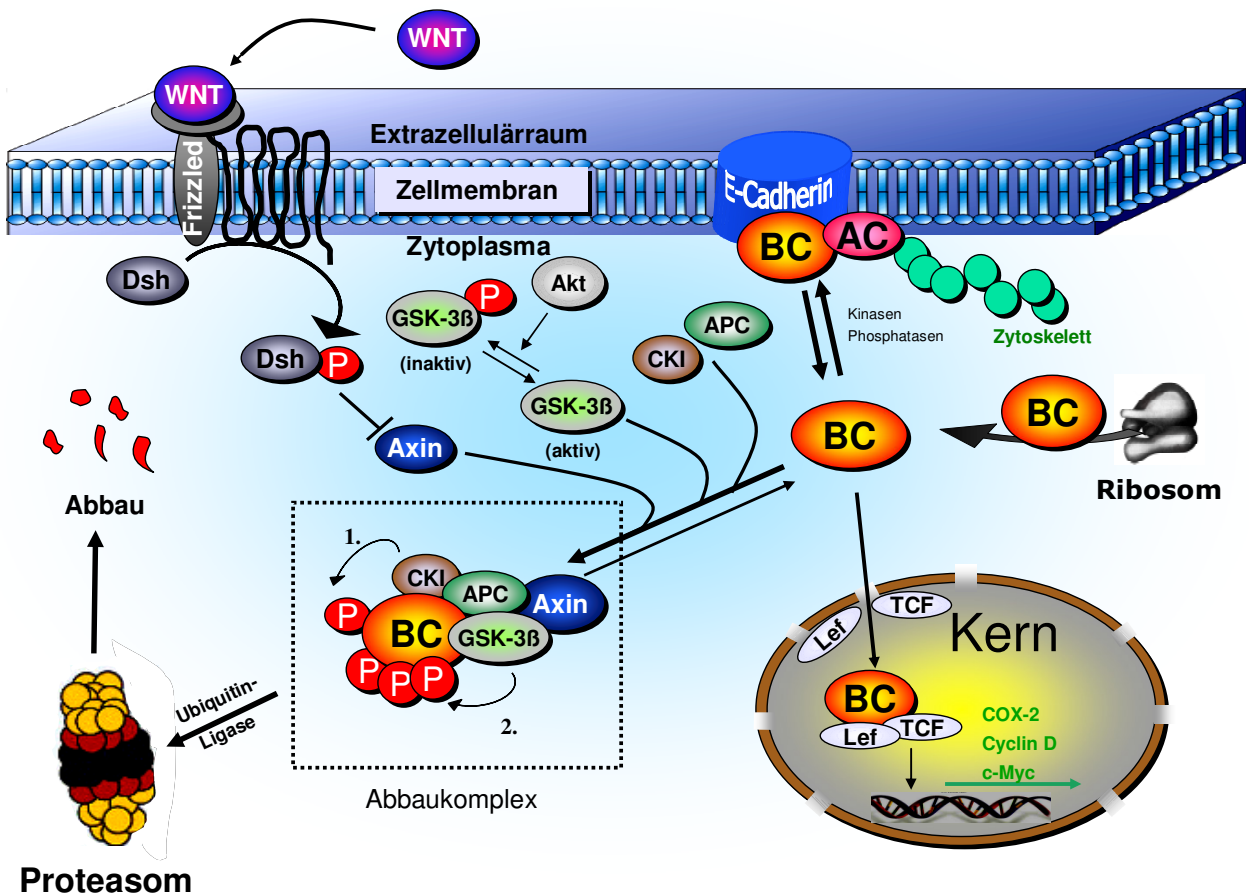


Abbildung 1.6: Regulation des APC/Beta-Catenin-Signaltransduktionsweges. Durch kontinuierliche Neusynthese und GSK-3β-abhängige, proteasomale Degradierung von Beta-Catenin wird die zelluläre Expression auf weitgehend konstantem Level gehalten. Extrazelluläre WNT-Liganden sowie intrazelluläre Kinaseaktivitäten können den proteasomalen Abbau von Beta-Catenin blockieren und so die zytoplasmatischen Beta-Catenin-Spiegel erhöhen. Beta-Catenin transloziert dann entweder zur Membran, wo es am Aufbau der Zell-Zell-Verbindungen beteiligt ist oder in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor im Komplex mit TCF- und Lef-Proteinen die Expression verschiedener proliferationsfördernder Gene steigert. Für weitergehende Erläuterung siehe auch Kapitel 1.2.4. Abkürzungen: AC, Alpha-Catenin; APC, adenomatous polyposis coli; BC, Beta-Catenin; CKI, casein kinase-I; COX-2, Cyclooxygenase-2; Dsh, dishevelled; GSK-3β, Glykogensynthase-Kinase-3β; Lef, lymphoid-enhancer-factor; P, Phosphatrest; TCF, T-cell-factor.

Neben Mutationen im Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg findet sich im Stadium des frühen Adenoms in ca. 40% der Gewebeproben auch eine Überexpressionen der Cyclooxygenase-2. In Karzinomgewebe ist die COX-2 sogar in 80-90% aller Proben überexprimiert (Eberhart et al., 1994). Mutationen in späteren Stadien der Karzinogenese betreffen häufig auch das p53-Protein, das wichtige regulatorische Funktionen im Zellzyklus oder der Apoptose besitzt (Chung, 2000).

1.3 Antineoplastische Effekte von NSAIDs durch Hemmung der Cyclooxygenase-2

Mit der Entdeckung, dass die COX-2 in vielen Tumorgeweben überexprimiert wird, begannen intensive Untersuchungen zu den COX-2-abhängigen antikarzinogenen Effekten von NSAIDs *in vitro* und *in vivo*. Es werden mehrere Mechanismen diskutiert:

1.3.1 Reduktion der antiapoptotischen und proliferationsfördernden Wirkung von PGE₂ im Tumorgewebe durch NSAID-vermittelte Hemmung der COX

Bereits 1993 konnte gezeigt werden, dass *in vitro* extern zugeführte Prostaglandine die Wachstumsraten von kultivierten Magenepithelzellen deutlich erhöhen (Nakano et al., 1993). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wurde von Pai et al. beschrieben, der eine Hochregulation der Expression von EGF (epithelial growth factor)-Rezeptoren in Magenepithelzellen und Kolonkarzinom-Zellen unter Zugabe von PGE₂ beobachtete (Pai et al., 2002). Damit verbunden war auch ein verstärktes Ansprechen der Tumor-Zellen auf die proliferationsfördernde Wirkung von Wachstumsfaktoren (siehe Abbildung 1.7 und 1.8). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass PGE₂ direkt die transkriptionelle Aktivität von PPAR δ (siehe auch Kapitel 1.4.5) in humanen Kolonkarzinom-Zellen steigert und über die Hochregulation der Expression von PPAR-kontrollierten Genen das Zellwachstum und Adenomformation in APC-Mäusen fördert (Wang et al., 2004). Tsujii konnte 1995 zeigen, dass die Überexpression der COX-2 in intestinalen Epithelzellen der Ratte zu Prostaglandin-vermittelter Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli, verstärkter Expression von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen und zur Erniedrigung der Expression von TGF- β -Rezeptoren (transforming growth factor β) führt (Tsujii and DuBois, 1995). TGF- β -Rezeptoren sind wichtige Modulatoren zwischen extra- und intrazellulären apoptotischen Signalen (siehe auch Abbildung 1.7 und 1.8). Weiterhin führte eine induzierte Überexpression von COX-2 in humanen Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen zu gesteigerter Zell-migration und erhöhter Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP) (Tsujii et al., 1997). MMP sind für den Abbau von extrazellulärer Matrix zuständig und spielen bei Gewebsveränderungen (z.B. Wundheilung), aber auch bei der Metastasierung eine wichtige Rolle (siehe auch Abbildung 1.8). Eine Erniedrigung der Prostaglandin-Spiegel im Tumorgewebe durch Inhibition der COX führt also über die Blockade mehrerer neoplastischer Effekte zu einer Hemmung des Tumorwachstums.

1.3.2 Antineoplastische Effekte von NSAIDs durch Hemmung der Angiogenese

Ab einem Durchmesser von ca. 2 mm benötigt ein Tumor zum weiteren Größenwachstum eine eigene Blutversorgung (Holash et al., 1999). Arbeiten von Majima et al. konnten zeigen, dass eine Hemmung der COX-2 eine verminderte Ausschüttung von Angiogenesefaktoren aus Fibroblasten der Ratte zur Folge hat (Majima et al., 2000). Pai et al. konnten kurz darauf zeigen, dass PGE₂ die Expression und Ausschüttung von VEGF (vascular endothelial growth factor) in humanen Endothelzellen fördert (Pai et al., 2001). Direkte *in vivo*

Effekte der COX-2-Aktivität auf die Neovaskularisierung und das Tumorwachstum von humanen Lungenkrebszellen konnten von Williams et al. in Mäusen beobachtet werden (Williams et al., 2000). Eine Erniedrigung der PGE₂-Konzentrationen im Tumorgewebe durch NSAID-vermittelte Hemmung der COX-2 inhibiert daher die Neovaskularisierung und folglich auch das Tumorwachstum (siehe Abbildung 1.7).

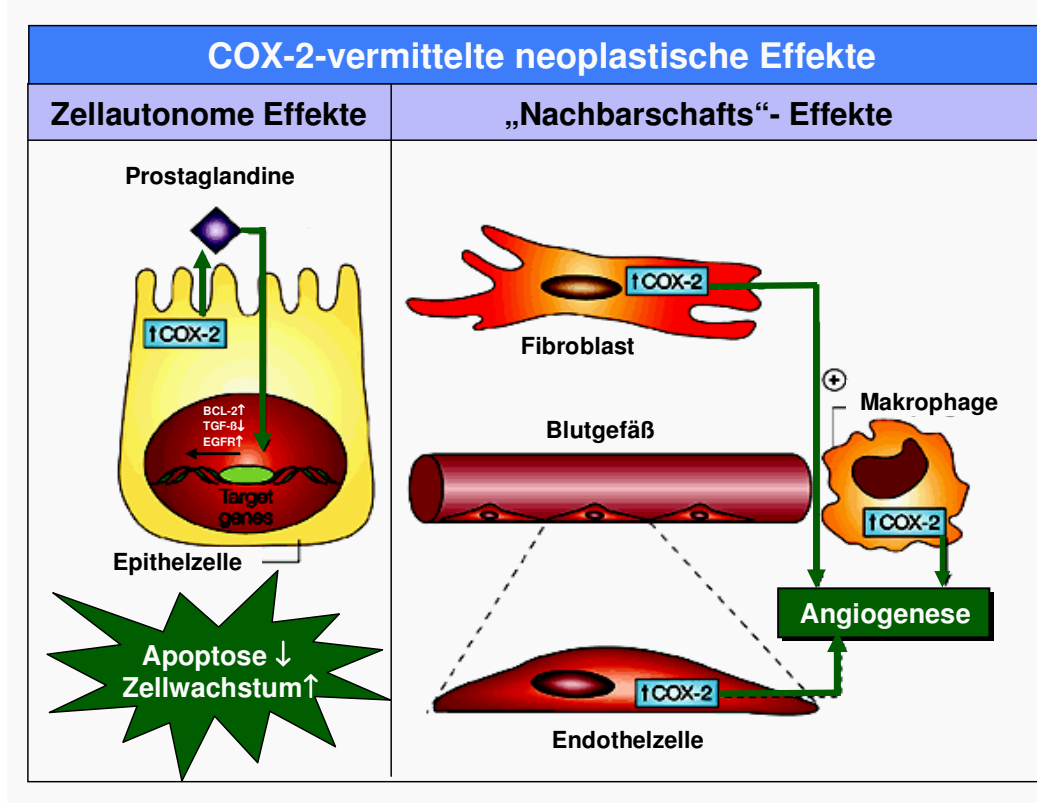


Abbildung 1.7: Darstellung von Mechanismen, über die eine COX-2-Überexpression das Wachstum von kolorektalen Tumoren fördert. **Zellautonome Effekte:** Prostaglandine erhöhen direkt über die gesteigerte Expression proliferationsfördernder oder antiapoptotischer Gene (z.B. EGF-R, PPAR und Bcl-2) das Zellwachstum und hemmen die Induktion von Apoptose. Prostaglandine wirken entweder direkt auf die Ursprungszelle oder auf Zellen der direkten Nachbarschaft. **„Nachbarschafts“-Effekte:** Eine Überexpression von COX-2 in Fibroblasten, Makrophagen oder in den Endothelzellen des Tumors führt zur Ausschüttung von Faktoren, die eine Zellmigration und Angiogenese im Karzinomgewebe anregen. Eine Hemmung der Prostaglandinsynthese durch NSAIDS führt daher zur Blockade dieser neoplastischen, COX-2-abhängigen Mechanismen. Für weitergehende Beschreibung siehe auch Kapitel 1.3. Abkürzungen: COX, Cyclooxygenase; EGF-R, epithelial growth factor receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TGF-β, transforming growth factor-β. Abbildung nach Gupta, R.A. & Dubois, R.N. (2001). *Nat Rev Cancer*, 1, 11-21.

1.3.3 Antikarzinogene Effekte durch Erhöhung der intrazellulären Ceramidkonzentration

Ein weiterer, COX-2-abhängiger antikarzinogener Mechanismus von NSAIDs, der jedoch nicht auf einer Verminderung der Prostaglandinsynthese beruht, wurde von Chan et al. formuliert (Chan et al., 1998). So konnten Hinweise erbracht werden, dass die schlagartig verminderte Umsetzungsrate der COX-2 nach Behandlung von Kolonkarzinom-Zellen mit verschiedenen COX-inhibitorischen NSAIDs zu einer

Akkumulation nicht-umgesetzter Arachidonsäure führt. Die akkumulierende Arachidonsäure fungiert dabei möglicherweise als Aktivator von Sphingomyelinasen, die Sphingomyelin zu Ceramid umwandeln. Die nach NSAID-Behandlung beobachteten erhöhten intrazellulären Ceramidkonzentrationen führten u.a. zur Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-9 und lösten Apoptose aus. Die folgende Abbildung fasst die wichtigen, bisher veröffentlichten COX-2-abhängigen antineoplastischen Mechanismen von NSAIDs zusammen.

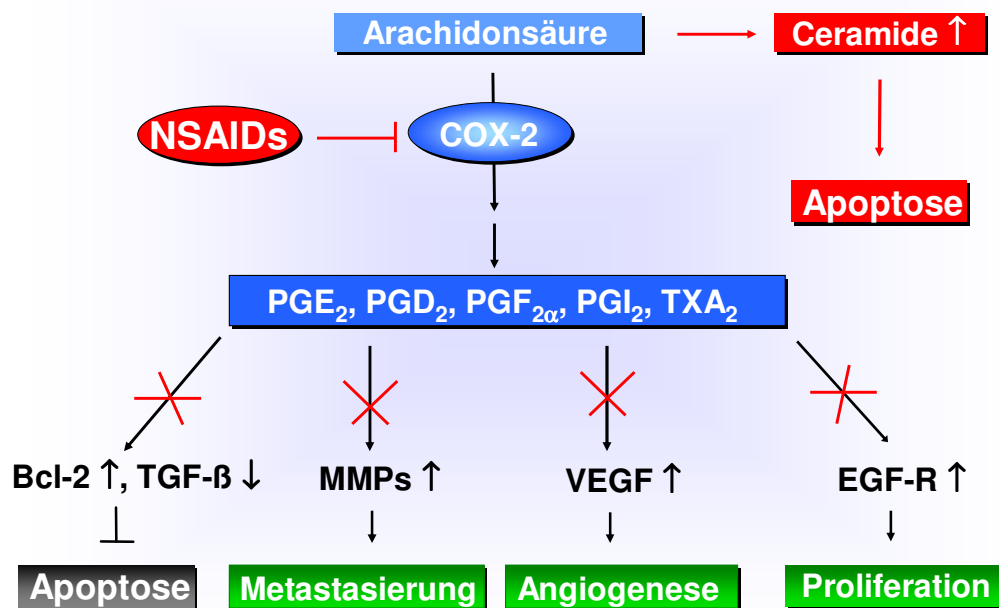


Abbildung 1.8: Antikarzinogene Effekte von NSAIDs durch Hemmung der Cyclooxygenase-2. Prostaglandine fördern das Tumorstadium, indem sie direkt die Zellproliferation anregen, über die Erhöhung der Expression von Bcl-2-Proteinen Apoptose in den Tumor-Zellen hemmen und Endothelzellen zur Angiogenese stimulieren. Prostaglandine erhöhen auch die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP), die bei der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen. NSAIDs-vermittelte Hemmung der COX-2 führt daher zur Blockade dieser Prostaglandin-abhängigen, neoplastischen Mechanismen. Für weitergehende Beschreibung siehe auch Kapitel 1.3. Abkürzungen: COX, Cyclooxygenase; EGF-R, epithelial growth factor-receptor; MMP, Matrixmetalloproteinase; NSAIDs, nicht-steroidale Antiphlogistika; PG, Prostaglandin; TGF-β, transforming growth factor-β; VEGF, vascular endothelial growth factor.

1.4 Die Rolle COX-2-unabhängiger antikarzinogener Mechanismen von NSAIDs

1.4.1 Hinweise auf COX-2-unabhängige antikarzinogene Mechanismen von NSAIDs

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass auch COX-2-unabhängige Mechanismen für die antikarzinogene Wirkung von NSAIDs verantwortlich sein müssen. So wurde eine Induktion von Apoptose in verschiedenen Kolonkarzinom-Zellen unter Behandlung mit dem COX-2-selektiven Inhibitor Sulindac-Sulfid und dem

COX-unselektiven NSAID Piroxicam beobachtet. Die externe Zugabe von PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ in das Medium konnte jedoch die Induktion von Apoptose nicht aufheben (Hanif et al., 1996). Ferner wurden unter Behandlung mit R-Flurbiprofen oder Sulindac-Sulfon antiproliferative Effekte in Mäusen und in der Zellkultur beobachtet, obwohl diese NSAIDs die COX-2 in pharmakologisch relevanten Konzentrationen nicht hemmen (Grosch et al., 2003; McCracken et al., 1996; Wechter et al., 1997). Die tumorregressiven Effekte in Mäusen unter Sulindac-Behandlung korrelierten auch nicht mit verminderten Konzentrationen an PGE₂ im Tumorgewebe. Zudem war es möglich, in COX-2-knockout-Mäusen oder COX-2-negativen Zelllinien antikarzinogene Effekte mit verschiedenen COX-2-inhibitorischen NSAIDs zu erzielen (Hanif et al., 1996). Im direkten Vergleich zu Celecoxib waren die antikarzinogenen Effekte des selektiveren COX-2-Inhibitors Rofecoxib in Zellkulturexperimenten deutlich schwächer ausgeprägt, obwohl die eingesetzten Rofecoxibkonzentrationen weit höher als die IC₅₀-Werte für die Hemmung der COX-2 waren (Patti et al., 2002). Es wurde daher geschlussfolgert, dass sowohl COX-2-abhängige, als auch COX-2-unabhängige Mechanismen für die antineoplastischen Effekte von NSAIDs verantwortlich sind. Dabei scheint mehr als nur ein gemeinsamer, COX-2-unabhängiger Mechanismus zu existieren, da durch die antiproliferativ wirkenden NSAIDs teils verschiedene Signaltransduktionswege beeinflusst werden (siehe Abbildung 1.9). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten, zurzeit diskutierten COX-2-unabhängigen Mechanismen gegeben werden:

1.4.2 Direkte, COX-2-unabhängige zelluläre Angriffspunkte von NSAIDs

In den letzten Jahren konnten mehrere Proteine identifiziert werden, deren Aktivität durch NSAIDs direkt beeinflusst wird. Alle Proteine sind an der Regulation von Zellteilung, Apoptose, Zelldifferenzierung, Entzündung oder Metastasierung beteiligt. Ein Angriff an diesen Regulatorproteinen stellt somit einen potentiellen Erklärungsansatz für die antineoplastischen Effekte von NSAIDs dar. Folgend sollen nun einige COX-2-unabhängige Angriffspunkte vorgestellt werden.

1.4.3 Hemmung von cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der Sulindac Metabolit Sulindac-Sulfon (sehr schwacher COX-2-Inhibitor) in höheren Konzentrationen (100 µM) Guanosin-3',5'-Monophosphat-spezifische Phosphodiesterasen (cGMP-PDE) hemmt (siehe Abbildung 1.9). Der hieraus resultierende Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration führte über eine Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) zur Phosphorylierungen diverser Regulatorproteine anderer Signaltransduktionswege, darunter solche, die zur Aktivierung des JNK-1-(c-jun N-terminal kinase-1) Signaltransduktionsweges oder zum Abbau von Beta-Catenin im Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg führen. Es konnte zudem eine Verbindung zwischen

dem Angriff von Sulindac-Sulfon an diesen Signaltransduktionswegen und der Induktion von Apoptose und Zellzyklusblockade gezeigt werden (Thompson et al., 2000).

1.4.4 Der NF κ B-Signaltransduktionsweg als Angriffspunkt von NSAIDs

Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist wesentlich bei der Regulation der Expression von Proteinen beteiligt, die eine schnelle Entzündungsantwort oder Reaktionen auf Zellstress steuern. NF κ B ist ein Dimer und setzt sich aus verschiedenen Kombinationen strukturverwandter Transkriptionsfaktoruntereinheiten zusammen, darunter die p50- und p65-Untereinheiten. Im Ruhezustand der Zelle wird NF κ B durch Bindung einer kleinen inhibitorischen Untereinheit (I κ B) im inaktiven, zytoplasmatischen Zustand stabilisiert (siehe auch Abbildung 1.9). Diverse extrazelluläre Stimuli, darunter Entzündungen, Infektionen oder unspezifischer Zellstress, führen zur Aktivierung einer I κ B-Kinase (IKK), die I κ B phosphoryliert und so dem proteasomalen Abbau zuführt. Das p50/p65-Dimer transloziert nun in den Zellkern, wo es die gesteigerte Expression von proliferationsfördernden (u.a. c-Myc, COX-2, Cyclin D) und antiapoptotischen (z.B. Bcl-x_L, IAP) Genen bewirkt. Für einige NSAIDs, wie Aspirin, Sulindac und Celecoxib, konnte eine direkte inhibitorische Wirkung auf die IKK-Aktivität *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, wodurch die transkriptionelle Aktivität von NF κ B herunterreguliert wird (Niederberger et al., 2001; Yamamoto et al., 1999; Yin et al., 1998).

1.4.5 Beeinflussung des PPAR-Signaltransduktionsweges durch NSAIDs

PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) gehören zur Familie der intrazellulären Homonrezeptoren und sind an der Regulation des Fettstoffwechsels beteiligt. Man unterscheidet drei PPAR-Typen, PPAR α , PPAR γ und PPAR δ . Verschiedene Fettsäuren und Fettsäure-Metabolite konnten als intrazelluläre Liganden vom PPAR identifiziert werden. Nach Ligandenbindung translozieren PPARs im Komplex mit den RXR-Faktoren (retinoid X receptor) in den Zellkern, binden an spezifische DNA-Promotorregionen und steigern die Expression von Genen, die den Energiehaushalt, Zelldifferenzierung, Apoptose und die Entzündungsantwort regulieren (Houseknecht et al., 2002). Einige NSAIDs, darunter Indomethacin und Ibuprofen, wirken als direkter Ligand und Aktivator von PPAR α und PPAR γ in C3H-Epithelzellen (Lehmann et al., 1997) und fördern auf diese Weise die Adipogenese und Peroxisomen-Aktivität (siehe auch Abbildung 1.9). Die Rolle dieser Aktivierungen für die antikarzinogene Wirkung von Indomethacin und Ibuprofen ist bisher jedoch unklar. Für Sulindac-Sulfid und Indomethacin konnte zudem gezeigt werden, dass diese NSAIDs die DNA-Bindungsaktivität des PPAR δ /RXR-Heterodimers direkt inhibieren. Der PPAR δ -Faktor wird intrazellulär durch Prostaglandin I₂ aktiviert und findet sich häufig überexprimiert in kolorektalen Karzinomgeweben. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine forcierte Überexpression von

PPAR δ eine teilweise Resistenz gegenüber Sulindac-induzierter Apoptose erzeugt (He et al., 1999). Auch die präzise Rolle von PPAR δ in der kolorektalen Karzinogenese ist noch unklar.

1.4.6 Weitere, direkte zelluläre Targets von NSAIDs

Weiterhin wurden für verschiedene NSAIDs Wechselwirkungen mit MAPK-Signaltransduktionswegen beschrieben. Der MAPK-Weg (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) besitzt zentrale Bedeutung für Zellwachstum und Differenzierung und verläuft über eine Kette von hintereinandergeschalteten Proteinkinasen. Extrazelluläre Wachstumssignale werden zunächst über Rezeptor-Tyrosinkinasen registriert und über GDP-GTP-Austausch an das RAS-Protein weitergeleitet. RAS-GTP bewirkt dann eine sequentielle Aktivierung nachgeschalteter Kinasen (RAF-MAPKKK, MAPKK, MAPK). Eine zentrale Funktion der terminalen MAPK besteht in der Aktivierung der Genexpression durch Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, darunter c-Jun, c-Fos und ELK-1. In embryonalen menschlichen Nierenzellen konnte eine direkte Bindung von Sulindac an das RAS-Protein gezeigt werden, die eine nachfolgende Aktivierung von RAF verhindert (Herrmann et al., 1998). Weiterhin wurde für verschiedene NSAIDs, darunter Aspirin, Sulindac und Indomethacin, eine Hemmung der ribosomalen S6-Kinase (RSK2) beschrieben (Stevenson et al., 1999). Die RSK2 wird durch eine MAPK phosphoryliert und aktiviert und ist überwiegend für die schnelle Transkription von Genen nach extrazellulärer Zytokinstimulation zuständig. Die NSAID-vermittelte RSK2-Inhibition verhinderte u.a. die Aktivierung von CREB und I κ B α . Die folgende Abbildung illustriert zusammenfassend wichtige, COX-2-unabhängige antikarzinogene Mechanismen von NSAIDs, die jedoch erst bei höheren NSAID-Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{M}$) und überwiegend in Zellkultorexperimenten beobachtet wurden. Die bereits für Celecoxib identifizierten, COX-2-unabhängigen Angriffspunkte werden im Kapitel 4 dieser Arbeit diskutiert.

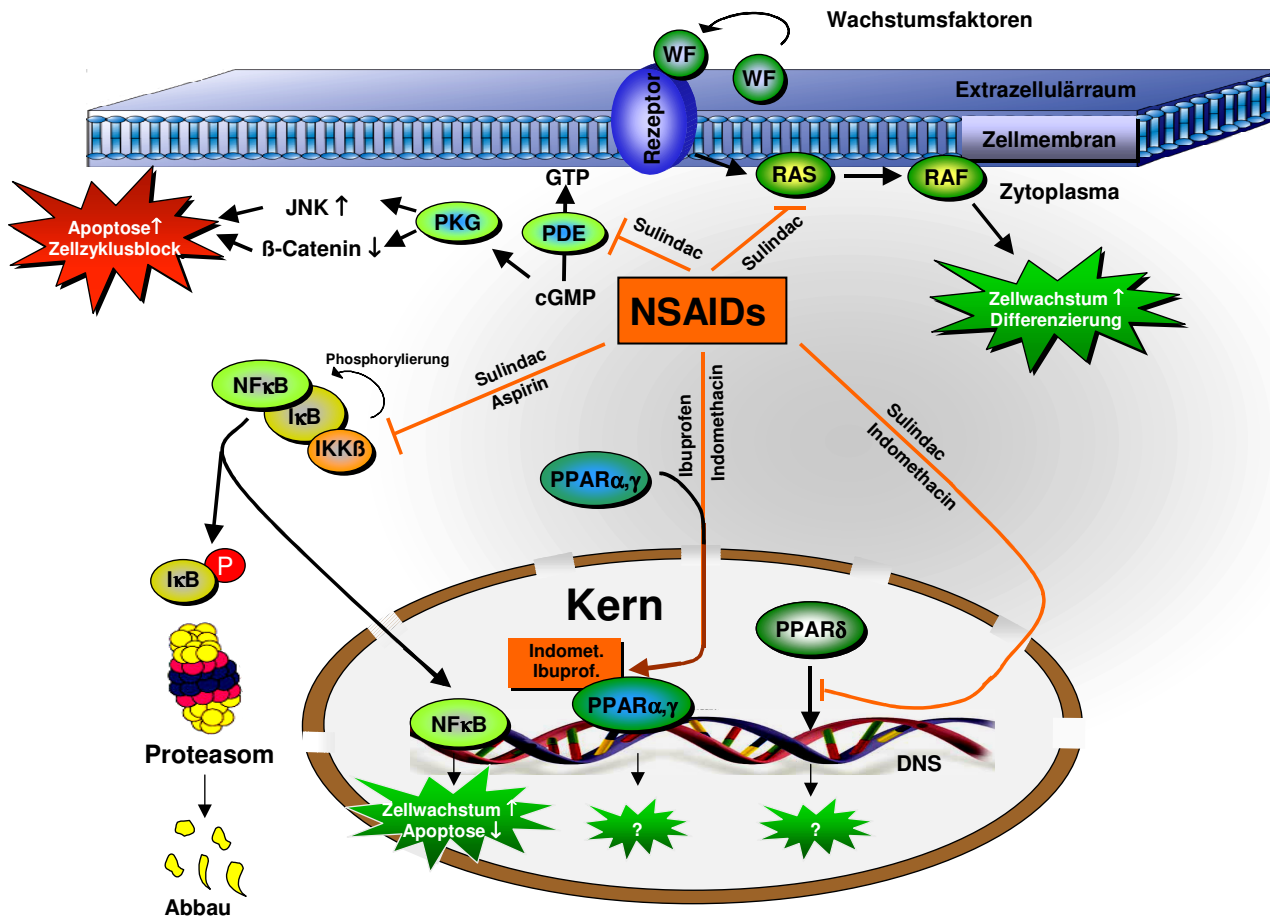


Abbildung 1.9: Wichtige COX-2-unabhängige Angriffspunkte von NSAIDs. Für höhere NSAID-Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{M}$) wurden bereits einige COX-2-unabhängige Mechanismen *in vitro* beschrieben, so zum Beispiel eine Hemmung des RAS/RAF/MAPK-Signaltransduktionsweges durch Sulindac. Für Sulindac, Aspirin, Indomethacin und Ibuprofen wurden weiterhin Interferenzen mit dem PPAR- und NFκB-Signaltransduktionsweg beobachtet. Alle aufgeführten Mechanismen wurden eng mit der Induktion von Zellzyklusblockade oder Apoptose in Verbindung gebracht. Für weitergehende Beschreibung siehe auch Kapitel 1.4. Abkürzungen: COX, Cyclooxygenase; IKKβ, IκB-Kinase-β; JNK, c-jun N-terminale Kinase-1; NFκB, nuclear factor κB; NSAIDs, nicht-steroidale Antiphlogistika; PDE, Phosphodiesterase, PKG, cGMP-abhängige Proteinkinase; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; WF, Wachstumsfaktoren.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Kolorektaler Krebs gehört weltweit gesehen zu einer der häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen. Das Kolonkarzinom kann mit den derzeit zur Verfügung stehen klassischen Chemotherapeutika oftmals nur unzureichend und unter Inkaufnahme teils erheblicher Nebenwirkungen therapiert werden. Der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib ist ein neuer antikarzinogener Wirkstoff, der sowohl prophylaktische, als auch therapeutische Wirksamkeit bei der Behandlung des Kolonkarzinoms gezeigt hat, jedoch deutlich weniger Nebenwirkungen verursacht als klassische Chemotherapeutika. Die molekularen Mechanismen von Celecoxib, denen die antikarzinogenen Effekte zugrunde liegen, werden bisher nur teilweise verstanden.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen behandelt:

- 1.) Zu welchem Ausmaß sind die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib von der COX-2-Expression der Tumor-Zellen abhängig ?
- 2.) Welche COX-2-unabhängigen molekularen Mechanismen spielen bei der Induktion der Zellzyklusblockade und Apoptose durch Celecoxib eine Rolle ?
- 3.) Stellen die antikarzinogenen Effekte einen „Klasseneffekt“ aller COX-2-selektiver NSAIDs vom Coxib-Typ dar oder treten diese Effekte spezifisch und ausschließlich nach Behandlung der Tumorzellen mit Celecoxib auf ?

Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde die Rolle der COX-2-Inhibition für die antikarzinogene Wirkung von Celecoxib diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Substanz:

1,4-Dithiothreitol

2-Mercaptoethanol

³²P- γ -ATP

Aceton

Acetonitril

Actinomycin D

Agarose NEEO

Ammoniumacetat

Ammoniumthiocyanat

Aprotinin

APS

Borsäure

Bromphenolblau

BSA

Calciumchlorid x 2 H₂O

Coomassie brilliant blue G-250

Cycloheximid

DAPI

DMSO

Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H₂OEDTA (Idranal[®] III)

Essigsäure 100%

Ethanol absolut

Ethidiumbromid

Geneticinsulfat (G418)

L-Glutamat

Glycerol

Glycin

Guanidiniumthiocyanat

HEPES

Isopropanol 100%

Isopropylalkohol

Hersteller:

Carl Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

MP Biomedicals, Heidelberg

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Carl Roth, Karlsruhe

Carl Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Boehringer, Mannheim

Carl Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

Serva Electrophoresis, Heidelberg

PAA Laboratories, Linz, Österreich

Merck, Darmstadt

Serva Electrophoresis, Heidelberg

Calbiochem, La Jolla, CA

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Merck, Darmstadt

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Carl Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Gibco, Paisley, Schottland

AppliChem, Darmstadt

AppliChem, Darmstadt

Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Carl Roth, Karlsruhe

Carl Roth, Karlsruhe

Carl Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Riedel-de-Haën, Seelze
Lactacystin	Biomol, Hamburg
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Lithiumchlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
Magermilchpulver (Nutaflor [®])	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol 100%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Nodinet [®] NP40	Boehringer, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin G/Streptomycin	Gibco, Paisley, Schottland
Pepstatin	Boehringer, Mannheim
Phenol	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Phosphorsäure 85%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
PMSF	Perbio Science, Bonn
PNK	Roche Diagnostics, Mannheim
PNK-Puffer (10 x)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
RNase A	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
t-RNA (yeast)	Roche Diagnostics, Mannheim
Tween [®] 20	AppliChem, Darmstadt

2.2 COX-2-selektive Inhibitoren

Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib und Valdecoxib wurden von der Berlin-Adlershof GmbH synthetisiert. Lumiracoxib wurde freundlicherweise von Novartis, Basel bereitgestellt. Die Identität und Reinheit der Coxibe wurde mittels der HPLC- (high performance liquid chromatography) Methode (Bräutigam et al., 2001) und NMR bestätigt und betrug jeweils mehr als 99%.

Methylcelecoxib ist ein enges Celecoxib-Strukturanalogon, in dem der 4-Methyl-Phenylring des Celecoxibs durch einen 2,5-Dimethyl-Phenylring ersetzt wurde und das eine deutlich schwächere Hemmung der PGE₂ Synthese zeigt (IC₅₀ = 9,86 ± 0,4 µM, *in vitro* assay zur Bestimmung der Hemmung der PGE₂-Synthese in HCA-7 Zellen). Durch die Verwendung dieser Kontrollsubstanz soll die Rolle der COX-2-Hemmung für die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib zusätzlich beleuchtet werden.

2.3 Eingesetzte Celecoxibkonzentrationen für die Zellkulturexperimente

Als Voraussetzung für alle folgenden Experimente wurden zunächst die Celecoxibkonzentrationen ermittelt, die für die Auslösung der antiproliferativen Effekte in den Zellkulturexperimenten benötigt werden. Eine Western Blot-Analyse der Expression des Zellzyklus-inhibitorischen Proteins p27 und von Markerproteinen der Induktion von Apoptose (PARP-Spaltung) konnte zeigen, dass die antiproliferativen Effekte bereits bei Celecoxibkonzentrationen von 20-40 µM zu beobachten sind (Experiment nicht dargestellt). Diese Konzentrationen sind allerdings annähernd 10-fach höher als die Plasmakonzentrationen in Patienten nach oraler Einnahme von Celecoxib (Niederberger et al., 2001). Es wird jedoch weitläufig akzeptiert, dass Zellkulturexperimente für die Auslösung von apoptotischen Effekten höhere Wirkstoffkonzentrationen erfordern als die Tumorregression in Tieren oder Patienten. Beispielsweise wurden für die Auslösung von Apoptose in Karzinom-Zelllinien *in vitro* Cisplatinkonzentrationen bis zu 100 µM benötigt (Brozovic et al., 2004), während die maximalen Plasmakonzentration in Patienten, denen Cisplatin (klassisches Chemotherapeutikum) intravenös verabreicht wurde und die für eine Tumorregression ausreichend ist, ca. 13,5 ± 9,3 µM betrug (Sileni et al., 1992). Interessanterweise waren Cisplatinkonzentrationen im Bereich der Plasmakonzentrationen (< 15 µM) in Zellkulturexperimenten für die Auslösung der klassischen Cisplatin-vermittelten Effekte, wie der Induktion der SAP-Kinase (Stress-aktivierte Proteinkinase) nach DNS-Schädigung, nahezu unwirksam. Diese Diskrepanz zwischen den benötigten Wirkstoffkonzentrationen *in vivo* und *in vitro* wird verständlich, bedenkt man, dass die Tumorregression in Patienten oder Tieren eine Behandlungsdauer von Wochen oder Monaten erfordert, während die antikarzinogenen Effekte in der Zellkultur bereits nach wenigen Stunden gemessen werden müssen. Zudem erfolgt das Wachstum von kultivierten Zellen unter optimierten Bedingungen, die zu einer Erniedrigung der Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff beitragen können. Aufgrund dieser Sachverhalte und bereits publizierter Daten wurden in den meisten Experimenten Celecoxibkonzentrationen von bis zu 100 µM eingesetzt.

2.4 Zelllinien

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 (ACC-169), die humane Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 sowie die Prostatakarzinom-Zelllinie LNCAP wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig), die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT-116 von der American Type Culture Collection (ATCC, Wesel) und HCA-7-Zellen von der European collection of cell cultures (ECACC, Salisbury, UK) bezogen. Caco-2- und HCA-7-Zellen wurden in dulbecco's modified medium (DMEM) kultiviert, HCA-7-Zellen zusätzlich in Anwesenheit von 200 mM L-Glutamin. MCF-7- und LNCAP-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium und HCT-116-Zellen in McCoy's-5A-Medium kultiviert. Allen Medien wurde 10% FCS (fetales Kälber Serum, Gibco, Paisley, Schottland), 100 Einheiten/ml Penicillin G sowie 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Das Medium der Caco-2-Klone enthielt zusätzlich 2 mg/ml Geneticinsulfat (G418). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Heraeus Hera Cell Inkubator (Kendo products, Hanau) kultiviert.

2.5 Bestimmung der freien Coxibkonzentration in Medium mit 10% FCS

Für die Bestimmung der freien Coxibkonzentrationen wurden 10 ml DMEM oder McCoy's Medium mit 10% FCS und steigenden Konzentrationen an Coxiben (20, 40, 60, 80, 100 µM für Celecoxib und Methylcelecoxib; 40, 80, 120, 160, 200 µM für Etoricoxib, Valdecoxib und Lumiracoxib und Rofecoxib) bei 180.000 g und 37 °C für 16 Stunden in einer Sorvall Discovery 90 SE Ultrazentrifuge (Kendo Laboratory products, Hanau) zentrifugiert. Die Zentrifugation führt zu einer Trennung von Protein-ungebundenem (Überstand) und Protein-gebundenem (Pellet) Coxib. Anschließend wurde der Überstand 1:100 in einer Acetonitril/Wasser/Ammonium-Lösung (50:50:0,1) aufgenommen und die Coxib-Konzentration mittels LC/MS/MS analysiert. Um den prozentualen Anteil $C_{\text{Rel_Medium}}$ an freiem Coxib zu erhalten, wurde die freie Konzentration der Coxibe im Medium ($C_{\text{Frei_Medium}}$) in das Verhältnis zur totalen Konzentration ($C_{\text{Total_Medium}}$) gesetzt:

$$C_{\text{Rel_Medium}} [\%] = \frac{C_{\text{Frei_Medium}}}{C_{\text{Total_Medium}}} \times 100$$

2.6 Bestimmung der intrazellulären Coxibkonzentration in humanen Kolonkarzinom-Zellen

Ca. 6×10^5 HCA-7-Zellen und $4,5 \times 10^5$ HCT-116-Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät und 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Coxibkonzentrationen (10 µM, 30 µM und 50 µM für Methylcelecoxib; 50 µM, 80 µM und 100 µM für alle anderen Coxibe) für verschiedene Zeiten (5 s, 10 s, 15 s 30 s, 45 s, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 Minuten) behandelt. Danach wurden die Zellen viermal gründlich mit 10 ml kaltem PBS (phosphate buffered saline) gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und in ein 1,5 ml Ultrazentrifugationseppendorfgefäß überführt. Nach

einer kurzen Zentrifugation bei 4 °C und 2000 g für 1 Minute (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand restlos abgesaugt und das Gewicht der Zellen mit einer Feinwaage (H54AR, Mettler, Giessen) auf 0,01 mg genau bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl PBS überschichtet und mit einer optima™ TLX Ultrazentrifuge (Beckman, Krefeld) bei 180.000 g und 24 °C für 16 Stunden zentrifugiert. Durch die hohen Zentrifugalkräfte platzen die Zellkörper und lösliche Bestandteile werden aus der Zelle herausgepresst, während Proteine und übrige Zellbestandteile als Pellet am Boden verbleiben. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation zügig und komplett in ein neues Eppendorfgefäß überführt, um Ansaugeffekte des Pellets zu vermeiden. Der Überstand wurde anschließend kurz durchmischt, im Verhältnis 1:100 in einer Acetonitril/Wasser/Ammonium-Lösung (50:50:0,1) aufgenommen und die entsprechende Coxibkonzentration mittels LC/MS/MS analysiert. Das verbleibende Pellet wurde erneut auf 0,01 mg genau ausgewogen. Aus der Differenz der Zellgewichte vor ($m_{\text{vor_UZ}}$) und nach ($m_{\text{nach_UZ}}$) der Zentrifugation ließ sich das Volumen des Zellfiltrates berechnen zu:

$$V_{\text{Filtrat}} [\mu\text{l}] \cong m_{\text{vor_UZ}} - m_{\text{nach_UZ}}$$

Da das spezifische Gewicht des Filtrats durch seinen wässrigen Charakter annähernd 1 µg/µl beträgt, konnten Volumen und Masse bei dieser Berechnung gleichgesetzt werden. Aus dem Volumen $V_{\text{Filtrat}} [\mu\text{l}]$ und der Verdünnung $(V_{\text{Filtrat}} + 200 \mu\text{l})/V_{\text{Filtrat}}$ des Zellfiltrats, dem Molekulargewicht des Coxibs (MG_{Coxib} , [g/mol]) sowie der Coxibkonzentration im Überstand $C_{\text{Coxib_ÜBST}}$ [ng/ml] ließ sich die intrazelluläre Konzentration $C_{\text{Coxib_IZ}}$ berechnen zu:

$$C_{\text{Coxib_IZ}} [\mu\text{M}] = \frac{C_{\text{Coxib_ÜBST}} \left(\frac{(V_{\text{Filtrat}} + 200 \mu\text{l})}{V_{\text{Filtrat}}} \right)}{MG_{\text{Coxib}}}$$

Da in dem Filtrat eine Restproteinkonzentration von ca. 0,6 mg/ml vorherrscht (siehe Kapitel 3.3.10) und die Coxibe eine starke Proteinbindung besitzen (siehe Tabelle 1.2), entspricht die gemessene intrazelluläre Coxibkonzentration nicht exakt der freien intrazellulären Coxibkonzentration, nähert sich ihr jedoch an. Weil für diese Methode weitere Validierungen zu erbringen sind, bleibt zunächst unklar, ob die gemessenen intrazellulären Coxibkonzentrationen exakt den tatsächlichen Konzentrationen entsprechen. Die Untersuchung der intrazellulären Konzentrationen zielt daher weniger auf die Bestimmung absoluter Konzentrationswerte aus, sondern soll vielmehr einen Vergleich der intrazellulären Konzentrationen innerhalb der Gruppe der Coxibe ermöglichen.

Die Bildung des Verhältnisses $C_{\text{Rel_IZ}} [\%]$ aus Coxibkonzentration in der Zelle ($C_{\text{Coxib_IZ}}$) und im Medium $C_{\text{Coxib_Frei_Medium}}$ erlaubt eine Aussage über mögliche Aufkonzentrierungseffekte der Coxibe:

$$C_{\text{Rel_IZ}} [\%] = \frac{(C_{\text{Coxib_IZ}})}{(C_{\text{Coxib_Frei_Medium}})} \times 100$$

<u>PBS-Puffer:</u>	10 g Natriumchlorid
	0,25 g Kaliumchlorid
	1,77 g Dinatriumhydrogenphosphat
	0,25 g Kaliumdihydrogenphosphat
	ad 1 l Aqua dest.

2.7 Stabile Transfektion von Caco-2-Zellen mit humaner COX-2-cDNA

Zunächst wurde die humane COX-2-cDNA (bereitgestellt von Dr. Timothy Hla, USA) in den Expressionsvektor pcDNA in sense- und antisense-Orientierung einkloniert. Die Caco-2-Zellen wurden anschließend mit den Konstrukten (hCOX-2-s und hCOX-2-as) sowie mit dem leeren pcDNA-Vektor mittels der Kalziumphosphat-Methode transfiziert und 48 Stunden später einer Selektion mit 1,5 mg/ml Neomycin unterzogen. 10 Tage später wurden die Neomycin-resistenten Klone isoliert und mittels Western Blot-Analyse (siehe Kapitel 2.13) hinsichtlich ihrer COX-2-Expression untersucht. COX-2-positive hCOX-2-sense-Zellen und COX-2-negative hCOX-2-as-Zellen wurden isoliert und in den weiteren Experimenten verwendet.

2.8 Messung von Prostaglandin E₂ Konzentrationen im Medium mittels PGE₂-EIA (enzyme-linked immunoassay)

2.8.1 Messung von Prostaglandin E₂ Konzentrationen im Medium der Caco-2-Klone

Je 10⁶ Caco-2-Klone wurden in 5 cm Kulturschalen für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ in Medium mit 10% FCS inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut 24 Stunden in Medium mit 10% FCS inkubiert. Anschließend wurden Proben zu je 1 ml aus dem Überstand entnommen und bei 21.000 g für 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Der Gehalt an Prostaglandin E₂ wurde unter Verwendung eines PGE₂-Correlate EIATM-Kit (Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA) nach Herstellerangaben ermittelt. Die verbleibenden Zellen wurden abtrypsinisiert und gezählt. Der Gehalt an PGE₂ im Überstand [pg/ml] konnte so auf die Zellzahl bezogen werden [pg PGE₂/10⁶ Zellen].

2.8.2 Messung von Prostaglandin E₂ Konzentrationen im Medium von HCA-7-Zellen

Je 10⁶ HCA-7-Zellen wurden in 5 cm Kulturschalen für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ in Medium mit 10% FCS inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut 24 Stunden in Medium mit 10% FCS inkubiert. Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes der COX-2-Inhibition durch Methylcelecoxib

wurden je 10^6 HCA-7-Zellen in 5 cm Kulturschalen für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ in Medium mit 10% FCS inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit steigenden Konzentrationen an Methylcelecoxib (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100 µM) für 2 Stunden behandelt. Die Messung der Konzentrationen von PGE₂ wurde wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben durchgeführt.

2.9 RNA-Analytik

2.9.1 Prinzip der RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde nach der Chomczynski-Methode mit Tri-Reagenz und Chloroform (Chomczynski, 1993; Chomczynski and Sacchi, 1987) extrahiert. Im Tri-Reagenz sind Guanidiniumthiocyanat und saures Phenol enthalten. Nach Zugabe von Chloroform entsteht ein 3-Phasen-System, in dem sich die RNA in der oberen, wässrigen Phase anreichert, während sich Proteine in der Phenol-Phase und DNA in der Interphase befinden. Die RNA kann so leicht abpipettiert und mit Alkohol gefällt werden.

2.9.2 RNA-Extraktion aus humanen Kolonkarzinom-Zellen

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden ca. 5×10^6 Zellen in PBS aufgenommen und für 1 Minute bei 15.500 g (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml Tri-Reagenz suspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Chloroform (200 µl) zugegeben, die Lösung vorsichtig geschüttelt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten bei 15.500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine Phasentrennung zu beobachten. Die obere, RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Isopropylalkohol, zehninütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 8 Minuten bei 15.500 g und 4 °C. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit 800 µl Ethanol (75%) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Zur Entfernung von mitextrahierten DNA-Anteilen wurden die Proben anschließend mit einem RNeasy[®]-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben von DNA gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit einem BioPhotometer[®] (Eppendorf, Hamburg).

<u>Tri-Reagenz:</u>	800 mM Guanidiniumthiocyanat
	400 mM Ammoniumthiocyanat
	0,1 mM Natriumacetat
	5% Glycerol
	ad 1 l Aqua dest.
	q.s. Essigsäure (zur Einstellung von pH 5)
	1 kg geschmolzenes Phenol
	ad 2,6 l mit Aqua dest.

2.9.3 Prinzip der Taqman[®]-RT-PCR

Die Quantifizierung der COX-2-mRNA erfolgte mittels reverser Transkription und nachfolgender real-time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) am Taqman[®]-Gerät (Roche Diagnostics, Mannheim). Durch die Taq-Polymerase wird ein kurzes DNA-Stück amplifiziert, dessen Größe durch die beiden flankierenden Primer definiert wird. Die Bildung des PCR-Produkts erfolgt in Anwesenheit eines kurzen einsträngigen DNA-Oligonukleotids (Sonde), das komplementär zu einer Sequenz innerhalb des DNA-Stückes ist. Die Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (hier FAM), am 3'-Ende mit einem Quencher-molekül (hier TAMRA) gekoppelt. Erreicht die Taq-Polymerase bei der Extension der Primer das 5'-Ende der Sonde, so wird diese durch die intrinsische 5'-3'-Nukleaseaktivität der Polymerase gespalten und das Quencher-molekül vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt. Die nun emittierte Fluoreszenz-Signalstärke ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge und wird während der PCR-Reaktion (real-time) graphisch als Funktion der Zyklenzahl dargestellt.

2.9.4 Durchführung der RT-PCR

Die reverse Transkription wurde mit 500 ng isolierter und gereinigter RNA (siehe Kapitel 2.9.2) mit einem enhanced avian reverse transcription kit (Signal Aldrich, Seelze) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Transkription wurden 50 ng cDNA in Taqman[®] Universal Mastermix (P/N4304437, Applied Biosystems, Darmstadt) aufgenommen und die COX-2-spezifische Sonde und Primer nach dem Protokoll des Herstellers zugegeben. Die für die Taqman[®]-PCR optimale Sequenz der Primer und der Sonde wurde mit Hilfe der Primer-Express Software (Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelt. Primer und Sonde wurden von MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Die optimierte Konzentration betrug für die Sonde 200 nM, für die Primer je 300 nM.

Folgende COX-2-Primer- und Sondensequenzen wurden verwendet:

forward-primer: 5'- GTT CCC ACC CAT CTC AAA AC - 3'

reverse-primer: 5'- CAA CGT TCC AAA ATC CCT TG - 3'

Sonde: 5'- FAM-TTC TGA AAC CCA CTC CAA ACA CAG TGC- TAMRA - 3'

Die RT-PCR der COX-2 wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz (25 µl):

300	nM	COX-2-forward-primer
300	nM	COX-2-reverse-primer
200	nM	COX-2-Sonde
50	ng	cDNA
12,5	µl	Taqman Universal Mastermix [®]
ad 25	µl	mit Aqua dest.

Reaktionsbedingungen:

Amplifizierung:	2 Min.	50 °C	}	Initiale Aktivierung der Enzyme
	10 Min.	95 °C		
	15 s	95 °C	}	40 Zyklen
	1 Min.	60 °C		

Zur relativen Quantifizierung wurde in den identischen Proben der relative Gehalt an 18S-RNA bestimmt.

Reaktionsansatz (25 µl):

1,25	µl	PDAR [®] system control (enthält 18S-RNA-primer und Sonde)
50	ng	cDNA
12,5	µl	Taqman Universal Mastermix [®]
ad 25	µl	mit Aqua dest.

Reaktionsbedingungen:

Amplifizierung:	2 Min.	50 °C	}	Initiale Aktivierung der Enzyme
	10 Min.	95 °C		
	15 s	95 °C	}	40 Zyklen
	1 Min.	60 °C		

2.9.5 Berechnung der relativen mRNA-Menge

Der Gehalt an COX-2-mRNA in den verschiedenen Caco-2-Zellpräparationen wurde zunächst gegen den Gehalt an 18S-RNA standardisiert und der Gehalt an COX-2-mRNA in hCOX-2-sense- und hCOX-2-antisense-Zellen auf den Gehalt in pcDNA-Zellen (als 1 festgelegt) bezogen (relative Quantifizierung). Zur Berechnung der in den Proben enthaltenen relativen Mengen an COX-2-mRNA wurde daher sowohl die Amplifikation des Zielgens (COX-2), als auch die des Referenzgens (18S-RNA) gemessen und mit der Fit-Point-Methode des Taqman[®]-Instrumentes analysiert. Dabei wird eine horizontale Linie in die exponentielle Phase des gemessenen Fluoreszenzsignals gelegt. An den Schnittpunkten der Fluoreszenzsignale verschiedener Proben (c_t -Werte) mit einer horizontalen Linie liegt die gleiche Fluoreszenzintensität und somit die gleiche momentane DNA-Menge vor.

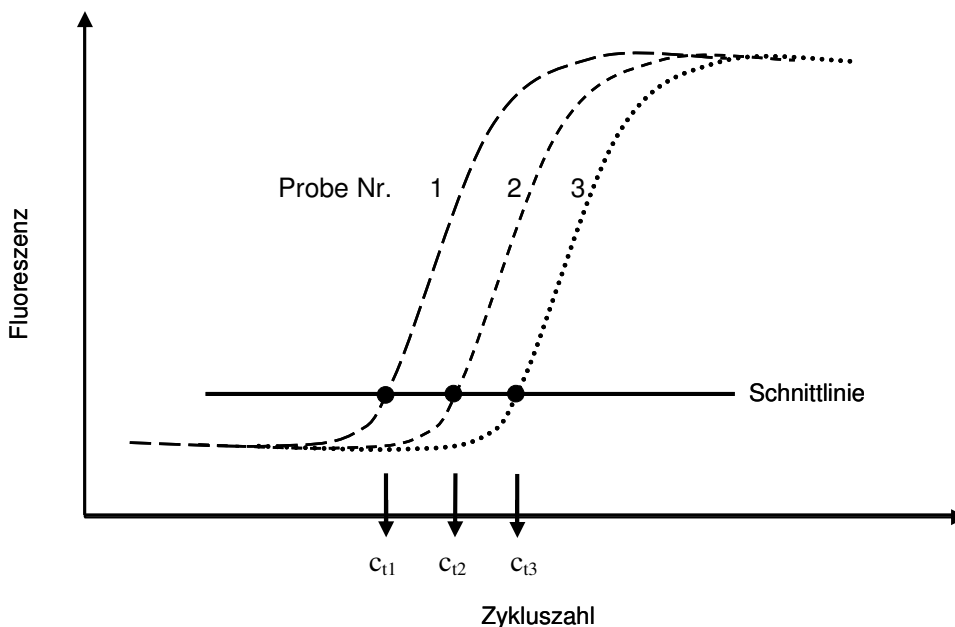


Abbildung 2.1: PCR-Quantifizierung mittels der Fit-Point-Methode des Taqman[®]-Instrumentes. An den Schnittpunkten der Fluoreszenzsignale der drei Proben mit der horizontalen Linie liegt die gleiche Fluoreszenzintensität und somit die gleiche momentane DNA-Menge vor.

Der relative COX-2-mRNA-Gehalt konnte durch Einsetzen der entsprechenden c_t -Werte in die folgende Gleichung (Herleitung siehe auch (Livak and Schmittgen, 2001)) errechnet werden:

$$\text{rel. mRNA} = 2^{-\Delta C_t(\text{COX-2})} / 2^{-\Delta C_t(18S)} \text{ wobei}$$

$$\Delta C_t(\text{COX-2}) = C_t^{\text{COX-2 (hCOX-2-s, hCOX-2-as)}} - C_t^{\text{COX-2 (pcDNA)}} \text{ und}$$

$$\Delta C_t(18S) = C_t^{18S(\text{hCOX-2-s, hCOX-2-as})} - C_t^{18S(\text{pcDNA})}.$$

2.10 Colony-forming-assay

Jeweils 500 Caco-2-Klone wurden in 5 cm Schalen ausgesät und für 16 Stunden bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere zehn Tage mit steigenden Konzentrationen (0, 20, 30, 35, 40, 45 µM) an Celecoxib behandelt. Danach wurden die Zellen mit 100% Methanol fixiert und die Kolonien mit Giesma-Kristallviolettlösung angefärbt. Der Zahl der Kolonien in den Kontrollschalen ohne Celecoxib wurde 100% Überlebensrate zugeordnet und die Zahl der Kolonien in den behandelten Schalen in prozentuale Relation zu den Kontrollschalen gesetzt.

Giesma-Kristallviolettlösung: 0,5% Kristallviolett
5% Giemsa
in Aqua dest.

2.11 WST-Proliferationstest

2.11.1 Prinzip des WST-Proliferationstests

Der WST-Proliferationstest beruht auf der Umwandlung einer extern zugeführten Tetrazolium-Verbindung zu einer Formazan-Verbindung durch mitochondriale Enzyme stoffwechselaktiver Zellen. Im Gegensatz zum Tetrazolium-Salz absorbiert die Formazan-Verbindung kurzwelliges Licht im Bereich von 350 nm bis 500 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 450 nm liegt. Die Bildung der Formazan-Verbindung ist daher proportional zur Anzahl lebender und stoffwechselaktiver Zellen.

2.11.2 Durchführung des WST-Proliferationstests

HCT-116- und HCA-7-Zellen wurden zunächst in 96-Loch-Platten (5x10³ Zellen in 100 µM Medium/Loch) für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit frischem Medium und steigenden Konzentrationen an Coxiben (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µM für Rofecoxib, Celecoxib und Methylcelecoxib; 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µM für Etoricoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib) für 20 Stunden behandelt. Die Wahl des niedrigeren Konzentrationsbereiches erklärt sich bei Celecoxib und Methylcelecoxib durch die in Vorexperimenten bereits beobachteten starken antiproliferativen Effekte. Bei Rofecoxib ergaben sich die niedrigeren Bereiche durch die eingeschränkte Löslichkeit bei Konzentrationen ≥ 100 µM. Nach der Coxibbehandlung wurden 10 µl WST-Reagenz/Loch hinzugegeben, die Platten 1,5 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und für 1 Minute auf einem Schüttler (Titramax 100T, Heidolph, Schwabach) geschwenkt. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm mit einem ELISA-reader

(SPECTRAFluor Plus, Tecan, Crailsheim) gemessen. Die Absorption der unbehandelten Zellen wurde als Index für 100%ige Lebensfähigkeit definiert und die Absorption der Löcher mit behandelten Zellen prozentual auf diesen Wert bezogen.

2.12 Darstellung der Induktion von Apoptose und Zellzyklusblockade mittels Durchflusszytometrie

2.12.1 Durchflusszytometrische Messung mit vorherigem Hungern der Zellen

Näherungsweise 5×10^5 Caco-2-Klone wurden in 10 cm Kulturschalen ausgesät und in 10% FCS-haltigem DMEM-Medium für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Synchronisation in der G₁-Phase in Hungermedium (DMEM-Medium ohne FCS) überführt und für 48 Stunden inkubiert. Am dritten Tag wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen an Celecoxib (0, 25, 50, 75, 100 µM) für 20 Stunden in Medium mit FCS behandelt. Am vierten Tag wurden die Zellen abtrypsinisiert, zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und in 80% Ethanol für mindestens 2 Stunden bei -20 °C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung für 5 Minuten in PBS/0,125% Triton X-100 inkubiert und schließlich die DNA mit 10 µg/ml Ethidiumbromid in Anwesenheit von 200 µg/ml RNase A in PBS angefärbt. Für die Zellzyklusanalyse wurden 10.000 Zellen in der G₁-Phase mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, Beckton Dickinson, Heidelberg) gezählt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der CellQuest 9.0 Software (Beckton Dickinson, Heidelberg) oder mit WinMDI 2.8.

2.12.2 Durchflusszytometrische Messung ohne vorherigem Hungern der Zellen

Näherungsweise $4,5 \times 10^5$ HCT-116-Zellen oder $5,5 \times 10^5$ HCA-7-Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen ausgesät und in 10% FCS-haltigem DMEM-Medium für 72 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am dritten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit steigenden Konzentrationen an COX-2-Inhibitoren (0, 20, 40, 60, 80, 100 µM für Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Etoricoxib und Lumiracoxib; 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µM für Methylcelecoxib) für jeweils 20 Stunden behandelt. Die weitere Verarbeitung der Proben gleicht der unter Kapitel 2.12.1 beschriebenen Methode.

2.13 Proteinanalytik

2.13.1 Herstellung von löslichen Gesamtproteinextrakten und Membranextrakten

Die behandelten Zellen wurden auf der Kulturschale zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und dann für eine Minute bei 11.000 g abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Nach dem Suspendieren in Ultraschallpuffer wurden die Zellen samt Organellen mit Ultraschallwellen (Branson Sonifier 250, G. Heinmann, Schwäbisch Gmünd) aufgebrochen und die Suspension anschließend bei 21.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit Ultraschallpuffer einmal gewaschen, in 15 µl SDS-haltigem Lämmli-puffer (siehe Kapitel 2.13.5) suspendiert und für die Analyse der Membranextrakte (siehe Kapitel 3.2) auf ein Gel aufgetragen. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mit der Methode nach Bradford (siehe Kapitel 2.13.4) bestimmt und Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

<u>Ultraschallpuffer:</u>	20	mM Tris/HCl pH 8,5
	1	mM EDTA
	1	mM Mercaptoethanol
	1	mM PMSF
	2	mM DTT

2.13.2 Herstellung von Kernextrakten

Die behandelten Zellen wurden auf der Kulturschale zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und dann für eine Minute bei 11.000 g abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Zelllysispuffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 53 µl 10%iger Nodinet[®]-P40- (NP-40) Lösung erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 2 Minuten. In Anwesenheit von NP-40 werden die Zellmembranen, nicht jedoch die Zellkerne, lysiert und das Zytoplasma in den Zelllysispuffer freigesetzt. Bei der anschließenden Zentrifugation mit 650 g für 5 Minuten sedimentieren ausschließlich die Zellkerne aufgrund ihrer hohen spezifischen Dichte, während die übrigen Zellbestandteile in der Lösung verbleiben. Nach dem Waschen in 500 µl Zelllysispuffer wurde das Kernpellet in ca. 2 Volumen KCl-haltigem Kernlysispuffer zügig resuspendiert und für ca. 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 21.000 g für 10 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, mit 1 Volumen KCl-freiem Kernlysispuffer verdünnt und Glycin zu einer Endkonzentration von ca. 20% zugegeben. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mit der Methode nach Bradford (siehe Kapitel 2.13.4) bestimmt, Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zelllysispuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.4
10 mM NaCl
3 mM MgCl₂

Kernlysispuffer mit KCl: 20 mM HEPES
600 mM KCl
0,2 mM EDTA
2 mM DTT
1 mM PMSF

2.13.3 Herstellung von Zytosolextrakten

Die behandelten Zellen wurden auf der Kulturschale je einmal mit 10 ml kaltem PBS und 10 ml Zytosolextraktionspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Zytosolextraktionspuffer aufgenommen und mit einem dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Durch diese Behandlung werden die Zellmembranen aufgebrochen, während die Zellkerne sowie die übrigen Organellen weitgehend unversehrt bleiben. Nach der Zentrifugation der Suspension bei 21.000 g für 10 Minuten (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand abgenommen und der Proteingehalt mit der Methode nach Bradford (siehe Kapitel 2.13.4) bestimmt und Aliquots bei -80 °C aufbewahrt. Die Aufbereitung der Zytosolextrakte erfolgte nach einer von Li et al. (Li et al., 2001) beschriebenen Methode.

Zytosolextraktionspuffer: 0,25 M Saccharose
30 mM Tris-HCl pH 7,9
1 mM EDTA
1 mM PMSF
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Pepstatin
1 µg/ml Aprotinin

Sammelgel 5% (1 Gel):

- 1,2 ml Aqua dest.
- 0,5 ml Tris-HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8)
- 0,25 ml Acrylamidlösung (rotiphorese® Gel 30, Roth, Karlsruhe)
- 20 µl SDS-Lösung (10%)
- 20 µl APS-Lösung (10%)
- 2 µl TEMED

Lämmli-puffer (4-fach):

- 1,0 g SDS
- 0,24 g Tris
- 0,1 g Bromphenolblau
- 4 ml Glycerol
- ad 10 ml mit Aqua dest.
- q.s. konzentrierte Salzsäure (zur Einstellung von pH 6,8)
- 20% β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)

Elektrophoresepuffer:

- 15 g Glycin
- 3 g Tris
- 1 g SDS
- ad 1 l mit Aqua dest.

2.13.6 Western Blot der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach der Burnette-Methode (Burnette, 1981) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond[®], Amersham, Freiburg) überführt. Der Transfer erfolgte nach einer kurzen Äquilibration von Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel), Membran und Gel in Transferpuffer mit einer Trans-Blot[®] Semi-Dry-Transferzelle (Bio-Rad, München) bei einer konstanten Spannung von 12 V über 20 min. Alternativ wurde auch eine Mini Trans-Blot[®]-Transferzelle (Bio-Rad, München) bei einer konstanten Spannung von 100 V über 1 Stunde verwendet. Unmittelbar danach wurden der Proteintransfer und die gleichmäßige Proteinbeladung durch eine reversible Färbung der Membran mit Ponceau-Lösung kontrolliert und mittels Lichtfotokopie dokumentiert. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nun über Nacht bei 4 °C in 5% Magermilchpulver in PBS inkubiert. Bei späterer Verwendung von in Ziege generierten Antikörpern wurde die Membran alternativ in Odyssey[®]-Blockpuffer (LI-COR, Bad Homburg) über Nacht eingelegt, da die sekundären anti-Ziege-Antikörper Kreuzreaktionen mit Bestandteilen der Milch aufweisen.

Transferpuffer:

5,81 g	Tris
2,93 g	Glycin
200 ml	Methanol
0,37 g	SDS
ad 1l	mit Aqua dest.

Ponceau-Lösung:

3%	Trichloressigsäure
0,1%	Ponceau S
	in Aqua dest.

Blockpuffer:

5% Magermilchpulver in PBS-Puffer oder
Odyssey [®] blocking buffer (LI-COR, Bad Homburg)

2.13.7 Antikörper-Inkubation der Nitrozellulosemembran

Die Membran wurde zusammen mit dem in 5 ml Blockpuffer/0,1% Tween aufgenommenen Primärantikörper in eine Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte auf einem Überkopfmischer (Reax[®]-2, Heidolph, Schwabach) unter ständigem Umschütteln über einen Zeitraum von 2 Stunden. Die gegen COX-2 und p-GSK-3 β gerichteten Primärantikörper wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran aus der Folie entnommen, auf einem Schüttler (GFL-3005[®], GFL, Burgwedel) dreimal für 10 Minuten in PBS/0,1% Tween gewaschen und für 1 Stunde mit dem in 25 ml Blockpuffer/0,1% Tween aufgenommenen Sekundärantikörper inkubiert.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

	<u>Name:</u>	<u>Verdünnung:</u>	<u>Lieferant:</u>
<u>Primärantikörper:</u>	Beta-Catenin, Ziege polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	Caspase-3, Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	Caspase-9, Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	COX-2, Maus monoklonal	1:1000	Cayman, Ann Arbor, USA
	Cyclin A, Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	Cyclin B1, Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	Cyclin D1, Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	Cytochrom C, Maus monoklonal	1:500	Pharmingen, San Diego, CA
	ERK-2, Maus monoklonal	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg
	GSK-3 β , Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	GSK-3 β (p-ser-9), Ziege polyklonal	1:100	Santa Cruz, Heidelberg
	PARP, Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	p21, Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	p27, Hase polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
	<u>Sekundärantikörper:</u>	Ziege, anti-Hase IgG-HRP	1:20.000
Ziege, anti-Maus IgG-HRP		1:10.000	Santa Cruz, Heidelberg
Esel, anti-Ziege IgG-HRP		1:40.000	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege, anti-Maus IgG IRDye		1:10.000	Molecular probes, Leiden, Niederlande
Ziege, anti-Hase IgG IRDye		1:10.000	Molecular probes, Leiden, Niederlande
Esel, anti-Ziege IgG IRDye	1:10.000	Molecular probes, Leiden, Niederlande	

2.13.8 Detektion der Peroxidase- und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper

Nach der Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase (HPR) oder Fluoreszenzfarbstoff (IRDye) konjugierten Sekundärantikörper wurde die Membran viermal für 5-10 Min. mit PBS/0,1% Tween gewaschen. Die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte mittels Chemilumineszenz-Reaktion mit dem ECL[®]-System (Amersham, Freiburg) nach Herstellerangaben. Die Membranen wurden anschließend auf einen lichtempfindlichen Film (Hyperfilm[®], Amersham) gelegt und je nach gewünschter Signalintensität mehrere Sekunden oder Minuten inkubiert. Die Banden wurden schließlich mit Ultrafin[®]-liquid-Entwickler und Superfix[®]-Fixierer (Tetenal, Norderstedt) sichtbar gemacht.

Die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper wurden mit dem Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR, Bad Homburg) detektiert.

2.14 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

2.14.1 Messprinzip

Mit der EMSA-Methode kann die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren an DNA-Konsensussequenzen innerhalb von Promotoregionen gemessen werden. Hierzu werden Kernproteinextrakte mit radioaktiv-markierten Konsensus-Oligonukleotiden inkubiert, die entstandenen Protein-Oligonukleotid-Komplexe mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt.

2.14.2 Annealing der Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden für die Messung der Beta-Catenin-DNA-Bindungsaktivität verwendet:

<u>Transkriptionsfaktor:</u>	<u>Sequenz der Oligonukleotide:</u>	<u>Hersteller:</u>
Beta-Catenin	5´- AGTGG <u>CCTTTGATCT</u> AGT- 3´ 5´- ACTAGATCAAAGGCCACT- 3´	MWG-Biotec GmbH, Ebersberg

Zunächst wurden die Oligonukleotide in annähernd äquimolarem Verhältnis (ca. je 250 pmol) in einem Eppendorfgefäß vereint und das Gefäß in ein Becherglas mit 2 Liter Wasser von 80 °C gegeben. Das Becherglas wurde nun über Nacht stehen gelassen, so dass die Wassertemperatur innerhalb mehrerer Stunden auf Raumtemperatur abfiel.

2.14.3 Herstellung der radioaktiv-markierten Oligonukleotide

Das Prinzip der radioaktiven Markierung der Oligonukleotide besteht in einer 5´-terminalen Phosphorylierung durch eine Polynukleotidkinase (PNK) unter Verbrauch von ³²P-γ-ATP.

<u>Reaktionsansatz :</u>	1-5 µl	Oligonukleotid (2,5 pmol gesamt)
	2 µl	PNK Puffer 10x
	1,5-3 µl	³² P-γ-ATP
	1 µl	PNK (10 U/µl)
	ad 20 µl	Aqua dest.

Der Ansatz wurde nun für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

80	µl	Aqua dest.
100	µl	4 M NH ₄ OAc (pH 7,2)
2	µl	1 M MgCl ₂
5	µl	yeast t-RNA (≅ 10 µg)
500	µl	Ethanol 100% (2,5-fach)

Die markierten Oligonukleotide wurde nun über Nacht bei -20 °C gefällt und dann bei 21.000 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun abgenommen, das Pellet kurz angetrocknet und in 100 µl Aqua dest. aufgenommen.

2.14.4 Auftrennung der Oligonukleotid-Protein-Komplexe mittels Gelelektrophorese

Jeweils 5 µg Kernextrakt (vgl. 2.13.2) wurden in EMSA-Bindungspuffer in Anwesenheit von 25 fmol [³²P]-ATP-markiertem Oligonukleotid für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nukleotid/Protein-Komplexe wurden anschließend auf einem 4%igen nativen Polyacrylamid-Gel bei 100 V und Raumtemperatur mit einer Laufzeit von 2,5 Stunden von restlichen Proteinen und freiem Oligonukleotid getrennt.

<u>EMSA-Bindungspuffer:</u>	10%	Glycerol
	10 mM	HEPES KOH, pH 7.9
	50 mM	KCl
	4 mM	MgCl ₂
	4 mM	Tris-HCl
	0,5 mM	DTT
	0,5 mM	EDTA

<u>Reaktionsansatz:</u>	1	µl	BSA (Rinder-Albumin, 10 µg/ml)
	1	µl	poly dI-dC (1 µg/ml)
	1	µl	³² P-γ-ATP-Oligonukleotidlösung (siehe Kapitel 2.14.3)
	3,2	µl	EMSA-Bindungspuffer
	ad 15	µl	mit Aqua dest.
	5	µg	Kernextrakt

<u>4%iges EMSA-Gel:</u>	5 ml	Acrylamidlösung (rotiphorese® Gel 40, Roth, Karlsruhe)
	1 ml	10x TBE-Puffer
	34 ml	Aqua dest.
	400 µl	APS (10% in Aqua dest.)
	40 µl	TEMED
<u>10x TBE-Puffer:</u>	108 g	Tris
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA
	ad 1 l	mit Aqua dest.

Die radioaktiven Gele wurden anschließend getrocknet (gel dryer 698, Bio-Rad, München) und die Banden autoradiographisch mit dem BAS-1500 phosphoimaging system (Fujifilm, Düsseldorf) dargestellt. Für die Supershift-Experimente wurden 5 µg Kernextrakt aus unbehandelten Caco-2-Zellen mit 2 µg Supershift-Antikörper für 1 Stunde bei 4 °C vorinkubiert und der Extrakt wie oben geschrieben weiterverarbeitet. Es wurden folgende Supershift-Antikörper verwendet:

<u>Supershift-Antikörper:</u>	<u>Hersteller:</u>
Lef-1, Ziege, polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
TCF-1, Hase, polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
TCF-4, Ziege polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
p-c-Jun, Maus monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg

Für die Kompetitions-Experimente wurde 5 µg Kernextrakt in Anwesenheit von 25 fmol [³²P]-ATP-markiertem Oligonukleotid und steigenden Konzentrationen an kaltem (nicht radioaktiv-markiertem) Oligonukleotid (1-fach, 10-fach und 100-facher Überschuss im Vergleich zum markierten Oligonukleotid) inkubiert. Die Proben wurden dann wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

2.15 Immunzytochemie

Näherungsweise 2×10^5 Zellen wurden in 5 cm Schalen auf Mikroskop-Deckgläsern ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann für verschiedene Zeiten (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 Stunden) mit 100 µM Celecoxib behandelt, danach dreimal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei 4 °C für 5 Minuten fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit PBS/0,1% Triton X-100 für 5 Minuten permeabilisiert und einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun über Nacht in der PBS/3% BSA-Blocklösung inkubiert und anschließend mit dem primären Beta-Catenin-Antikörper (1:100 in PBS/1% BSA) behandelt. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser mit PBS erfolgte zunächst die Behandlung mit dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000 in PBS/0,1% BSA, Sigma-Aldrich, Seelze), anschließend die Inkubation mit 1 µg/ml DAPI in PBS für 5 Minuten zur spezifischen Anfärbung der Zellkerne. Nach fünfmaligem Waschen mit 5 ml PBS wurden die Deckgläser schließlich mit klarem Nagellack auf den Objektträgergläsern fixiert und unter einem eclipse®- 600 Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon, Tokyo, Japan) in 1000-facher Vergrößerung betrachtet.

2.16 Statistik

Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel® 2000 und SPSS® für Windows 9.01. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Die IC₈₀- und IC₅₀-Werte wurden mit Hilfe eines sigmoidalen E_{max}-Modells berechnet und einer univariaten Analyse der Varianz (ANOVA) und einem T-Tests unter Verwendung einer Bonferroni α -Korrektur für multiple Vergleiche ($\alpha = 0.05$) unterzogen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib in COX-2-transfizierten Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen

3.1.1 Ziel der durchgeführten Experimente

Der COX-2-selektive Inhibitor Celecoxib ist das einzige NSAID, das von der FDA für die adjuvante Behandlung von Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis zugelassen wurde. Die molekularen Mechanismen, die für die antikarzinogene Wirkung von Celecoxib verantwortlich sind, bleiben unklar, jedoch scheinen COX-2-abhängige, als auch COX-2-unabhängige Wirkmechanismen beteiligt zu sein. Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib von der COX-2-Expression der Kolonkarzinom-Zellen abhängig sind, wurden humane Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen mit pcDNA-Vektoren transfiziert, in denen die humane COX-2-cDNA sowohl in sense- (hCOX-2-sense), als auch in antisense- (hCOX-2-as) Orientierung einkloniert wurde. Die pcDNA-Kontrollzellen wurden nur mit dem leeren pcDNA-Vektor transfiziert. Caco-hCOX-2-sense-Zellen sollten nach erfolgreicher Transfektion folglich eine Überexpression der COX-2 zeigen, während die COX-2-Expression in hCOX-2-as-Zellen im Vergleich zu pcDNA- Kontrollzellen reduziert sein sollte.

3.1.2 Expression und Aktivität der COX-2 in den transfizierten Caco-2-Zellen

Als Voraussetzung für alle Experimente mit den transfizierten Caco-2-Zellen wurden zunächst Expression und Aktivität der Cyclooxygenase-2 in hCOX-2-sense- (hCOX-2-s) und hCOX-2-antisense- (hCOX-2-as) und pcDNA-Zellen überprüft. Die Western Blot-Analyse der löslichen Gesamtproteinextrakte aus unbehandelten Klonen (siehe Abbildung 3.1 A) ergab eine starke Expression der COX-2 in hCOX-2-s-Zellen, eine schwache Expression in pcDNA-Zellen und eine marginale COX-2-Expression in hCOX-2-as-Zellen. Die COX-1 war in hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen in gleichem Maß exprimiert (Resultate nicht dargestellt). Die unterschiedliche Expression der COX-2 wurde weiterhin durch Bestimmung der relativen Mengen an COX-2-mRNA in den Klonen mittels RT-PCR (siehe Abbildung 3.1 B) bestätigt. Da sowohl antisense-, als auch sense-mRNA als Matrize für die PCR-Reaktion fungieren kann, wurden erhöhte Mengen an COX-2-mRNA im Vergleich zu pcDNA-Kontrollzellen in beiden Zelltypen (hCOX-2-s und hCOX-2-as) beobachtet. Die COX-2 stellt ein Schlüsselenzym für die Synthese der verschiedenen Prostaglandine dar. Eine Überexpression der COX-2 in hCOX-2-s-Zellen sollte folglich mit erhöhten Konzentrationen an Prostaglandin E₂ (PGE₂) im Mediumüberstand einhergehen. Daher wurden die Konzentrationen an PGE₂ im Mediumüberstand der verschiedenen Klone mit einem EIA-Kit bestimmt und miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.1 C). Im Medium von pcDNA- und hCOX-2-as-Zellen wurden

nahezu identische Konzentrationen an PGE_2 gemessen, während das Medium von hCOX-2-s-Zellen einen ca. 3-fach höheren Gehalt an PGE_2 enthielt.

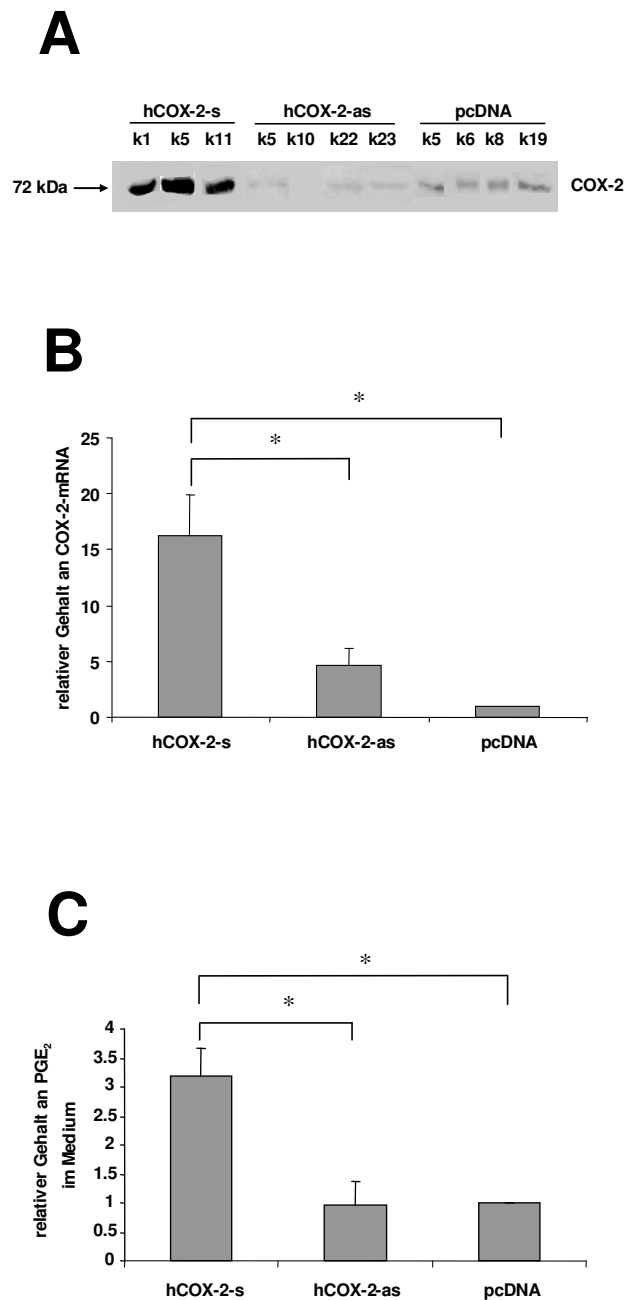


Abbildung 3.1: Untersuchungen zur Expression und Aktivität der COX-2 in den transfizierten Caco-2-Klonen. **(A)** Western Blot-Analyse der COX-2-Expression in löslichen Gesamtproteinextrakten unbehandelter hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen. **(B)** Bestimmung des relativen Gehalts an COX-2-mRNA in Caco-2-hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen mittels Taqman[®]-RT-PCR. Der Gehalt an COX-2-mRNA in hCOX-2-s- und hCOX-2-as-Zellen wurde im Verhältnis zum Gehalt in pcDNA-Kontrollzellen angegeben. Als interner Standard wurde 18S-RNA verwendet. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit verschiedenen Zell-Klonen. **(C)** Relativer Gehalt an PGE_2 im Medium von hCOX-2-s- und hCOX-2-as-Zellen im Vergleich zu pcDNA-Kontrollzellen. Die Messung wurde mit einem PGE_2 -Correlate EIA[™]-Kit durchgeführt und der Gehalt an PGE_2 auf die Zellzahl bezogen ($\text{pg PGE}_2/10^6$ Zellen). Abgebildet sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit verschiedenen Zell-Klonen. Die Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$.

3.1.3 Die Caco-2 Klone zeigen eine unterschiedliche Wachstumshemmung nach Behandlung mit Celecoxib

Um zu testen, ob die Sensitivität der Caco-2-Klone gegenüber Celecoxib von ihrem COX-2-Expressionsstatus abhängt, wurde das Wachstum der Kolonkarzinom-Zellen in Gegenwart steigender Celecoxibkonzentrationen über 10 Tage mittels des colony-forming-assay (Koloniebildungsexperiment) untersucht. Es zeigte sich, dass hCOX-2-s- und pcDNA-Zellen ($IC_{80} = 33,5 \pm 1,3 \mu M$ und $32,7 \pm 2,1 \mu M$) sensitiver auf Celecoxib reagierten und relativ weniger Kolonien bildeten als hCOX-2-as-Zellen ($IC_{80} = 39,9 \pm 1,5 \mu M$), wobei die Unterschiede zwischen hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen teils signifikant waren, $p < 0,05$ (siehe Abbildung 3.2).

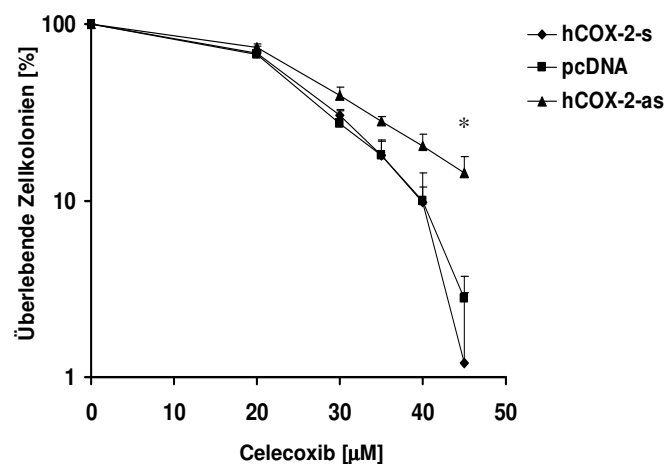


Abbildung 3.2: Überlebensrate von hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen in Gegenwart von Celecoxib. Zunächst wurden 500 Zellen in 5 cm Kulturschalen ausgesät und 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib für 10 Tage behandelt, mit Methanol fixiert, angefärbt und die Kolonien gezählt. Der Zahl der Kolonien in den Kontrollschalen ohne Celecoxib wurde 100% Überlebensrate zugeordnet und die Zahl der Kolonien in den behandelten Schalen in prozentuale Relation zu den Kontrollschalen gesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit verschiedenen Zell-Klonen. Die Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen mit $p < 0,05$.

3.1.4 Die Apoptoserate in Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib ist abhängig von ihrem COX-2-Expressionsstatus

Eine Hemmung von Zellwachstum kann zum einen durch die Induktion von Apoptose, zum anderen durch eine Hemmung der Zellzyklusprogression verursacht werden. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher untersucht, inwieweit Celecoxib Apoptose oder eine Zellzyklusblockade in den transfizierten Caco-2-Zellen induziert. Mittels Durchflusszytometrie wurde zunächst die Apoptoserate der Zellen nach Behandlung mit Celecoxib bestimmt. In fortgeschrittenen Stadien der Apoptose kommt es zur Bildung von apoptotischen Vesikeln, die durch ihren Gehalt an fragmentierter DNA in der zytometrischen Analyse als separate SubG₁-Fraktionen erscheinen. Wie in Abbildung 3.3 und Tabelle 3.1 zu erkennen, wurden in hCOX-2-s- und pcDNA-Zellen unter Behandlung mit hohen Konzentrationen an Celecoxib (75 und 100 µM) stärkere Apoptoseraten beobachtet als bei hCOX-2-as-Zellen.

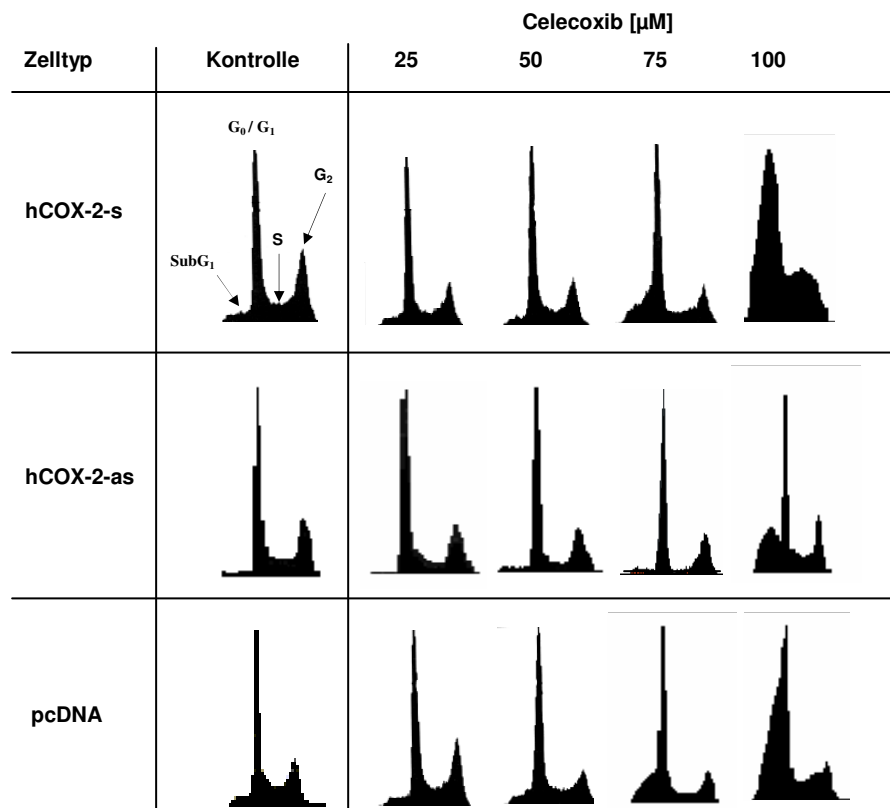


Abbildung 3.3: Zellzyklusanalyse von hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib für 20 Stunden. Nach der Inkubation wurden die Zellen abtrypsinisiert, in Ethanol fixiert, die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und die Zellzyklusverteilung der Zellen zytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Zell-Klonen.

hCOX-2-s	Celecoxib [μM]	SubG ₁ [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ [%]
	Kontrolle	3.71 ± 0.67	45.21 ± 2.79	14.78 ± 1.67	32.03 ± 3.67
	25	6.14 ± 1.65	51.63 ± 2.95	11.87 ± 0.13	30.13 ± 4.13
	50	6.1 ± 1.27	56.02 ± 1.04 *	11.92 ± 0.39	27.16 ± 2.28
	75	17.43 ± 0.57 *	52.07 ± 2.02	9.42 ± 1.32 *	18.11 ± 1.84 *
	100	32.5 ± 0.77 *	38.01 ± 2.27	10.45 ± 1.18	18.27 ± 3.06 *

hCOX-2-as	Celecoxib [μM]	SubG ₁ [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ [%]
	Kontrolle	3.76 ± 0.76	52.43 ± 1.54	14.76 ± 0.69	27.76 ± 1.33
	25	3.86 ± 0.94	54.62 ± 1.2	14.12 ± 1.44	27.32 ± 1.91
	50	3.33 ± 0.31	58.16 ± 2.57	11.37 ± 1.49	24.06 ± 2.85
	75	6.07 ± 0.94	59.28 ± 1.85 *	7.92 ± 0.32 *	21.86 ± 3.77
	100	19.19 ± 2.93 *	46.94 ± 3.48	9.81 ± 1.78 *	18.26 ± 5.49

pcDNA	Celecoxib [μM]	SubG ₁ [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ [%]
	Kontrolle	4.55 ± 0.52	56.52 ± 1.61	15.5 ± 1.38	22.16 ± 0.59
	25	3.38 ± 0.87	58.5 ± 1.77	15.53 ± 0.61	21.03 ± 1.33
	50	6.7 ± 1.1	68.9 ± 5.54	10.62 ± 2.96	13.22 ± 2.54 *
	75	18.81 ± 4.08 *	62.59 ± 3.79	5.09 ± 0.85 *	12.88 ± 2.16 *
	100	31.17 ± 2.58 *	41.79 ± 5.57	9.43 ± 1.34 *	11.56 ± 1.44 *

Tabelle 3.1: Zellzyklusverteilung von hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen an Celecoxib für 20 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Zell-Klonen. Die Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede von behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen mit $p < 0,05$.

Im nächsten Schritt wurde die Induktion von Apoptose mittels Western Blot-Analyse auf molekularer Ebene untersucht. Ein Kennzeichen für fortgeschrittene Stadien des programmierten Zelltodes ist die Spaltung der Poly(ADP)-Ribose Polymerase (PARP). PARP (112 kDa) ist ein nukleares DNA-Reparaturenzym, das durch die aktiven Caspasen-3, -6 und -7 in ein 29 und 85 kDa großes Fragment proteolytisch gespalten wird. Nach 20-stündiger Celecoxib-Behandlung war diese Spaltung in hCOX-2-s-Zellen bereits bei Konzentrationen von 60 μM , in pcDNA-Zellen bei 80 μM und in hCOX-2-as-Zellen erst bei einer Konzentration von 100 μM Celecoxib deutlich zu beobachten (siehe Abbildung 3.4).

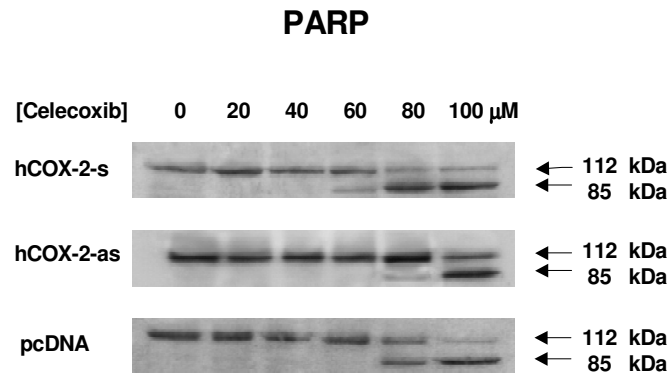


Abbildung 3.4: Western Blot-Analyse der PARP-Spaltung in löslichen Gesamtproteinextrakten aus hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib für 20 Stunden. Es wurde ein polyklonaler Antikörper gegen humane PARP verwendet, der sowohl das Holoenzym (112 kDa), als auch das Spaltprodukt (85 kDa) erkennt. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung kontrolliert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment dreier unabhängiger Experimente mit verschiedenen Zell-Klonen.

Da die PARP von Mitgliedern der Caspase-3-Familie gespalten wird, wurde im nachfolgenden Experiment die Aktivierung von Caspase-3 und vorgeschalteter apoptotischer Signale (Caspase-9-Aktivierung und Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien) mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 3.5). Nach Behandlung der Zellen mit 100 μ M Celecoxib wurde eine Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-9 sowie eine Freisetzung von Cytochrom C bereits nach 0,5 Stunden Inkubationsdauer beobachtet, wobei diese Effekte in hCOX-2-as-Zellen schwächer ausgeprägt waren als in hCOX-2-s- und pcDNA-Zellen.

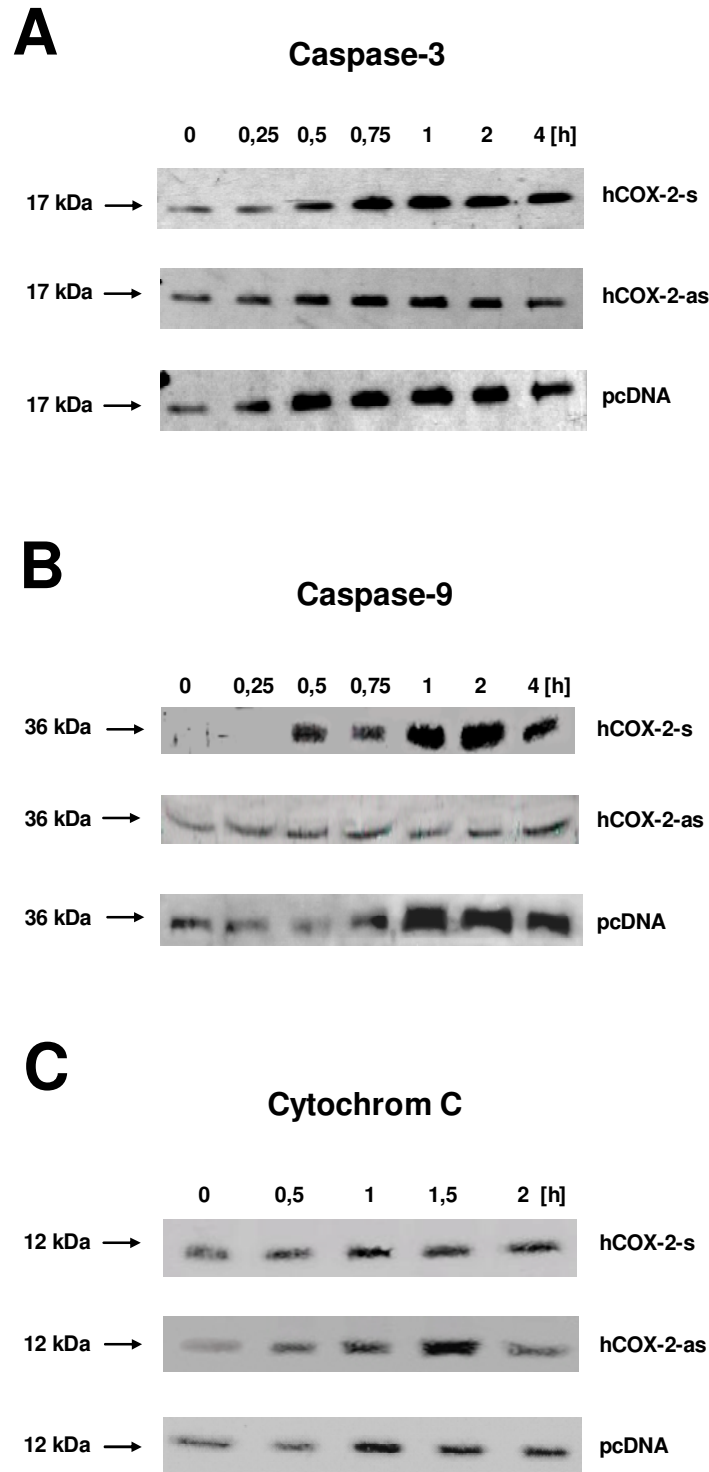


Abbildung 3.5: (A) und (B) Western Blot-Analyse der Caspase-3- und -9-Aktivierung in löslichen Gesamtproteinextrakten aus hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen nach Behandlung mit 100 μ M Celecoxib für die angegebenen Zeiten. Es wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der jeweils die aktiven Untereinheiten der Caspasen erkennt. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung kontrolliert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment dreier unabhängiger Experimente mit verschiedenen Zell-Klonen. (C) Western Blot-Analyse der Freisetzung von Cytochrom C in hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen nach Behandlung mit 100 μ M Celecoxib für die angegebenen Zeiten. Für dieses Experiment wurden zytosolische Extrakte analysiert. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Zell-Klonen.

3.1.5 Die Induktion einer Zellzyklusblockade in den COX-2-transfizierten Caco-2-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib erfolgt COX-2-unabhängig

Neben der Auslösung von Apoptose werden die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib auch eng mit der Induktion einer Zellzyklusblockade in den Tumor-Zellen in Verbindung gebracht. Mittels Durchflusszytometrie (vergleiche Abbildung 3.3 und Tabelle 3.1) konnte gezeigt werden, dass durch steigende Konzentrationen an Celecoxib (0-75 μM) in allen drei Zell-Klonen die Zahl der Zellen in der G₁-Phase zu ähnlichem Ausmaß signifikant erhöht, die Zahl der Zellen in der S- und G₂-Phase jedoch zu ähnlichem Ausmaß signifikant erniedrigt wurde. Um die gewonnenen zytometrischen Ergebnisse auch auf molekularer Ebene bestätigen zu können, wurde im nächsten Schritt die Expression von Schlüsselproteinen der Zellzyklusregulation mittels Western Blot-Analyse untersucht. Nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen an Celecoxib für 20 Stunden kam es in allen drei Zell-Klonen in gleichem Maße zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Expression von Cyclin A und Cyclin B1, die eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklusprogression besitzen (siehe Abbildung 3.6).

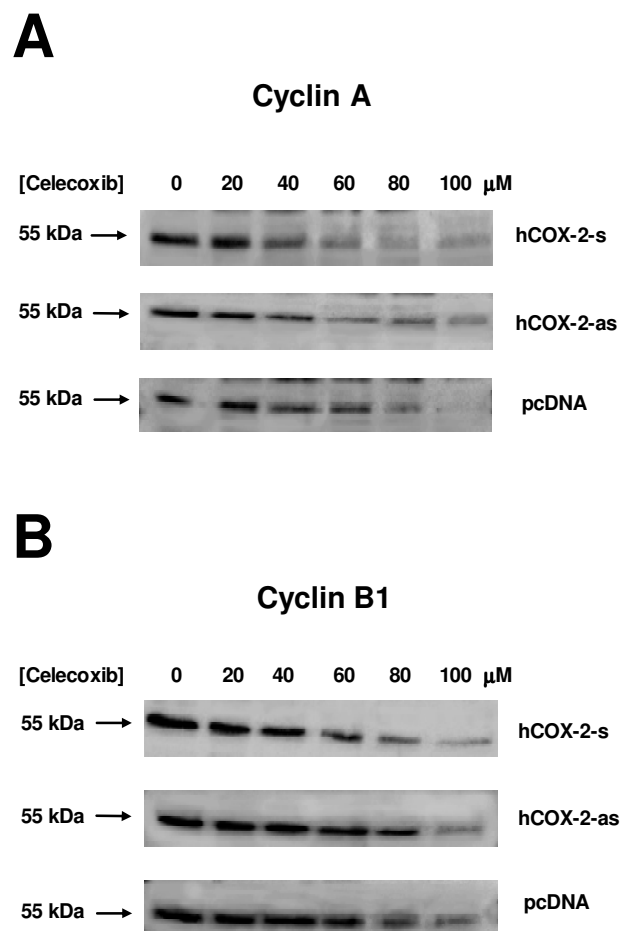


Abbildung 3.6: Western Blot-Analyse der Cyclin A- (A) und Cyclin B1-Expression (B) in löslichen Gesamtproteinextrakten aus hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib für 20 Stunden. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment dreier unabhängiger Experimente mit verschiedenen Zell-Klonen.

Ferner kam es unter gleichen Versuchsbedingungen in allen drei Zell-Klonen zu einer ausgeprägten Hochregulation der Expression der Proteine p21 und p27, die starke Inhibitoren des G₁-S-Überganges sind. Wie beim Cyclinabbau wurden auch im Falle der Hochregulation von p21 und p27 keine signifikanten Unterschiede zwischen hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen beobachtet (siehe Abbildung 3.7).

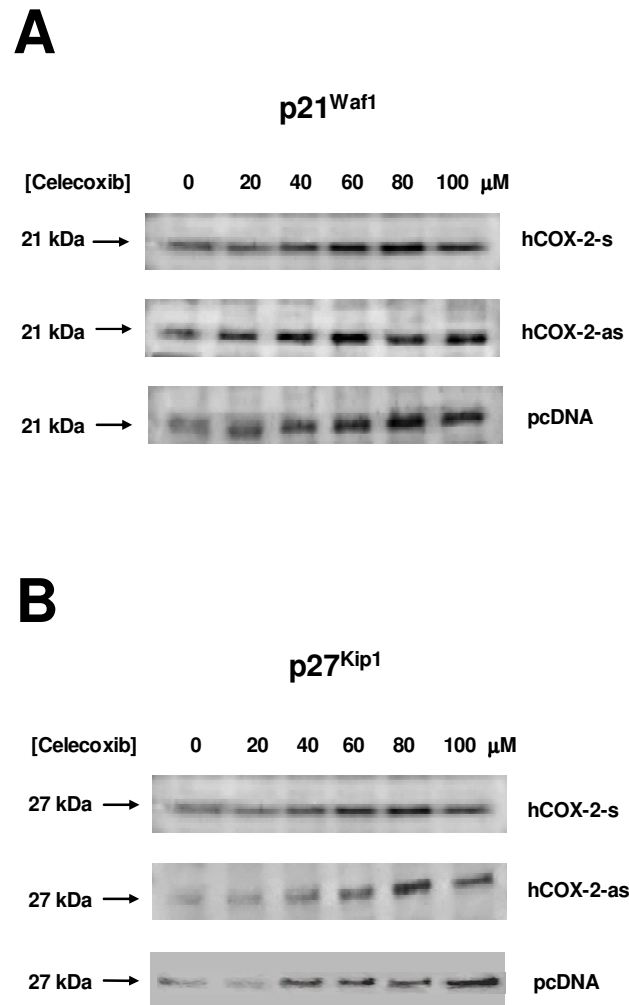


Abbildung 3.7: Western Blot-Analyse der Expression der Proteine p21 (A) und p27 (B) in löslichen Gesamtproteinextrakten aus hCOX-2-s-, hCOX-2-as- und pcDNA-Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib für 20 Stunden. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment dreier unabhängiger Experimente mit verschiedenen Zell-Klonen.

3.2 Der Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg als COX-2-unabhängiger Angriffspunkt von Celecoxib in humanen Kolonkarzinom-Zellen

3.2.1 Ziel der durchgeführten Experimente

Biochemische Untersuchungen von kolorektalen Polypen oder von Karzinomgewebe aus Patienten konnten zeigen, dass Mutationen im APC- oder Beta-Catenin-Gen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von kolorektalen Tumoren zukommt (Fujimori et al., 2001; Sparks et al., 1998). Weiterhin spielt der Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Apoptose (Zhang et al., 2001) und Zellzyklusprogression (Heinen et al., 2002). Daher wurde im Weiteren untersucht, ob Celecoxib einen Einfluss auf den Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg besitzt. Zunächst wurden humane Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen mit 100 µM Celecoxib für verschiedene Zeiten behandelt und die Expression von Beta-Catenin in verschiedenen zellulären Fraktionen mittels Western Blot-Analyse untersucht.

3.2.2 Die Behandlung humaner Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen mit Celecoxib beeinflusst die Expression der Proteine Beta-Catenin und E-Cadherin

Nach Behandlung von Caco-2-Zellen mit 100 µM Celecoxib wurde in löslichen Gesamtproteinextrakten ein zeitabhängiger Anstieg der Beta-Catenin-Spiegel zwischen 0 und 6 Stunden Behandlungsdauer beobachtet. Längere Inkubation der Zellen für 8 und 16 Stunden verursachte hingegen einen starken Abfall des Protein-Spiegels, der durch einen starken Abbau von Beta-Catenin zu erklären ist (siehe Abbildung 3.8 A).

Da Beta-Catenin in Assoziation mit E-Cadherin maßgeblich am Aufbau von Zelladhäsionskomplexen beteiligt ist, wurde im nächsten Schritt die Expression beider Proteine in Membranextrakten nach Behandlung der Zellen mit 100 µM Celecoxib untersucht. Bereits nach 2 Stunden Inkubationsdauer war ein Abfall der Beta-Catenin-Spiegel in der Membran zu beobachten, während eine Verminderung von Membran-gebundenem E-Cadherin erst nach 16 Stunden Celecoxib-Behandlung erfolgte (siehe Abbildung 3.8 B).

Um die Spezifität des Celecoxib-vermittelten Abbaus von Beta-Catenin zu bestätigen, wurden die Caco-2-Zellen für 20 Stunden mit steigenden Konzentrationen an Celecoxib (0-100 µM) behandelt (siehe Abbildung 3.8 C). Eine schwache Reduktion der Expression von Beta-Catenin wurde bereits bei 60 µM Celecoxib beobachtet, während ein deutlicher Abbau von Beta-Catenin bei Konzentrationen von 80 und 100 µM Celecoxib erfolgte. Diese Celecoxibkonzentrationen liegen auch im Bereich derer, die für die Auslösung von COX-2-unabhängigen Effekten in Zellkulturexperimenten, zum Beispiel die Inhibition der PDK-1 (IC_{50} = 48 µM; *in vitro* assay; (Zhu et al., 2004)) oder die Hemmung von Ca^{2+} -ATPasen des Endoplasmatischen Retikulums (IC_{50} = 35 µM; *in vitro* assay; (Johnson et al., 2002)) benötigt werden. Als Ladungskontrolle wurde in beiden Experimenten die ERK-2-Expression analysiert, da diese durch Celecoxib-Behandlung innerhalb der verwendeten Konzentrations- und Zeitbereiche nicht beeinflusst wird. Die ERK-2-Expression wurde daher auch in den nachfolgenden Western Blot Experimenten als Ladungskontrolle verwendet.

In einem Kontrollexperiment wurde die Expression von Beta-Catenin zu den gleichen Zeitpunkten wie in Experiment 3.8 A mittels Western Blot-Analyse untersucht, jedoch ohne vorherige Zugabe von Celecoxib (siehe Abbildung 3.8 D). Es zeigte sich keine zeitabhängige Veränderung der Expression von Beta-Catenin. Die in Abbildung 3.8 A dargestellten Effekte werden daher spezifisch durch die Behandlung der Zellen mit Celecoxib verursacht und sind keine Folge einer physiologischen Schwankung der Beta-Catenin-Expression.

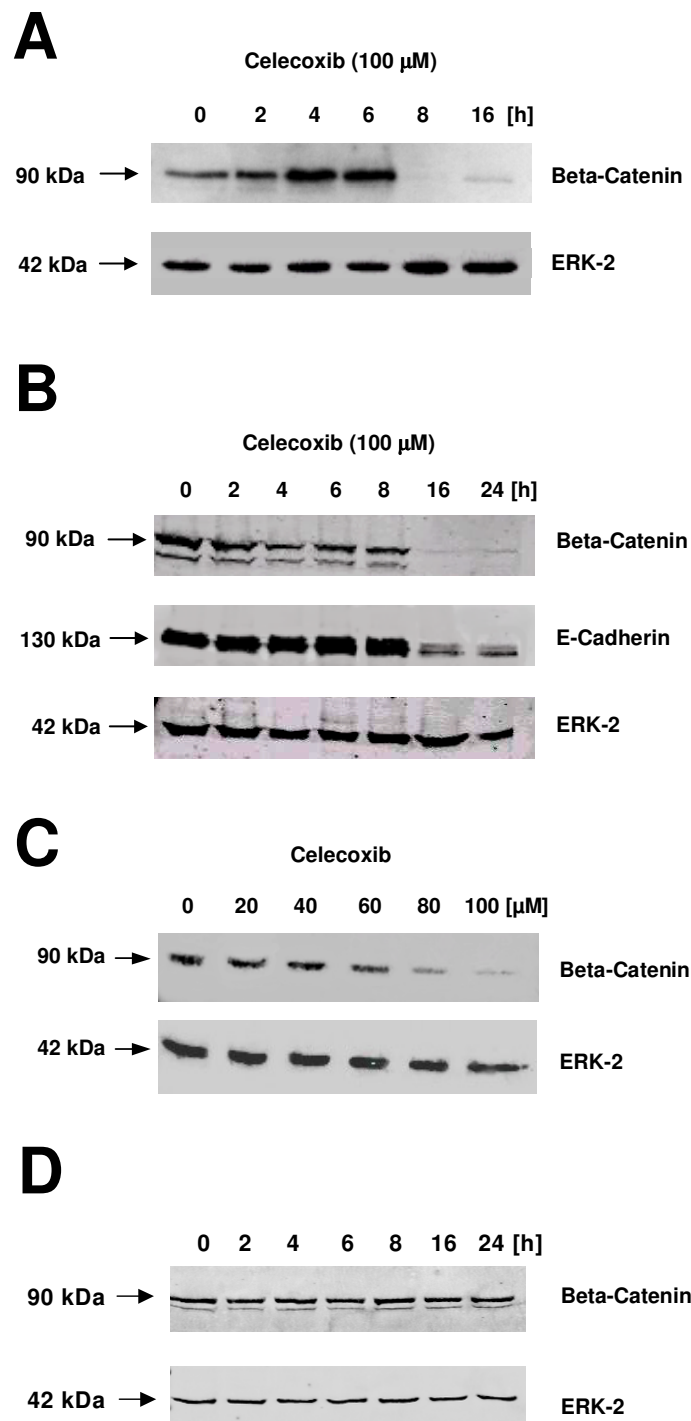


Abbildung 3.8: Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten (**A**) sowie der Expression von Beta-Catenin und E-Cadherin in Membranextrakten (**B**) nach Behandlung von Caco-2-Zellen mit 100 μM Celecoxib für die dargestellten Zeiten. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung und Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment dreier unabhängiger Experimente. (**C**) Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten aus Caco-2-Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib für 20 Stunden. Die gleichmäßige Beladung des Gels wurde mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten. (**D**) Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin zu den angegebenen Zeiten jedoch ohne vorherige Zugabe von Celecoxib. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt.

3.2.3 Die Behandlung von Caco-2-Zellen mit Celecoxib verursacht eine rapide Translokation von Beta-Catenin in den Zellkern

Um zu untersuchen, ob die Akkumulation von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten auch mit ansteigenden nuklearen Beta-Catenin-Spiegeln einhergeht, wurde die Expression von Beta-Catenin im Kern nach Inkubation der Caco-2-Zellen mit 100 μ M Celecoxib für verschiedene Zeiten mittels Western Blot-Analyse untersucht. Unter dieser Behandlung kam es zu einer Translokation von Beta-Catenin in den Zellkern innerhalb von 0,5 Stunden, wobei die erhöhten Beta-Catenin-Spiegel bis zu 4 Stunden zu beobachten war. Anschließend fielen die Beta-Catenin-Spiegel wieder auf Kontrollniveau ab (Abbildung 3.9 A). Da sowohl die Kerntranslokation, als auch die Bindung von Beta-Catenin an DNA in Assoziation mit Faktoren der TCF/Lef-Familie erfolgt, wurde im nächsten Schritt die Expression von Lef-1 und TCF-4 im Kern mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 3.9 B). Unter Behandlung mit 100 μ M Celecoxib war eine schwache Translokation von TCF-4 in den Zellkern innerhalb von 1 Stunde zu beobachten, während der Proteinspiegel von Lef-1 unverändert blieb. Als Kontrollelexperiment wurde parallel hierzu der Gehalt an Beta-Catenin im Zellkern analysiert.

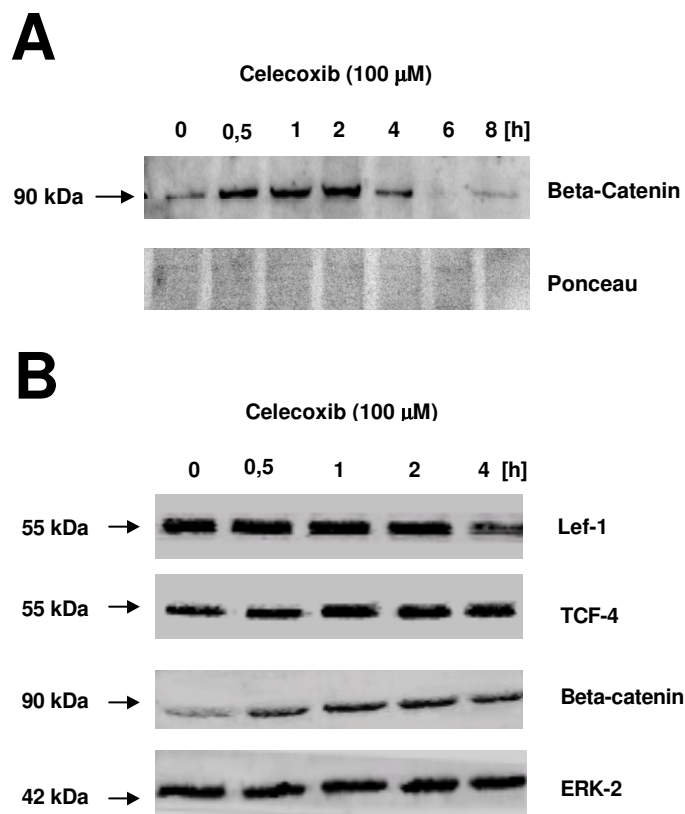


Abbildung 3.9: Western Blot-Analyse der Protein-Spiegel von Beta-Catenin (A) sowie Lef-1, TCF-4 und Beta-Catenin (B) in Kernextrakten nach Behandlung von Caco-2-Zellen mit 100 μ M Celecoxib für die dargestellten Zeiten. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment von drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten.

3.2.4 Die Behandlung der Caco-2-Zellen mit Celecoxib vermindert die Beta-Catenin/TCF/Lef-DNA-Bindungsaktivität

Neben der Beteiligung am Aufbau von Zelladhäsionskomplexen fungiert Beta-Catenin auch als Transkriptionsfaktor und reguliert in Assoziation mit TCF- oder Lef-Proteinen die Expression spezifischer Zielgene. Um zu untersuchen, ob der Anstieg der Beta-Catenin-Spiegel im Kern einen Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität von Beta-Catenin hat, wurde die EMSA- (electro mobility shift assay) Technik verwendet (siehe Abbildung 3.10 A). Überraschenderweise kam es durch die erhöhten Beta-Catenin-Spiegel im Kern zu keinem Anstieg der DNA-Bindungsaktivität, vielmehr fiel die DNA-Bindungsaktivität bereits 2 Stunden nach Behandlung der Zellen mit 100 μ M Celecoxib ab. Um die spezifischen Faktoren zu identifizieren, die an der Entstehung der DNA-Bindungssignale beteiligt sind, wurden Supershift-Experimente mit Antikörpern gegen TCF-1, TCF-4, Lef-1 und p-c-Jun (Kontroll-IgG) durchgeführt (siehe Abbildung 3.10 B). Supershift-Signale wurde unter Verwendung der TCF-1- und Lef-1-Antikörper beobachtet. Keine Supershift-Signale ergaben sich beim Einsatz der TCF-4- und p-c-Jun-Antikörper. Die Spezifität des Beta-Catenin/TCF/Lef-DNA-Bindungssignals wurde mittels eines Kompetitions-Experiments unter Verwendung von unmarkierten Oligonukleotiden für die beiden oberen Banden bestätigt (siehe Abbildung 3.10 B).

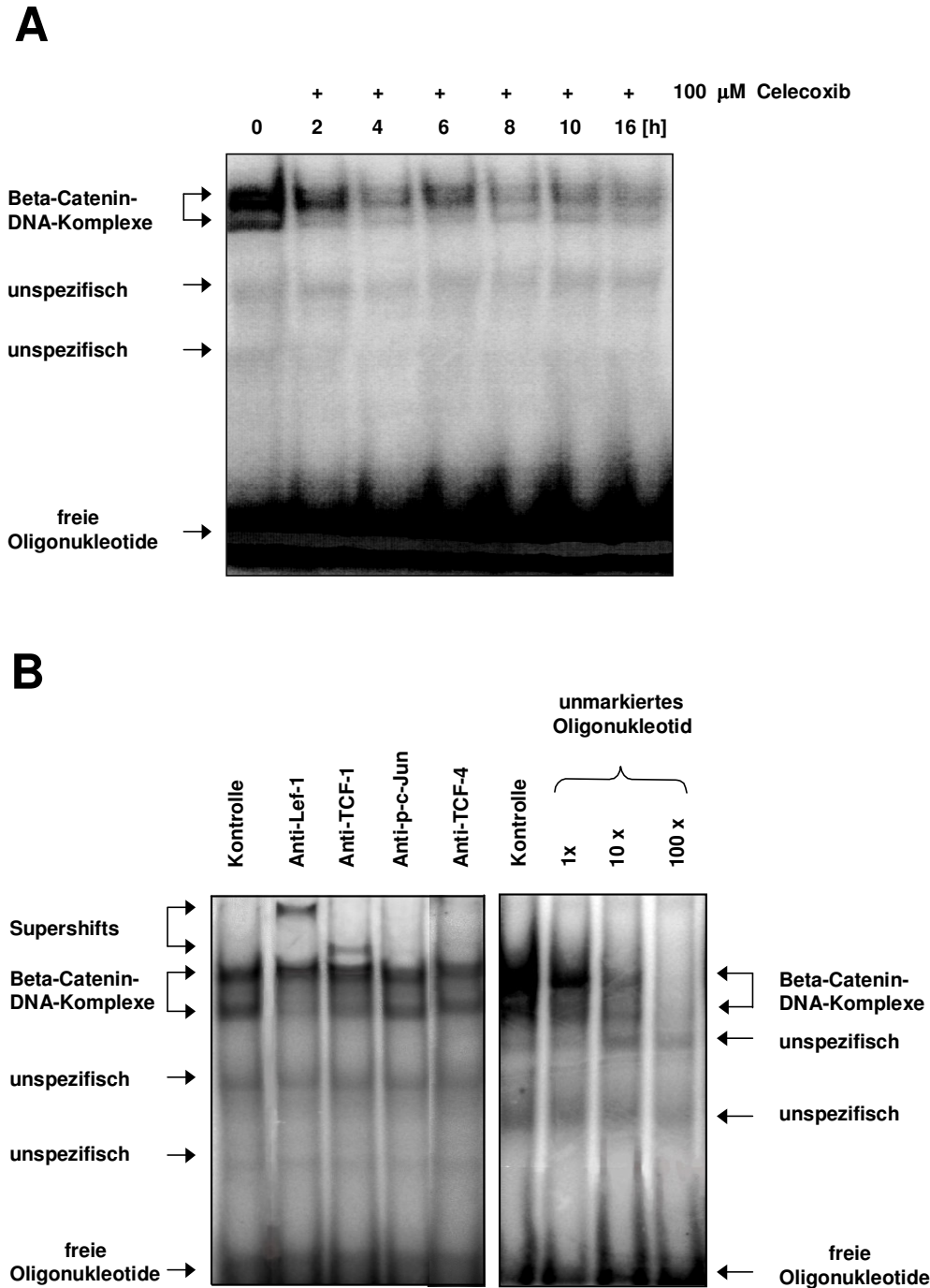


Abbildung 3.10: (A) Bestimmung der Beta-Catenin/TCF/Lef-DNA-Bindungsaktivität nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit 100 μ M Celecoxib für die angegebenen Zeiten. Nach der Behandlung der Zellen wurden zunächst Kernextrakte aufbereitet. Für das EMSA-Experiment wurden 5 μ g Kernextrakt mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden inkubiert, die eine Beta-Catenin/TCF-Konsensussequenz beinhalten. Die so entstandenen Protein-Oligonukleotid-Komplexe wurden anschließend in einem 5%igen nativen Acrylamidgel von freien Oligonukleotiden und Kernproteinen getrennt und autoradiographisch dargestellt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten. (B) Für die Supershift-Experimente wurden 5 μ g Kernextrakt mit Supershift-Antikörpern gegen TCF-1, TCF-4, Lef-1 und p-c-Jun präinkubiert und anschließend die markierten Oligonukleotide zugegeben. Für das Kompetitions-Experiment wurden 5 μ g Kernextrakt zusammen mit den radioaktiv-markierten Oligonukleotiden und einem steigenden Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid inkubiert und die so entstandenen Protein-Oligonukleotid-Komplexe anschließend in einem 5%igen nativen Acrylamidgel von freien Oligonukleotiden und Kernproteinen getrennt und autoradiographisch dargestellt.

3.2.5 Der Anstieg der Beta-Catenin-Spiegel in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Behandlung von Caco-2-Zellen mit Celecoxib entsteht nicht durch Neusynthese

Der Anstieg der Beta-Catenin-Spiegel in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit Celecoxib kann entweder durch Neusynthese oder zelluläre Umverteilung von Beta-Catenin verursacht werden. Im nächsten Schritt wurde daher der Proteinspiegel von Beta-Catenin nach Koinkubation der Zellen mit Celecoxib und potenten Inhibitoren der mRNA- oder Proteinbiosynthese mittels Western Blot-Analyse untersucht (siehe Abbildung 3.11 A). Die Zellen wurden zunächst mit 5 µg/ml Actinomycin D und 10 µg/ml Cycloheximid für 30 Minuten vorinkubiert. Der Anstieg der Beta-Catenin-Spiegel nach 0-6 Stunden Behandlung mit 100 µM Celecoxib konnte jedoch nicht durch die Gegenwart der mRNA- und Proteinsyntheseinhibitoren gehemmt werden.

Im anschließenden Kontrollexperiment wurden die Zellen separat mit Cycloheximid und Actinomycin D unter Verwendung gleicher Konzentrationen und Inkubationsdauer wie in 3.11 A behandelt (siehe Abbildung 3.11 B). Eine Western Blot-Analyse konnte zeigen, dass die alleinige Inkubation mit Cycloheximid und Actinomycin bereits nach 2 Stunden zu einer leichten Reduktion der Beta-Catenin-Expression führt, was wahrscheinlich auf die hohe „turnover“-Rate des Proteins (siehe Kapitel 1.2.4) zurückzuführen ist.

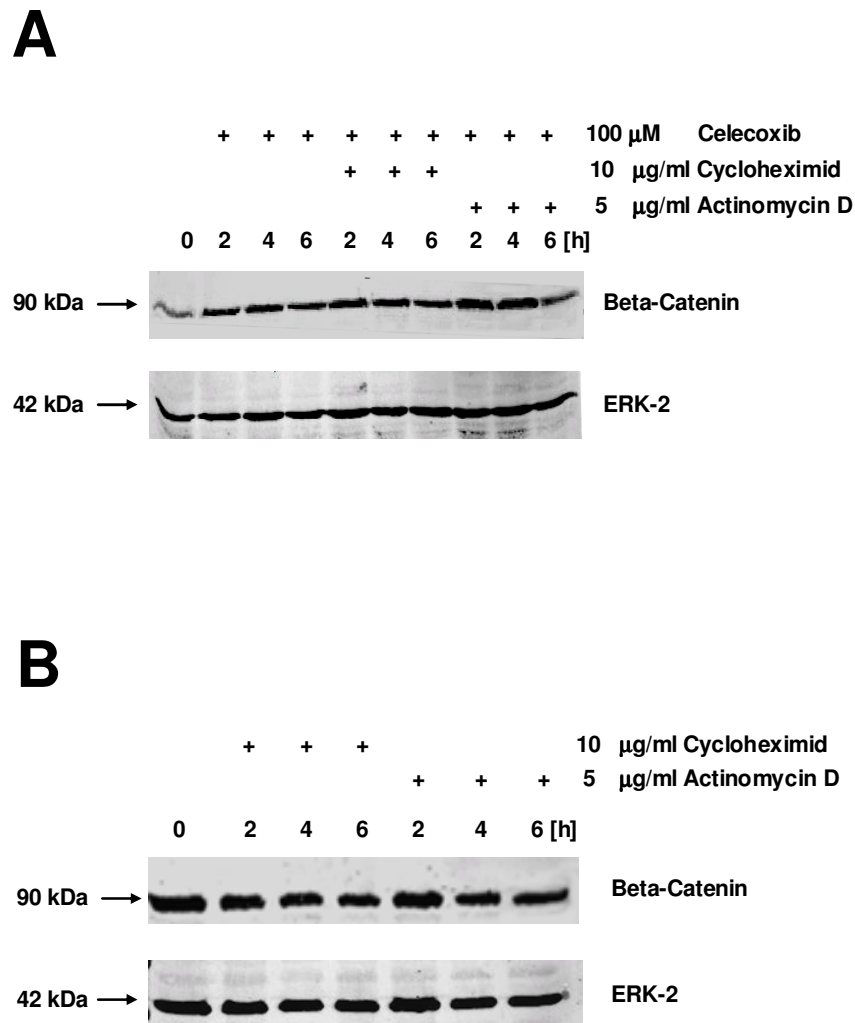


Abbildung 3.11: (A) Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Coinkubation der Caco-2-Zellen mit 100 μ M Celecoxib und 5 μ g/ml Actinomycin D bzw. 100 μ M Celecoxib und 10 μ g/ml Cycloheximid für die dargestellten Zeiten. Vor der Celecoxib-Behandlung wurden die Zellen jeweils für 30 Minuten mit den Synthesehemmern vorbehandelt. (B) Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Behandlung der Zellen mit 5 μ g/ml Actinomycin D bzw. 10 μ g/ml Cycloheximid für die dargestellten Zeiten. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde in beiden Experimenten mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment zweier unabhängiger Experimente.

3.2.6 Die Behandlung mit Celecoxib beeinflusst die zelluläre Verteilung von Beta-Catenin in Caco-2-Zellen

Eine immunzytochemische Analyse der Expression von Beta-Catenin in unbehandelten Caco-2-Zellen ergab, dass Beta-Catenin überwiegend in der äußeren Zellmembran lokalisiert ist (siehe Abbildung 3.12 A). Weiterhin war eine schwache Expression im Zytoplasma zu beobachten, während an oder in den Zellkernen keine Färbung von Beta-Catenin zu erkennen war. Diese Resultate bestätigen immunzytochemische Untersuchungen zur zellulären Verteilung von Beta-Catenin in humanen Kolonkarzinom-Zellen (Wong and

Pignatelli, 2002). Nach Behandlung der Zellen mit 100 μM Celecoxib für 1,5 und 3 Stunden kam es zu einer Verminderung von Membran-gebundenem Beta-Catenin, während gleichzeitig eine starke Akkumulation von Beta-Catenin in direkter Umgebung der Zellkerne beobachtet wurde, die in Caco-2-Zellen den Hauptanteil des Zytoplasmas darstellt. Parallel zur Ansammlung von Beta-Catenin im Zytoplasma kam es ebenfalls zu einer Anfärbung des Nukleoplasmas (siehe Abbildung 3.12 B und C). Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse der Western Blot-Analyse (siehe Abbildung 3.8), die eine Reduktion von Membran-gebundenem Beta-Catenin und eine gleichzeitige Zunahme der zyto- und nukleoplasmatischen Beta-Catenin-Spiegel nach Celecoxib-Behandlung ergaben. Diese Daten weisen auf eine durch Celecoxib verursachte Translokation von Beta-Catenin aus der Zellmembran in das Zytoplasma und die Zellkerne hin.

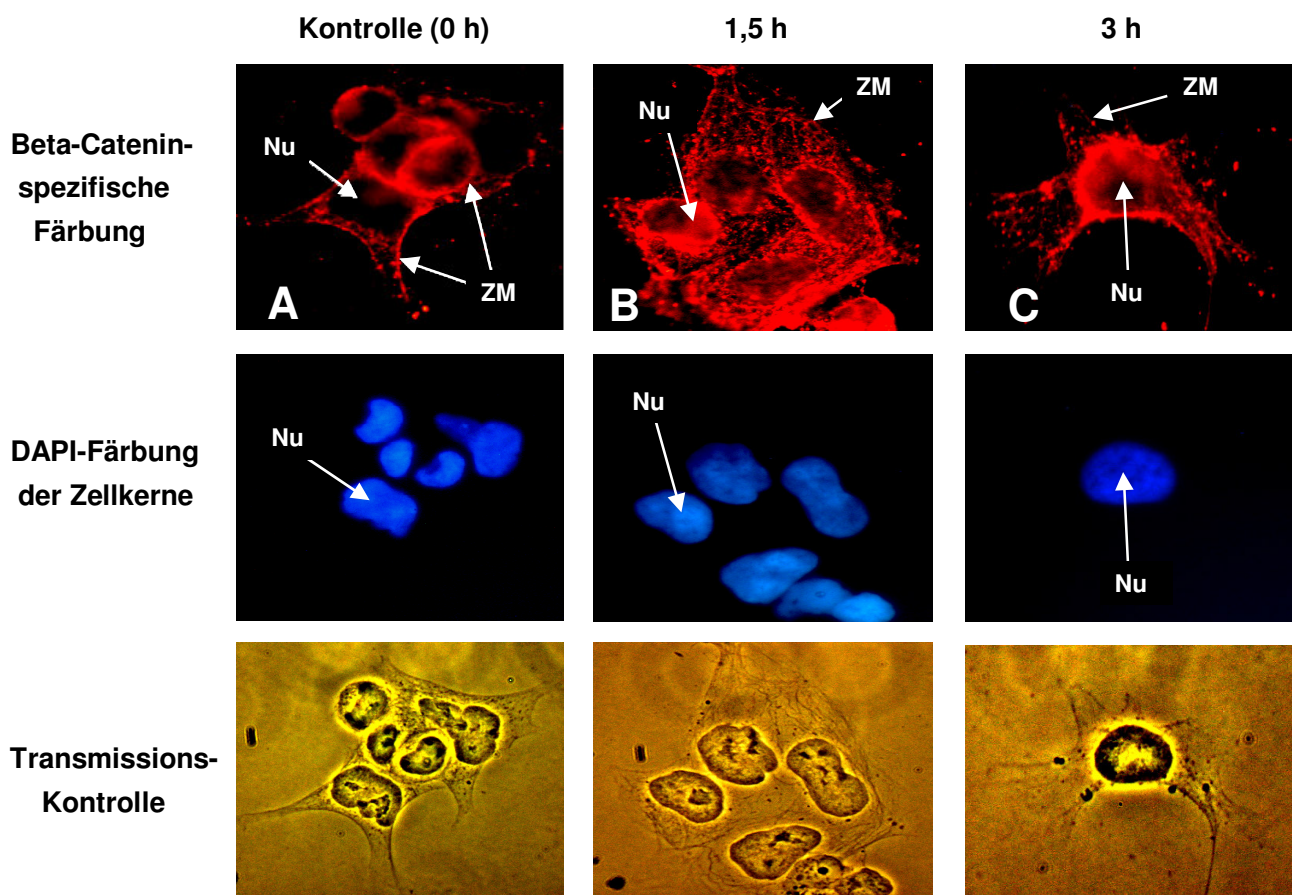


Abbildung 3.12: (A)-(C) Darstellung der zellulären Verteilung von Beta-Catenin nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit 100 μM Celecoxib für die angegebenen Zeiten. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Triton-X 100 permeabilisiert. Nach dem Blocken in BSA/PBS wurden die Zellen mit dem Beta-Catenin-spezifischen Erstantikörper und anschließend mit dem Cy3-markierten Sekundäntikörper behandelt. Die Bilder wurden dann mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon eclipse E600; 1000-fache Vergrößerung) betrachtet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten. Abkürzungen: ZM, Zellmembran; Nu, Nukleus.

3.2.7 Die durch Celecoxib verursachte Degradierung von Beta-Catenin erfolgt durch proteasomalen Abbau und durch Caspasen

Durch die bisherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Caco-2-Zellen mit 100 μ M Celecoxib einen Abbau von Beta-Catenin bereits nach 8 Stunden Inkubationsdauer verursacht. Neben dem Abbau von Beta-Catenin kam es ferner nach 8, 10 und 16 Stunden Behandlung mit Celecoxib auch zu einer Spaltung von PARP, was auf eine Induktion von Apoptose hinweist (siehe Abbildung 3.13 A). Für Beta-Catenin wurden bisher zwei mögliche Abbauwege beschrieben. Einerseits wird Beta-Catenin im Rahmen des physiologischen „turnover“ proteasomal abgebaut, andererseits kann eine Spaltung durch Caspasen im Rahmen einer Induktion von Apoptose erfolgen. Um Hinweise auf den Mechanismus des Beta-Catenin Abbaus durch Celecoxib zu erhalten, wurden die Zellen jeweils für 30 Minuten mit dem irreversiblen Breitband-Caspase-Inhibitor Boc-D-FMK und dem selektiven Proteasom-Inhibitor Lactacystin vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine Koinkubation der Zellen mit 100 μ M Celecoxib und den Inhibitoren für 8, 10 und 16 Stunden. Interessanterweise konnte Lactacystin und stärker noch der Caspase-Inhibitor den Abbau von Beta-Catenin durch Celecoxib teilweise hemmen (siehe Abbildung 3.13 A). Durch die Anwesenheit des Caspase-Inhibitors kam es, wie zu erwarten, ferner zu einer Hemmung der PARP-Spaltung, während Lactacystin auf den Fortschritt der Apoptose keinen Einfluss hatte.

Im anschließenden Kontrollexperiment wurden die Zellen separat mit Lactacystin und Boc-D-FMK unter Verwendung gleicher Konzentrationen und Inkubationsdauern wie in 3.13 A behandelt (siehe Abbildung 3.13 B). Die Western Blot-Analyse konnte zeigen, dass es unter alleiniger Inkubation mit Lactacystin aufgrund der hohen „turnover“-Rate von Beta-Catenin bereits nach 2 Stunden zu einer leichten Erhöhung der Beta-Catenin-Spiegel kam. Der Caspase-Inhibitor alleine hatte keinen Effekt auf die Beta-Catenin-Expression.

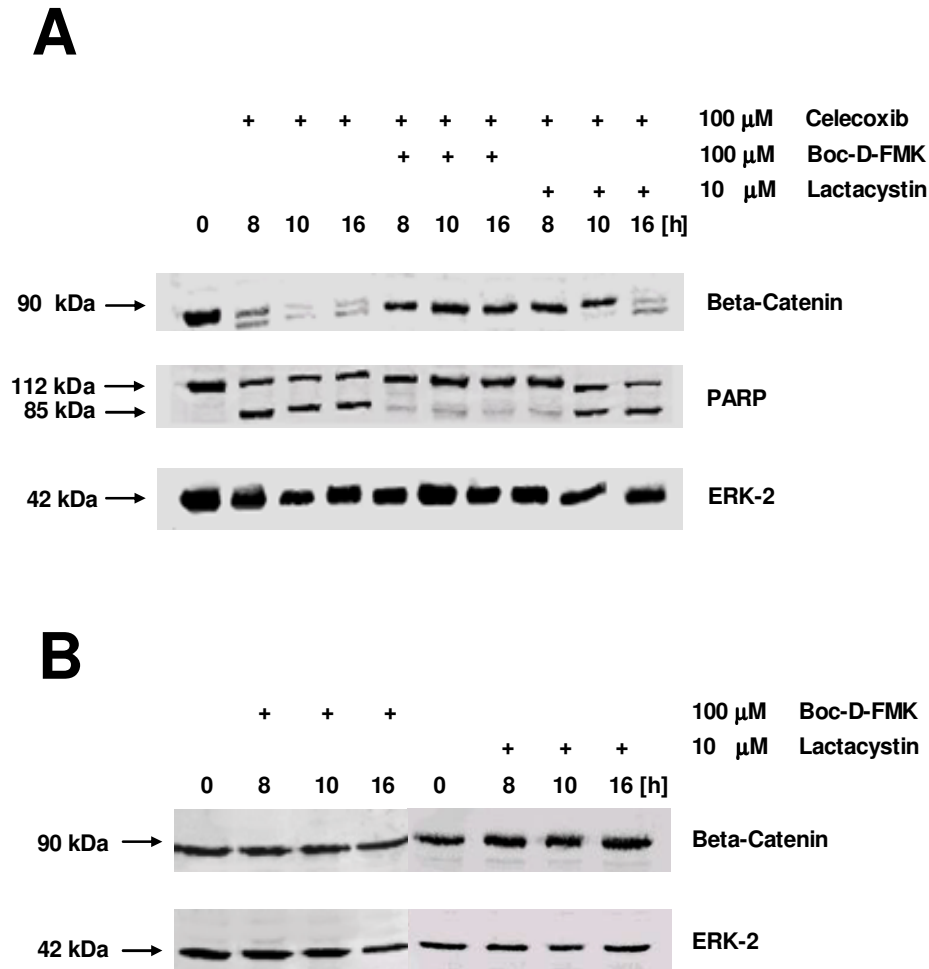


Abbildung 3.13: (A) Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin und PARP in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Coinkubation der Caco-2-Zellen mit 100 µM Celecoxib und 10 µM Lactacystin (Proteasom-Inhibitor) bzw. 100 µM Celecoxib und 100 µM Boc-D-FMK (Caspase-Inhibitor) und nach Behandlung der Zellen mit 100 µM Celecoxib alleine für die dargestellten Zeiten. Vor der Coinkubation wurden die Zellen jeweils für 30 Minuten mit den Inhibitoren vorbehandelt. **(B)** Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Behandlung der Zellen mit 10 µM Lactacystin bzw. 100 µM Boc-D-FMK für die dargestellten Zeiten. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde in beiden Experimenten mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment von drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten.

Eine Voraussetzung für den proteasomalen Abbau von Beta-Catenin ist eine Phosphorylierung des Proteins durch die Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β). Die Aktivität dieses Enzyms wird durch seinen Phosphorylierungsstatus reguliert, wobei die an Ser-9 phosphorylierte GSK-3 β die inaktive Form repräsentiert (Cross et al., 1994). Um einen möglichen Einfluss von Celecoxib auf den Phosphorylierungsstatus von GSK-3 β zu untersuchen, wurden die Phospho-Ser-9 sowie die totalen GSK-3 β -Spiegel nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit 100 µM Celecoxib für verschiedene Zeiten mittels Western Blot-Analyse bestimmt (siehe Abbildung 3.14 A). Interessanterweise kam es bereits nach 2 Stunden Inkubationsdauer zu einem Abfall der Phospho-Ser-9-GSK-3 β -Spiegel, wobei die totalen GSK-3 β -Spiegel über die gesamte Inkubationsdauer

hinweg unverändert blieben. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die durch Celecoxib aktivierte GSK-3 β an der Freisetzung von Beta-Catenin aus der Zellmembran beteiligt ist. Hierzu wurden Caco-2-Zellen mit 20 mM des selektiven GSK-3 β -Inhibitors Lithiumchlorid (Stambolic et al., 1996) vorbehandelt und anschließend mit 100 μ M Celecoxib und 20 mM Lithiumchlorid für 4 und 6 Stunden coinkubiert (siehe Abbildung 3.14 B). In Gegenwart von Lithiumchlorid kam es zu einer deutlichen Hemmung der Freisetzung von Beta-Catenin aus der Membran. Identische Konzentrationen an Lithiumchlorid alleine hatten jedoch keinen Effekt auf die Expression von Membran-gebundenem Beta-Catenin.

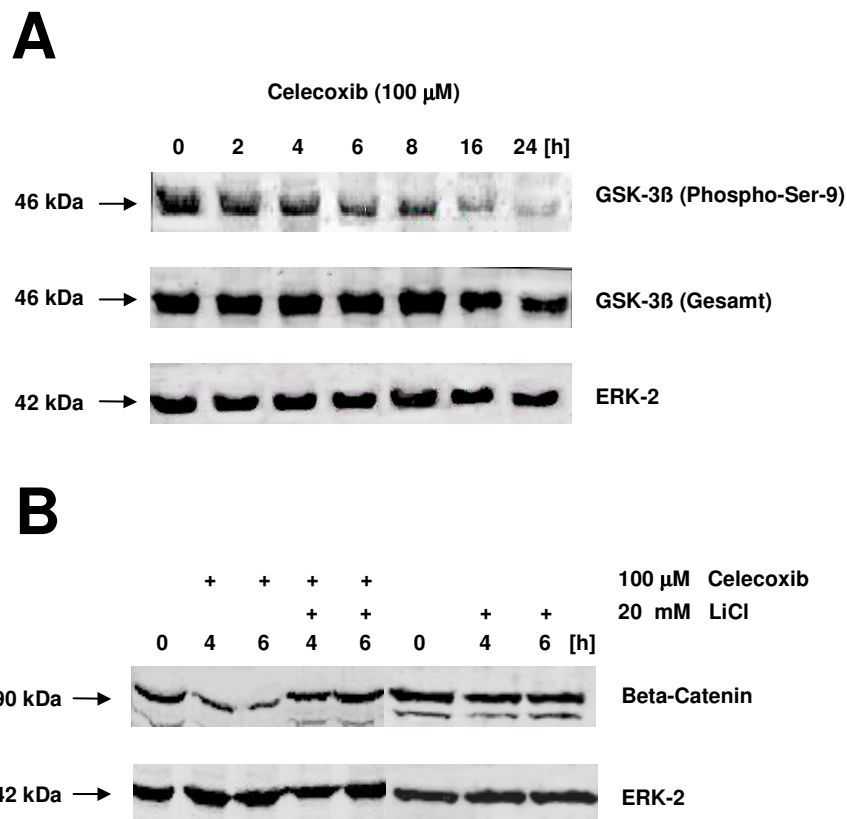


Abbildung 3.14: (A) Western Blot-Analyse der Expression von Phospho-Ser-9-GSK-3 β sowie Gesamt-GSK-3 β in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Behandlung der Zellen mit 100 μ M Celecoxib für die dargestellten Zeiten. (B) Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in Membranextrakten nach Coinkubation der Caco-2-Zellen mit 100 μ M Celecoxib und 20 mM Lithiumchlorid (selektiver GSK-3 β -Inhibitor) sowie mit 100 μ M Celecoxib alleine für die dargestellten Zeiten. Vor der Coinkubation wurden die Zellen für 30 Minuten mit identischen Konzentrationen an Lithiumchlorid vorbehandelt. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde in beiden Experimenten mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment von zwei (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten.

Die bisherigen Daten erlauben keine Aussage über mögliche Kopplungen von proteasomalem und Caspase-vermitteltem Abbau von Beta-Catenin. So wäre es denkbar, dass die Freisetzung von Beta-Catenin aus der Membran in das Zytoplasma eine Voraussetzung für den Abbau durch Caspasen ist. Um diese Frage zu

klären, wurden in den nachfolgenden Experimenten humane HCT-116-Kolonkarzinom-Zellen verwendet. Diese Zellen exprimieren mutiertes Beta-Catenin, dem der Serin-45-Rest aufgrund einer 3-Basen Deletion fehlt. Das Vorhandensein dieses Aminosäurerestes ist jedoch essentiell für Phosphorylierung der Reste Ser-33, Ser-37 und Thr-41 durch GSK-3 β (siehe Kapitel 1.2.4) und somit auch für den proteasomalen Abbau von Beta-Catenin. Die Western Blot-Analyse der Beta-Catenin-Expression nach Behandlung dieser Zellen mit Celecoxib ermöglicht daher Einblicke, in welchem Ausmaß der Abbau von Beta-Catenin von der Phosphorylierung durch die GSK-3 β abhängt. Die Behandlung von HCT-116-Zellen mit 100 μ M Celecoxib für verschiedene Zeiten (siehe Abbildung 3.15 A) führte zu einer moderaten Reduktion der Beta-Catenin-Spiegel nach 10 Stunden Behandlungsdauer, wobei ein starker Abbau von Beta-Catenin erst nach 16 Stunden Inkubationsdauer zu beobachten war. Deutliche Unterschiede im Vergleich zur Situation in Caco-2-Zellen (siehe Abbildung 3.8 B) wurden auch bei der Analyse der Expression von Membran-gebundenem Beta-Catenin in HCT-116-Zellen nach Behandlung mit 100 μ M Celecoxib beobachtet (siehe Abbildung 3.15 B). Ein sichtbarer Abbau von Membran-gebundenem Beta-Catenin erfolgte hier erst nach 16 Stunden Inkubationsdauer.

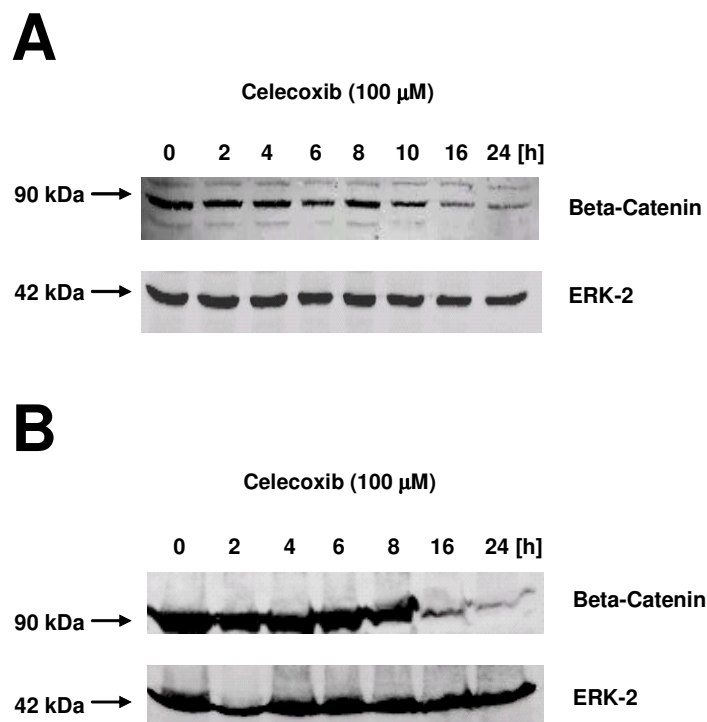


Abbildung 3.15: Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten (A) und Membranextrakten (B) nach Behandlung von HCT-116-Zellen mit 100 μ M Celecoxib für die dargestellten Zeiten. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Wie bereits in Kapitel 3.2.7 beschrieben und in Abbildung 3.13 A gezeigt, spielen Caspasen eine wesentliche Rolle beim Celecoxib-vermittelten Abbau von Beta-Catenin. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Beta-

Catenin durch die Proteaseaktivität der Caspasen-3,-6, und -7 in Fragmente in der Größe von 70 bis 76 kDa gespalten wird (Steinhusen et al., 2000). Für Caspase-6 und -7 wurden jedoch nur sehr schwache Spaltungsaktivitäten beschrieben, während Caspase-3 die Hauptrolle bei der Spaltung von Beta-Catenin spielt. Um die Rolle von Caspase-3 im Abbau von Beta-Catenin durch Celecoxib zu untersuchen, wurden in den nachfolgenden Experimenten humane MCF-7-Mammakarzinom-Zellen verwendet. MCF-7-Zellen exprimieren keine funktionale Caspase-3 aufgrund einer 50-Basenpaar-Deletion in einem Exon des *Casp-3* Gens (Janicke et al., 1998). Die Western Blot-Analyse der Beta-Catenin-Expression nach Behandlung dieser Zellen mit Celecoxib liefert daher Informationen, zu welchem Ausmaß der Abbau von Beta-Catenin von der Caspase-3-Spaltungsaktivität abhängig ist. Nach Behandlung von MCF-7-Zellen mit 100 μ M Celecoxib wurde innerhalb des Inkubationsintervalls von 6 bis 16 Stunden eine leichte Reduktion der Beta-Catenin-Spiegel in Gesamtproteinextrakten beobachtet, während Beta-Catenin nach 24 Stunden Behandlung nahezu vollständig abgebaut wurde (siehe Abbildung 3.16 A). Der Anstieg der Beta-Catenin-Expression nach 2-4 Stunden war schwächer ausgeprägt als in Caco-2-Zellen. Infolge fehlender Caspase-3-, -6- und -7-Aktivitäten wurde zudem in MCF-7-Zellen nach Celecoxib-Behandlung keine Spaltung von PARP beobachtet. Ähnlich zur Situation in Caco-2-Zellen erfolgte eine Abnahme der Spiegel von Membran-gebundenem Beta-Catenin bereits nach 4 Stunden Inkubationsdauer (Abbildung 3.16 B)

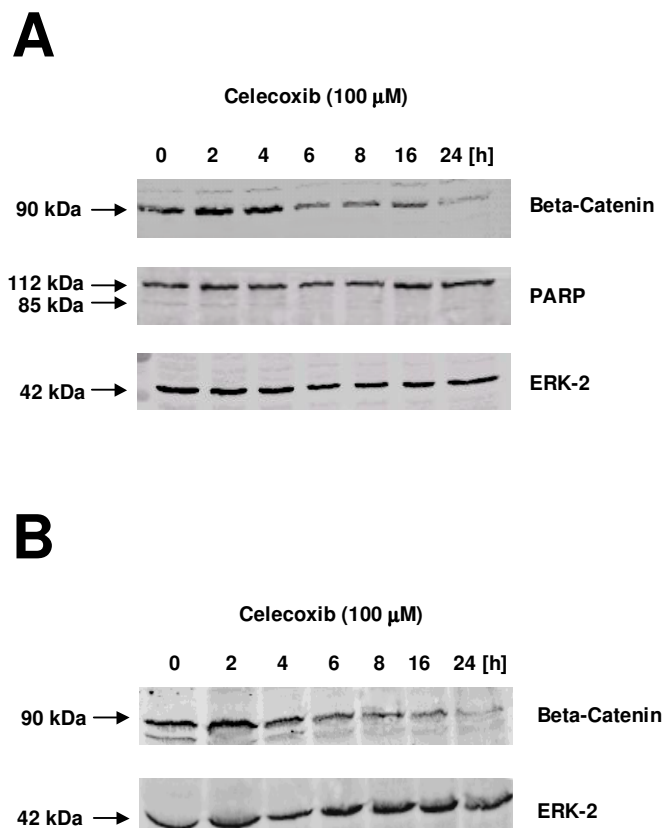


Abbildung 3.16: Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten (A) und Membranextrakten (B) nach Behandlung von MCF-7-Mammakarzinom-Zellen mit 100 μ M Celecoxib für die dargestellten Zeiten. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Beta-Catenin nach Celecoxib-Behandlung sowohl in Caspase-3-defizienten MCF-7-Zellen, als auch in HCT-116-Zellen, in denen die GSK-3 β -vermittelte proteasomale Degradierung von Beta-Catenin nicht stattfindet, im Vergleich zu Caco-2-Zellen verzögert abgebaut wird. Um weitere Belege dafür zu erbringen, dass der Celecoxib-vermittelte Abbau von Beta-Catenin nicht auf einen oder wenige Zelltypen beschränkt ist, wurden humane LNCAP-Prostatakarzinom-Zellen mit 100 μ M Celecoxib für bis zu 24 Stunden behandelt. Die Western Blot-Analyse konnte zeigen, dass Beta-Catenin nach 24-stündiger Behandlung mit Celecoxib abgebaut wird, jedoch war die Degradierung in LNCAP-Zellen deutlich schwächer ausgeprägt im Vergleich zu Caco-2-Zellen (siehe Abbildung 3.17). Zusammengefasst wurde ein Celecoxib-vermittelter Abbau von Beta-Catenin in vier verschiedenen Tumor-Zelllinien (Caco-2, HCT-116, MCF-7 und LNCAP) beobachtet. Eine Zelltyp-spezifische Degradierung von Beta-Catenin kann daher ausgeschlossen werden.

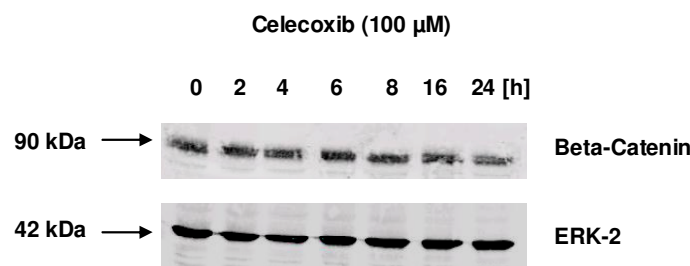


Abbildung 3.17: Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin in löslichen Gesamtproteinextrakten) nach Behandlung von LNCAP-Prostatakarzinom-Zellen mit 100 μ M Celecoxib für die dargestellten Zeiten. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.8 Die Behandlung von Caco-2-Zellen mit Rofecoxib oder R-Flurbiprofen hat keinen Einfluss auf die Expression von Beta-Catenin

Die bisherigen Daten erlauben keine Aussage über die Spezifität des Abbaus von Beta-Catenin durch Celecoxib. So könnte der Abbau eine direkte Folge der COX-2-Inhibition sein und wäre somit auch nach Behandlung der Zellen mit anderen COX-2-Inhibitoren zu erwarten. Der Abbau könnte auch unspezifisch infolge der Induktion von Apoptose auftreten und somit generell nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen apoptotisch wirksamen NSAIDs zu beobachten sein. Um diese Frage zu klären, wurden humane Caco-2-Zellen zunächst mit Rofecoxib behandelt, das eine ca. 5-fach höhere COX-2-Selektivität besitzt und ein wesentlich potenterer COX-2-Hemmer ist als Celecoxib (siehe Tabelle 1.2). Die Inkubation mit 100 μ M Rofecoxib für bis zu 24 Stunden hatte jedoch keinen Effekt auf die Beta-Catenin-Expression und verursachte auch keine Spaltung der PARP (Abbildung 3.18 A). Auch die Behandlung der Zellen mit hohen Konzentrationen des NSAID R-Flurbiprofen (1000 μ M), das die COX-2 in physiologischen

Konzentrationen nicht hemmt, aber starke antiproliferative Effekte *in vivo* und *in vitro* zeigte (Grosch et al., 2003), verursachte keine Veränderung der Beta-Catenin-Spiegel (Abbildung 3.18 B).

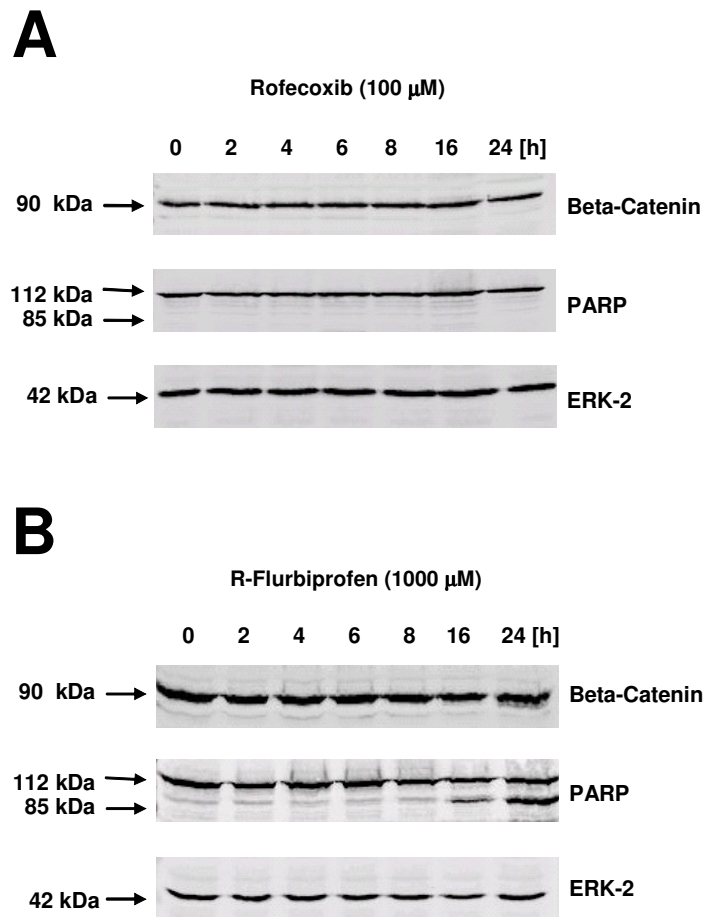


Abbildung 3.18: Western Blot-Analyse der Expression von Beta-Catenin und der Spaltung von PARP in löslichen Gesamtproteinextrakten nach Behandlung von Caco-2-Zellen mit 100 μ M Rofecoxib (A) und 1000 μ M R-Flurbiprofen (B) für die dargestellten Zeiten. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten.

3.3 Vergleichende Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung COX-2-selektiver NSAIDs in COX-2-überexprimierenden und COX-2-defizienten Kolonkarzinom-Zellen

3.3.1 Ziel der durchgeführten Experimente

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 und 3.2 dieser Arbeit konnten zeigen, dass die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib sowohl über COX-2-abhängige, als auch COX-2-unabhängige Mechanismen erklärt werden können. In den letzten Jahren kamen weitere, strukturverwandte NSAIDs vom Coxib-Typ auf den Markt, die eine höhere COX-2-Selektivität als Celecoxib aufweisen. Über mögliche antikarzinogene Effekte dieser Wirkstoffe ist jedoch noch wenig bekannt. Die folgenden Experimente sollten daher die Frage klären, ob die antikarzinogene Wirksamkeit einen Klasseneffekt aller Coxibe darstellt oder nur spezifisch nach Behandlung von Tumor-Zellen mit Celecoxib auftritt. Durch die Verwendung des Celecoxib-Strukturanalogs Methylcelecoxib, in dem der 4-Methyl-Phenylring des Celecoxibs durch einen 2,5-Dimethyl-Phenylring ersetzt wurde und das nur eine schwache COX-2-inhibitorische Aktivität besitzt ($IC_{50} = 9,86 \pm 0,4 \mu\text{M}$, in vitro assay zur Bestimmung der Inhibition der PGE_2 -Synthese in HCA-7 Zellen), soll die Rolle der COX-2-Hemmung für die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib zusätzlich beleuchtet werden.

3.3.2 Expression und Aktivität der COX-2 in humanen HCT-116- und HCA-7-Kolonkarzinom-Zellen

Als Voraussetzung für alle Experimente mit HCT-116- und HCA-7-Zellen wurde zunächst die unterschiedliche Expression der COX-2 in löslichen Gesamtproteinextrakten aus unbehandelten Zellen mittels Western Blot-Analyse überprüft (Abbildung 3.19 A). In HCA-7-Zellen wurde eine starke Expression der COX-2 beobachtet, während HCT-116-Zellen keine COX-2-Expression aufweisen. Beide Zelltypen zeigten auch eine schwache Expression der COX-1 (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Aktivität der COX-2 in HCA-7-Zellen wurde durch Bestimmung der Konzentration an Prostaglandin E_2 ($\text{pg PGE}_2/10^6$ Zellen) im Mediumüberstand überprüft. Zum Vergleich wurde die PGE_2 -Konzentration im Medium von HCT-116-Zellen analysiert und in das Verhältnis zur Konzentration im Medium von HCA-7-Zellen gesetzt (Abbildung 3.19 B). Die Konzentration an PGE_2 im Medium von HCA-7-Zellen war mehr als 100-fach höher als im Medium von HCT-116-Zellen. Beide Zelltypen wurden daher für die Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung von COX-2-selektiven Inhibitoren in Abhängigkeit vom COX-2-Expressionsstatus der Kolonkarzinom-Zellen verwendet.

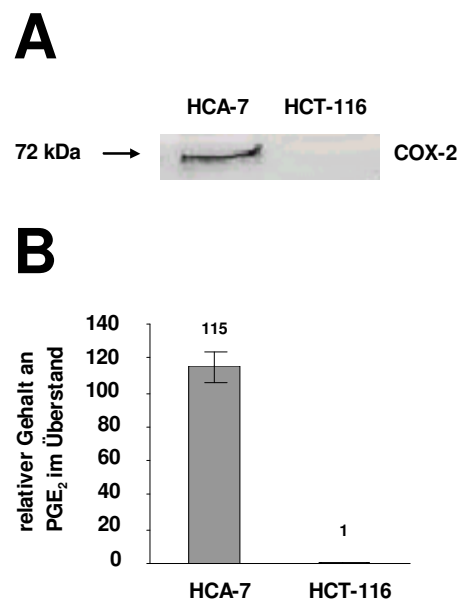


Abbildung 3.19: Bestimmung der COX-2-Expression und der PGE₂-Mediumkonzentration von HCT-116- und HCA-7-Zellen. **(A)** Western Blot-Analyse der COX-2-Expression in löslichen Gesamtproteinextrakten von unbehandelten HCT-116- und HCA-7-Zellen. **(B)** Relative Konzentration an PGE₂ im Medium von unbehandelten HCA-7-Zellen im Vergleich zur PGE₂-Mediumkonzentration von unbehandelten HCT-116-Zellen. Die Messung wurde mit einem PGE₂-Correlate EIATM-Kit durchgeführt und der Gehalt an PGE₂ auf die Zellzahl bezogen (pg PGE₂/10⁶ Zellen). Abgebildet sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente.

3.3.3 Celecoxib und Methylcelecoxib verursachen im Proliferationstest deutlich stärkere wachstumshemmende Effekte in HCT-116- und HCA-7-Zellen als die anderen Coxibe

Um die Sensitivität von HCT-116- und HCA-7-Zellen gegenüber den verschiedenen Coxiben (siehe Tabelle 1.2) untersuchen zu können, wurden die Zellen mit steigenden Coxibkonzentrationen für 20 Stunden inkubiert und einem WST-Proliferationstest unterzogen (siehe Abbildung 3.20). Die mit Abstand stärksten antiproliferativen Effekte wurden nach Behandlung der Zellen mit Celecoxib und Methylcelecoxib beobachtet, wobei Methylcelecoxib das Zellwachstum in HCA-7-Zellen ($IC_{50_{HCA-7}} = 41,52 \pm 6,66 \mu\text{M}$) und in HCT-116-Zellen ($IC_{50_{HCT-116}} = 63,28 \pm 9,55 \mu\text{M}$) stärker hemmte als Celecoxib ($IC_{50_{HCA-7}} = 64,47 \pm 9,15 \mu\text{M}$ und $IC_{50_{HCT-116}} = 73,39 \pm 4,04 \mu\text{M}$). Interessanterweise reagierten COX-2-positive HCA-7-Zellen empfindlicher auf die Behandlung mit Celecoxib als COX-2-defiziente HCT-116-Zellen. Auch Methylcelecoxib erzeugte in HCA-7-Zellen deutlich stärkere wachstumshemmende Effekte als in HCT-116-Zellen (siehe Abbildung 3.20 A und B). Die Inkubation von HCA-7- und HCT-116-Zellen mit Rofecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib verminderte die Proliferationsrate selbst beim Einsatz hoher Konzentrationen bis zu 200 μM nur um durchschnittlich ca. 20-30%, wobei die stärksten antiproliferativen Effekte nach Behandlung von HCA-7-Zellen mit Valdecoxib beobachtet wurden (Reduktion der Proliferationsrate um ca. 40% bei 200 μM Valdecoxib). Insgesamt verursachten Valdecoxib, Lumiracoxib,

Etoricoxib und Rofecoxib jedoch deutlich schwächere antiproliferative Effekte als Celecoxib und Methylcelecoxib (siehe Abbildung 3.20 C-F).

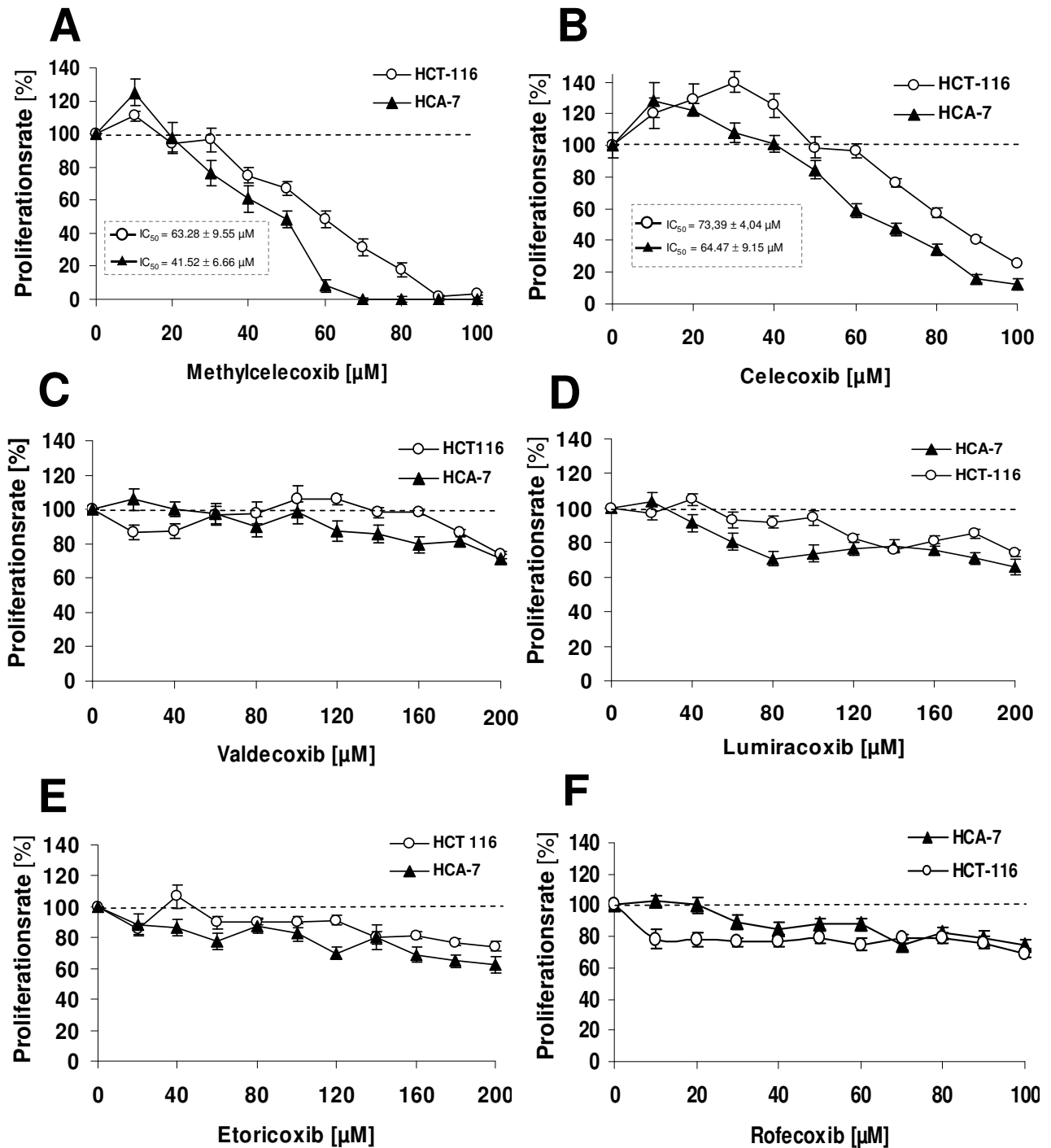


Abbildung 3.20: Vergleich der wachstumshemmenden Effekte von Methylcelecoxib (A), Celecoxib (B), Valdecoxib (C), Lumiracoxib (D), Etoricoxib (E) und Rofecoxib (F) in HCT-116- und HCA-7-Zellen mittels WST-Proliferationstest. Hierzu wurden 5×10^3 Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an Coxiben für 20 Stunden behandelt und ein WST-Proliferationstest nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Absorption der unbehandelten Zellen wurde als Index für 100%ige Lebensfähigkeit definiert und die Absorption der Löcher mit behandelten Zellen prozentual auf diesen Wert bezogen. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente.

3.3.4 Die verschiedenen Coxibe lösen in unterschiedlichem Ausmaß eine Zellzyklusblockade und die Induktion von Apoptose in HCT-116- und HCA-7-Zellen aus

Im Weiteren wurde untersucht, ob den verschiedenen Coxiben ein zu Celecoxib ähnlicher molekularer Wirkungsmechanismus zugrunde liegt. Daher wurde im Folgenden der Einfluss der Coxibe auf die Zellzyklusverteilung und die Apoptoserate in HCT-116- und HCA-7-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Untersuchungen sollten gleichzeitig auch dazu dienen, Informationen über die Ursachen der unterschiedlichen Sensitivitäten von HCT-116- und HCA-7-Zellen gegenüber den verschiedenen Coxiben im WST-Proliferationstest (vergleiche Kapitel 3.3.3) zu erhalten (siehe Abbildung 3.21).

Nach Behandlung von HCT-116-Zellen mit 40-60 μM Celecoxib und 20-40 μM Methylcelecoxib wurde ein mit $p < 0,05$ signifikanter Anstieg von Zellen in der G_1 -Phase beobachtet, während die Zahl von Zellen in der S- und G_2 -Phase mit $p < 0,05$ parallel hierzu teils signifikant abfiel. Bei Konzentrationen von 60–100 μM Celecoxib und 60-80 μM Methylcelecoxib kam es zudem in HCT-116-Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate, die durch den Anstieg der Zellzahl in der Sub G_1 -Phase charakterisiert ist. Dagegen hatte Valdecoxib in HCT-116-Zellen keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung.

In HCA-7-Zellen konnte nach Behandlung mit 0-100 μM Celecoxib für 20 Stunden ein ausgeprägter, mit $p < 0,05$ teils signifikanter Anstieg von Zellen in der Sub G_1 -Phase beobachtet werden, der eine starke Induktion von Apoptose kennzeichnet. Parallel hierzu fiel die Zahl der Zellen in der S- und G_2 -Phase mit $p < 0,05$ teils signifikant ab. Diese Effekte waren nach Behandlung der HCA-7-Zellen mit Methylcelecoxib deutlich stärker als mit Celecoxib, so dass der Konzentrationsbereich auf 0-60 μM Methylcelecoxib beschränkt wurde. Ein G_1 -Zellzyklusblock, wie er in HCT-116-Zellen stattfindet, wurde in HCA-7-Zellen weder nach Behandlung mit Celecoxib noch Methylcelecoxib beobachtet. In HCA-7-Zellen kam es nach Behandlung mit 0-100 μM Valdecoxib zu einem leichten und konzentrationsabhängigen Anstieg von Zellen in der Sub G_1 - und G_1 -Phase sowie zu einem schwachen Abfall der Zellzahl in der S-Phase.

Ähnlich zu Valdecoxib hatten Rofecoxib und Etoricoxib selbst beim Einsatz hoher Konzentrationen bis zu 100 μM nur einen schwachen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung oder Apoptoserate in HCA-7- und HCT-116-Zellen. Eine Illustration der Daten für Rofecoxib und Etoricoxib findet sich in Abbildung 3.22.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass HCA-7-Zellen deutlich sensitiver auf die Apoptose-induzierende Wirkung von Celecoxib und Methylcelecoxib reagierten als COX-2-negative HCT-116-Zellen. Methylcelecoxib zeigte in HCA-7-Zellen eine stärkere apoptotische Wirksamkeit als Celecoxib. In HCT-116-Zellen ergab sich zwischen Celecoxib und Methylcelecoxib jedoch kein deutlicher Unterschied. Valdecoxib, Rofecoxib und Etoricoxib hatten nur einen schwachen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung in HCT-116- und HCA-7-Zellen.

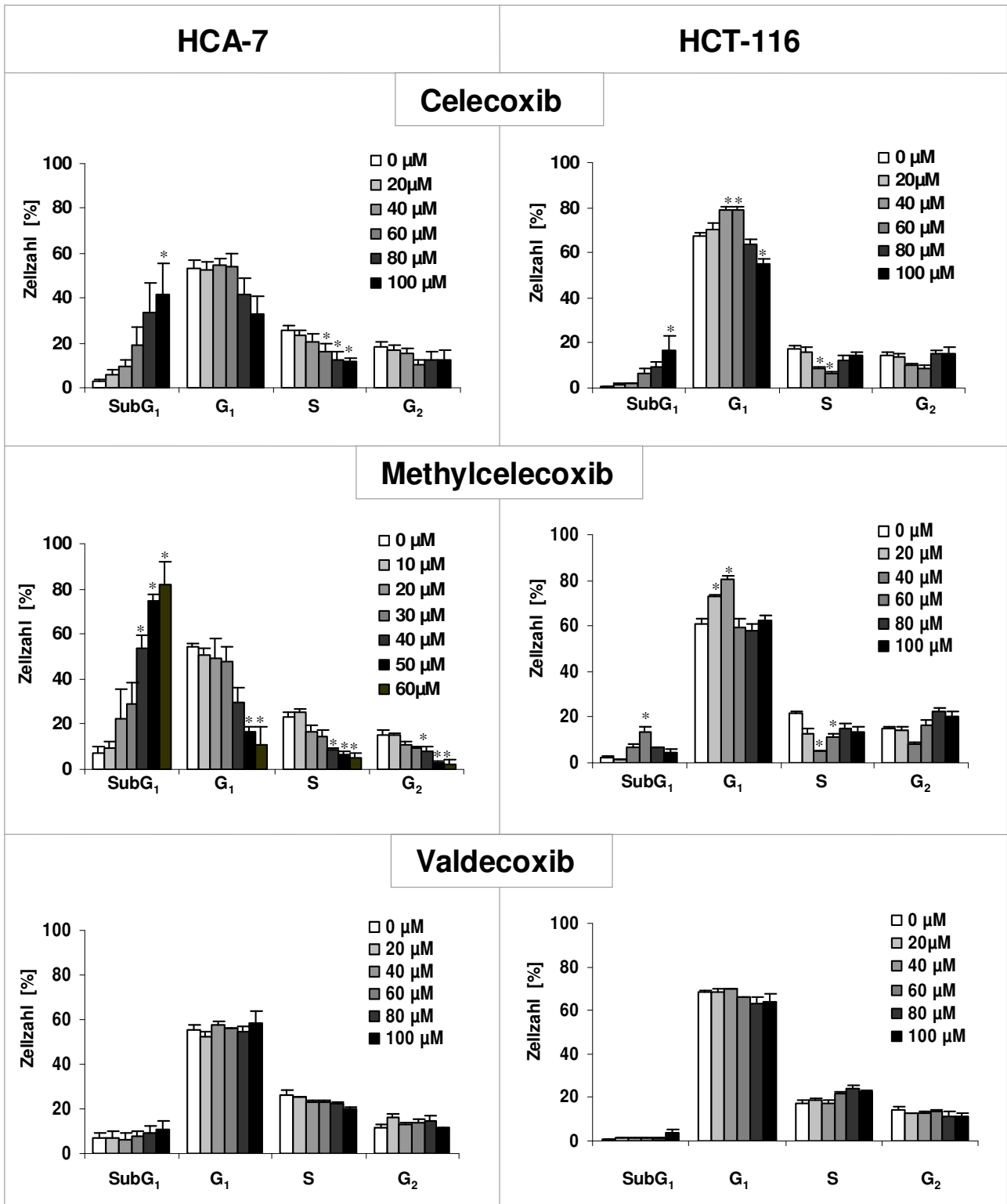


Abbildung 3.21: Zellzyklusanalyse von HCA-7- und HCT-116-Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib, Methylcelecoxib und Valdecoxib für 20 Stunden. Nach der Behandlung mit den Coxiben wurden die Zellen abtrypsinisiert, in Ethanol fixiert, die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und die Zellzyklusverteilung der Zellen zytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede von behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (0 µM Coxib) mit $p < 0,05$.

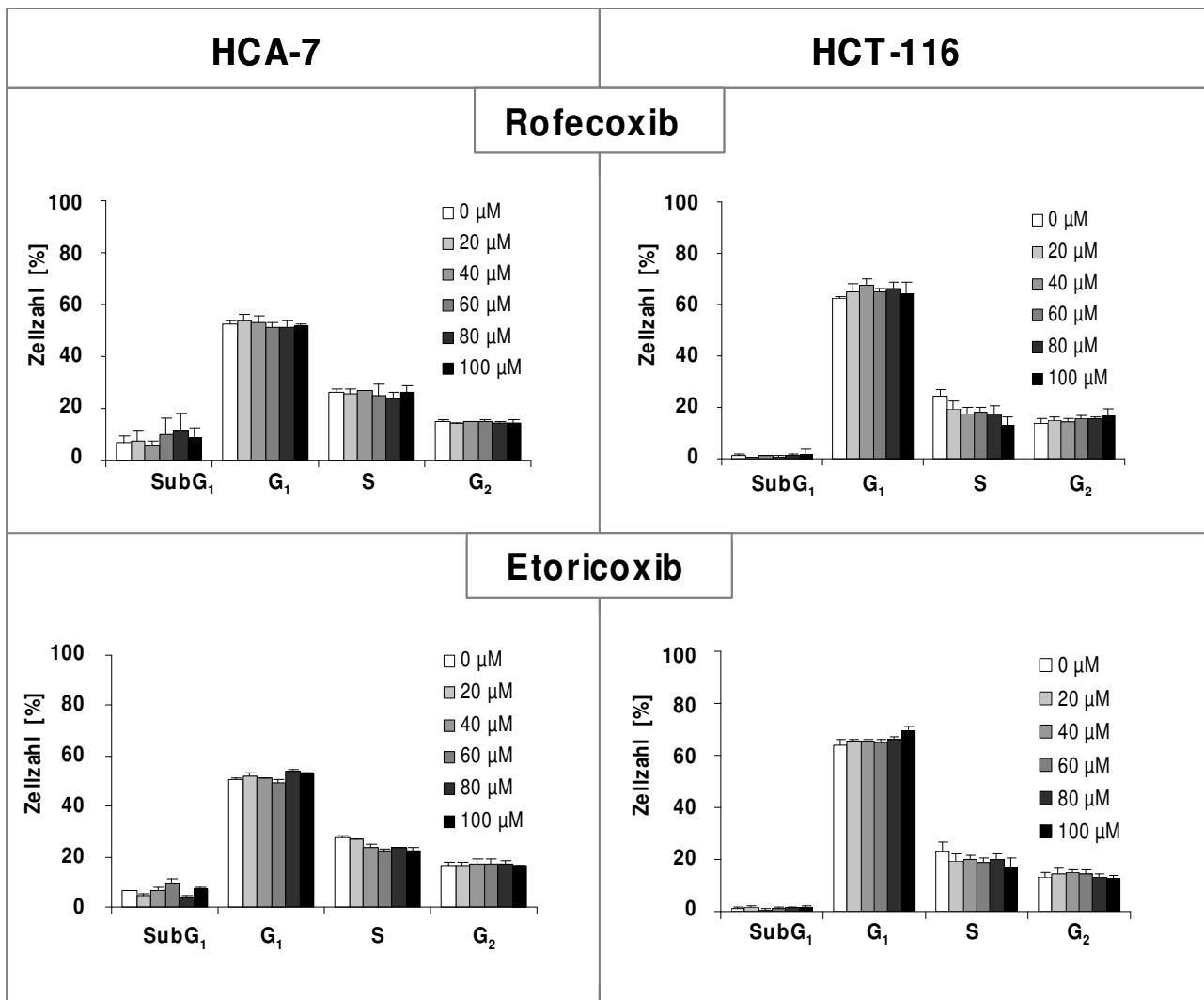


Abbildung 3.22: Zellzyklusanalyse von HCA-7- und HCT-116-Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an Rofecoxib und Etoricoxib für 20 Stunden. Nach der Behandlung mit den Coxiben wurden die Zellen abtrypsinisiert, in Ethanol fixiert, die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und die Zellzyklusverteilung der Zellen zytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt jeweils die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.3.5 Darstellung der Induktion von Apoptose und Zellzyklusblockade mittels Western Blot-Analyse

3.3.5.1 Übersicht über die durchgeführten Experimente

Um Informationen über die molekularen Mechanismen zu erhalten, die für die beobachteten antiproliferativen Effekte, insbesondere von Celecoxib und Methylcelecoxib, verantwortlich sind, wurde mittels Western Blot-Analyse die Expression von Regulatorproteinen der Apoptose und der Zellzyklustransition nach Coxibbehandlung untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen an Celecoxib, Methylcelecoxib und Valdecoxib für 20 Stunden behandelt und die Expression der Proteine Cyclin D1 und p27 analysiert. Cyclin D1 fördert u.a. den Übergang aus der G₁- in

die S-Phase, während p27 ein potenter Inhibitor der Cyclin D1/CDK-Komplexe ist und somit den G₁-S-Übergang hemmt. Für die Darstellung der Induktion von Apoptose wurde die Spaltung des Caspase-Substrats PARP nach Behandlung der Zellen mit Celecoxib, Methylcelecoxib, Valdecoxib, Rofecoxib und Etoricoxib untersucht.

3.3.5.2 Celecoxib, Methylcelecoxib und Valdecoxib beeinflussen unterschiedlich stark die Expression der Zellzyklus-Regulatorproteine Cyclin D1 und p27 in HCT-116- und HCA-7-Zellen

Nach Behandlung von HCT-116-Zellen mit Celecoxib und Methylcelecoxib für 20 Stunden kam es bei Konzentrationen von $\geq 40 \mu\text{M}$ zu einer starken Reduktion der Cyclin D1-Expression (siehe Abbildung 3.23 A, rechts). Auch Valdecoxib verursachte in HCT-116-Zellen einen Abbau von Cyklin D1. Parallel hierzu verursachte die Behandlung von HCT-116-Zellen mit Celecoxib und Methylcelecoxib bei Konzentrationen von $\geq 20 \mu\text{M}$ einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Expression von p27, wobei dieser Effekt nach Behandlung der Zellen mit Valdecoxib jedoch erst bei Konzentrationen von $\geq 60 \mu\text{M}$ auftrat und schwächer ausgeprägt war (siehe Abbildung 3.23 B, rechts).

In HCA-7-Zellen kam es nach Behandlung mit Celecoxib und Methylcelecoxib ebenso zu einem konzentrationsabhängigen Abbau von Cyclin D1, dieser war jedoch schwächer ausgeprägt als in HCT-116-Zellen (siehe Abbildung 3.23 A, links). Im Gegensatz zu HCT-116-Zellen hatte Valdecoxib keinen Effekt auf die Expression von Cyclin D1 in HCA-7-Zellen. Eine Induktion von p27 nach Behandlung mit Celecoxib und Methylcelecoxib erfolgte in HCA-7-Zellen jeweils bei Konzentrationen zwischen 20-40 μM (siehe Abbildung 3.23 B, links). Insgesamt war diese Induktion ebenfalls schwächer ausgeprägt als in HCT-116-Zellen. Valdecoxib hatte keinen Effekt auf die Expression von p27 in HCA-7-Zellen.

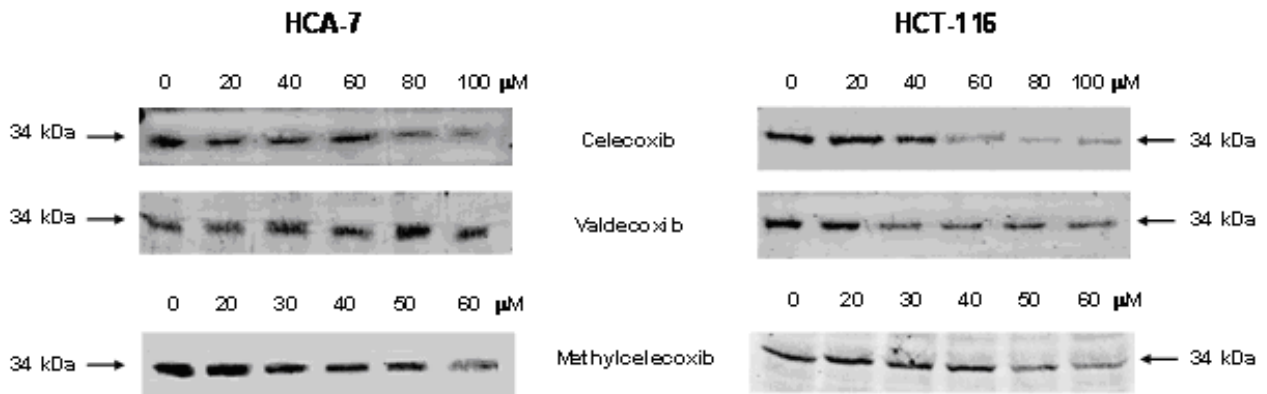
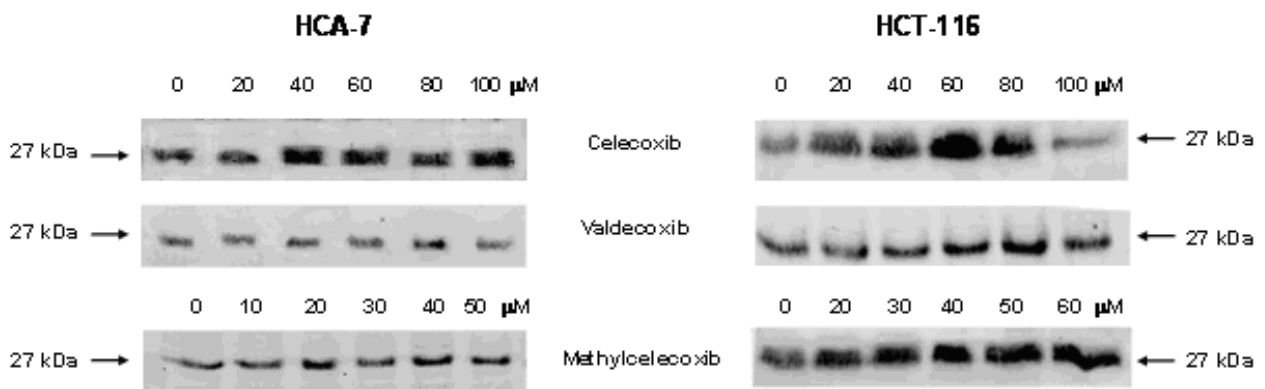
A**Cyclin D1****B****p27**

Abbildung 3.23: Western Blot-Analyse der Expression von Cyclin D1 (A) und p27 (B) in HCA-7- (links) und HCT-116-Zellen (rechts) nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an Coxiben für 20 Stunden. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment zweier unabhängiger Experimente.

3.3.5.3 Celecoxib und Methylcelecoxib, nicht jedoch die anderen Coxibe, verursachen eine PARP-Spaltung in HCT-116 und HCA-7-Zellen

In Analogie zu Kapitel 3.3.5.2 wurden die Zellen zunächst für 20 Stunden mit steigenden Coxibkonzentrationen behandelt. Eine Spaltung von PARP erfolgte in HCA-7-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib bei Konzentrationen $\geq 60 \mu\text{M}$, während die Entstehung der 85-kDa-Fragmente nach Behandlung mit Methylcelecoxib bereits bei Konzentrationen von $\geq 30 \mu\text{M}$ zu erkennen war (siehe Abbildung 3.24,

links). Valdecoxib verursachte keine erkennbare PARP-Spaltung in HCA-7-Zellen. In HCT-116-Zellen kam es bei Konzentrationen von $\geq 80 \mu\text{M}$ Celecoxib und $\geq 50 \mu\text{M}$ Methylcelecoxib zu einer Spaltung der PARP, während Valdecoxib keine erkennbare PARP Spaltung verursachte (siehe Abbildung 3.24 rechts). Nach Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen an Rofecoxib und Etoricoxib ergab sich keine PARP-Spaltung.

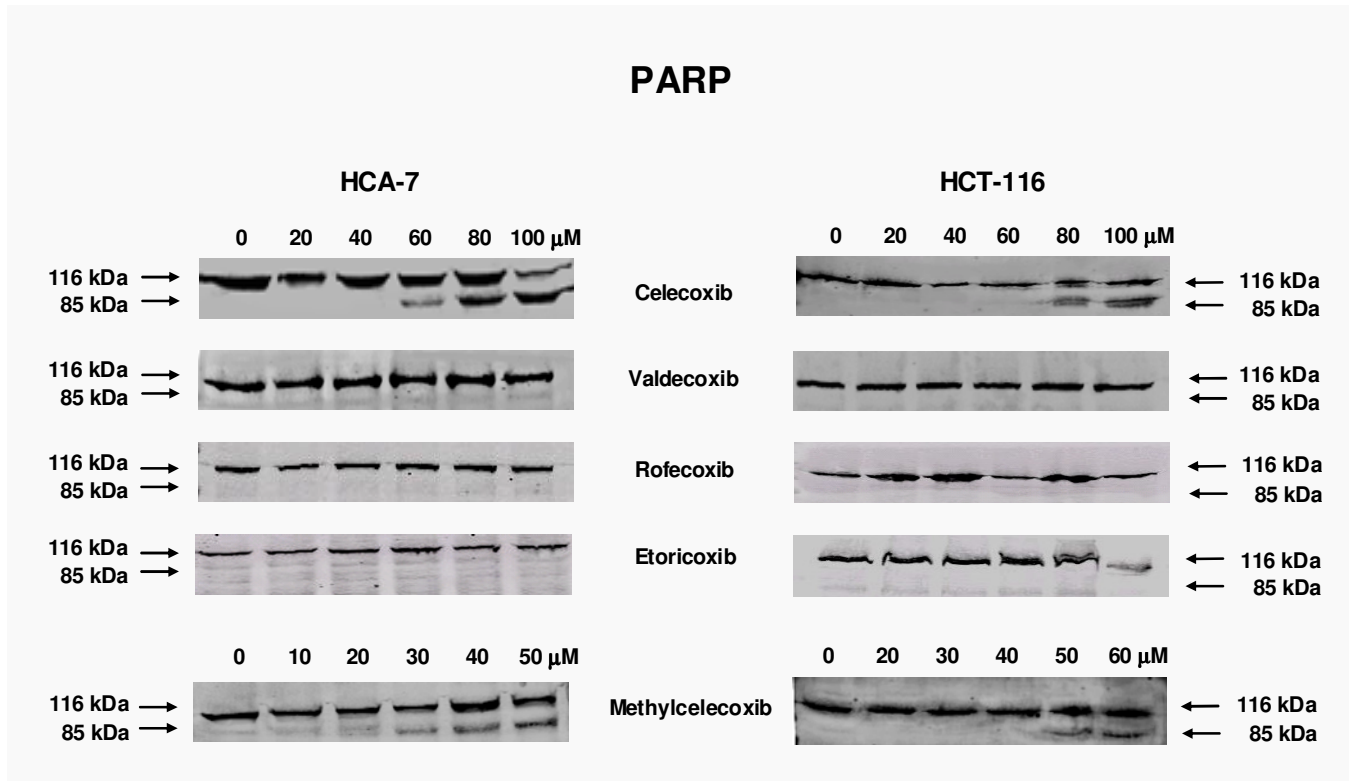


Abbildung 3.24: Western Blot-Analyse der Expression von PARP in HCA-7- (links) und HCT-116-Zellen (rechts) nach Behandlung mit den angegebenen Coxibkonzentrationen für 20 Stunden. Es wurde ein polyklonaler Antikörper gegen humane PARP verwendet, der sowohl das Holoenzym (112 kDa) als auch das Spaltprodukt (85 kDa) erkennt. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels Ponceaufärbung und durch Analyse der ERK-2-Expression kontrolliert. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment zweier unabhängiger Experimente.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Western Blot-Analysen aus Kapitel 3.3.5.2 und 3.3.5.3, dass es nach Behandlung von HCA-7-Zellen mit Celecoxib und Methylcelecoxib zu einer starken Induktion von Apoptose kommt, die durch eine frühe PARP-Spaltung charakterisiert ist. In HCT-116-Zellen wurde eine schwächere Induktion von Apoptose nach Behandlung mit Celecoxib und Methylcelecoxib beobachtet, jedoch war die Zellzyklusblockade mit Induktion von p27 sowie Abbau von Cyclin D1 stärker ausgeprägt als in HCA-7-Zellen. Methylcelecoxib erzeugte in HCA-7-Zellen stärkere antikarzinogene Effekte als Celecoxib. HCT-116-Zellen zeigten nach Behandlung mit Methylcelecoxib eine frühere Induktion von Apoptose als nach Behandlung mit Celecoxib. Die anderen Coxibe waren hingegen in beiden Zelllinien nur schwach antiproliferativ wirksam.

3.3.6 Der prozentuale Anteil an freiem Wirkstoff in Medium mit 10% FCS (fetal calf serum) ist bei den Coxiben unterschiedlich

Wie bereits in Tabelle 1.2 dargestellt besitzen die verschiedenen Coxibe eine hohe Protein-Bindungsaffinität, wodurch die freien Coxibkonzentrationen im Plasma deutlich niedriger liegen als die entsprechenden totalen Konzentrationen. Da die Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Coxiben in Anwesenheit von 10% Kälberserum erfolgte, waren auch in den Zellkulturexperimenten die freien Coxibkonzentrationen im Medium entsprechend niedriger als die eingesetzten Konzentrationen. Weil überwiegend nur freie und ungebundene Coxibe in die Zelle aufgenommen werden (siehe Kapitel 3.3.9), sind Informationen über die freien Coxibkonzentrationen im Medium wichtig für die Interpretation der antiproliferativen Effekte dieser Wirkstoffe.

Mittels LC/MS/MS konnte gezeigt werden, dass ca. 30% des eingesetzten Celecoxibs frei und Proteinungebunden vorliegen (Abbildung 3.25 A). Der Anteil an freiem Wirkstoff lag bei Valdecoxib und Methylcelecoxib im Bereich von 40%. Die Methylsulfone Rofecoxib und Etoricoxib wiesen hingegen deutlich höhere freie Konzentrationen auf (freier Anteil 78% bei Etoricoxib und 93% bei Rofecoxib). Im Gegensatz zu den anderen Coxiben war der Anteil an freiem Lumiracoxib im Medium annähernd linear von der eingesetzten totalen Lumiracoxibkonzentration abhängig (siehe Abbildung 3.25 B), was auf eine frühe Absättigung der Proteinbindungsstellen von Lumiracoxib und auf eine strukturbedingte, von den restlichen Coxiben abweichende Pharmakokinetik von Lumiracoxib hindeutet.

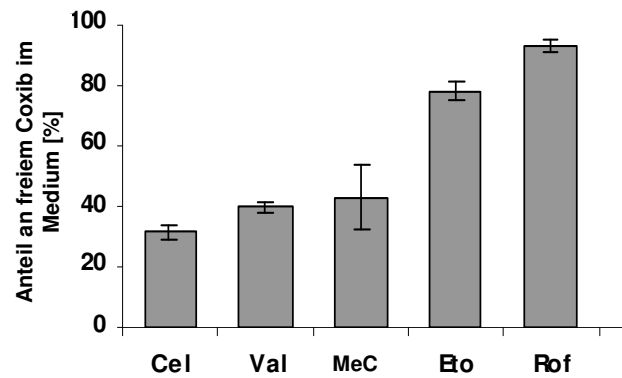
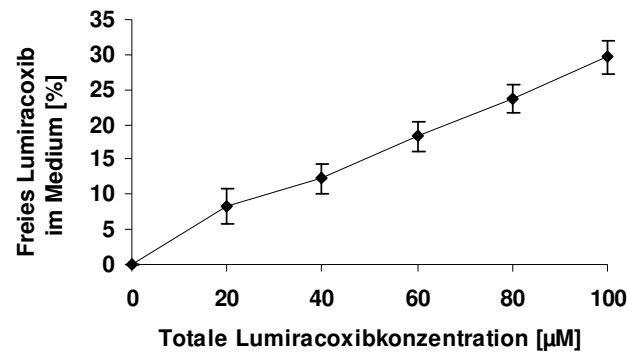
A**B**

Abbildung 3.25: (A) Bestimmung des prozentualen Anteils an freiem, ungebundenem Coxib im Bezug auf die totale Konzentration im Medium mit 10% FCS. 10 ml Medium mit steigenden Konzentrationen an Coxiben (0, 20, 40, 60, 80, 100 µM) wurden zunächst bei 37 °C für 20 Stunden ultrazentrifugiert, die Konzentration der Coxibe im nahezu Protein-freien Überstand mittels LC/MS/MS bestimmt und daraus der prozentuale Anteil an freiem Coxib im Medium errechnet. Abgebildet sind die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten unter Verwendung verschiedener Coxibkonzentrationen (20, 40, 60, 80, 100 µM. Abkürzungen: Cel, Celecoxib; Val, Valdecoxib; MeC, Methylcelecoxib; Eto, Etoricoxib; Rof, Rofecoxib. (B) Abhängigkeit des prozentualen Anteils an freiem Lumiracoxib in Medium mit 10% FCS von der totalen eingesetzten Lumiracoxibkonzentration. 10 ml Medium mit den angegebenen Konzentrationen an Lumiracoxib wurden zunächst ultrazentrifugiert, die freie Konzentration von Lumiracoxib im nahezu Protein-freien Überstand mittels LC/MS/MS bestimmt und daraus der prozentuale Anteil an freiem Lumiracoxib im Medium errechnet. Abgebildet sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.7 Die intrazellulären Konzentrationen von Celecoxib und Methylcelecoxib in HCT-116- und HCA-7-Kolonkarzinom-Zellen sind deutlich höher als die freien Wirkstoffkonzentrationen in Medium mit 10% FCS

Die effektive Aufnahme der Coxibe in die Kolonkarzinom-Zellen stellt eine Voraussetzung für den Angriff der Coxibe an intrazelluläre Targets dar. Die folgenden Experimente sollten die Frage klären, welche intrazellulären Wirkstoffkonzentrationen in HCT-116- und HCA-7-Zellen nach Behandlung mit den verschiedenen Coxiben erreicht werden und ob eine mögliche Korrelation zwischen der Stärke der antikarzinogenen Effekte und der intrazellulären Konzentration der Coxibe besteht. In einem Vorexperiment wurden HCT-116-Zellen zunächst mit 100 μM Celecoxib für verschiedene Zeiten (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 16; 24 Stunden) behandelt und die jeweilige intrazelluläre Celecoxibkonzentration mittels LC/MS/MS bestimmt (Experiment nicht dargestellt). Es zeigte sich, dass sich eine intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration von Celecoxib bereits nach ca. 0,5 Stunden einstellt. Diese Beobachtung wurde auch in nachfolgenden Experimenten unter Verwendung kleinerer Inkubationsintervalle bestätigt (siehe Abbildung 3.27 A). Für den Vergleich der intrazellulären Konzentrationen der verschiedenen Coxibe wurde eine Inkubationszeit von 2 Stunden gewählt, da sich bei dieser Behandlungsdauer bereits eine stabile Gleichgewichtskonzentration von Celecoxib eingestellt hat, morphologische Veränderungen der Zelle durch Apoptose mit möglicher Auswirkung auf Coxibaufnahme oder -abgabe jedoch noch nicht zu erwarten sind. Für die Experimente wurden die Zellen mit hohen Konzentrationen an Coxib (80 und 100 μM) behandelt, da insbesondere die intrazellulären Konzentrationen von Etoricoxib nahe der analytischen Nachweisgrenze liegen. Die gemessenen intrazellulären Konzentrationen der Coxibe wurden anschließend in das prozentuale Verhältnis zur jeweiligen freien Konzentration der Coxibe im Medium mit 10% FCS gesetzt (siehe Abbildung 3.26). Diese Berechnung erlaubt Aussagen über mögliche intrazelluläre Aufkonzentrierungseffekte der Coxibe gegenüber dem Medium. Interessanterweise war die intrazelluläre Celecoxibkonzentration in HCT-116- und HCA-7-Zellen nach 2 Stunden Inkubationsdauer ca. 3-fach höher als die entsprechende freie Konzentration im Medium. Die intrazelluläre Konzentration vom Methylcelecoxib war in HCT-116-Zellen ca. um den Faktor 2, in HCA-7-Zellen um annähernd den Faktor 3,5 höher als die freie Konzentration im Medium. Im Vergleich zu Celecoxib wurden für Valdecoxib, Etoricoxib, Rofecoxib und Lumiracoxib niedrigere intrazelluläre Konzentrationen gemessen, die alle unterhalb der entsprechenden freien Mediumkonzentration lagen.

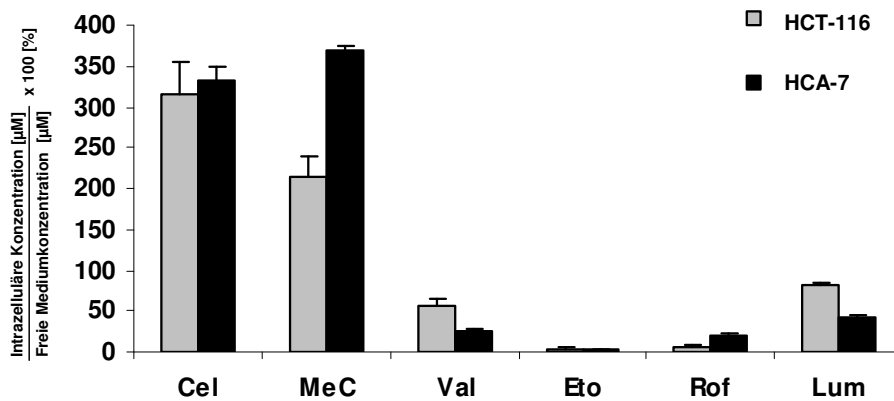


Abbildung 3.26: Relative intrazelluläre Coxibkonzentration im Bezug auf die entsprechende freie Konzentration der Coxibe im Medium mit 10% FCS. Die Zellen wurden zunächst mit 100 μM Coxib für 2 Stunden behandelt, anschließend mehrfach mit kaltem PBS gewaschen und der wässrige Zellbestandteil durch Ultrazentrifugation ausgepresst. Die Konzentration der Coxibe im PBS-Überstand wurde anschließend mittels der LC/MS/MS Methode bestimmt und die errechnete intrazelluläre Konzentration relativ zur freien Konzentration des entsprechenden Coxibs im Medium angegeben. Abgebildet sind die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten. Abkürzungen: Cel, Celecoxib; MeC, Methylcelecoxib; Val, Valdecoxib; Eto, Etoricoxib; Rof, Rofecoxib; Lum, Lumiracoxib.

3.3.8 Untersuchung zur Aufnahme von Celecoxib in HCT-116-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Inkubationstemperatur

Um Informationen über die pharmakokinetischen Eigenschaften der Aufnahme von Celecoxib in die Kolonkarzinom-Zellen zu erhalten, wurden HCT-116-Zellen für verschiedene Zeiten mit 100 μM Celecoxib behandelt und die jeweiligen intrazellulären Konzentrationen mittels LC/MS/MS bestimmt (Abbildung 3.27 A). Es zeigte sich, dass bereits nach 5 Sekunden Inkubationsdauer eine intrazelluläre Celecoxibkonzentration von ca. 23 μM erreicht wurde. Nach Inkubation der Zellen für 5 Minuten (300 s) betrug die intrazelluläre Konzentration bereits ca. 96 μM . Bei längeren Inkubationszeiten stabilisierten sich die Werte der intrazellulären Konzentrationen im Bereich von 90-110 μM .

Die Aufnahme von Celecoxib in die Zelle kann entweder durch aktiven Transport unter direktem oder indirektem Verbrauch von ATP (Adenosintri-phosphat) oder passiv durch Diffusion erfolgen. Im Gegensatz zur Diffusion ist der aktive Transport temperaturabhängig und kommt bei 4 °C weitgehend zum Erliegen. Im nächsten Schritt wurden daher HCT-116-Zellen mit 100 μM Celecoxib für 2 Stunden bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (37 °C, RT, 12 °C und 4 °C) behandelt und die jeweiligen intrazellulären Konzentrationen bestimmt (Abbildung 3.27 B). Die Aufnahme von Celecoxib konnte durch die niedrigeren Temperaturen jedoch nicht gehemmt werden, vielmehr kam es bei Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 12 °C zu signifikant ($p < 0,05$) höheren intrazellulären Celecoxibkonzentrationen ($278 \pm 40 \mu\text{M}$) im Vergleich zur Kontrolle bei 37 °C ($123 \pm 13 \mu\text{M}$). Die intrazelluläre Celecoxibkonzentration nach Inkubation der Zellen bei 4 °C war mit $207 \pm 21 \mu\text{M}$ niedriger als bei 12 °C, jedoch noch immer höher als die

Kontrollkonzentration bei 37 °C (siehe Abbildung 3.27 B). Interessanterweise kam es bei Erniedrigung der Temperatur auf bis zu 4 °C zu einer mit $p < 0,05$ signifikanten Erniedrigung des Anteils an freiem Celecoxib in reinem Medium mit 10% FCS (siehe Abbildung 3.27 C). Die Erhöhung der intrazellulären Celecoxibkonzentrationen bei Erniedrigung der Inkubationstemperatur lässt sich daher nicht über eine temperaturbedingte Erhöhung der freien Celecoxibkonzentration im Medium erklären.

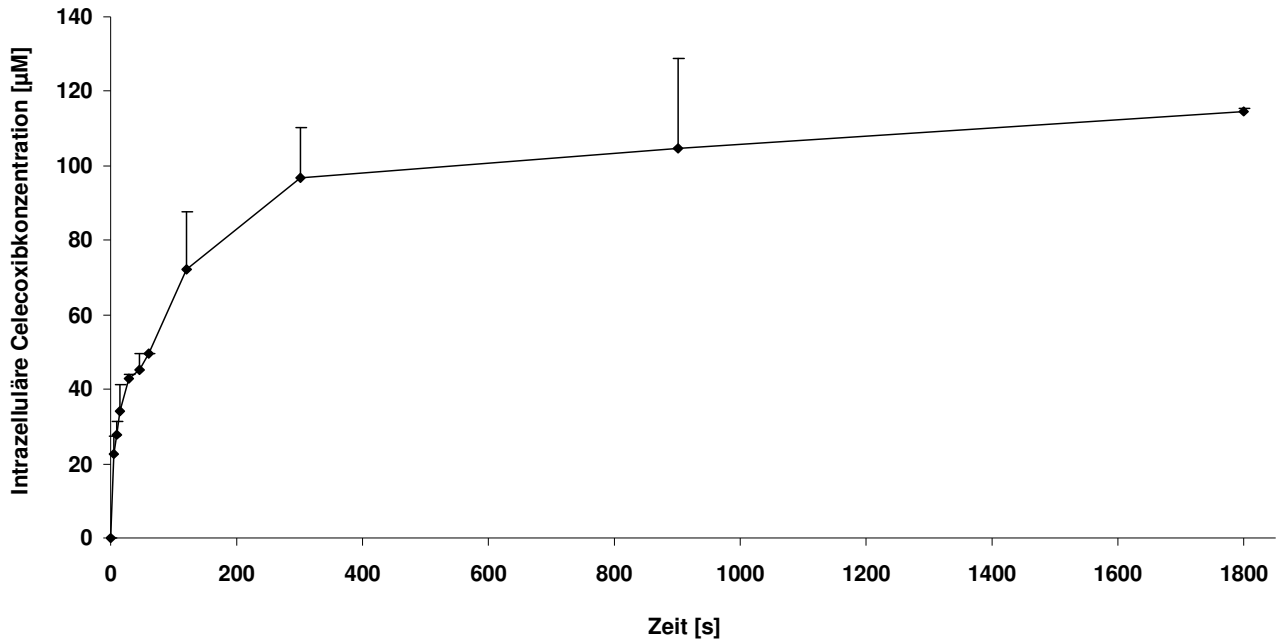
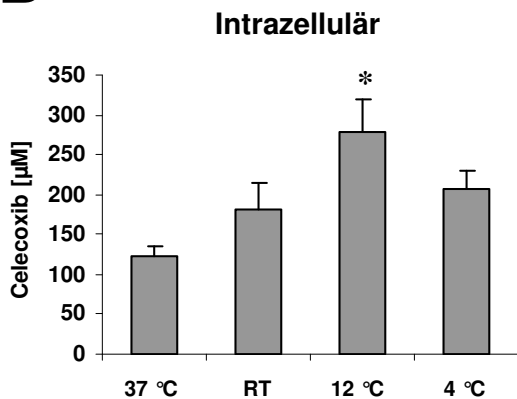
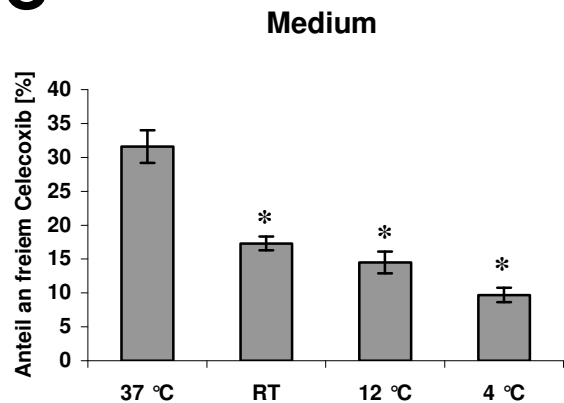
A**B****C**

Abbildung 3.27: Untersuchungen zur Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Aufnahme von Celecoxib in HCT-116-Kolonkarzinom-Zellen. (A) Zur Messung der Zeitabhängigkeit wurden die Zellen mit 100 µM Celecoxib für die angegebenen Zeiten behandelt und die intrazellulären Konzentrationen mittels LC/MS/MS bestimmt. (B) Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit wurden die Zellen mit 100 µM Celecoxib für 2 Stunden bei den angegebenen Temperaturen inkubiert und die intrazellulären Konzentrationen mittels LC/MS/MS bestimmt. (C) Zusätzlich wurde die Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils an freiem Celecoxib in Medium mit 10% FCS ohne Zellen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) zwei bzw. (B) drei bzw. (C) fünf unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 37 °C sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Abkürzungen: s, Sekunden; RT, Raumtemperatur.

3.3.9 Die Bindung von Celecoxib an Mediumproteine hemmt dessen Aufnahme in HCT-116-Kolonkarzinom-Zellen

In vorausgegangenen Experimenten (siehe Kapitel 3.3.6) konnte gezeigt werden, dass im Konzentrationsbereich von 0-100 μM annähernd 70% des gesamten Celecoxibs in FCS-haltigem Medium an Proteine gebunden vorliegen. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Bindung von Celecoxib an Mediumproteine dessen Aufnahme in die Zelle beeinflusst (siehe Abbildung 3.28). Im ersten Schritt wurden HCT-116-Zellen mit jeweils 10 μM Celecoxib in Medium mit 10% FCS (Kontrolle) und in FCS-freiem Medium für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es zeigte sich, dass der Entzug von FCS die intrazelluläre Konzentration von Celecoxib mit $p < 0,05$ signifikant um annähernd den Faktor 3,5 erhöht. Die Wahl der niedrigen Ausgangskonzentration von 10 μM Celecoxib in diesem Experiment verhindert bei Entzug von FCS extrem hohe und toxische intrazelluläre Celecoxibkonzentrationen. Im nächsten Schritt wurde Celecoxib zunächst mit 100 g/l BSA (bovine serum albumin, dreifach höhere Konzentration im Vergleich zum Plasma) in PBS für 30 Minuten vorbehandelt, dem FCS-haltigen Medium zu einer Endkonzentration von 100 μM Celecoxib zugegeben und anschließend HCT-116-Zellen mit diesem Medium für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Vorbehandlung des Celecoxibs mit BSA führte zu einem mit $p < 0,05$ signifikanten Abfall der intrazellulären Konzentration um mehr als 90% im Vergleich zur Kontrollkonzentration (100 μM unbehandeltes Celecoxib in Medium mit 10% FCS). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass maßgeblich das freie, ungebundene Celecoxib in die Kolonkarzinom-Zellen aufgenommen wird, während eine Bindung von Proteinen an Celecoxib dessen Aufnahme in die Zelle hemmt.

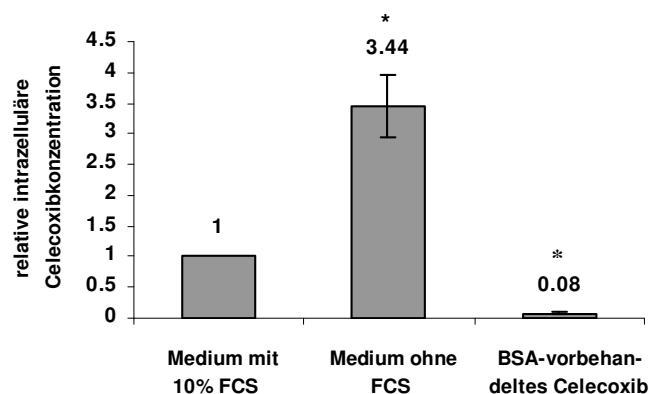


Abbildung 3.28: Untersuchungen zum Einfluss der Proteinbindung von Celecoxib auf die Aufnahme in HCT-116-Zellen. Zur Kontrolle wurden die Zellen zunächst mit 100 μM bzw. 10 μM Celecoxib in Medium mit 10% FCS für 2 Stunden behandelt und die intrazelluläre Celecoxibkonzentration mittels LC/MS/MS bestimmt. Weiterhin wurden die Zellen mit 10 μM Celecoxib in FCS-freiem Medium bzw. mit 100 μM Celecoxib, das zuvor mit 100 g/ml BSA für 30 Minuten vorbehandelt wurde, für 2 Stunden inkubiert und die intrazellulären Konzentrationen bestimmt. Diese Konzentrationen wurden anschließend in das Verhältnis zur jeweiligen Kontrollkonzentration gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollkonzentration sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

3.3.10 Kontrollexperimente zur Validierung der Methode zur Bestimmung intrazellulärer Coxibkonzentrationen

Im Folgenden sollen Kontrollexperimente aufgeführt werden, die zur Validierung der intrazellulären Messungen dienen:

Adsorption der Coxibe an verwendete Materialien: Zum Ausschluss von möglichen Adsorptionseffekten der Coxibe wurden alle verwendeten Materialien (Eppendorfgläser, Falcon-Tube, Zellkulturschalen, Pipettenspitzen) mit einer Kontrolllösung bekannter Celecoxibkonzentration in intensiven Kontakt gebracht und anschließend die Celecoxibkonzentration mittels LC/MS/MS bestimmt. Keine Adsorption zeigte sich bei Zellkulturschalen, Falcon-Tubes und Pipettenspitzen. Dagegen wiesen klassische Eppendorfgläser eine potentielle Adsorption von Celecoxib auf (zu erkennen am Abfall der Celecoxibkonzentration in der Kontrolllösung). Alternativ zu den klassischen Eppendorfgläsern wurden speziell beschichtete Ultrazentrifugationsgefäße (Eppendorf, Hamburg) verwendet, die keine Adsorption der Coxibe zeigten.

Bestimmung der Celecoxibkonzentration der PBS-Waschlösungen: Wie bereits in Kapitel 2.6 beschrieben, wurden die Zellen nach der Coxibbehandlung zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration viermal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Bei vorausgegangener Inkubation mit 100 μM Celecoxib betrug die Konzentration im Waschpuffer nach viermaligem Waschen $0,16 \pm 0,03 \mu\text{M}$ Celecoxib und war somit vernachlässigbar gegenüber den intrazellulären Konzentrationen von Celecoxib. Viermaliges Waschen war also für dieses Experiment ausreichend.

Bestimmung der Celecoxibkonzentration in einer PBS-Lösung nach 16-stündiger Inkubation über den gewaschenen Zellen: Wie bereits in Kapitel 2.6 beschrieben, wurden die mit Celecoxib behandelten und bereits gewaschenen Zellen vor der 16-stündigen Ultrazentrifugation mit 200 μl PBS überschichtet. Als Kontrollexperiment wurden daher 200 μl PBS-Lösung für 16 Stunden ohne Ultrazentrifugation über den Zellen stehen gelassen und anschließend die Celecoxibkonzentration mittels LC/MS/MS bestimmt. Im direkten Vergleich zur filtrierten Celecoxibmenge nach Ultrazentrifugation verließen ca. 25% des intrazellulären Celecoxibs die Zellen ohne das Einwirken von Zentrifugalkräften.

Bestimmung der Proteinkonzentration des PBS-Überstandes nach der Ultrazentrifugation: Mittels der Bradford-Methode wurde die Proteinkonzentration der überstehenden PBS-Lösung nach der Ultrazentrifugation der Zellen zu $0,62 \pm 0,19 \text{ mg/ml}$ bestimmt. Aufgrund der hohen Proteinbindung der Coxibe wäre eine Protein-freie Lösung ideal, ließ sich jedoch selbst beim Einsatz sehr hoher Zentrifugalkräfte von 180.000 g nicht realisieren.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib in COX-2-transfizierten Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib eine antikarzinogene Wirksamkeit sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* besitzt. Celecoxib ist zurzeit das einzige NSAID, das von der FDA für die adjuvante Behandlung von Patienten mit einer FAP-Erkrankung zugelassen wurde. Die Rolle der COX-2-Hemmung sowie COX-2-unabhängiger Mechanismen bei der Auslösung dieser anti-neoplastischen Effekte ist nach wie vor unklar. Um Informationen zu erhalten, in welchem Ausmaß die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib von der COX-2-Expression der Tumor-Zellen abhängen, wurden humane Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen mit pcDNA-Vektoren transfiziert, in denen die humane COX-2-cDNA in sense- und antisense- Orientierung inkloniert wurde. Anschließend wurden die Zell-Klone mit Celecoxib behandelt und die ausgelösten antikarzinogenen Effekte in den verschiedenen Zelltypen miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass COX-2-defiziente hCOX-2-as-Zellen eine signifikant niedrigere Apoptoserate nach Behandlung mit Celecoxib aufweisen als COX-2-überexprimierende hCOX-2-s- und pcDNA-Zellen. Jedoch ergaben sich bei der Untersuchung der G₁-Zellzyklusblockade mittels Durchflusssyztometrie und der Expression Zellzyklus-regulierender Proteine mittels Western Blot-Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zell-Klonen.

Gesteigerte Apoptoseraten in Verbindung mit erhöhter COX-2-Expression wurden auch von Li et al. (Li et al., 2001) und Chang und Weng et al. (Chang and Weng, 2001) nach Behandlung von 15 humanen Kolon- bzw. Lungenkarzinom-Zelllinien mit dem COX-2-selektiven Inhibitor NS-398 beschrieben. Ferner berichtete Hsu et al. über erhöhte Apoptoseraten in COX-2-überexprimierenden Prostatakarzinom-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib (Hsu et al., 2000). Die Behandlung von COX-2-überexprimierenden HT-29-Kolonkarzinom-Zellen mit SC-236, einem COX-2-selektiven Strukturanalogon von Celecoxib, führte ebenfalls zu deutlich höheren Apoptoseraten im Vergleich zu COX-2-defizienten HCT-116-Zellen (Agarwal et al., 2003). Aus diesen Beobachtungen und den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann geschlussfolgert werden, dass die Expression der COX-2 für die Induktion von Apoptose durch COX-2-selektive NSAIDs nicht essentiell ist, da eine Auslösung von Apoptose auch in COX-2-defizienten Kolonkarzinom-Zellen stattfindet. Jedoch scheint die Hemmung der COX-2 auf noch unklare Weise die apoptotischen Effekte dieser Wirkstoffe zu verstärken, da in dieser und den oben genannten Studien höhere Apoptoseraten in COX-2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu COX-2-defizienten Zellen nach Behandlung mit verschiedenen COX-2-Inhibitoren beobachtet wurden.

Für einige Prostaglandine, insbesondere PGE₂, konnte in mehreren Studien eine antiapoptotische und wachstumsfördernde Wirkung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Entsprechend wurden auch in hCOX-2-s-Zellen erhöhte Prostaglandin E₂-Konzentration im Medium und gesteigerte Wachstumsraten beobachtet. In Analogie zur erhöhten Apoptoserate in hCOX-2-s-Zellen verursachte Celecoxib auch in Tiermodellen und

Patienten eine Regression von Tumorgewebe mit erhöhter COX-2-Expression, wobei es zu keiner nennenswerten Schädigung von gesundem Gewebe kam (Kawamori et al., 1998; Zweifel et al., 2002).

Um die Rolle der COX-2 bei der Induktion von Apoptose durch NSAIDs besser verstehen zu können, wurden kürzlich humane Leberkarzinom-Zellen mit COX-2-Expressionsvektoren transfiziert. Auch bei diesen Zellen wurde, bedingt durch die erhöhte COX-2-Aktivität, eine gesteigerte Proliferationsrate beobachtet. In Verbindung mit der COX-2-Überexpression kam es in diesen Zellen auch zu einem erhöhten Phosphorylierungsstatus der PKB/Akt-Kinase (Leng et al., 2003). Mit Celecoxib behandelte Zellen zeigten neben den morphologischen und biochemischen Charakteristika der Induktion von Apoptose auch eine reduzierte Phosphorylierung der PKB/Akt-Kinase. Exogen zugeführtes PGE₂ konnte die durch Celecoxib verursachten Effekte jedoch nur teilweise aufheben (Leng et al., 2003). Daraus wurde gefolgert, dass die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib sowohl über COX-2-abhängige, als auch COX-2-unabhängige Effekte vermittelt werden. Eindeutige Hinweise für die Existenz von COX-2-unabhängigen Mechanismen von Celecoxib ergaben sich auch aus Studien mit Rofecoxib, das eine ca. 5-fach höhere COX-2-Selektivität und höhere Potenz als Celecoxib aufweist. Nach Behandlung von verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien mit Rofecoxib wurden deutlich schwächere antiproliferative Effekte im direkten Vergleich zu Celecoxib beobachtet, obwohl die COX-2 bei den verwendeten Rofecoxibkonzentrationen nahezu vollständig gehemmt wurde (Patti et al., 2002; Waskewich et al., 2002). Interessanterweise waren zudem die Konzentrationen von Celecoxib und Rofecoxib, die für die Auslösung der antiproliferativen Effekte in Zellkulturexperimenten eingesetzt werden mussten, in dieser Studie und auch in der vorliegenden Arbeit deutlich höher (Faktor 50-100) als die IC₅₀-Werte für die Hemmung der COX-2. Dieses Phänomen wurde auch in einer klinischen Studie von Steinbach et al. beschrieben. Die tägliche Gabe von 800 mg Celecoxib führte bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis zu signifikant reduzierter Polypenbildung und Polypengröße, während eine Dosis von 100 mg täglich (die empfohlene Dosierung zur Behandlung von rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis und ausreichend für eine gesamte COX-2-Hemmung) nahezu unwirksam war.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die oben genannten Studien und erbringt neue Hinweise auf COX-2-unabhängige antikarzinogene Mechanismen von Celecoxib. Die Untersuchung der Celecoxib-vermittelten G₁-Zellzyklusblockade und der Abnahme von Zellen in S- und G₂/M-Phase sowie die Analyse des Abbaus von Cyclin A und Cyclin B und der Induktion der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 in den Caco-2-Klonen konnte zeigen, dass die durch Celecoxib verursachte Zellzyklusblockade unabhängig vom COX-2-Expressionsstatus der Zellen stattfindet. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch COX-2-unabhängige Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Auslösung der antikarzinogenen Effekte durch Celecoxib spielen.

Neuere Untersuchungen zu den antineoplastischen Mechanismen von Celecoxib führten zur Identifikation mehrerer, COX-2-unabhängiger Angriffspunkte, die bei der Celecoxib-vermittelten Induktion von Zellzyklusblockade und Apoptose wahrscheinlich beteiligt sind. Dabei ergab sich, dass Interferenzen von Celecoxib mit Zytokin-gekoppelten Signaltransduktionswegen eine wichtige Bedeutung zukommt. So konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Apoptose durch Celecoxib mit einer Hemmung der Phosphatidylinositol-Triphosphat-abhängigen Kinase-1 (PKC-1) in Verbindung steht. Nach Stimulation der

Zellen mit bestimmten Wachstumsfaktoren phosphoryliert die PDK-1 die Akt-Kinase, die wiederum eine Reihe von Proteinen, darunter I κ B α , CREB, Bad und Caspase-9 phosphoryliert. Aktivierung der Akt-Kinase führte letztendlich zu gesteigerter Zellproliferation und Apoptoseresistenz (Belham et al., 1999). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Celecoxib in höheren Konzentrationen (50 μ M–100 μ M) die PDK-1 in HT-29-Kolonkarzinom-Zellen hemmt. Die PDK-1-Hemmung korrelierte mit einer Inhibition der Phosphorylierung der Akt-Kinase und förderte so die Induktion von Apoptose und Zellzyklusblockade in HT-29-Zellen. Diese Resultate wurden zudem durch die Beobachtung gestützt, dass eine konstitutive Überexpression von aktiver PDK-1 in HT-29-Zellen eine weitgehende Resistenz gegenüber Celecoxib-induzierter Apoptose bewirkte (Arico et al., 2002).

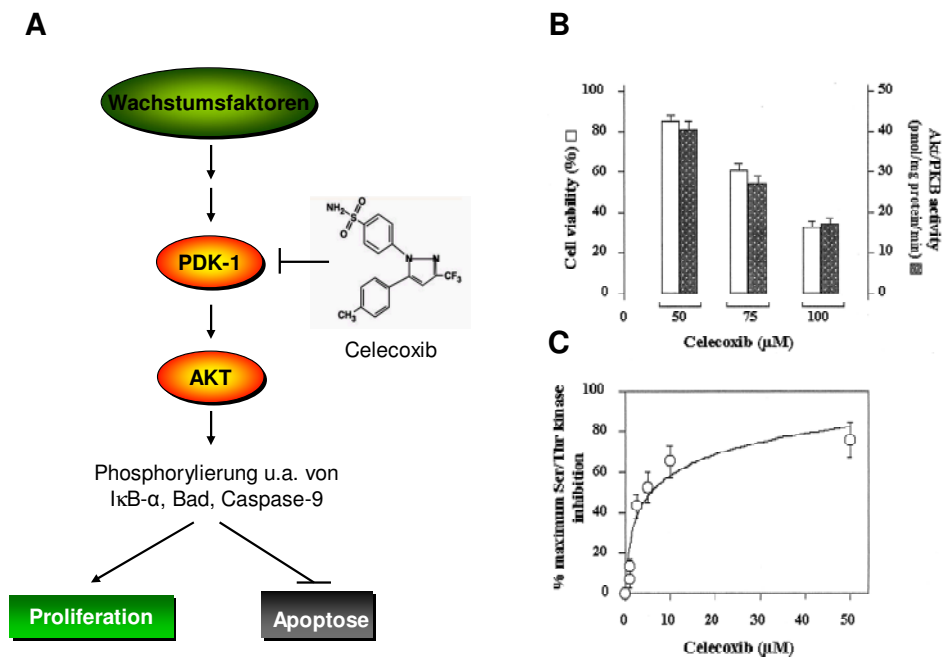


Abbildung 4.1: Angriffspunkt von Celecoxib am PDK-1/Akt-Signaltransduktionsweg. (A) Durch Hemmung der PDK-1 kommt es zu einer reduzierten Akt-Kinase Phosphorylierung und folglich zu einer Verminderung der antiapoptotischen und proliferationsfördernden Wirkung der Akt-Kinase. Abbildung nach DuBois, RA et al. 2003. (B) Die Celecoxib-vermittelte Hemmung der PDK-1 in humanen HT-29 Kolonkarzinom-Zellen korrelierte direkt mit der Verminderung der Proliferationsrate. (C) Aktivität immunpräzipitierter PDK-1 in Gegenwart steigender Celecoxibkonzentrationen. Der IC₅₀-Wert für die Hemmung der PDK-1 betrug in diesem Experiment 3,5 μ M. Abhängig vom PDK-1-Assay wurden jedoch von anderen Autoren auch höhere IC₅₀-Werte für die Celecoxib-vermittelte Hemmung der PDK-1 ermittelt (siehe Kapitel 3.2.2). Abbildungen B und C entnommen aus Arico, S et al. 2002.

Neben dem Angriff am PDK-1/Akt-Signal-transduktionsweg konnte gezeigt werden, dass Celecoxib eine Aktivierung des EGR-1- (early growth response) Transkriptionsfaktors hemmt. Auf diverse Wachstumssignale hin erhöht dieser Faktor die Expression verschiedener Angiogenesefaktoren und Zytokine und fördert somit auch das Tumorwachstum (Szabo et al., 2001). Weiterhin wurde nach Behandlung von Pankreaskarzinom-Zellen eine Hemmung der Angiogenese durch eine verminderte DNA-Bindungsaktivität

des Transkriptionsfaktors Sp1 und dadurch bedingte reduzierte Expression von VEGF beobachtet (Wei et al., 2004). Interessanterweise wurden für Celecoxib auch Angriffspunkte außerhalb von Zytokin-gekoppelten Signaltransduktionswegen beschrieben. So beobachteten Johnson et al. nach Behandlung von Prostatakarzinom-Zellen mit Celecoxib einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, der durch eine Celecoxib-vermittelte Hemmung einer Ca^{2+} -ATPase des Endoplasmatischen Retikulums verursacht wird. Dieser Anstieg verursachte über die Aktivierung von Caspasen und die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien eine Induktion von Apoptose in diesen Zellen (Johnson et al., 2002). Es existieren auch neueste Studien, die die Aktivierung der Caspasen nach Celecoxib-Behandlung in direkte Verbindung mit einem durch Celecoxib verursachten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials bringen (Ding et al., 2005).

Die oben beschriebenen, COX-2-unabhängigen Mechanismen wurden überwiegend in Zellkulturmodellen unter Verwendung hoher Celecoxibkonzentrationen (50-100 μM) beobachtet. Die verwendeten Konzentrationen waren deutlich höher als der IC_{50} -Wert für die Hemmung der COX-2 durch Celecoxib, was die COX-2-Unabhängigkeit dieser Mechanismen unterstreicht. Auch in der vorliegenden Arbeit mussten für die Auslösung von antiproliferativen Effekten vergleichbar hohe Celecoxibkonzentrationen eingesetzt werden. Daher könnten die oben genannten COX-2-unabhängigen Mechanismen von Celecoxib auch bei der Auslösung der antikarzinogenen Effekte in den Caco-2-Klonen eine Rolle spielen.

Interessanterweise erfolgte die Induktion der Zellzyklusblockade in den Caco-2-Klonen bei niedrigeren Celecoxibkonzentrationen (40 μM) als die Induktion von Apoptose (60-100 μM), was auf eine Unabhängigkeit dieser Prozesse hindeutet.

Es kann argumentiert werden, dass solch hohe Konzentrationen physiologisch selbst nach hochdosierter Gabe von Celecoxib im Plasma niemals erreicht werden können und die bei diesen hohen Konzentrationen auftretenden COX-2-unabhängigen Mechanismen keine Bedeutung für die Situation *in vivo* hätten. Wie im Plasma von Patienten nach Gabe von Celecoxib, sind auch die im Medium mit 10% FCS auf die Zellen einwirkenden Celecoxibkonzentrationen deutlich niedriger (ca. 30% des Celecoxib liegen frei und Proteinungebunden vor, siehe auch Kapitel 3.3.6) als die eingesetzten, totalen Konzentrationen. Zudem konnten neuere Untersuchungen zeigen, dass die in Zellkulturmodellen gewonnenen Mechanismen auch *in vivo* nach deutlich längeren Applikationszeiten (Wochen oder Monate) zu beobachten sind. So konnte in Gewebeproben arterieller Blutgefäße aus Ratten, die mit Celecoxib behandelt wurden, eine reduzierte Phosphorylierung der Akt-Kinase beobachtet werden, die wirksam die neointimale Hyperplasie nach gezielter Verletzung des Gefäßes durch Ballon-Dilatation reduzieren konnte (Yang et al., 2004). Die bereits oben beschriebene Hemmung der Akt-Kinase durch Celecoxib scheint daher auch Relevanz für die Situation *in vivo* zu besitzen.

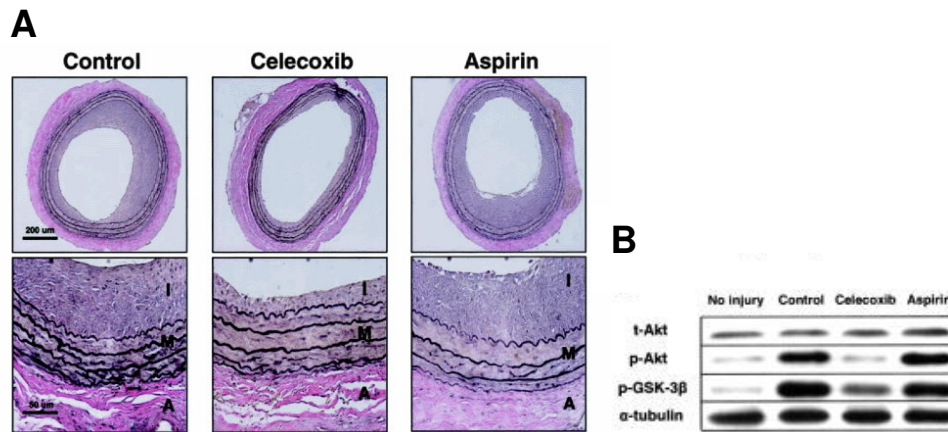


Abbildung 4.2: (A) Histologische Schnitte von arteriellen Gefäßen aus Ratten. Celecoxib reduzierte die neointimale Hyperplasie in Arterien von Ratten, die zwei Wochen zuvor durch gezielte Verletzung des Gefäßes mit einem Ballon ausgelöst wurde. Aspirin dagegen hatte keinen Effekt auf die Hyperplasie. (B) Eine Western Blot-Analyse erbrachte, dass die Hemmung der neointimalen Hyperplasie durch eine Celecoxib-vermittelte Inhibition der Akt-Phosphorylierung *in vivo* verursacht wurde. Abbildungen entnommen aus Yang, HM et al. 2004.

Zusammengefasst konnten in diesem Abschnitt der Arbeit gezeigt werden, dass die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib nur teilweise von der COX-2-Expression der Zellen abhängig sind. So wurden anti-proliferative Effekte nach Celecoxib-Behandlung auch in COX-2-defizienten hCOX-2-as-Zellen beobachtet und die Induktion der G1-Zellzyklusblockade erfolgte unabhängig vom COX-2-Expressionsstatus der Caco-2-Zellen. Daher spielen auch COX-2-unabhängige Mechanismen bei der Auslösung der antikarzinogenen Effekte durch Celecoxib eine wichtige Rolle.

4.2 Der Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg als COX-2-unabhängiger Angriffspunkt von Celecoxib in humanen Kolonkarzinom-Zellen

Basierend auf den Erkenntnissen des ersten Teils dieser Arbeit wurde mittels nachfolgender Experimente versucht, COX-2-unabhängige Angriffspunkte von Celecoxib zu identifizieren. Untersuchungen zur Entstehung des Kolonkarzinoms konnten zeigen, dass Mutationen im APC- oder Beta-Catenin-Gen eine entscheidende Rolle bei der Transformation von gesundem Gewebe zu Tumorgewebe zukommt (Fujimori et al., 2001; Sparks et al., 1998). Weiterhin ist der Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg wesentlich an der Regulation von Apoptose (Zhang et al., 2001) und Zellzyklusprogression (Heinen et al., 2002) beteiligt. Interessanterweise wurde insbesondere bei Tumorerkrankungen, die durch eine Dysregulation des Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweges charakterisiert sind, eine antineoplastische Wirksamkeit von Celecoxib beschrieben (Spano et al., 2004; Steinbach et al., 2000). Diese Beobachtung ließ eine mögliche Verbindung zwischen den antikarzinogenen Effekten von Celecoxib und dem Beta-Catenin/APC-

Signaltransduktionsweg als möglichen Angriffspunkt vermuten. Um diese Hypothese experimentell bestätigen zu können, wurde der Einfluss von Celecoxib auf den Beta-Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen Kolonkarzinom-Zellen untersucht.

So wurde nach Behandlung von humanen Caco-2-Zellen mit Celecoxib eine Freisetzung von Beta-Catenin aus der Zellmembran in das Zytoplasma beobachtet, der eine starke Degradierung des Proteins folgte. Ferner konnte gezeigt werden, dass diese Freisetzung durch die GSK-3 β (Glykogensynthase-Kinase-3 β) vermittelt wird und somit durch Phosphorylierung von Beta-Catenin stattfinden könnte. Tatsächlich ergab die Western Blot-Analyse, dass es nach Behandlung der Zellen mit Celecoxib zu einer Dephosphorylierung und daraus resultierender Aktivierung der GSK-3 β kommt. Die zytoplasmatische Akkumulation von Beta-Catenin wurde ferner von einer schnellen Translokation des Proteins in den Zellkern begleitet. Überraschenderweise kam es parallel hierzu zu einer deutlichen Abnahme der Beta-Catenin-DNA-Bindungsaktivität. Nach der zellulären Reorganisation wurde ein starker Abbau von Beta-Catenin beobachtet, der sowohl durch proteasomale Aktivitäten, als auch durch Caspasen verursacht wird. Experimente mit Celecoxib-behandelten Caspase-3-defizienten humanen MCF-7-Mammakarzinom-Zellen und humanen HCT-116-Kolonkarzinom-Zellen, in denen ein GSK-3 β -abhängiger Abbau von Beta-Catenin aufgrund einer Mutation im Beta-Catenin-Protein nicht stattfindet, konnten zeigen, dass Caspasen und das Proteasom Beta-Catenin unabhängig voneinander abbauen. Jedoch konnte eine Beta-Catenin-Degradierung weder nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit dem COX-2-selektiven Inhibitor Rofecoxib, noch nach Behandlung mit dem stark antiproliferativ wirksamen NSAID R-Flurbiprofen beobachtet werden. Dies verdeutlicht, dass die durch Celecoxib verursachten Effekte auf den Beta-Catenin/APC-Weg weder eine Konsequenz der COX-2-Hemmung darstellen, noch unspezifisch als generelle Folge der Induktion von Apoptose auftreten.

Diese Ergebnisse werden durch neuere Studien unterstützt, in denen reduzierte Beta-Catenin-Spiegel nach Behandlung von humanen Kolonkarzinom-Zellen mit verschiedenen NSAIDs, darunter Sulindac-Sulfid und Sulindac-Sulfon, beschrieben wurden. Im Gegensatz zu Sulindac-Sulfid zeigt das Sulfon keine COX-2-Hemmung, woraus geschlossen wurde, dass der Abbau von Beta-Catenin nicht durch eine Hemmung der COX-2 verursacht wird. Zudem hatte die Behandlung von humanen Kolonkarzinom-Zellen mit dem selektiven COX-2-Inhibitor Rofecoxib keinen Effekt auf die Expression von Beta-Catenin (Boon et al., 2004; Gardner et al., 2004; Rice et al., 2003).

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre konnten zeigen, dass der Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg bei der Entwicklung von Tumoren eine zentrale Rolle spielt. Im Falle des Kolonkarzinoms finden sich im Tumorgewebe häufig Mutationen des APC-Proteins, das beim proteasomalen Abbau von Beta-Catenin beteiligt ist. Dysregulationen des Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweges wurden jedoch auch bei anderen extragastrintestinalen Tumortypen beschrieben (Kolligs et al., 2002; Rask et al., 2003). Zum Beispiel wurden APC-Mutationen häufig in Gewebeproben aus fortgeschrittenen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) gefunden und mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Sanz-Ortega et al., 1999). Eine Dysregulation des Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweges geht häufig mit einer Hochregulation der Expression von unphosphoryliertem Beta-Catenin einher, das nach der

Neusynthese in die Zellkerne transloziert und im Komplex mit TCF/Lef-Proteinen die Transkription von spezifischen Zielgenen steigert, darunter c-Myc, Cyclin D1, VEGF und MMP-7 (Crawford et al., 1999; Easwaran et al., 2003; He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999). Die Produkte dieser Gene steigern das Zellwachstum und spielen eine kritische Rolle bei der Karzinogenese. So konnte in einer Beta-Catenin-knockdown Studie mit Kolonkarzinom-Zellen demonstriert werden, dass die reduzierten, zytoplasmatischen Spiegel von Beta-Catenin mit einem stark verminderten Zellwachstum einhergehen. Zudem verloren die transfizierten Beta-Catenin-knockdown-Zellen ihr kanzerogenes Potential im Nacktmausmodell (Cong et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von humanen Kolonkarzinom-Zellen mit Celecoxib die DNA-Bindungsaktivität der Beta-Catenin/TCF/Lef-Komplexe erniedrigt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Dihlmann et al. beschrieben. So wurde nach Behandlung von humanen Kolonkarzinom-Zellen mit Aspirin und Indomethacin eine reduzierte Beta-Catenin/TCF/Lef-DNA-Bindungsaktivität aufgrund einer zytoplasmatischen Stabilisierung von phosphoryliertem Beta-Catenin beobachtet (Dihlmann et al., 2003). Interessanterweise konnte solch phosphoryliertes Beta-Catenin im Zellkern an Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie binden, jedoch wiesen die entstandenen Komplexe keine DNA-Bindungsaktivität auf (Sadot et al., 2002). Die Konsequenzen, die sich aus einer erniedrigten Beta-Catenin-DNA-Bindungsaktivität für die Zelle ergeben, wurden von Heinen et al. untersucht. Zunächst wurde durch eine gezielte Überexpression des Wildtyp-APC-Proteins in humanen Kolonkarzinom-Zellen eine reduzierte Beta-Catenin-Expression sowie verminderte DNA-Bindungsaktivität verursacht. Die Abnahme der Beta-Catenin-Aktivität führte direkt zu einer G₁-Zellzyklusblockade in diesen Zellen (Heinen et al., 2002). Interessanterweise wurde eine solche G₁-Zellzyklusblockade auch in eigenen Studien nach Behandlung von verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien mit Celecoxib beobachtet (Grosch et al., 2001; Maier et al., 2004).

Unter der transkriptionellen Kontrolle von Beta-Catenin/TCF-Komplexen steht jedoch nicht nur die Expression von Proteinen, die das Zellwachstum fördern. Auch die Expression der proapoptotischen Caspasen-3, -6 und -7 wird durch Beta-Catenin und TCF-Faktoren negativ reguliert. So wurde in intestinalen Gewebeproben aus APC^{+/+}-Mäusen und in Tumorgewebe mit APC-Mutationen eine Reduktion der Expression dieser Caspasen um mehr als 50% im Vergleich zu normalem Mucosagewebe beobachtet. Zudem zeigte sich in Verbindung mit der APC-Mutation eine Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli. Hingegen führte eine Überexpression von Wildtyp-APC sowie die Transfektion eines dominant-negativen TCF/Lef-Konstrukts in humanen APC^{-/-}-HT29-Kolonkarzinom-Zellen zu gesteigerter Expression der Caspasen und verstärkter Apoptoserate nach Behandlung der Zellen mit 5-Fluoruracil (Chen et al., 2003). Aus diesen Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass Beta-Catenin/TCF/Lef-Komplexe wichtige Repressoren der Transkription von Caspase-3, -6 und -7-mRNA darstellen. Neben der negativen Regulation von Apoptose auf transkriptioneller Ebene scheint freies nukleares Beta-Catenin auch unabhängig von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor die Apoptose steuern zu können. So führte eine Überexpression von Beta-Catenin in verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien zur Ansammlung von freiem, unkomplexiertem Beta-Catenin im

Zellkern. Das freie Beta-Catenin zeigte keine Bindung an DNA oder Lef/TCF-Faktoren, löste jedoch in allen untersuchten Zelltypen Apoptose aus (Kim et al., 2000). Interessanterweise wurden beide Effekte, sowohl die verminderte Beta-Catenin/TCF/Lef-DNA-Bindung, als auch eine Akkumulation von nuklearem Beta-Catenin nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit Celecoxib beobachtet. Zudem konnten die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.4 dieser Arbeit zeigen, dass die durch Celecoxib in Caco-2-Zellen ausgelöste Apoptose durch eine starke Aktivierung der Caspase-3 und -9 charakterisiert ist (Maier et al., 2004). Zusammenfassend legen die oben beschriebenen Ergebnisse nahe, dass der Abfall der Beta-Catenin/TCF/Lef-DNA-Bindung nach Celecoxib-Behandlung sowohl zur Induktion einer Zellzyklusblockade durch Hemmung der Expression wachstumsfördernder Proteine, als auch zur Auslösung von Apoptose durch transkriptionelle Aktivierung von Caspase-3, -6 und -7 beiträgt. Auch der nach Celecoxib-Behandlung beobachtete erhöhte nukleare Spiegel von Beta-Catenin ohne DNA-Bindungsaktivität könnte zusätzliche apoptotische Signale erzeugen. Der Mechanismus, durch den es nach Behandlung mit Celecoxib zu einem Abfall der DNA-Bindungsaktivität kommt, bleibt unklar. Jedoch könnten Kompetitionseffekte von phosphoryliertem Beta-Catenin mit seiner unphosphorylierten Form um die Bindung an TCF/Lef- Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, da unphosphoryliertes Beta-Catenin für Assoziationen mit der DNA eine Komplexbildung mit TCF/Lef-Faktoren benötigt.

Neben der Hemmung der Beta-Catenin/TCF/Lef-DNA-Bindungsaktivität verursachte Celecoxib in den Caco-2-Zellen auch eine starke Degradierung von Beta-Catenin. Ferner konnte gezeigt werden, dass dieser Abbau sowohl durch GSK-3 β -vermittelte proteasomale Aktivitäten, als auch durch Caspasen erfolgt. Neue Studien liefern Erklärungsansätze für den GSK-3 β -vermittelten Abbau von Beta-Catenin nach Celecoxibbehandlung. So berichteten Cross et al., dass die GSK-3 β -Aktivität wirksam durch PKB/Akt-vermittelte Phosphorylierung gehemmt werden kann (Cross et al., 1994). Zudem berichteten Hsu et al., dass Celecoxib die PKB/Akt-Kinaseaktivität in humanen Prostatakarzinomzellen inhibiert (Hsu et al., 2000). Der zugrundeliegende Mechanismus für diese Hemmung wurde schließlich von Arico et al. aufgeklärt. So konnte gezeigt werden, dass Celecoxib direkt die PDK-1 hemmt (vergleiche auch Kapitel 4.1), die wiederum ein potenter Aktivator der PKB/Akt-Kinase ist. Die durch die PDK-1-Hemmung verursachte Reduktion der PKB/Akt-Kinase-Aktivität verursachte in HT-29-Zellen nach der Behandlung mit Celecoxib eine Induktion von Apoptose (Arico et al., 2002). In Betracht dieser Daten liegt eine mechanistische Verbindung zwischen der Hemmung der PDK-1 durch Celecoxib und dem Abbau von Beta-Catenin nahe. Aus der Hemmung der PDK-1 durch Celecoxib resultiert eine Inaktivierung der PKB/Akt-Kinase sowie eine dadurch bedingte Aktivierung der GSK-3 β , die Membran-assoziiertes Beta-Catenin phosphoryliert und so dem proteasomalen Abbau im Zytoplasma zuführt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Behandlung mit Celecoxib tatsächlich den Ser-9-Phosphorylierungsstatus der GSK-3 β reduziert und das Enzym auf diese Weise aktiviert. Zudem konnte durch Experimente mit dem selektiven GSK-3 β -Inhibitor Lithiumchlorid eine Rolle der GSK-3 β beim Celecoxib-vermittelten Abbau von Beta-Catenin belegt werden. Auch die verzögerte Degradierung von Beta-Catenin in HCT-116-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib deutet auf eine Phosphorylierung von Beta-

Catenin mittels Western Blot-Analyse darzustellen, da die Spezifität des kommerziell erhältlichen Phospho-Beta-Catenin-Antikörpers (Ser-33/-37/Thr-41) zu gering war. Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Beta-Catenin/E-Cadherin-Adhäsionskomplexe konnten zeigen, dass die Freisetzung und der Einbau von Beta-Catenin durch ein sehr komplexes Zusammenspiel verschiedener Kinasen und Phosphatasen reguliert wird (Nelson and Nusse, 2004). Daher könnten neben der GSK-3 β auch weitere Kinaseaktivitäten bei der Freisetzung von Beta-Catenin aus der Membran beteiligt sein. Die präzisen mechanistischen Vorgänge an der Zellmembran bleiben noch unklar und erfordern weitere Untersuchungen. Mechanistische Untersuchungen des Abbaus von Beta-Catenin durch Celecoxib erbrachten, dass die Degradierung von Beta-Catenin auch durch Caspaseaktivitäten erfolgt. Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtung wurde von Steinhusen et al. beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Beta-Catenin ein Substrat von Caspase-3 darstellt und direkt durch dieses Enzym gespalten werden kann (Steinhusen et al., 2000) und die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.4 demonstrieren, dass Celecoxib in humanen Caco-2-Zellen eine starke Aktivierung von Caspase-3 verursacht (Maier et al., 2004). Interessanterweise wurde nach Behandlung von Caco-2-Zellen mit R-Flurbiprofen kein Abbau von Beta-Catenin beobachtet, obwohl dieses NSAID eine Caspase-vermittelte Spaltung von PARP verursacht. Möglicherweise spielen daher weitere, Celecoxib-spezifische Mechanismen beim Caspase-3-vermittelten Abbau von Beta-Catenin durch Celecoxib eine Rolle. Die Relevanz der aus den Zellkulturexperimenten gewonnenen Daten für die Situation *in vivo* kann aus Experimenten mit Nacktmäusen abgeleitet werden. So führte eine Applikation von Beta-Catenin-Antisense-Oligonukleotiden zu deutlich vermindertem Wachstum von implantierten Tumoren in Nacktmäusen (Roh et al., 2001). Ähnliche Effekte wurden von Yamada et al. beschrieben, die eine Reduktion der Zahl von Beta-Catenin-angereicherten Krypten im Darm von Ratten, die mit Celecoxib behandelt wurden, beobachteten (Yamada et al., 2001). Schließlich konnten Boon et al. verminderte Level von nuklearem Beta-Catenin in Polypengewebe aus FAP-Patienten messen, die zuvor mit Sulindac behandelt worden waren (Boon et al., 2004). Diese Resultate verdeutlichen, dass eine Reduktion der Expression von Beta-Catenin als antineoplastischer Mechanismus auch für die *in vivo* Situation Relevanz besitzt und zu den antikarzinogenen Effekten von Celecoxib beiträgt.

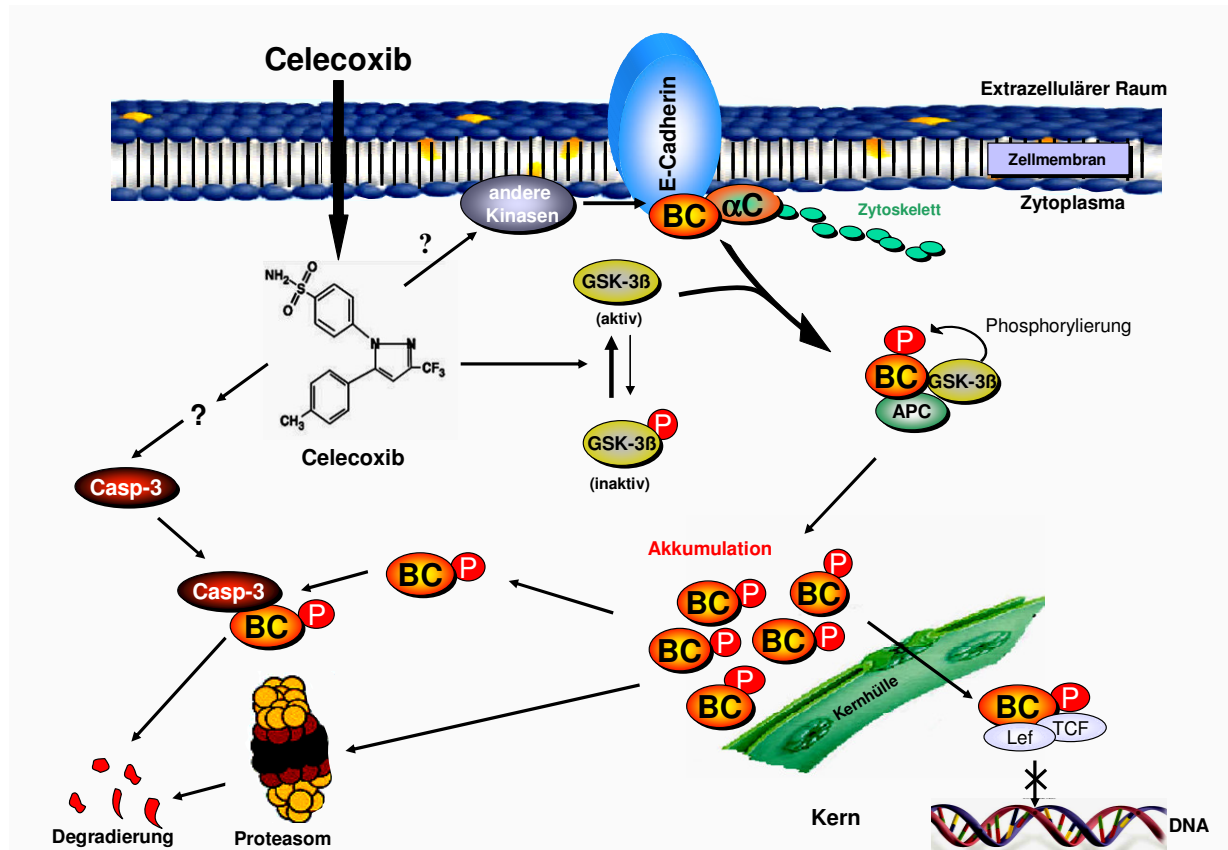


Abbildung 4.3: Zusammenfassendes Diagramm zum Mechanismus des durch Celecoxib verursachten Abbaus von Beta-Catenin. Durch Celecoxib kommt es über eine Aktivierung der GSK-3 β zu einer Phosphorylierung von Membran-gebundenem Beta-Catenin, wodurch das Protein zum proteasomalen Abbau in das Zytoplasma dirigiert wird. Durch bisher unbekannte Mechanismen kommt es ferner zu einer Erniedrigung der TCF/Lef/Beta-Catenin-DNA-Bindungsaktivität. Freies, zytoplasmatisches Beta-Catenin wird anschließend durch Caspasen und das Proteasom abgebaut. Abkürzungen: α C, Alpha-Catenin, BC, Beta-Catenin, GSK-3 β , Glykogensynthase-Kinase-3 β , Lef, lymphoid enhancer factor, TCF, T-cell factor.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass der Angriff am APC/Beta-Catenin-Signaltransduktionsweg einen neuen Ansatz zur Erklärung der antiproliferativen Wirkungsweise von Celecoxib darstellt. Die Bedeutung dieser neuen Resultate wird deutlich, bedenkt man, dass eine starke nukleare Beta-Catenin-Expression in kolorektalen Tumorgewebe mit invasiverem Tumorwachstum, höherer Wahrscheinlichkeit für Rezidiven und geringerer Überlebensrate verbunden ist (Brown et al., 2001). Die vorliegenden *in vitro* Daten legen die Durchführung von klinischen Studien mit Celecoxib zur Behandlung von Tumorerkrankungen nahe, die auf einer Dysregulation des Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweges basieren. Die Arbeit soll zudem zur Entwicklung von neuen antineoplastischen Wirkstoffen beitragen, die, unabhängig von einer COX-2-Hemmung, selektiv am Beta-Catenin-Signaltransduktionsweg angreifen und so das Tumorwachstum hemmen.

4.3 Vergleichende Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung von selektiven COX-2-Inhibitoren in COX-2-überexprimierenden und COX-2-defizienten Kolonkarzinom-Zellen

Die Ergebnisse aus den Kapiteln 3.1 und 3.2 dieser Arbeit konnten darlegen, dass die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib sowohl über COX-2-abhängige, als auch COX-2-unabhängige Mechanismen erklärbar sind. In den letzten Jahren kamen weitere COX-2-Inhibitoren auf den Markt, die eine höhere COX-2-Selektivität als Celecoxib aufweisen. Über mögliche antikarzinogene Effekte dieser COX-2-selektiveren NSAIDs ist jedoch bisher wenig bekannt.

So konnte in der vorliegenden Arbeit mittels WST-Proliferationstest, Durchflusszytometrie und Western Blot-Analyse gezeigt werden, dass Celecoxib und Methylcelecoxib (Struktur analogon von Celecoxib mit schwacher COX-2-Hemmung) starke antikarzinogene Effekte (Zellzyklusblockade und Apoptose) in COX-2-überexprimierenden, als auch in COX-2-defizienten Kolonkarzinom-Zellen verursachen. Unter Behandlung der Zellen mit den COX-2-selektiven Inhibitoren Rofecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib wurden hingegen nur sehr schwache antiproliferative Effekte beobachtet, wobei Valdecoxib unter diesen NSAIDs die stärksten Effekte erzeugte. Interessanterweise reagierten sowohl COX-2-defiziente HCT-116-, als auch COX-2-überexprimierende HCA-7-Zellen deutlich sensitiver auf Methylcelecoxib als auf die Behandlung mit Celecoxib. Zudem waren HCA-7-Zellen empfindlicher gegenüber Celecoxib- und Methylcelecoxib-Behandlung und zeigten eine deutlich stärkere Induktion von Apoptose als HCT-116-Zellen, bei denen die Induktion einer Zellzyklusblockade im Vordergrund stand. Eine LC/MS/MS-Analyse der intrazellulären Coxibkonzentrationen erbrachte, dass es in HCT-116- und auch in HCA-7-Zellen zu einer Aufkonzentrierung von Celecoxib und Methylcelecoxib gegenüber den freien Konzentrationen der Wirkstoffe im Medium kommt, die nach Behandlung der Zellen mit Rofecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib jedoch nicht beobachtet wurde.

Mit der Einführung der COX-2-selektiven Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib im Jahre 1998 und 1999 kam eine neue Generation von Antiphlogistika auf den Markt, die die gastrointestinalen Nebenwirkungen der klassischen COX-unselektiven NSAIDs vermindern sollten. In Patientenstudien aus dem Jahr 2000 wurde eine reduzierte gastrointestinale Toxizität unter Behandlung mit COX-2-selektiven Inhibitoren im direkten Vergleich zu klassischen NSAIDs beobachtet und diese Wirkstoffe daher weltweit v.a. zur Behandlung von Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis verwendet (Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000). Auch die antineoplastische Wirksamkeit von Celecoxib wurde eng mit der selektiven Hemmung der COX-2-Aktivität in Verbindung gebracht (Gupta and Dubois, 2001; Sheng et al., 1997). Diese Hypothese wurde weiterhin durch Studien unterstützt, die eine antineoplastische Wirksamkeit auch von Rofecoxib im APC^{Δ716}-Mäusen (Tiermodell der FAP-Erkrankung) und in Patienten mit kolorektalen Neoplasien belegen konnten (Fenwick et al., 2003; Oshima et al., 2001; Rahme et al., 2003). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich daher auf die Frage, ob auch die antineoplastische Wirksamkeit einen Klasseneffekt aller COX-2-selektiver NSAIDs vom Coxib-Typ darstellt, der infolge der COX-2-Hemmung verursacht wird.

So ergaben sich in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf COX-2-abhängige antikarzinogene Mechanismen aus den deutlich stärkeren Apoptoseraten in COX-2-überexprimierenden HCA-7-Zellen im Vergleich zu COX-2-defizienten HCT-116-Zellen nach Behandlung mit Methylcelecoxib und Celecoxib. Diese Resultate bestätigen auch die Ergebnisse aus dem ersten Teil dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.1), in dem eine erhöhte Apoptoserate in COX-2-überexprimierenden hCOX-2-s-Klonen in Vergleich zu COX-2-defizienten hCOX-2-as-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib beschrieben wurde. Neben den in Kapitel 4.1 erwähnten Arbeiten konnten bereits im Jahre 1997 Studien von Sheng et al. zeigen, dass COX-2-überexprimierende HCA-7-Transplantate in Nacktmäusen und auch kultivierte HCA-7-Zellen deutlich sensitiver auf eine Behandlung mit dem COX-2-selektiven Inhibitor SC-58125 reagierten als COX-2-defiziente HCT-116-Zellen (Sheng et al., 1997). Der den erhöhten Apoptoseraten in COX-2-positiven Kolonkarzinom-Zellen zugrundeliegende Mechanismus bleibt jedoch unklar. Ein möglicher Erklärungsansatz wurde von Cao et al. formuliert, die direkte apoptotische Effekte von akkumulierender Arachidonsäure infolge der COX-2-Hemmung in den Kolonkarzinom-Zellen beobachten konnten (Cao et al., 2000). Auch eine Umwandlung von nicht-umgesetzter Arachidonsäure zu proapoptotischen Ceramiden könnte bei der Auslösung der Apoptose durch selektive COX-2-Inhibitoren eine Rolle spielen (Chan et al., 1998).

Es ergaben sich aus der vorliegenden Studie jedoch stärkere Indizien für COX-2-unabhängige antikarzinogene Mechanismen von Celecoxib. So verursachte Celecoxib, trotz geringer COX-2-Selektivität im Vergleich zu den anderen verwendeten COX-2-Inhibitoren, in allen durchgeführten Experimenten deutlich stärkere antiproliferative Effekte als Rofecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib. Diese Beobachtungen werden durch *in vitro* und *in vivo* Studien bestätigt, in denen eine deutlich schwächere antikarzinogene Wirksamkeit von Rofecoxib im Vergleich zu Celecoxib sowohl in Experimenten mit verschiedenen Zelllinien (Kazanov et al., 2004; Srinath et al., 2003; Waskewich et al., 2002), als auch in klinischen Studien zur Behandlung von Patienten mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen (Becerra et al., 2003) beschrieben wurde. Auch im direkten Vergleich zu COX-2-selektiven bzw. -präferentiellen Inhibitoren anderer Strukturgruppen, wie NS-398, Nimesulid und Etodolac, zeigte Celecoxib die stärksten antikarzinogenen Effekte in kolorektalen Adenokarzinom-Zellen (Yamazaki et al., 2002). Neueste Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung zahlreicher COX-2-selektiver und klassischer NSAIDs in humanen Karzinom-Zellen konnten zudem zeigen, dass Celecoxib auch im Gesamtvergleich zu den stärksten antiproliferativ wirksamen Antiphlogistika gehört (Kardosh et al., 2004; Takada et al., 2004). Weitere Hinweise auf COX-2-unabhängige antikarzinogene Effekte von Celecoxib ergaben sich auch aus den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit dem Celecoxib-Strukturanalogon Methylcelecoxib, in dem der 4-Methyl-Phenylring des Celecoxibs durch einen 2,5-Dimethyl-Phenylring ersetzt wurde. Trotz der hieraus resultierenden starken Verminderung der COX-2-inibitorischen Aktivität (Kulp et al., 2004), zeigte dieser Wirkstoff unter allen verwendeten Coxiben sowohl in HCT-116-, als auch in HCA-7-Zellen die stärksten antiproliferativen Effekte. Auch Kulp et al. beschrieben die im Vergleich zu Celecoxib stärkere antiproliferative Wirksamkeit von Methylcelecoxib in humanen Prostatakarzinom-Zellen, die zudem mit einer relativ zu Celecoxib erhöhten Hemmung der Akt-Kinase durch Methylcelecoxib korrelierte. Weiterhin

konnte von der selben Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Rofecoxib den PDK-1/Akt-Signaltransduktionsweg nur sehr schwach hemmt (Kulp et al., 2004). Die Bedeutung der PDK-1-Inhibition für die Hemmung von Zellwachstum wurde in Arbeiten von Zhu et al. beschrieben. So konnten durch verschiedene Substitutionen des Methyl-Phenylringes Derivate von Celecoxib mit stärkerer PDK-1-Hemmung generiert werden, die, unabhängig von ihrer COX-2-inhibitorischen Aktivität, auch eine stärkere Induktion von Apoptose in PC-3-Prostatakarzinom-Zellen verursachten (Zhu et al., 2004; Zhu et al., 2002). Die im Vergleich zu den anderen Coxiben stärkere Hemmung der PDK-1 durch Celecoxib und Methylcelecoxib könnte somit die in der vorliegenden Arbeit beobachteten starken antiproliferativen Effekte dieser beiden Wirkstoffe, zumindest teilweise, erklären.

Arbeiten von Vullo et al. konnten demonstrieren, dass es in vielen Tumorgeweben zu einer Überexpression verschiedener Formen der Carboanhydrase kommt, die mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf verbunden ist (Vullo et al., 2003). Interessanterweise konnten neuere Untersuchungen demonstrieren, dass die Sulfonamide Celecoxib und Valdecoxib, nicht jedoch das Methylsulfon Rofecoxib, potente Inhibitoren verschiedener Carboanhydrasen sind und durch Störung der Protonenabpufferung im Tumorgewebe eine Hemmung von Tumorgewachstum verursachen könnten (Weber et al., 2004). Eine Hemmung von Carboanhydrasen könnte auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimenten eine Rolle spielen, da die stärksten antiproliferativen Effekte unter Behandlung mit den Sulfonamiden Celecoxib, Methylcelecoxib und Valdecoxib beobachtet wurden. Auch die in Kapitel 4.1 bereits erwähnte Hemmung von endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen war hochgradig spezifisch für Celecoxib und wurde nach Behandlung der Zellen u.a. mit den COX-2-selektiven Inhibitoren NS-398 und Rofecoxib nicht beobachtet.

Neben dem spezifischen Angriff von Celecoxib an intrazellulären Targets, könnte auch der Wirkstoffkonzentration in der Tumor-Zelle für die antiproliferativen Effekte von Celecoxib eine wichtige Bedeutung zukommen. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es in HCT-116- und in HCA-7-Zellen zu einer Aufkonzentrierung von Celecoxib und Methylcelecoxib kommt, die nach Behandlung der Zellen mit Rofecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib jedoch nicht beobachtet wurde.

Interessanterweise korrelierten die gemessenen intrazellulären Coxibkonzentrationen weitgehend mit der Stärke der antiproliferativen Effekte, die nach Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Coxibe zu beobachten waren. So wurden im direkten Vergleich der Coxibe die höchsten intrazellulären Konzentrationen gegenüber der freien Mediumkonzentration bei den Sulfonamiden Methylcelecoxib und Celecoxib beobachtet und diese Sulfonamide verursachten auch in den Zellkulturexperimenten die stärksten antiproliferativen Effekte.

Hinweise auf die Bedeutung der intrazellulären NSAID-Konzentrationen in kolorektalem Tumorgewebe für die Auslösung von antikarzinogenen Effekten ergaben sich bereits in den 80iger Jahren auch aus Arbeiten von Duggan et al. und Waddell et al. So konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an Sulindac-Sulfid im epithelialen Dickdarmgewebe von Mäusen ca. 20-fach höher ist als die entsprechende Plasmakonzentration (Duggan et al., 1980; Waddell et al., 1989). Neuere Studien zur Gewebsverteilung von Celecoxib in Ratten und Hunden erbrachten, dass sich oral appliziertes [¹⁴C] Celecoxib in einer Dosis von 2 mg/kg in nahezu alle Gewebe und Organe verteilt. Die höchsten Konzentrationswerte von Celecoxib wurden in der Leber und in gastrointestinalen Geweben gefunden. (Paulson et al., 2000). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es im Gastrointestinaltrakt zu einer Anreicherung von Celecoxib kommt. Interessanterweise kam es bei oraler Applikation von [¹⁴C] Rofecoxib in Hunden und Ratten ebenso zu einer raschen Verteilung des Wirkstoffes in nahezu alle Gewebe, wobei in gastrointestinalen Geweben keine relativ zu den anderen Geweben erhöhten Konzentrationen von Rofecoxib beobachtet wurde (Halpin et al., 2000). Diese *in vivo* Daten unterstützen die Ergebnisse, die sich aus der Messung der intrazellulären Coxibkonzentrationen in HCT-116- und HCA-7-Kolonkarzinom-Zellen ergaben. Auch in diesen *in vitro* Experimenten wurden für Celecoxib und Methylcelecoxib deutlich höhere intrazelluläre Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Coxiben beobachtet. Weitere *in vivo* Untersuchungen erscheinen hier notwendig, um die Bedeutung der Celecoxibkonzentrationen in den Tumor-Zellen für die Auslösung der antikarzinogenen Effekte zu verstehen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Aufnahme von Celecoxib in HCT-116-Zellen (siehe Abbildung 3.27 A) konnten zeigen, dass bereits nach wenigen Minuten Behandlung mit Celecoxib eine hohe intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration erreicht wird. Auch nach Behandlung von PC-3-Prostatakarzinom-Zellen mit Celecoxib konnte ein rapider Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Celecoxib-vermittelte Hemmung von Ca²⁺-ATPasen des Endoplasmatischen Retikulums innerhalb von Sekunden beobachtet werden, was ebenfalls auf eine schnelle Aufnahme von Celecoxib in die Zellen hinweist (Johnson et al., 2002). Der Mechanismus der Aufnahme von Celecoxib in die Tumorzellen bleibt jedoch noch unklar. Interessanterweise wurde die Aufnahme von Celecoxib in HCT-116-Zellen durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur bis auf 4 °C nicht gehemmt (vergleiche Abbildung 3.27 B), was auf eine passive Aufnahme von Celecoxib durch Diffusion hindeutet. Die Ursache für die überraschenderweise aufgetretene Erhöhung der intrazellulären Celecoxibkonzentration bei Erniedrigung der Inkubationstemperatur bleibt ebenfalls unklar. Weitere Studien sind hier notwendig, um den präzisen Mechanismus der Aufnahme von Celecoxib in die Tumor-Zellen komplett zu verstehen.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass die antineoplastischen Effekte von Celecoxib keinen Klasseneffekt aller COX-2-selektiver NSAIDs darstellen, sondern spezifisch und weitgehend COX-2-unabhängig nach Behandlung der Tumor-Zellen mit Celecoxib oder Celecoxib-Derivaten auftreten. Neben dem Angriff von Celecoxib an spezifische, COX-2-unabhängige intrazelluläre Targets könnte auch der Aufkonzentrierung von Celecoxib in den Kolonkarzinom-Zellen eine wichtige Bedeutung bei der Auslösung der antikarzinogenen Effekte zukommen. Die Arbeit soll zur Entwicklung von

neuen antineoplastischen Wirkstoffen auf der strukturellen Basis von Celecoxib beitragen, die, unabhängig von einer COX-2-Hemmung und unter Umgehung kardiovaskulärer Nebenwirkungen, zur adjuvanten Therapie verschiedener Tumorerkrankungen eingesetzt werden können.

5 Zusammenfassung

Der COX-2-selektive Inhibitor Celecoxib ist zurzeit das einzigste NSAID, das von der FDA für die adjuvante Therapie von Patienten mit der FAP-Erkrankung zugelassen wurde. Die antineoplastischen Mechanismen dieses Wirkstoffes werden nur teilweise verstanden, jedoch spielen COX-2-abhängige, aber auch COX-2-unabhängige Mechanismen eine wichtige Rolle. Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib von der COX-2-Expression der Tumor-Zelle abhängig sind, wurden humane Caco-2-Kolonkarzinom-Zellen mit pcDNA-Vektoren transfiziert, in denen die humane COX-2-cDNA sowohl in sense- (hCOX-2-sense), als auch in antisense- (hCOX-2-as) Orientierung einkloniert wurde. Die pcDNA-Kontrollzellen wurde nur mit dem leeren pcDNA-Vektor transfiziert. Caco-hCOX-2-s-Zellen zeigten eine starke Überexpression der COX-2, pcDNA-Kontrollzellen nur eine schwache Expression von COX-2 und hCOX-2-as-Zellen waren COX-2-defizient. Die Behandlung dieser Zellen mit steigenden Konzentrationen an Celecoxib (0-100 μ M) führte in Proliferationstests zu einer starken Verminderung der Überlebensrate, die durch die Induktion einer G₀/G₁-Zellzyklusblockade und durch die Auslösung von Apoptose mit Aktivierung von Caspase-3 und -9 sowie Freisetzung von Cytochrom C charakterisiert ist. Sowohl die Verminderung der Überlebensrate, als auch die Induktion von Apoptose waren in COX-2-defizienten hCOX-2-as-Zellen schwächer ausgeprägt als in COX-2-exprimierenden pcDNA- und hCOX-2-s-Zellen. Im Gegensatz hierzu erfolgte die Induktion der G₀/G₁-Zellzyklusblockade durch Celecoxib unabhängig vom COX-2-Expressionsstatus der Zellen und war durch einen starken Abfall der Expression von Cyclin A und Cyclin B1 sowie eine Induktion der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 gekennzeichnet. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib sowohl über COX-2-abhängige, als auch COX-2-unabhängige Mechanismen erklärt werden können.

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Mutationen im APC- oder Beta-Catenin-Gen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von kolorektalen Polypen und Karzinomen spielen. Weiterhin ist der Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg ein wichtiger Regulator von Apoptose und Zellzyklusprogression. Daher wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Celecoxib einen Einfluss auf den Beta-Catenin/APC-Signaltransduktionsweg in humanen Kolonkarzinom-Zellen besitzt.

So wurde nach Behandlung von humanen Caco-2-Zellen mit 100 μ M Celecoxib eine schnelle Translokation von Beta-Catenin von seiner überwiegend Membran-assoziierten Lokalisation in das Zytoplasma beobachtet, die durch die Aktivität der GSK-3 β vermittelt wird und somit durch Phosphorylierung von Beta-Catenin stattfinden könnte. Tatsächlich führte die Behandlung von Caco-2-Zellen mit 100 μ M Celecoxib bereits nach 2 Stunden Behandlungsdauer zu einer Reduktion des Ser-9-Phosphorylierungsstatus der GSK-3 β und somit zu deren Aktivierung. Die zytosolische Akkumulation von Beta-Catenin war ferner von einem schnellen Anstieg der Beta-Catenin-Spiegel im Zellkern begleitet, der bereits nach 30 Minuten Inkubationsdauer zu beobachten war. Überraschenderweise kam es parallel hierzu zu einem zeitabhängigen Abfall der DNA-Bindungsaktivität von Beta-Catenin. Nach dieser zellulären Reorganisation konnte nach 8 Stunden Behandlungsdauer mit 100 μ M Celecoxib ein starker, Proteasom- und Caspase-abhängiger Abbau von Beta-

Catenin beobachtet werden. Ein im Vergleich zu Caco-2-Zellen verminderter Beta-Catenin Abbau wurde sowohl in humanen MCF-7-Mammakarzinom-Zellen, die keine funktionale Caspase-3 exprimieren, als auch in humanen HCT-116-Zellen, in denen ein GSK-3 β -abhängiger Abbau von Beta-Catenin aufgrund einer Mutation im Beta-Catenin-Protein nicht stattfindet, beobachtet. Interessanterweise fand ein Abbau von Beta-Catenin weder nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit dem stark antikarzinogen wirksamen NSAID R-Fluriprofen, noch mit dem COX-2-selektiven Inhibitor Rofecoxib statt. Die Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit deuten darauf hin, dass der Abbau von Beta-Catenin bei der Auslösung der COX-2-unabhängigen antikarzinogenen Effekte von Celecoxib eine wichtige Rolle spielt.

In den letzten Jahren kamen weitere strukturverwandte NSAIDs vom Coxib-Typ auf den Markt, die eine höhere COX-2-Selektivität als Celecoxib besitzen. Die Experimente des dritten Teils dieser Arbeit sollten die Frage klären, ob die antikarzinogene Wirksamkeit einen Klasseneffekt aller Coxibe darstellt, oder nur spezifisch nach Behandlung von Tumor-Zellen mit Celecoxib zu beobachten ist. Mittels Proliferationstests konnte gezeigt werden, dass Celecoxib und Methylcelecoxib (Struktur analogon von Celecoxib mit schwacher COX-2-inhibitorischer Aktivität) starke wachstumshemmende Effekte (Zellzyklusblockade und Apoptose) in COX-2-überexprimierenden HCA-7-, als auch in COX-2-defizienten HCT-116-Kolonkarzinomzellen verursachen. Unter Behandlung dieser Zellen mit den selektiven COX-2-Inhibitoren Rofecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib wurden nur schwache antiproliferative Effekte beobachtet. Die Analyse der Zellzahl in der SubG₁-Phase mittels Durchflusszytometrie sowie der Spaltung von PARP mittels Western Blot-Analyse konnte demonstrieren, dass sowohl HCT-116-, als auch HCA-7-Zellen deutlich sensitiver auf die Apoptose-induzierende Wirkung von Methylcelecoxib reagierten als auf Celecoxib. Zudem zeigten COX-2-überexprimierende HCA-7-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib und Methylcelecoxib eine höhere Apoptoserate als HCT-116-Zellen, bei denen jedoch die Induktion einer G₁-Zellzyklusblockade mit Induktion von p27 und Abbau von Cyclin D1 ausgeprägter als in HCA-7-Zellen war. Eine LC/MS/MS-Analyse der Coxibkonzentrationen in Medium ergab, dass aufgrund der starken Proteinbindungen die freien Coxibkonzentrationen teils deutlich niedriger sind als die totalen eingesetzten Coxibkonzentrationen in Medium mit 10% FCS. Ferner konnte mittels LC/MS/MS demonstriert werden, dass es nach Behandlung von HCT-116- und HCA-7-Zellen mit Celecoxib und Methylcelecoxib zu einer intrazellulären Aufkonzentrierung der Wirkstoffe relativ zur freien Coxibkonzentration im Medium kommt, die nach Behandlung der Zellen mit Rofecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib jedoch nicht beobachtet wurde. Die Aufkonzentrierung von Celecoxib in den Kolonkarzinom-Zellen könnte bei der Auslösung der antikarzinogenen Effekte möglicherweise eine Rolle spielen. Die Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit konnten belegen, dass die antiproliferativen Effekte spezifisch und weitgehend COX-2-unabhängig nach Behandlung der Tumor-Zellen mit Celecoxib auftreten und daher keinen Klasseneffekt aller COX-2-selektiven NSAIDs darstellen.

6 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf	apoptotic protease-activating factor
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinder-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
CAK	Cyclin-activating kinase
Caspase	<u>C</u> ysteiny-l- <u>A</u> spartase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	Cyclin-dependent kinase inhibiting protein
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CKI	Casein kinase-I
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP response element binding protein
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemo luminescence
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	epithelial growth factor
EIA	Enzyme-linked immunoassay
EMSA	Electro mobility shift assay
ERK-2	Extracellular-signal-regulated protein kinase-2
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FADD	FAS-associated death domain
FAP	familial adenomatous polyposis (familiäre adenomatöse Polyposis)
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
$\text{I}\kappa\text{B}$	inhibiting protein κB
IAP	Apoptosis-inhibiting protein
IKK	$\text{I}\kappa\text{B}$ kinase
IL-1	Interleukin-1
Iso	Isoleucin
JNK	c-jun N-terminal kinase-1
kDa	Kilo-Dalton

LC/MS	Liquid chromatography / mass spectrometry
Lef	Lymphoid enhancer factor
LiCl	Lithiumchlorid
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Min.	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
NFκB	nuclear factor κB
NSAIDs	Nicht-steriodale Antiphlogistika
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDK-1	Phosphatidylinositol-triphosphat-dependent kinase-1
PG	Prostaglandin
PGS	Prostaglandin-Synthase
PKB	Protein kinase B (Proteinkinase B)
PKG	c-GMP-dependent protein kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
q.s.	quantum satis (soviel wie nötig)
RNA	Ribonukleinsäure
RSK-2	ribosomal S6-kinase
RT	Raumtemperatur
RXR	retinoid X receptor
SAP	Stress-activated protein kinase
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
Ser	Serin
sog.	sogenannt
TCF	T-cell-factor
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	transforming growth factor-β
Thr	Threonin
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Val	Valin
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
WF	Wachstumsfaktor

7 Literatur

- Agarwal B, Swaroop P, Protiva P, Raj SV, Shirin H and Holt PR (2003) Cox-2 is needed but not sufficient for apoptosis induced by Cox-2 selective inhibitors in colon cancer cells. *Apoptosis* **8**:649-54.
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y and Alkalay I (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* **16**:1066-76.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K and Hla T (1994) Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* **302** (Pt 3):723-7.
- Arico S, Patingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P and Ogier-Denis E (2002) Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* **277**:27613-21.
- Bates S and Vousden KH (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **55**:28-37.
- Becerra CR, Frenkel EP, Ashfaq R and Gaynor RB (2003) Increased toxicity and lack of efficacy of Rofecoxib in combination with chemotherapy for treatment of metastatic colorectal cancer: A phase II study. *Int J Cancer* **105**:868-72.
- Belham C, Wu S and Avruch J (1999) Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol* **9**:R93-6.
- Bienz M and Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**:311-20.
- Bingham CO, 3rd (2002) Development and clinical application of COX-2-selective inhibitors for the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Cleve Clin J Med* **69** Suppl 1:S15-12.
- Bjarnason I and Rainsford KD (2001) COX-2 inhibitors and the gastrointestinal tract. *Gut* **48**:451.
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK and Schnitzer TJ (2000) Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* **343**:1520-8, 2 p following 1528.
- Boon EM, Keller JJ, Wormhoudt TA, Giardiello FM, Offerhaus GJ, van der Neut R and Pals ST (2004) Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* **90**:224-9.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
- Bräutigam L, Vetter G, Tegeder I, Heinkele G and Geisslinger G (2001) Determination of Celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **261**:203-212.
- Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, Pestell RG and Greenberg ME (1998) Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol* **18**:5609-19.
- Brown WA, Skinner SA, Vogiagis D and O'Brien PE (2001) Inhibition of beta-catenin translocation in rodent colorectal tumors: a novel explanation for the protective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* **46**:2314-21.
- Brozovic A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M and Kaina B (2004) Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer* **112**:974-85.
- Brune K and Neubert A (2001) Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of the ideal COX-2 inhibitor: a pharmacologist's perspective. *Clin Exp Rheumatol* **19**:S51-7.
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**:195-203.
- Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM (2000) Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11280-5.
- Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1998) Mechanisms underlying nosteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:681-686.
- Chang HC and Weng CF (2001) Cyclooxygenase-2 level and culture conditions influence NS398-induced apoptosis and caspase activation in lung cancer cells. *Oncol Rep* **8**:1321-5.

- Chen T, Yang I, Irby R, Shain KH, Wang HG, Quackenbush J, Coppola D, Cheng JQ and Yeatman TJ (2003) Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res* **63**:4368-74.
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**:532-4, 536-7.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-9.
- Chung DC (2000) The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* **119**:854-65.
- Cong F, Zhang J, Pao W, Zhou P and Varmus H (2003) A protein knockdown strategy to study the function of beta-catenin in tumorigenesis. *BMC Mol Biol* **4**:10.
- Coruzzi G, Menozzi A and Dobrilla G (2004) Novel non-steroidal anti-inflammatory drugs: what we have learned from animal studies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**:43-61.
- Courtney ED, Melville DM and Leicester RJ (2004) Review article: chemoprevention of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* **19**:1-24.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P and Matrisian LM (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* **18**:2883-91.
- Cross DA, Alessi DR, Vandenhede JR, McDowell HE, Hundal HS and Cohen P (1994) The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* **303** (Pt 1):21-6.
- DeWitt DL (1999) Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* **55**:625-31.
- Diaz BL and Arm JP (2003) Phospholipase A(2). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**:87-97.
- Dihlmann S, Klein S and Doeberitz Mv MK (2003) Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther* **2**:509-16.
- Ding H, Han C, Zhu J, Chen CS and D'Ambrosio SM (2005) Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *Int J Cancer* **113**:803-10.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L and Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**:33-42.
- Duggan DE, Hooke KF and Hwang SS (1980) Kinetics of the tissue distributions of sulindac and metabolites. Relevance to sites and rates of bioactivation. *Drug Metab Dispos* **8**:241-6.
- Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**:383-424.
- Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E, Wiesmann M, Garcia PD, Fuller JH, Chan V, Randazzo F, Gundel R, Warren RS, Escobedo J, Aukerman SL, Taylor RN and Fantl WJ (2003) beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res* **63**:3145-53.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S and DuBois RN (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adeno carcinomas. *Gastroenterology* **107**:1183-1188.
- Enoch T and Norbury C (1995) Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem Sci* **20**:426-30.
- Esser R, Berry C, Du Z, Dawson J, Fox A, Fujimoto RA, Haston W, Kimble EF, Koehler J, Peppard J, Quadros E, Quintavalla J, Toscano K, Urban L, van Duzer J, Zhang X, Zhou S and Marshall PJ (2005) Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *Br J Pharmacol* **144**:538-50.
- Fenwick SW, Toogood GJ, Lodge JP and Hull MA (2003) The effect of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on human colorectal cancer liver metastases. *Gastroenterology* **125**:716-29.
- FitzGerald GA and Patrono C (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* **345**:433-42.
- Fosslien E (2000) Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* **30**:3-21.

- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A and Needleman P (1990) The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* **265**:16737-40.
- Fujimori M, Ikeda S, Shimizu Y, Okajima M and Asahara T (2001) Accumulation of beta-catenin protein and mutations in exon 3 of beta-catenin gene in gastrointestinal carcinoid tumor. *Cancer Res* **61**:6656-9.
- Fujita T, Matsui M, Takaku K, Uetake H, Ichikawa W, Taketo MM and Sugihara K (1998) Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* **58**:4823-6.
- Gardner SH, Hawcroft G and Hull MA (2004) Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on beta-catenin protein levels and catenin-related transcription in human colorectal cancer cells. *Br J Cancer* **91**:153-63.
- Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K and Isakson PC (1999) Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J* **339**:607-14.
- Goppelt-Struebe M and Beiche F (1997) Cyclooxygenase-2 in the spinal cord: localization and regulation after a peripheral inflammatory stimulus. *Adv Exp Med Biol* **433**:213-6.
- Grösch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L and Geisslinger G (2001) COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J* **15**:2742-4.
- Grösch S, Tegeder I, Schilling K, Maier TJ, Niederberger E and Geisslinger G (2003) Activation of c-Jun-N-terminal-kinase is crucial for the induction of a cell cycle arrest in human colon carcinoma cells caused by flurbiprofen enantiomers. *Faseb J* **17**:1316-8.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Korsmeyer SJ (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* **274**:1156-63.
- Gupta RA and Dubois RN (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* **1**:11-21.
- Haffner R and Oren M (1995) Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev* **5**:84-90.
- Hajnoczky G, Davies E and Madesh M (2003) Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **304**:445-54.
- Halpin RA, Geer LA, Zhang KE, Marks TM, Dean DC, Jones AN, Melillo D, Doss G and Vyas KP (2000) The absorption, distribution, metabolism and excretion of rofecoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in rats and dogs. *Drug Metab Dispos* **28**:1244-54.
- Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, Shiff SI and Rigas B (1996) Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin independent pathway. *Biochem. Pharmacol.* **52**:237-245.
- Hannon GJ and Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**:257-61.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K and Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**:805-16.
- Hartwell LH and Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**:629-34.
- Hata AN and Breyer RM (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* **103**:147-66.
- Hawkey CJ (1999) COX-2 inhibitors. *Lancet* **353**:307-14.
- Hawkey CJ, Laine L, Harper SE, Quan HU, Bolognese JA and Mortensen E (2001) Influence of risk factors on endoscopic and clinical ulcers in patients taking rofecoxib or ibuprofen in two randomized controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther* **15**:1593-601.
- He TC, Chan TA, Vogelstein B and Kinzler KW (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**:335-45.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**:1509-12.

- Heinen CD, Goss KH, Cornelius JR, Babcock GF, Knudsen ES, Kowalik T and Groden J (2002a) The APC tumor suppressor controls entry into S-phase through its ability to regulate the cyclin D/RB pathway. *Gastroenterology* **123**:751-63.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-6.
- Herrmann C, Block C, Geisen C, Haas K, Weber C, Winde G, Moroy T and Müller O (1998) Sulindac sulfide inhibits Ras signaling. *Oncogene* **17**:1769-76.
- Hinz B and Brune K (2002) Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:367-75.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD and Wiegand SJ (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**:1994-8.
- Houseknecht KL, Cole BM and Steele PJ (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol* **22**:1-23.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ and Brown AM (1999) Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* **59**:1572-7.
- Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM and Chen CS (2000) The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* **275**:11397-403.
- Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M and Bodmer WF (1997) Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10330-4.
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR and Porter AG (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* **273**:9357-60.
- Johnson AJ, Hsu AL, Lin HP, Song X and Chen CS (2002) The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. *Biochem J* **366**:831-7.
- Kalgutkar AS and Zhao Z (2001) Discovery and design of selective cyclooxygenase-2 inhibitors as non-ulcerogenic, anti-inflammatory drugs with potential utility as anti-cancer agents. *Curr Drug Targets* **2**:79-106.
- Kardosh A, Blumenthal M, Wang WJ, Chen TC and Schonthal AH (2004) Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther* **3**:55-62.
- Kawamori T, Rao CV, Seibert K and Reddy BS (1998) Chemopreventive activity of Celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* **58**:409-412.
- Kazanov D, Dvory-Sobol H, Pick M, Liberman E, Strier L, Choen-Noyman E, Deutsch V, Kunik T and Arber N (2004) Celecoxib but not rofecoxib inhibits the growth of transformed cells in vitro. *Clin Cancer Res* **10**:267-71.
- Kikuchi A (2000) Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **268**:243-8.
- Kim K, Pang KM, Evans M and Hay ED (2000) Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol Biol Cell* **11**:3509-23.
- Kinzler KW and Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**:159-170.
- Kolligs FT, Bommer G and Goke B (2002) Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* **66**:131-44.
- Kudo I and Murakami M (1999) Diverse functional coupling of prostanoid biosynthetic enzymes in various cell types. *Adv Exp Med Biol* **469**:29-35.
- Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, Fowble JW, Ward PJ and Chen CS (2004) 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**:1444-51.
- Kune GA, Kune S and Watson LF (1988) Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne colorectal cancer study. *Cancer Res* **48**:4399-4404.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC and Stallings WC (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**:644-8.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM and Kliewer SA (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **272**:3406-10.
- Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK and Wu T (2003) Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* **38**:756-68.
- Li M, Wu X and Xu XC (2001) Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clin Cancer Res* **7**:1010-6.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-8.
- Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G and Grosch S (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **67**:1469-78.
- Majima M, Hayashi I, Muramatsu M, Katada J, Yamashina S and Katori M (2000) Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br J Pharmacol* **130**:641-9.
- Malumbres M and Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**:222-31.
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ and Hanski C (1999) Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1603-8.
- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I and Reed JC (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *Embo J* **22**:2729-40.
- Masferrer JL, Koki A and Seibert K (1999) COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci* **889**:84-6.
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC and Seibert K (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3228-32.
- McCracken JD, Wechter WJ, Liu Y, Chase RL, Kantoci D, Murray ED, Jr., Quiggle DD and Mineyama Y (1996) Antiproliferative effects of the enantiomers of flurbiprofen. *J Clin Pharmacol* **36**:540-5.
- Mitchell JA and Warner TD (1999) Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* **128**:1121-32.
- Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML and Sinicrope FA (1999) Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* **59**:4356-62.
- Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* **374**:131-4.
- Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**:261-91.
- Mukherjee D, Nissen SE and Topol EJ (2001) Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama* **286**:954-9.
- Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K and Kudo I (2003) Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* **278**:37937-47.
- Murray A (1995) Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* **81**:149-52.
- Murray AW (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* **359**:599-604.
- Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**:221-34.
- Murray NR, Davidson LA, Chapkin RS, Clay Gustafson W, Schattenberg DG and Fields AP (1999) Overexpression of protein kinase C betaII induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *J Cell Biol* **145**:699-711.
- Nagata S (1998) Fas-induced apoptosis. *Intern Med* **37**:179-81.
- Nakano O, Sakamoto C, Konda Y, Matsuda K, Matozaki T, Nishisaki H, Wada K, Suzuki T, Uchida T and Nagao M (1993) [Effect of prostaglandin E2 on the proliferation of cultured guinea pig gastric mucous cells]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* **90**:9-15.

- Nakashima K, Ueno N, Kamei D, Tanioka T, Nakatani Y, Murakami M and Kudo I (2003) Coupling between cyclooxygenases and prostaglandin F(2alpha) synthase. Detection of an inducible, glutathione-activated, membrane-bound prostaglandin F(2alpha)-synthetic activity. *Biochim Biophys Acta* **1633**:96-105.
- Nelson WJ and Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**:1483-7.
- Niederberger E, Tegeder I, Vetter G, Schmidtko A, Schmidt H, Euchenhofer C, Brautigam L, Grosch S and Geisslinger G (2001) Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *Faseb J* **15**:1622-4.
- Niitsu Y, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Hayashi T, Kukitsu T, Takanashi K, Ishiwatari H, Abe T, Kogawa T, Takahashi M, Matsunaga T and Kato J (2004) Chemoprevention of colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Norbury C and Nurse P (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* **61**:441-70.
- Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**:503-8.
- O'Connor PM, Ferris DK, Hoffmann I, Jackman J, Draetta G and Kohn KW (1994) Role of the cdc25C phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9480-4.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF and Taketo MM (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **87**:803-9.
- Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo MM and Evans JF (2001) Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* **61**:1733-40.
- Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D and Tarnawski AS (2002) Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* **8**:289-93.
- Pai R, Szabo IL, Soreghan BA, Atay S, Kawanaka H and Tarnawski AS (2001) PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **286**:923-8.
- Papkoff J and Aikawa M (1998) WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **247**:851-8.
- Patti R, Gumired K, Reddanna P, Sutton LN, Phillips PC and Reddy CD (2002) Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human primitive neuroectodermal tumors: effect of celecoxib and rofecoxib. *Cancer Lett* **180**:13-21.
- Paulson SK, Zhang JY, Breau AP, Hribar JD, Liu NW, Jessen SM, Lawal YM, Cogburn JN, Gresk CJ, Markos CS, Maziasz TJ, Schoenhard GL and Burton EG (2000) Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos* **28**:514-21.
- Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**:1837-51.
- Rahme E, Barkun AN, Toubouti Y and Bardou M (2003) The cyclooxygenase-2-selective inhibitors rofecoxib and celecoxib prevent colorectal neoplasia occurrence and recurrence. *Gastroenterology* **125**:404-12.
- Rainsford KD (2001) The ever-emerging anti-inflammatories. Have there been any real advances? *J Physiol Paris* **95**:11-9.
- Rask K, Nilsson A, Brannstrom M, Carlsson P, Hellberg P, Janson PO, Hedin L and Sundfeldt K (2003) Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of beta-catenin and GSK3beta. *Br J Cancer* **89**:1298-304.
- Reddy BS, Rao CV and Seibert K (1996) Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res* **56**:4566-9.
- Rice PL, Kelloff J, Sullivan H, Driggers LJ, Beard KS, Kuwada S, Piazza G and Ahnen DJ (2003) Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of beta-catenin protein in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2**:885-92.
- Rich T, Allen RL and Wyllie AH (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* **407**:777-83.

- Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, Ethier D, Falgout JP, Friesen RW, Gordon R, Greig G, Guay J, Mancini J, Ouellet M, Wong E, Xu L, Boyce S, Visco D, Girard Y, Prasit P, Zamboni R, Rodger IW, Gresser M, Ford-Hutchinson AW, Young RN and Chan CC (2001) Etoricoxib (MK-0663): Preclinical Profile and Comparison with Other Agents That Selectively Inhibit Cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:558-566.
- Rigas B, Goldman IS and Levine L (1993) Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* **122**:518-23.
- Rodriguez J and Lazebnik Y (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**:3179-84.
- Roh H, Green DW, Boswell CB, Pippin JA and Drebin JA (2001) Suppression of beta-catenin inhibits the neoplastic growth of APC-mutant colon cancer cells. *Cancer Res* **61**:6563-8.
- Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR and Burnier M (1999) Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther* **66**:76-84.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S and Polakis P (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* **272**:1023-6.
- Sadot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, Kam Z, Ben-Ze'ev A and Geiger B (2002) Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci* **115**:2771-80.
- Sanz-Ortega J, Bryant B, Sanz-Esponera J, Asenjo JA, Saez MC, Torres A, Balibrea JL, Sobel ME and Merino MJ (1999) LOH at the APC/MCC gene (5Q21) is frequent in early stages of non-small cell lung cancer. *Pathol Res Pract* **195**:677-80.
- Scorrano L and Korsmeyer SJ (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* **304**:437-44.
- Scott G, Rordorf C, Reynolds C, Kalbag J, Looby M, Milosavljev S, Weaver M, Huff JP and Ruff DA (2004a) Pharmacokinetics of lumiracoxib in plasma and synovial fluid. *Clin Pharmacokinet* **43**:467-78.
- Scott G, Yih L, Yeh CM, Milosavljev S, Laurent A and Rordorf C (2004b) Lumiracoxib: pharmacokinetic and pharmacodynamic profile when coadministered with fluconazole in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* **44**:193-9.
- Seibert K and Masferrer JL (1994) Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor* **4**:17-23.
- Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD and DuBois RN (1997) Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* **99**:2254-9.
- Sherr CJ and Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**:1149-63.
- Shimizu S, Narita M and Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**:483-7.
- Sileni VC, Fossier V, Maggiani P, Padula E, Beltrame M, Nicolini M and Arslan P (1992) Pharmacokinetics and tumor concentration of intraarterial and intravenous cisplatin in patients with head and neck squamous cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **30**:221-5.
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM and Geis GS (2000) Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama* **284**:1247-55.
- Smith CA, Farrah T and Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**:959-62.
- Smith WL, DeWitt DL and Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**:145-82.
- Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B and Spechler SJ (2000) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* **60**:5767-72.
- Spano JP, Chouahnia K and Morere JF (2004) [Cyclooxygenase 2 inhibitors and lung carcinoma]. *Bull Cancer* **91 Spec No**:S109-12.

- Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1998) Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**:1130-4.
- Srinath P, Rao PN, Knaus EE and Suresh MR (2003) Effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors on prostate cancer cell proliferation. *Anticancer Res* **23**:3923-8.
- Stambolic V, Ruel L and Woodgett JR (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* **6**:1664-8.
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK and Levin B (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **342**:1946-52.
- Steinhusen U, Badock V, Bauer A, Behrens J, Wittman-Liebold B, Dorken B and Bommert K (2000) Apoptosis-induced cleavage of beta-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J Biol Chem* **275**:16345-53.
- Stevenson MA, Zhao MJ, Asea A, Coleman CN and Calderwood SK (1999) Salicylic acid and aspirin inhibit the activity of RSK2 kinase and repress RSK2-dependent transcription of cyclic AMP response element binding protein- and NF-kappa B-responsive genes. *J Immunol* **163**:5608-16.
- Stroh C and Schulze-Osthoff K (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* **5**:997-1000.
- Subongkot S, Frame D, Leslie W and Drajer D (2003) Selective cyclooxygenase-2 inhibition: a target in cancer prevention and treatment. *Pharmacotherapy* **23**:9-28.
- Szabo IL, Pai R, Soreghan B, Jones MK, Baatar D, Kawanaka H and Tarnawski AS (2001) NSAIDs inhibit the activation of egr-1 gene in microvascular endothelial cells. A key to inhibition of angiogenesis? *J Physiol Paris* **95**:379-83.
- Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P and Aggarwal BB (2004) Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* **23**:9247-58.
- Tetsu O and McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**:422-426.
- Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D and Pamukcu R (2000) Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* **60**:3338-42.
- Thun MJ, Henley SJ and Patrono C (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* **94**:252-66.
- Toyoshima H and Hunter T (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**:67-74.
- Tsubouchi Y, Mukai S, Kawahito Y, Yamada R, Kohno M, Inoue K and Sano H (2000) Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* **20**:2867-72.
- Tsujii M and DuBois RN (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* **83**:493-501.
- Tsujii M, Kawano S and DuBois RN (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3336-40.
- Uefuji K, Ichikura T, Shinomiya N and Mochizuki H (2000) Induction of apoptosis by JTE-522, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, in human gastric cancer cell lines. *Anticancer Res* **20**:4279-84.
- van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X and Vandenabeele P (2003) Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **304**:487-97.
- Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**:232-5.
- Vane JR and Botting RM (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* **104**:2S-8S; discussion 21S-22S.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**:43-53.
- Vullo D, Franchi M, Gallori E, Pastorek J, Scozzafava A, Pastorekova S and Supuran CT (2003) Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett* **13**:1005-9.

- Waddell WR, Ganser GF, Cerise EJ and Loughry RW (1989) Sulindac for polyposis of the colon. *Am J Surg* **157**:175-9.
- Waddell WR and Gerner RE (1980) Indomethacin and ascorbate inhibit desmoid tumors. *J Surg Oncol* **15**:85-90.
- Waddell WR and Loughry RW (1983) Sulindac for polyposis of the colon. *J Surg Oncol* **24**:83-7.
- Wang D, Wang H, Shi Q, Katkuri S, Walhi W, Desvergne B, Das SK, Dey SK and DuBois RN (2004) Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell* **6**:285-95.
- Wang J and Lenardo MJ (2000) Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* **113** (Pt 5):753-7.
- Warner TD and Mitchell JA (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J* **18**:790-804.
- Waskewich C, Blumenthal RD, Li H, Stein R, Goldenberg DM and Burton J (2002) Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res* **62**:2029-33.
- Weber A, Casini A, Heine A, Kuhn D, Supuran CT, Scozzafava A and Klebe G (2004) Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *J Med Chem* **47**:550-7.
- Wechter WJ, Kantoci D, Murray ED, Jr., Quiggle DD, Leipold DD, Gibson KM and McCracken JD (1997) R-flurbiprofen chemoprevention and treatment of intestinal adenomas in the APC(Min)/+ mouse model: implications for prophylaxis and treatment of colon cancer. *Cancer Res* **57**:4316-24.
- Wei D, Wang L, He Y, Xiong HQ, Abbruzzese JL and Xie K (2004) Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Res* **64**:2030-8.
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**:323-30.
- Whelton A (2002) COX-2-specific inhibitors and the kidney: effect on hypertension and oedema. *J Hypertens* **20 Suppl 6**:S31-5.
- Whelton A, White WB, Bello AE, Puma JA and Fort JG (2002) Effects of celecoxib and rofecoxib on blood pressure and edema in patients > or =65 years of age with systemic hypertension and osteoarthritis. *Am J Cardiol* **90**:959-63.
- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK and DuBois RN (2000) Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* **105**:1589-94.
- Williams ED, Karim SM and Sandler M (1968) Prostaglandin secretion by medullary carcinoma of the thyroid. A possible cause of the associated idarrhoea. *Lancet* **1**:22-3.
- Wong NA and Pignatelli M (2002) Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* **160**:389-401.
- Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Hara A, Shimizu M, Kuno T, Katayama M, Qiao Z and Mori H (2001) Suppression of Occurrence and Advancement of beta-Catenin-accumulated Crypts, Possible Premalignant Lesions of Colon Cancer, by Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Celecoxib. *Jpn J Cancer Res* **92**:617-23.
- Yamamoto Y, Yin M-J, Lin K-M and Gaynor RB (1999) Sulindac inhibits activation of the NF-kB pathway. *J. Biol. Chem.* **274**:27307-27314.
- Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S and Kawai S (2002) Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* **531**:278-84.
- Yang HM, Kim HS, Park KW, You HJ, Jeon SI, Youn SW, Kim SH, Oh BH, Lee MM, Park YB and Walsh K (2004) Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces neointimal hyperplasia through inhibition of Akt signaling. *Circulation* **110**:301-8.
- Yin MJ, Yamamoto Y and Gaynor RB (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**:77-80.
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ and Boman BM (2001) Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* **61**:8664-7.

-
- Zhu J, Huang JW, Tseng PH, Yang YT, Fowble J, Shiau CW, Shaw YJ, Kulp SK and Chen CS (2004) From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Res* **64**:4309-18.
- Zhu J, Song X, Lin HP, Young DC, Yan S, Marquez VE and Chen CS (2002) Using cyclooxygenase-2 inhibitors as molecular platforms to develop a new class of apoptosis-inducing agents. *J Natl Cancer Inst* **94**:1745-57.
- Zweifel BS, Davis TW, Ornberg RL and Masferrer JL (2002) Direct Evidence for a Role of Cyclooxygenase 2-derived Prostaglandin E(2) in Human Head and Neck Xenograft Tumors. *Cancer Res* **62**:6706-11.

8 Anhang

8.1 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G and Grösch S (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **67**:1469-78.

Maier TJ, Janssen A, Schmidt R, Geisslinger G and Grösch S (2005) Targeting the beta-catenin/APC-pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Faseb J*. 2005 Jun 9; [Epub ahead of print].

8.2 Sonstige Veröffentlichungen

Grösch S, Tegeder I, Schilling K, Maier TJ, Niederberger E and Geisslinger G (2003) Activation of c-Jun-N-terminal-kinase is crucial for the induction of a cell cycle arrest in human colon carcinoma cells caused by flurbiprofen enantiomers. *Faseb J* **17**:1316-8.

Grösch S, Schilling K, Janssen A, Maier TJ, Niederberger E and Geisslinger G (2005) Induction of apoptosis by R-flurbiprofen in human colon carcinoma cells: involvement of p53. *Biochem Pharmacol* **69**:831-9.

Dressel D, Ritter CA, Sperker B, Grube M, Maier TJ, Klingebiel T, Siegmund W, Beck JF and Kroemer HK (2003) Busulfan induces activin A expression in vitro and in vivo: a possible link to venous occlusive disease. *Clin Pharmacol Ther* **74**(3):264-74

8.3 Förderung und Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2002 bis Juni 2005 am Institut für Klinische Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität im Rahmen des Europäischen Graduiertenkollegs „Roles of Eicosanoids in Biology and Medicine“ (DFG GRK 757/1) angefertigt. Weiterhin wurde die Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG GR 2011/1-1) und die Paul und Ursula Klein-Stiftung finanziell gefördert.

Für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die guten Arbeitsbedingungen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger bedanken. Für die Generierung der COX-2-transfizierten Caco-Klone und die vielen guten Ratschläge danke ich meiner Betreuerin Dr. Sabine Grösch. Mein Dank geht auch an meine Kollegin Dr. Susanne Schiffmann für Ihre engagierte Mitarbeit bei den Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung COX-2-selektiver Inhibitoren (siehe Kapitel 3.3). Für die Durchführung der LC/MS/MS-Messungen danke ich Ronald Schmidt und Carlo Angioni.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Thorsten Maier
Bert-Brecht-Str. 13
60437 Frankfurt am Main
geboren am 26.05.1975 in Frankfurt
ledig

Schulbildung und Wehrersatzdienst

1982 – 1986	Michael-Grzimek-Grundschule in Frankfurt Nieder-Eschbach
1986 – 1995	Altsprachliches Lessing-Gymnasium in Frankfurt Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
1995 – 2002	Wehrersatzdienst im Katastrophenschutz der Stadt Frankfurt a.M.

Hochschulausbildung

1995 – 2001	Studium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main Abschluss mit der Diplomprüfung im Februar 2001
seit 2001	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
2001 – 2005	Naturwissenschaftliche Promotion im Institut für Klinische Pharmakologie (Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger) der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Anleitung von Dr. Sabine Grösch