

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Institut für Klinische Pharmakologie
Pharmazentrum Frankfurt
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geißlinger

Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch die Enantiomere von Flurbiprofen

zur Erlangung des Doktorgrades der theoretischen Medizin des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Eltahmash Israr
aus Birmingham, Großbritannien

Frankfurt am Main, 2004

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Dr. Gerd Geisslinger

Koreferent: Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen.....	5
1 Einleitung.....	6
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Zymosan-induzierte Entzündung.....	12
2.2 Behandlungen und Dosierungen.....	13
2.3 Flurbiprofenplasmakonzentrationen.....	13
2.4 Prostaglandin E ₂ Freisetzung aus Gewebefragmenten.....	13
2.5 Quantitative RT-PCR.....	14
2.6 Westernblots	15
2.7 Zellkultur	16
2.8 Präparation von Cytosolfractionen und Kernextrakten.....	16
2.9 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay).....	17
2.10 Immunfluoreszenz	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Antiinflammatorische Effekte	19
3.2 Flurbiprofenplasmakonzentrationen.....	22
3.3 Hemmung der Prostaglandin-Freisetzung	23
3.4 Hemmung der COX-2 Synthese	23
3.5 Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1.....	26
3.6 Hemmung der Translokation der p65-Untereinheit von NFκB.....	28
3.7 Abbau von IκB-α.....	31
4 Diskussion.....	33
5 Schlussfolgerung.....	37
6 Zusammenfassung	38
7 Abstract.....	40
8 Literaturverzeichnis	41

9	Danksagung	48
10	Lebenslauf.....	49
11	Ehrenwörtliche Erklärung.....	50

Abkürzungen

AP-1	Aktivator-Protein 1
AUC	Area under the curve, Fläche unter einer Konzentrations- oder Effekt-Zeit-Kurve
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIA	Enzymimmunoassay
h	Stunde(n)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Konzentration, die eine 50%ige Inhibition hervorruft
IκB-α	Inhibitory kappa B
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharide
min.	Minute(n)
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
NF-κB	nuclear factor kappa B
NSAID	nicht-steroidale Antiphlogistika (non-steroidal anti-inflammatory drugs)
PBS	Phosphate Buffer Saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SD	Standardabweichung
TNF-α	Tumornekrosefaktor α

1 Einleitung

Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) werden zur symptomatischen Behandlung der Osteoarthritis und rheumatoiden Arthritis verwendet [1], dabei sind sie analgetisch und antientzündlich wirksam. Als schwerwiegende Nebenwirkungen können bei ihrer Anwendung u.a. Magen-Darm-Ulzera auftreten, mit Perforationen und Blutungen als Folge, oft mit tödlichem Ausgang. In den USA versterben schätzungsweise pro Jahr ca. 16.500 [2] und in Großbritannien 2.000-2.500 Patienten [3, 4, 5] durch schwerwiegende gastrointestinale NSAID-Komplikationen.

In entzündeten Geweben werden Prostaglandine synthetisiert, die an der Entstehung von Schmerz und Entzündung beteiligt sind [6]. Es wird davon ausgegangen, dass sich die antientzündliche und analgetische Wirksamkeit der NSAIDs aus der Hemmung der COX-2 Isoform der Cyclooxygenase (COX) [7, 8] ableitet. Die gastrointestinalen Nebenwirkungen der NSAIDs werden hauptsächlich auf eine COX-1 Hemmung zurückgeführt [9, 10]. Diese Annahmen haben zur systematischen Suche von Substanzen geführt, die präferentiell / selektiv die COX-2 hemmen. Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Rolle der COX-1 (und der Splice-Variante COX-3 [11]) und COX-2 in der Biosynthese von Prostaglandinen und Thromboxan sowie über ihre physiologische und pathophysiologische Rolle (modifiziert nach [12]).

Inzwischen sind selektive COX-2 Inhibitoren (Celecoxib, Rofecoxib, Parecoxib [13] und Valdecoxib [14]) zugelassen und werden unter anderem zur Behandlung von Symptomen der Osteoarthritis und der rheumatoiden Arthritis eingesetzt [15, 16, 17, 18]. In klinischen Zulassungsstudien konnte gezeigt werden, dass sich ihre gastrointestinale Toxizität nicht von Placebo unterscheidet [19, 20]. Da jedoch die COX-2 konstitutionell in der Niere exprimiert ist, vermindern auch diese Substanzen den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate und verursachen Ödeme vergleichbar zu nicht-selektiven NSAIDs, d.h. dass mit diesem Prinzip renale Nebenwirkungen nicht vermieden werden können [21]. Außerdem hat sich gezeigt, dass COX-2 selektive Substanzen die Ulkusheilung verzögern [22] und zur Exazerbation einer Kolitis führen können [23]. Obwohl die Entwicklung COX-2 selektiver Arzneimittel einen deutlichen Fortschritt in der symptomatischen Behandlung der Osteoarthritis und der rheumatoiden Arthritis darstellt, werden weiterhin andere antiinflammatorisch wirksame Substanzen mit einem verbesserten Nebenwirkungsprofil benötigt.

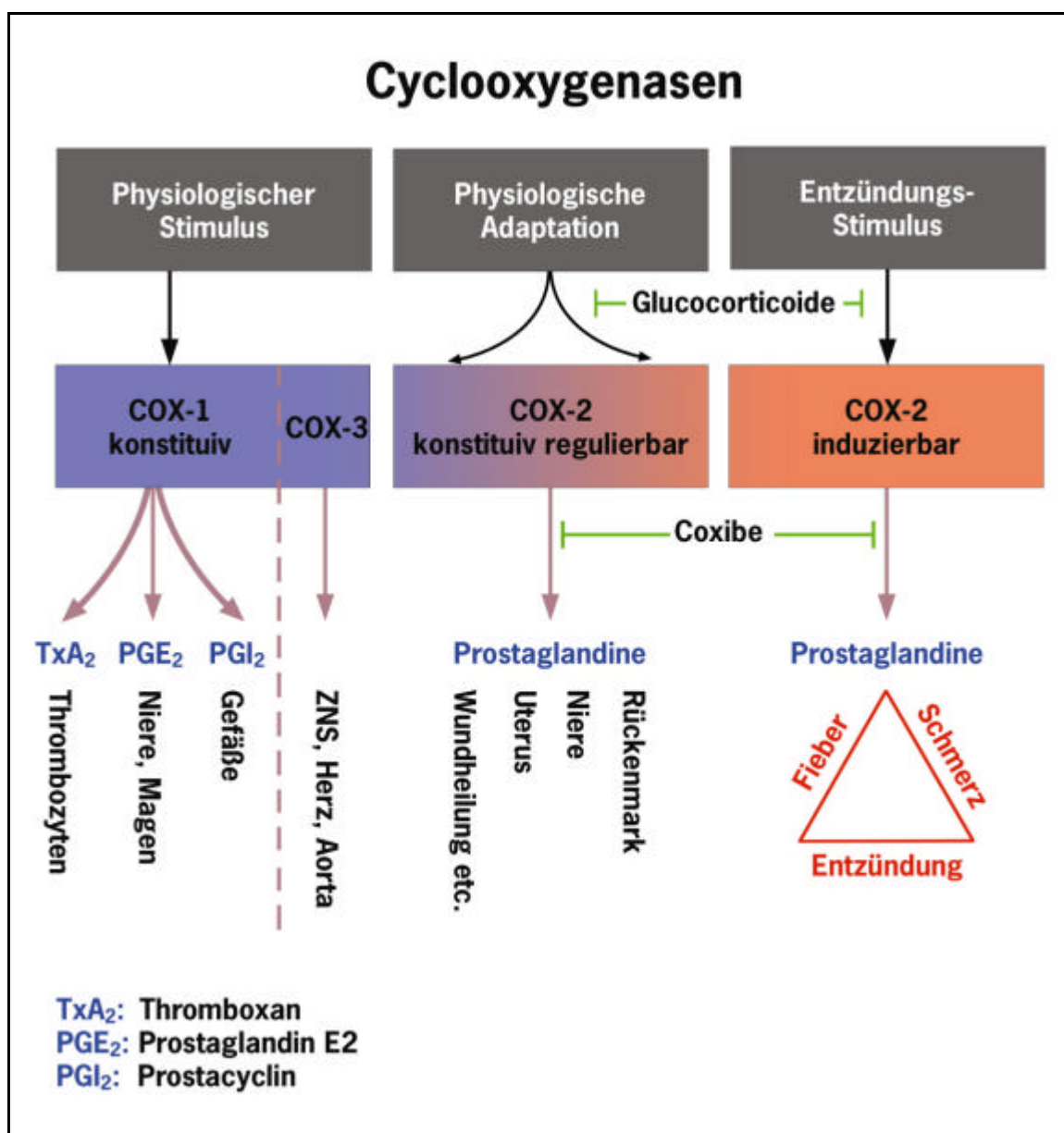


Abbildung 1: Schematische Übersichtsdarstellung über die Rolle der COX-1 (und der Splice-Variante COX-3) und COX-2 in der Biosynthese von Prostaglandinen und Thromboxanen sowie über ihre physiologische und pathophysiologische Rolle (modifiziert nach [12]).

Flurbiprofen gehört zu den chiralen NSAIDs aus der Gruppe der 2-Arylpropionsäuren. Im Gegensatz zu Ibuprofen wird das R-Enantiomer von Flurbiprofen nur zu einem vernachlässigbaren Anteil in das S-Enantiomer epimerisiert, dies trifft sowohl auf den Menschen [24] als auch auf die Ratte zu [25]. Flurbiprofen ist als Razemat im Handel erhältlich. Analog zu anderen NSAIDs wird die antiinflammatorische und analgetische Wirkung von Flurbiprofen durch eine Hemmung der COX und damit der Prostaglandinsynthese erklärt. Jedoch in therapeutischen Konzentrationen hemmt nur das S-Enantiomer die COX-Aktivität *in vitro*. Die IC₅₀ Werte von S- und R-Flurbiprofen unterscheiden sich ca. um den Faktor 500 für beide COX Isoformen [26,

27]. Trotz dieses Unterschiedes wirkte R-Flurbiprofen fast genauso stark antinozizeptiv wie S-Flurbiprofen sowohl in verschiedenen Tierschmerzmodellen [28, 29, 30, 31] als auch beim Menschen [32]. Es wird angenommen, dass der antinozizeptive Effekt von R-Flurbiprofen und anderen Analgetika wie z.B. Paracetamol über zentrale Mechanismen vermittelt wird [26, 33]. Für Paracetamol wird weiterhin davon ausgegangen, dass die Hemmung einer im zentralen Nervensystem exprimierten Splicing-Variante der COX-1 (von Chandrasekharan et al. [11] als COX-3 bezeichnet) möglicherweise am Wirkungsmechanismus beteiligt ist. Paracetamol hemmte diese Splicing-Variante mit einer IC_{50} von $64 \mu\text{M}$ während die IC_{50} -Werte für die COX-1 ca. 2-fach und für die COX-2 ca. 90-fach höher waren [11]. Allerdings wird bezweifelt, ob die COX-3 beim Menschen existent ist [34]. Im Gegensatz zu S-Flurbiprofen zeigte R-Flurbiprofen keine signifikante Verletzung der gastrointestinalen Mukosa, was auf eine fehlende COX-Hemmung in therapeutischen Konzentrationen hinweist [11].

Dem Transkriptionsfaktor NF κ B (nuclear factor-kappa B) kommt bei der Entzündung und immunologischen Prozessen eine besondere Rolle zu. NF κ B ist u.a. für die Regulation der Transkription von COX-2 verantwortlich. Außerdem wird die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Enzymen und Chemokinen aktiviert [35]. NF κ B kann durch eine Reihe spezifischer Aktivatoren z.B. IL-1 β (Interleukin 1 β) und TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α) rezeptorvermittelt, aber auch durch Lipopolysaccharide, Oxidantien und Viren aktiviert werden [36]. In seiner inaktiven Form dimerisiert NF κ B mit seinem Inhibitor, dem I- κ B α , in einer Art inaktivem cytosolischen Komplex. In diesem inaktiven Zustand wird NF κ B von unstimulierten Zellen freigesetzt. Stimuli rufen eine Phosphorylierung von I- κ B durch bestimmte Kinasen (IKK- α , IKK- β) hervor, was einen Zerfall des dimeren Komplexes in NF κ B und I- κ B zur Folge hat. Dies führt einerseits dazu, dass NF κ B aus dem Cytosol in den Zellkern wandert, andererseits dazu, dass I- κ B von Proteasen abgebaut wird. Im Zellkern binden die NF κ B-Untereinheiten p50 und p65 an die entsprechenden Stellen in den Promoter-Regionen von Genen, die die Transkription entzündlicher und immunologischer Gene starten. Dies induziert z.B. die Synthese von Enzymen (COX-2, iNOS, PLA₂, etc.) und Zytokinen (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , etc.) [37]. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Außerdem stimulieren TNF- α und IL-1 mesenchymale Zellen wie z.B. synoviale Fibroblasten, Osteoklasten und Chondrozyten,

die gewebezerstörende Metalloproteinasen freisetzen [38]. Die entzündungshemmenden Effekte von Glucocorticoiden werden zumindest teilweise durch eine Hemmung von NFκB vermittelt, entweder durch eine direkte Interaktion mit der NFκB p65-Untereinheit [39, 40, 41, 42] oder durch die vermehrte Transkription von IκBα, dem NFκB Inhibitor [43, 44]. Die Wirkungsweise von Acetylsalicylsäure wird im Allgemeinen darauf zurückgeführt, dass sie die Cyclooxygenase-vermittelte Prostaglandinsynthese unterdrückt. Es wurde aber ebenfalls entdeckt, dass Acetylsalicylsäure in hohen Konzentrationen die TNF-α- oder LPS-stimulierte Aktivität von NFκB blockieren kann [45, 46]. Acetylsalicylsäure hemmt die Translokation von NFκB in den Kern, indem es die Phosphorylierung und die anschließende Degradation von IκBα verhindert [47]. Des Weiteren kann die NFκB-Aktivität durch weitere in der Rheumatologie eingesetzte Substanzen wie z.B. Ibuprofen [48], Salicylsäure [49] und Sulfasalazin [50] gehemmt werden. NFκB hat neben der Aktivierung in Leukozyten zu Beginn einer Entzündung auch eine bedeutsame Rolle beim Heilungsprozess einer Entzündung [51]. In dieser Phase der Entzündung ist eine NFκB-Aktivität nicht mit einer iNOS-Expression oder der Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren vergesellschaftet, sondern mit einer Expression anti-inflammatorischer Regulationswege sowie einer Apoptose von Leukozyten.

AP-1 (activation protein 1) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist [37]. Diesem Transkriptionsfaktor kommt eine besondere Bedeutung wegen seiner weit verbreiteten Verteilung in den Matrix-Metalloproteinase- und Zytokin-Genen zu. AP-1 ist ein Proteinkomplex, der aus der Dimerisierung der Proteine FOS und JUN entsteht. Diese Proteine werden von immediate early genes (IEGs; c-fos und c-jun) kodiert. Die Aktivierung von AP-1 erfolgt durch eine Vielzahl von Stimulanzen, darunter auch TNF-α und IL-1. In der folgenden Abbildung ist die Aktivierung von NFκB und AP-1 bei entzündlichen Prozessen sowie experimentelle Möglichkeiten zu dieser Untersuchung schematisch dargestellt:

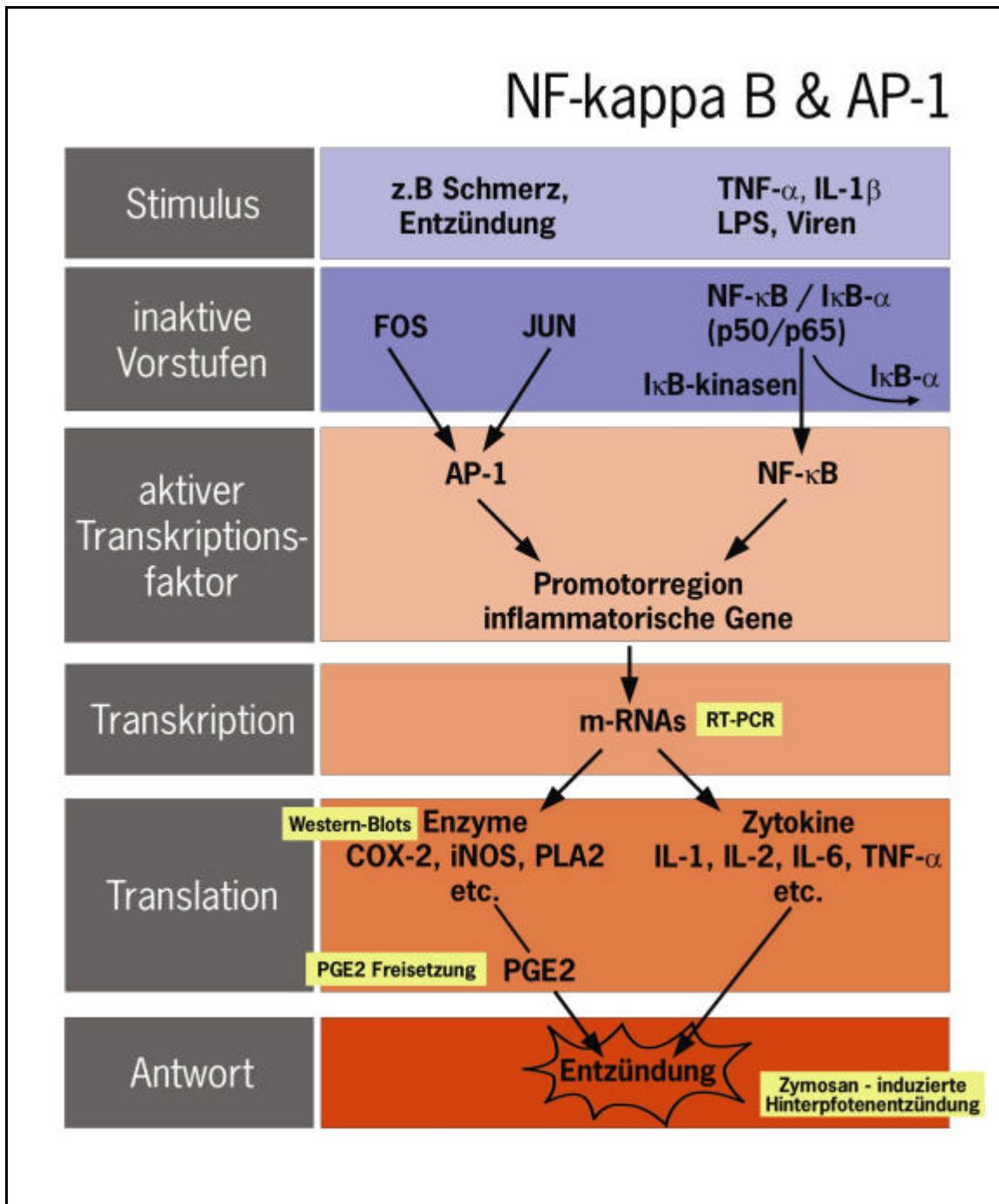


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von NF κ B und AP-1 bei entzündlichen Prozessen.

Auf diesen Vorkenntnissen aufbauend, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragestellungen: Wie lassen sich die für R-Flurbiprofen beobachteten antinozizeptiven Effekte ohne eine relevante COX-Inhibition erklären? Hat R-Flurbiprofen antiinflammatorische Effekte? Mit welchen Mechanismen ließen sich antiinflammatorische Effekte von R-Flurbiprofen erklären? Ist an einem solchen Effekt eine verminderte COX-2 Expression beteiligt? Spielt dabei eine Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 eine Rolle?

2 Material und Methoden

2.1 Zymosan-induzierte Entzündung

Bei männlichen Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 150 bis 200 g wurde mit subkutan injiziertem Zymosan eine Hinterpfotenentzündung erzeugt. Im Gegensatz zu Carrageenan und Freund's Adjuvans hat Zymosan den Vorteil, dass es Symptome verursacht, die weitgehend denen beim Menschen gleichen, d.h.: spontane Nozizeption (in hohen Dosierungen) bzw. thermale und mechanische Hyperalgesie (in niedriger Dosierung) und einem ausgeprägten Ödem, das für mehrere Tage anhält [52]. Zur Erzeugung der Hinterpfotenentzündung wurde 0.625 mg Zymosan (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 100 µl Phosphatpuffer suspendiert und subkutan in die mittlere plantare Region der rechten Hinterpfote injiziert.

Das Pfootenvolumen wurde mit einem Plethysmometers (Ugo Basile, Varese, Italien) bestimmt, und zwar vor der Zyomosaninjektion ($t=0$) und zu den Zeitpunkten $t=0.25$, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8 und 24 nach Zyomosaninjektion [53]. Zu jedem Zeitpunkt wurden 5 Messungen des Pfootenvolumens vorgenommen. Aus diesen 5 Messungen wurde der Mittelwert errechnet und die Nettozunahme des Pfootenvolumens im Vergleich zu dem Wert vor Zyomosangabe bestimmt.

Die Richtlinien für die Untersuchung an wachen Tieren wurden bei allen Experimenten befolgt. Vor der Durchführung der Experimente wurde ein zustimmendes Votum der zuständigen Ethikkommission eingeholt.

Die Fläche unter der Pfootenvolumenzunahme versus Zeitkurve (AUC_{pw}) wurde mit der linearen Trapezregel berechnet. Die AUCs wurden varianzanalytisch getestet. Die aktiven Behandlungen wurden mit der Kontrolle verglichen (Dunnett Post hoc Test). Alpha wurde auf 0.05 gesetzt.

2.2 *Behandlungen und Dosierungen*

Die Enantiomere von Flurbiprofen (2-(Fluoro-4-biphenyl)propionsäure) wurden von der PAZ Arzneimittelentwicklungsgesellschaft (Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Die optische Reinheit beider Enantiomere betrug >98%. Dexamethason wurde von Sigma-Aldrich (München) gekauft. Die Substanzen wurden in 1 ml Phosphatpuffer gelöst. Die Tiere erhielten eine intraperitoneale Injektion von 1, 3, 9 mg/kg R- oder S-Flurbiprofen, oder 0.5 mg/kg Dexamethason oder Phosphatpuffer (Placebo). Es wurden Dosierungen für R-Flurbiprofen ausgewählt, die keine gastrointestinale Toxizität verursachen [54]. Die Substanzen wurden 15 Minuten vor der intraplantaren Zymosaninjektion verabreicht. Für die Zymosan-induzierte Hinterpfotenentzündung wurden 6 Ratten pro Gruppe behandelt. Bei den Prostaglandin E₂-Freisetzungsexperimenten aus entzündetem Gewebe und aus dem Rückenmark und der Inhibition der COX-2 Expression umfasste jede Behandlungsgruppe 3-6 Ratten.

2.3 *Flurbiprofenplasmakonzentrationen*

Sieben Ratten erhielten eine intraperitoneale Injektion von 9 mg/kg R-Flurbiprofen, um die Plasmakonzentrationen von R-Flurbiprofen und den Grad der Epimerisierung in S-Flurbiprofen zu messen. Über einen Zeitraum von 3 Stunden wurden Blutproben aus einem Jugularis-Katheter entnommen und die Plasmakonzentrationen mittels HPLC bestimmt [55].

2.4 *Prostaglandin E₂ Freisetzung aus Gewebefragmenten*

Die Versuchstiere wurden 6 Stunden nach Zymosan-Injektion – zu diesem Zeitpunkt wird die maximale entzündliche Antwort erwartet – mit Ketamin (100 mg/kg, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen GmbH) tief anästhesiert. Nach einer Herzpunktion zur weitgehenden Blutentleerung des Versuchstieres wurde das Tier intrakardial mit 0.1 M PBS (Phosphate Buffered Saline) perfundiert. Die thorakalen und lumbalen Segmente des Rückenmarks sowie Gewebeproben der entzündeten Hinterpfote wurden zügig entnommen, kurz in eiskalter Kochsalzlösung gewaschen und in 1 - 3 mm³ große Stücke geschnitten. Die Gewebestücke wurden gewogen und 25 mg davon in 250 µl mit Sauerstoff angereicherter Tyrode-Lösung für 15 min. bei 37°C inkubiert [56]. Durch den Transfer des Mediums in ein anderes Röhrchen, das bei – 20°C bis zur Analyse aufbewahrt wurde, wurde die Inkubation gestoppt. Die PGE₂-Freisetzung aus den Gewebeproben in das Inkubationsmedium wurde mit einem

kommerziell verfügbaren EIA Kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA) bestimmt. Die Ergebnisse wurden in pg/mg Nassgewicht per 15 min. angegeben. Das untere PGE₂-Quantifizierungslimit betrug 15 pg/ml. Der Variationskoeffizient innerhalb des Kalibrationsbereichs von 15 – 1000 pg/ml war <14%. Die statistischen Vergleiche wurden wie in Kapitel 2.1 beschrieben durchgeführt.

2.5 Quantitative RT-PCR

Um die mRNA-Synthese von COX-1 und COX-2 zu bestimmen, wurden Gewebeproben wie in Kapitel 2.4 beschrieben vorbereitet. Die Gewebeproben wurden schockgefroren und bei –70°C bis zur Analyse aufbewahrt.

Die Expression von COX-1 und COX-2 mRNA im Vergleich zu β -Aktin mRNA (interner Standard) wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt. Diese Methode verwendet die 5'-3' Exonuclease Aktivität der diagonalen DNA-Polymerase, um die Probe während der PCR aufzuschneiden. Die Primer bestehen aus Oligonucleotiden, die am 5'-Ende mit dem Farbstoffmolekül FAM (6-Carboxy-fluorescein; Emission λ 518 nm) und an einem internen Thymidin mit dem Farbstoffmolekül TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine; Emission λ 582 nm) markiert sind. Zusätzlich ist die Probe am 3'-Ende phosphoryliert, um eine Verlängerung der Probe während der PCR zu gewährleisten. Beim Aufschließen der Probe trennen sich die beiden Farbstoffe, was zu einem Fluoreszenzsignal von FAM führt. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels eines ABI Prism 7700 SDS analytical thermal cycler (Applied Biosystems, Langen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers gemessen. Es wurde ein Schwellenwert festgelegt, der die exponentielle Phase des Fluoreszenzanstieges einer Standard-DNA in zwei Abschnitte teilt. Wenn das Fluoreszenzsignal einer Probe den Schwellenwert (C_T -Wert) überschreitet, ist die Anzahl der Zyklen proportional zu der Anzahl an RNA-Kopien zu Beginn der PCR. Die C_T -Werte wurden standardisiert durch Subtraktion der C_T -Werte des housekeeping-Proteins β -Aktin von COX-1 und COX-2. Die Standardisierung der C_T -Werte von COX-1 und COX-2 wurden folgendermaßen vorgenommen: $\Delta C_T = C_T^{\text{COX}} - C_T^{\beta\text{-Aktin}}$. Die Zunahme der COX mRNA von Zymosan- und Substanz-behandelten Ratten im Vergleich zu Ratten, die nicht mit Zymosan behandelt wurden, errechnete sich wie folgt: $\text{rel. mRNA} = 2^{-\Delta C_T} / 2^{-\Delta C_T(\text{Kontrolle})}$. Wenn die Fluoreszenzschwelle bei einer Zyklusanzahl von 45 nicht erreicht wurde, wurde dieser C_T -Werte für beide Berechnungen benutzt. Die relativen mRNA Werte wurden

varianzanalytisch geprüft und anschließend mit einem Dunnett Post-hoc Test versus Kontrolle (Zyosan-behandelte Ratten ohne Flurbiprofenbehandlung) verglichen. Das α -Level wurde auf 0.05 festgelegt. Für die PCR wurde ein Reaktionsgemisch von 25 μ l verwendet, das sich folgendermaßen zusammensetzte: 5 ng extrahierter RNA; 5 μ l 10X PCR Puffer(100 mM TRIS pH8.3, 500 mM KCl); 3 mM/l $Mn(Oac)_2$; 120 μ M/l von dATP, dCTP, dGTP und dUTP; 1.25 U von Taq-Polymerase; 0.2 μ M/l von jedem Primer; 0.1 μ M/l von TaqMan Proben und steriles Wasser. Die Zyklusparameter waren 2 min. bei 50°C, 10 min. bei 95°C und dann 45 Zyklen mit 15 sek. bei 95°C und 1 min. bei 60°C. Die Primer und TaqMan Proben wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. Die Oligonukleotidsequenzen waren:

COX-2 forward –TTT GTT GAG TCA TTC ACC AGA CAG AT-

COX-2 reverse –C AGT ATT GAG GAG AAC AGA TGG GAT T-

COX-2 probe –6 FAM-CTA CCA TGG TC (TAMRA)T CCC CAA AGA TAG CAT
CT ph

COX-1 forward –GCC CAG TTC CAG TAT CGC A-

COX-1 reverse –GCG GAT GCC AGT GAT AGA GG-

COX-1 probe –6(FAM)-CCG CAT CGC CTT GGA ATT CAA CC-(TAMRA) ph

β -Aktin forward –TCACCCACACTGTGCCCATCTATGA-

β -Aktin reverse –GGATGCCACAGGATTCCATACCCA-

β -Aktin probe –6FAM-ACG CGT(TAMRA)TCC CTC ATG CCA TCC TGC GT ph

2.6 Westernblots

Zur Untersuchung der COX-Expression auf Proteinebene wurden die Gewebeproben wie oben beschrieben, vorbereitet und in 10 mM/Tris HCl Puffer pH 7.4 (20mM 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan-sulfonat (CHAPS)), 0.5 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF und 10 μ M Pefabloc (Alexis, Grünberg) im Verhältnis 1:10 homogenisiert. Nach der Entfernung der Zelltrümmer (Zentrifugation bei 100.000 g für 1 Stunde) wurde der Überstand, der CHAPS-Extrakt, für 5 min. bei 95°C in 0.1 ml SDS-PAGE Puffer (3.6%(w/v)Glycerol, 120 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.125M DTT) erhitzt. Mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (7.5% Polyacrylamid Trenngel) wurden 30 μ g des Proteinextrakts aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran(Amersham, Freiburg) mit Elektroblothing (BioRad, Richmond, California, USA) übertragen. Über Nacht wurden die Membranen mit 5% (w/v) Magermilch und 0.03% Tween 20 (in PBS pH 7.6 gelöst) geblockt. Anschließend wurden die

Membranen 1:100 in Blockierpuffer (PBS mit 5% Magermilch) gelöst und für 90 min. mit dem primären COX-2 Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg) inkubiert. Nach einer 45-minütigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper, an Meerrettichperoxidase gekoppelt (Verdünnung 1:1000), wurde immunreaktives Protein mit ECL (enhanced chemiluminescence system, Amersham, Freiburg) entsprechend den Anweisungen des Herstellers nachgewiesen. Die Spezifität des Antikörpers wurde anhand gereinigten COX-2 Rattenproteins (Dianova, Hamburg) gezeigt.

2.7 Zellkultur

Die murinen Makrophagen der Zelllinie RAW 246.7 wurden bei 37°C (5% CO₂ / 95 % Luft) in RPMI 1640 Medium, dem 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Gibco BRL, Karlsruhe), 2 mM Glutamin 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt war, kultiviert.

Die Zellen wuchsen in 12er-Kulturplatten oder in Kulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm. Die Zellen wurden für die Dauer von einer Stunde mit 10 µg/ml LPS (Sigma- Aldrich, Steinheim) in Gegenwart oder Abwesenheit von Flurbiprofen stimuliert.

R-Flurbiprofen (0.1, 1, 10, 100 und 1000 µM) und S-Flurbiprofen (1, 10, 100 und 1000 µM) wurden in Phosphatpuffer gelöst und zu den Zellen 30 min. vor LPS Stimulation hinzugegeben. Die Zellen wurden geerntet und für die EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) oder einen Western Blot aufgearbeitet.

2.8 Präparation von Cytosolfractionen und Kernextrakten

RAW 246.7 Zellextrakte stimuliert mit 10 µg/ml LPS (Lipopolysaccharide) in Gegenwart oder Abwesenheit von R- oder S-Flurbiprofen wurden präpariert wie von Kleinert et al. 1996 beschrieben [57]. Die geernteten Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und bei 4°C für 10 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 µl eiskaltem hypotonen Lysepuffer (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1.5 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, 7 µg/ml Pepstatin A, 5 µg/ml Leupeptin, 0.1 mM Benzamidin, 0.5 mM Dithiothreitol (DTT)) resuspendiert und auf Eis für 15 min. inkubiert. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 12.5 µl 10%igem Nonidet-40 lysiert und die zytosolische Fraktion durch Zentrifugieren mit 13000 g für 1 min. gewonnen. Zytosolextrakte wurden verwendet, um den Abbau von IκB-α zu bestimmen. Die Extrakte wurden -wie oben beschrieben-

einer SDS-PAGE und einer Immunblotanalyse unterzogen. Die Blots wurden mit primären Antikörpern gegen I κ B- α (Santa Cruz, Heidelberg) in einer Verdünnung 1:1000 inkubiert. Das Kernpellet wurde in 60 μ l eines hochkonzentrierten Extraktionspuffers (20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 25% (v/v) glycerol, 0.5 mM PMSF, 1.5 mM Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, 7 μ g/ml Pepstatin A, 5 μ g/ml Leupeptin, 0.1 mM Benzamidin, 0.5 mM DTT) resuspendiert und unter Schütteln bei 4°C für 30 min. inkubiert. Der Nuklearextrakt wurde dann bei 13000 g für 15 min. zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BioRad Protein Assay bestimmt. Die Nuklearextrakte wurden für SDS-Page, Immunblotanalysen mit primären Antikörpern gegen die NF- κ B Untereinheit p65 (Santa Cruz, Heidelberg) und EMSA verwendet.

2.9 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die NF κ B-DNA-Komplexe in LPS-stimulierten Macrophagen aus den Untereinheiten p50 (NF κ B1) und p65 (RelA) zusammensetzen [58].

Doppelsträngige Oligonukleotide, die die NF- κ B Erkennungssequenz (5'-AGTTGAGGGGACTTTC $\underline{\text{CC}}\text{CAGGC}$ -3', Santa Cruz, Heidelberg) oder eine AP-1 Stelle (5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3') enthielten, wurden mittels T4 Polynukleotidkinase an ihrem Ende mit [γ -³²P]ATP markiert. Nuklearextrakte 5-10 μ g wurden für 30 min. mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden (2.5- 5.0 x 10⁴ cpm) in 20 μ l Reaktionspuffer, der 2 μ g poly dI-dC, 10 μ M Tris HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 μ g/ml Rinderserum Albumin und 10% (v/v) Glycerol enthielt, inkubiert. Vor Hinzugabe der radioaktiv markierten Probe, wurde ein 100facher molarer Überschuss der unmarkierten Probe zur Bindungsreaktion für 15 min. hinzugegeben. Kernproteine wurden von der DNA auf einem 5% nicht denaturierenden Polyacrylamidgel in 0.25x TBE Puffer bei 150 V und 4°C für 2 Stunden separiert. Die Gele wurden getrocknet und die DNA Proteinkomplexe mittels Autoradiographie visualisiert.

2.10 Immunfluoreszenz

RAW 246.7 Zellen wurden auf Objektträgern mit Kammern 3 Tage vor dem Experiment ausgesät. Die Zellen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von R- und S-Flurbiprofen (100 und 1000 μM) 1 Stunde, bevor sie mit LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert wurden, inkubiert. Nach einer Stimulationsdauer von 30 min. wurden die Zellen für 5 min. in Ringerlösung gewaschen und anschließend in 70%igem Methanol bei -20°C für 7 min. fixiert. Dann wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und im Anschluss erfolgte eine Blockade der unspezifischen Bindungsstellen mit 5% BSA für 20 min. bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen für 30 min. bei Zimmertemperatur mit einem polyklonalen Ziegenantikörper gegen p65 (Santa Cruz, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS mit 1%igem Rinderserumalbumin inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit einer 1:400 Verdünnung eines Hasen gegen Ziege Antikörpers (Sigma-Aldrich, Steinheim), der an Cy-3 gekoppelt war, für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut 3 Mal mit PBS gewaschen und die Objektträger in Glycerol/Gelatine eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt. Danach erfolgte die Untersuchung mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon Eclipse 600).

3 Ergebnisse

3.1 Antiinflammatorische Effekte

Verschiedene Dosierungen von R- und S-Flurbiprofen sowie eine Negativ- (Vehikel) und Positiv-Kontrolle (Dexamethason) wurden wie oben beschrieben in einer Zymosan-induzierten Hinterpfotenentzündung an Ratten untersucht. In den Abbildungen 3A und 3B sind die Zunahme des Pfortenvolumens über eine Zeit von 24 Stunden nach der Gabe von R- und S- Flurbiprofen im Vergleich zur Gabe von Vehikel und Dexamethason dargestellt.

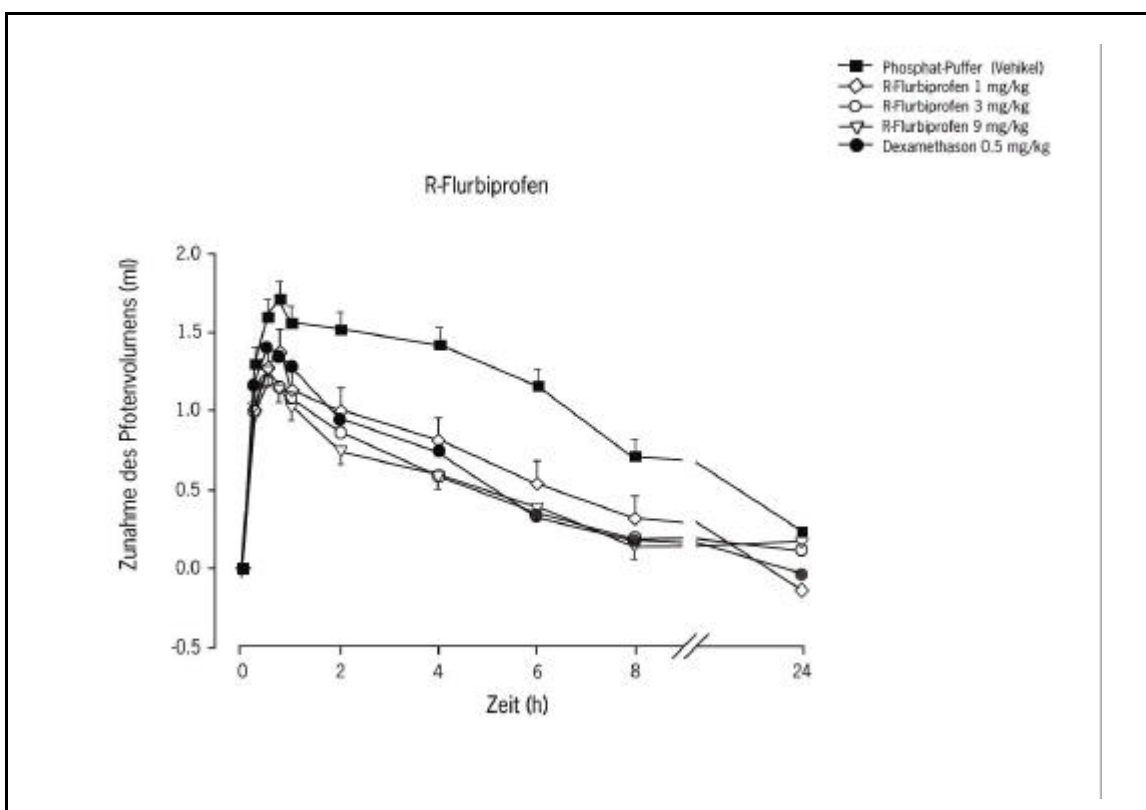


Abbildung 3A: Zeitverlauf der anti-inflammatorischen Effekte von R-Flurbiprofen in einer Zymosan induzierten Hinterpfotenentzündung bei Ratten. Pro Gruppe wurden 6 Ratten mit einer intraperitonealen Injektion von 1, 3, 9 mg/kg R-Flurbiprofen oder 0.5 mg/kg Dexamethason gelöst in 1 ml Phosphatpuffer behandelt. Kontrolltiere erhielten 1 ml Vehikel. 15 Minuten nach der Verabreichung der Behandlungen wurde 0.625 mg Zymosan suspendiert in 100 µl Phosphatpuffer in die plantare Seite der rechten hinteren Pfote injiziert. Das Pfortenvolumen wurde mittels Plethysmographie zu den gekennzeichneten Zeitpunkten bestimmt. Die absolute Zunahme im Vergleich zu dem Volumen vor Zymosanjektion ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

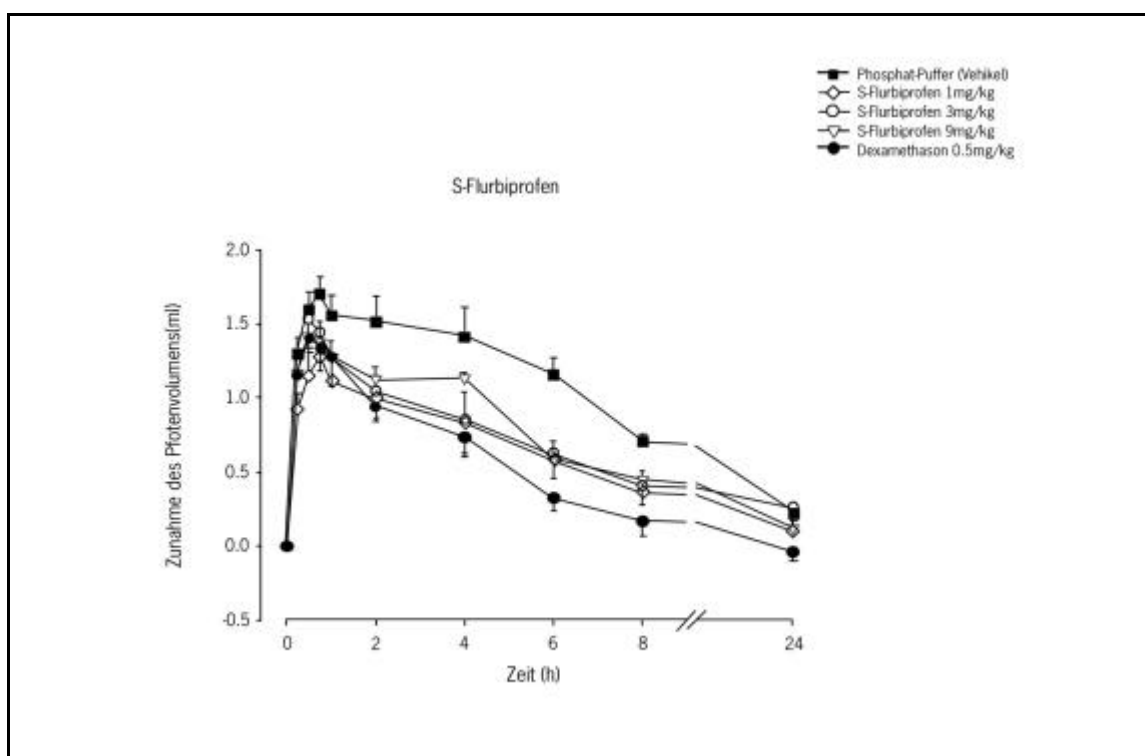


Abbildung 3B: Zeitverlauf der anti-inflammatorischen Effekte von S-Flurbiprofen in einer Zymosan induzierten Hinterpfotenentzündung bei Ratten. Pro Gruppe wurden 6 Ratten mit einer intraperitonealen Injektion von 1, 3, 9 mg/kg S-Flurbiprofen oder 0.5 mg/kg Dexamethason gelöst in 1 ml Phosphatpuffer behandelt. Kontrolltiere erhielten 1 ml Vehikel. 15 Minuten nach der Verabreichung der Behandlungen wurde 0.625 mg Zymosan suspendiert in 100 μ l Phosphatpuffer in die plantare Seite der rechten hinteren Pfote injiziert. Das Pfootenvolumen wurde mittels Plethysmographie zu den gekennzeichneten Zeitpunkten bestimmt. Die absolute Zunahme im Vergleich zu dem Volumen vor Zymosaninjektion ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Bei den Vehikel behandelten Ratten führte die intraplantare Zymosan-Injektion zu einer maximalen mittleren Zunahme des Pfootenvolumens von 1.52 ml (SD 0.39 ml). Diese Zunahme war nach Gabe von R-Flurbiprofen-, S-Flurbiprofen- und Dexamethason-behandelten Ratten signifikant reduziert. Unerwarteterweise reduzierte R-Flurbiprofen die Zunahme des Hinterpfotenvolumens effektiver als S-Flurbiprofen. In einer Dosierung von 3 und 9 mg/kg waren die Effekte von R-Flurbiprofen von denen nach Gabe von 0.5 mg/kg Dexamethason (Positiv-Kontrolle) nicht zu unterscheiden, mit Ausnahme der Dauer der anti-inflammatorischen Wirkung, die nach Gabe von R-Flurbiprofen kürzer war. Die $AUC_{\Delta PW}$ (0-24 h) war statistisch signifikant kleiner nach Gabe von Dexamethason ($P=0.003$) und R-Flurbiprofen ($P=0.007$ für 1 mg/kg und $P=0.005$ für 3 und 9 mg/kg) als nach Gabe von Vehikel. Da die anti-inflammatorischen Effekte von COX-hemmenden Substanzen im Zymosan-Modell vorwiegend zwischen 4 und 8 Stunden auftreten [59], wurde zusätzlich die $AUC_{\Delta PW}$ (4-8 h) berechnet. Während

dieser Phase reduzierte auch S-Flurbiprofen die AUC statistisch signifikant in einer Dosierung von 1 und 3 mg/kg (P=0.03 und P=0.04). In Abbildung 4 sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichungen der $AUC_{\Delta PW}$ (0-24 h) auf der linken und der $AUC_{\Delta PW}$ (4-8 h) auf der rechten Seite dargestellt.

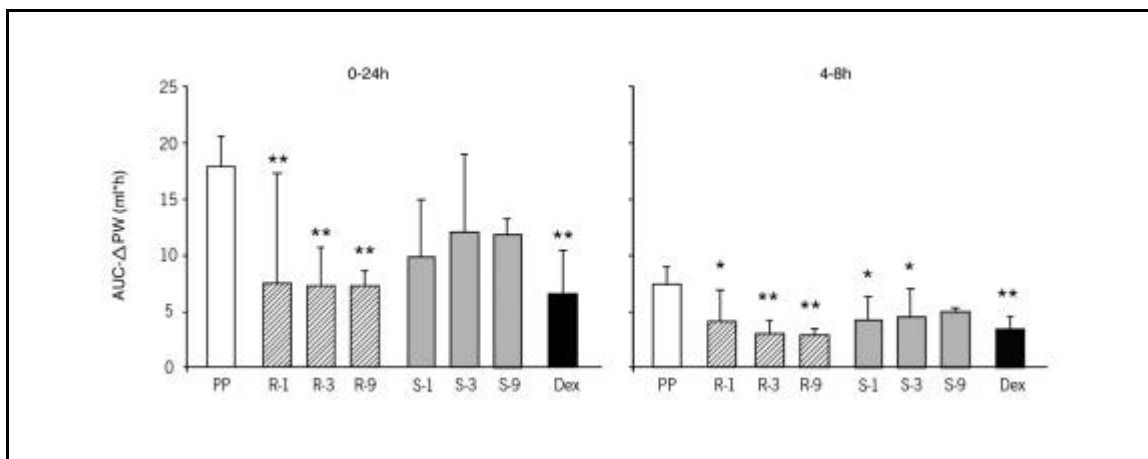


Abbildung 4: Fläche unter der Pfotenvolumen-Zeit-Kurve ($AUC_{\Delta PW}$), berechnet für den gesamten Beobachtungszeitraum (0-24 Stunden) sowie für 4-8 Stunden, angegeben als Mittelwerte und Standardabweichungen. PP: Vehikel (Kontrolle); R-1, -3, -9: 1, 3, 9 mg/kg R-Flurbiprofen i.p.; S-1, -3, -9: 1, 3, 9 mg/kg S-Flurbiprofen i.p.; Dex: 0.5 mg/kg Dexamethason i.p.; *: P<0.05, **: P<0.01 (Varianzanalyse mit Dunnett Posthoc-Test versus Kontrolle).

3.2 Flurbiprofenplasmakonzentrationen

Um die Höhe der Plasmakonzentrationen von R-Flurbiprofen, bei denen *in vivo* Effekte auftreten, und die Epimerisationsrate zu bestimmen, wurde der Plasmakonzentrations-Zeitverlauf von R- und S-Flurbiprofen nach intraperitonealer Verabreichung von 9 mg/kg R-Flurbiprofen an sieben Ratten gemessen. Der Konzentrationszeitverlauf von R- und S-Flurbiprofen ist in Abbildung 5 dargestellt. Die mittleren maximalen Plasmakonzentrationen von R-Flurbiprofen betragen 520.9 μM (SD 126.9); sie wurden zwischen 12 und 18 min. nach Verabreichung beobachtet. Die mittleren maximalen Plasmakonzentrationen von S-Flurbiprofen betragen 3.89 μM (SD 0.64). Basierend auf dem AUC Verhältnis ($\text{AUC}_{\text{S-Flurbiprofen}} / \text{AUC}_{\text{R-Flurbiprofen}} \times 100$) wurden 1.61 % (SD 0.21) von R-Flurbiprofen in S-Flurbiprofen epimerisiert.

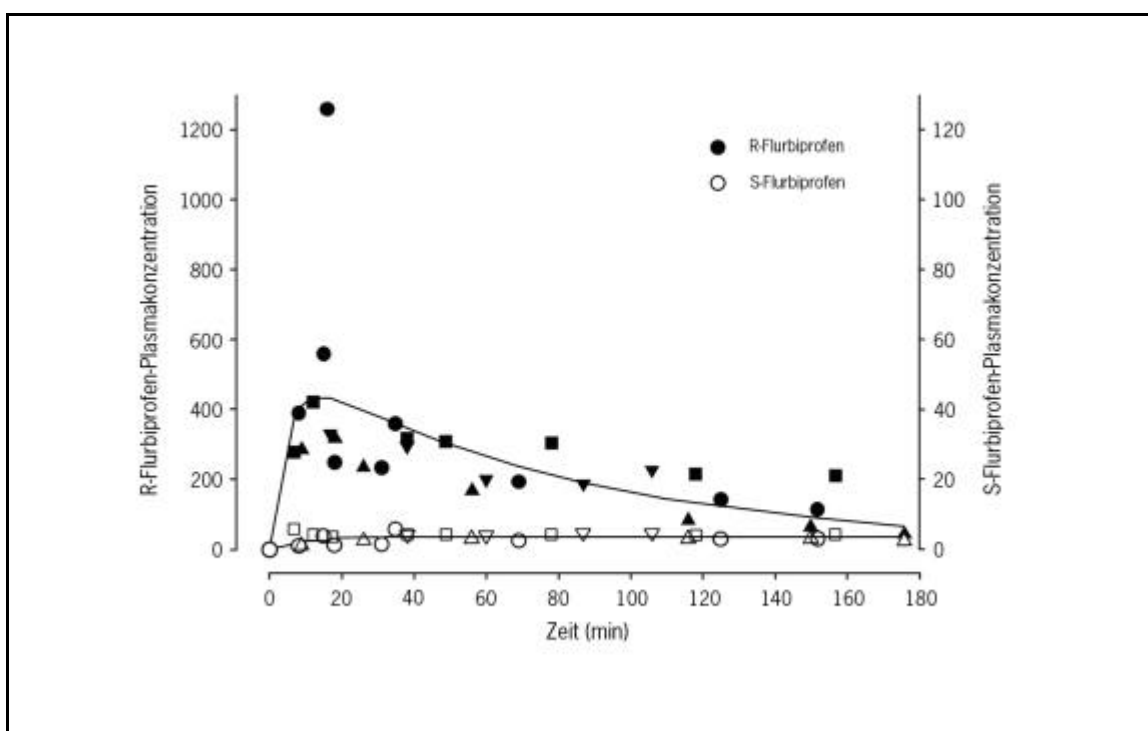


Abbildung 5: Plasmakonzentrationszeitverlauf von R- (geschlossene Symbole) und S-Flurbiprofen (offene Symbole) an 7 Ratten, die mit einer intraperitonealen Einzeldosis von 9 mg/kg R-Flurbiprofen behandelt wurden.

3.3 Hemmung der Prostaglandin-Freisetzung

In Abbildung 6 ist die Prostaglandinfreisetzung bei unbehandelten Ratten sowie 6 Stunden nach Zymosan-Stimulation im Bereich der entzündeten Hinterpfote und dem lumbalen Rückenmark nach der Behandlung mit S-Flurbiprofen, R-Flurbiprofen, Dexamethason oder Vehikel dargestellt.

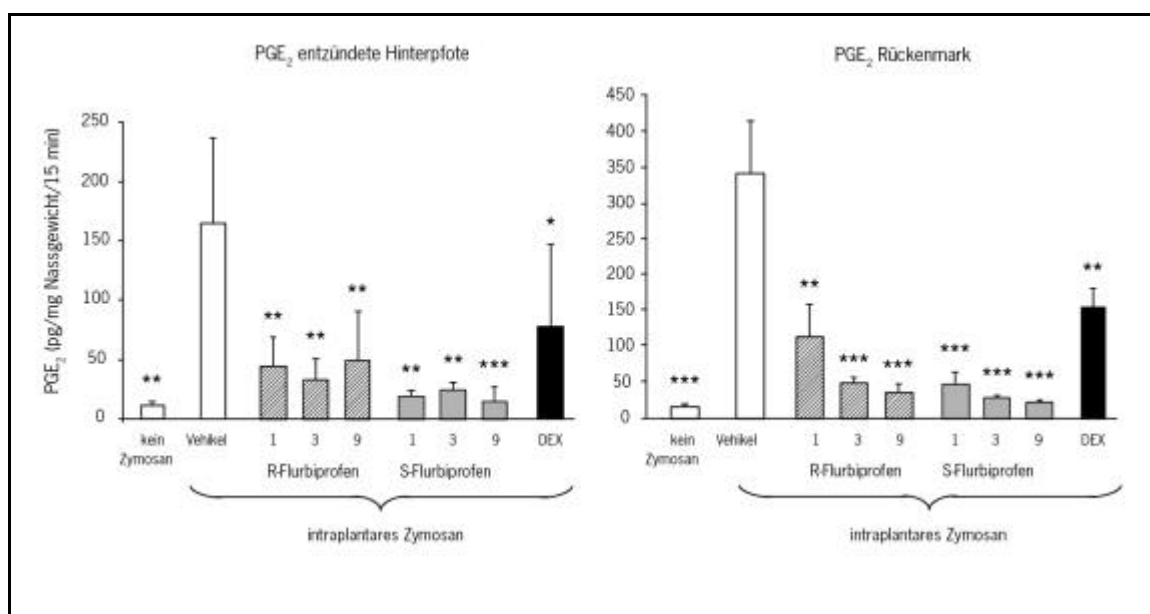


Abbildung 6: Prostaglandin E₂ (PGE₂) Freisetzung aus Gewebefragmenten der entzündeten Hinterpfote (links) und dem Rückenmark (rechts). Behandlungen: 1, 3, 9 mg/kg R- oder S-Flurbiprofen i.p. oder 0.5 mg/kg Dexamethason (DEX) i.p., 15 min vor der intraplantaren Injektion von 0.625 mg Zymosan in die Hinterpfote von Ratten, 3-6 Ratten pro Behandlungsgruppe. 6 Stunden nach Zymosan-Injektion wurden die Tiere getötet, Gewebeproben aus der entzündeten Pfote und dem Rückenmark rasch entnommen und in einer oxygenierten Tyrode-Lösung bei 37°C für 15 min inkubiert. Die Freisetzung von PGE₂ in das Inkubationsmedium wurde mittels EIA bestimmt.

Wie erwartet, reduzierte S-Flurbiprofen in allen verabreichten Dosierungen die PGE₂-Freisetzung in der entzündeten Pfote und auch im Rückenmark. Die Wirkung von Dexamethason war weniger ausgeprägt, dies könnte jedoch mit einem späteren Auftreten der Maximalwirkung von Dexamethason zusammenhängen. Auch R-Flurbiprofen hemmte statistisch signifikant die PGE₂-Freisetzung in der entzündeten Pfote und im Rückenmark, jedoch weniger wirksam als S-Flurbiprofen.

3.4 Hemmung der COX-2 Synthese

Zur Untersuchung der Beeinflussung der COX-Synthese durch die Gabe von R- oder S-Flurbiprofen wurde die Synthese der COX-1 und COX-2 mRNA sowie der COX-Proteine in entzündetem Gewebe und im Rückenmark mit und ohne aktive Behandlung untersucht. In den folgenden Abbildungen ist die COX-1 und COX-2 mRNA

Expression (als Vielfaches der COX mRNA von unbehandelten Kontrolltieren) in der entzündeten Hinterpfote (Abbildung 7) und im lumbalen Rückenmark (Abbildung 8) dargestellt:

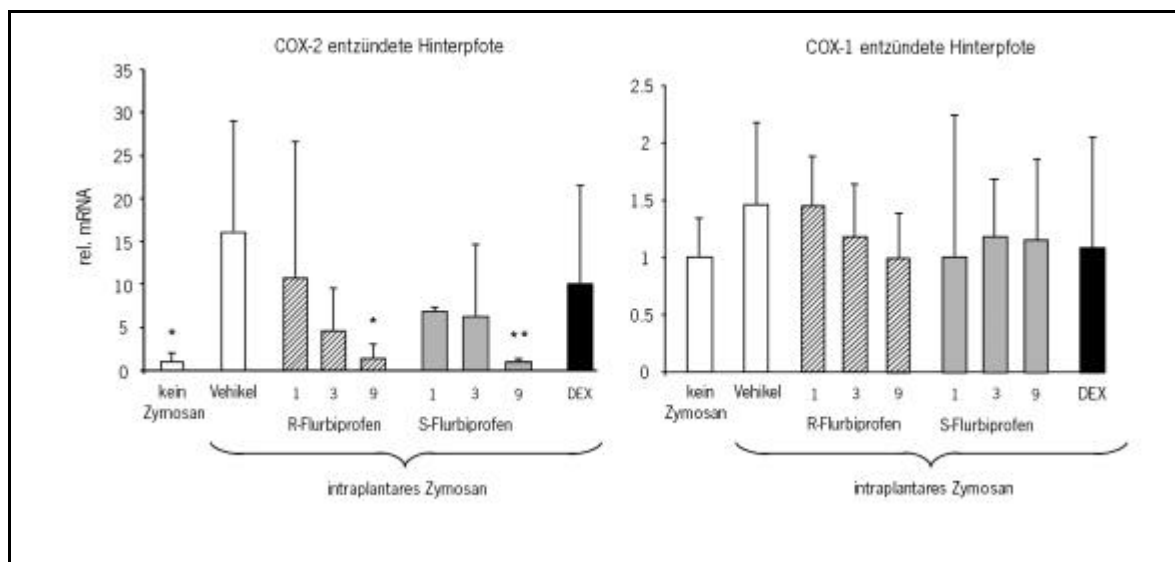


Abbildung 7: Cyclooxygenase (COX)-1 (rechts) und COX-2 (links) mRNA Synthese in der entzündeten Pfote. Behandlungen: 1, 3, 9 mg/kg R- oder S-Flurbiprofen i.p. oder 0.5 mg/kg Dexamethason (DEX) i.p., 15 min vor der intraplantaren Injektion von 0.625 mg Zymosan in die Hinterpfote von Ratten, 3-6 Ratten pro Behandlungsgruppe. 6 Stunden nach Zymosan-Injektion wurden die Tiere getötet, Gewebeproben aus der entzündeten Pfote und dem Rückenmark rasch entnommen. COX-1 und COX-2 mRNA Level in den Gewebeproben wurden relativ zu β -Aktin mRNA durch Real Time RT-PCR mit einem Thermocycler bestimmt. Die Ergebnisse sind als Vielfaches von COX-1 und COX-2 mRNA im Vergleich zu nicht mit Zymosan behandelten Tieren dargestellt.

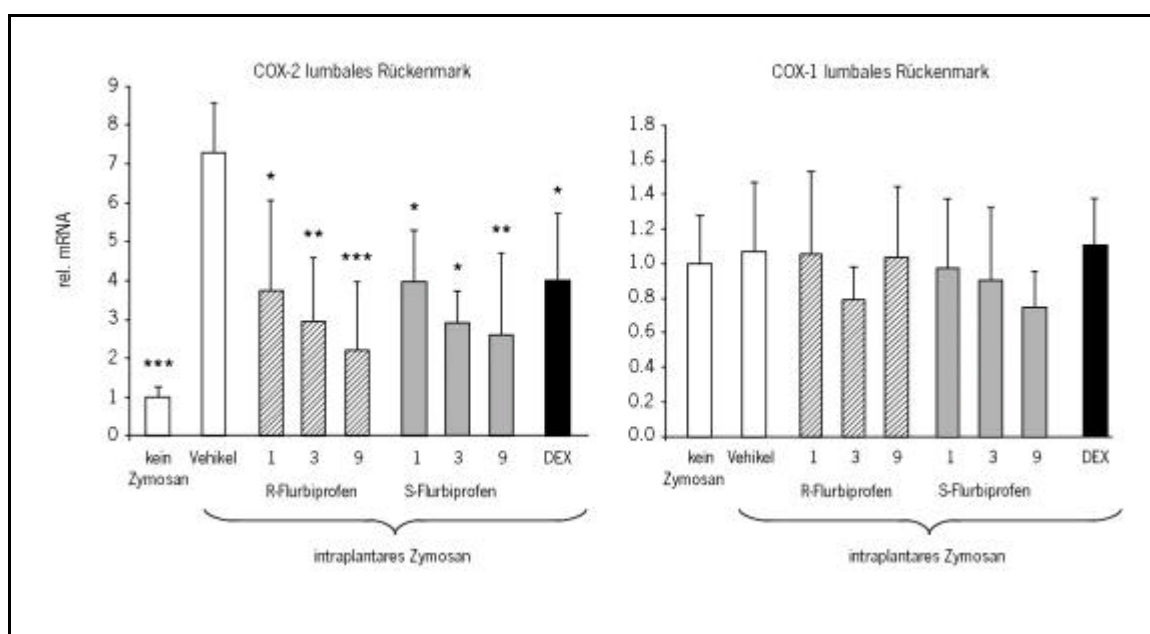


Abbildung 8: Cyclooxygenase (COX)-1 (rechts) und COX-2 (links) mRNA Synthese im Rückenmark 6 h nach der Injektion von Zymosan in die Hinterpfote, siehe Abbildung 7.

Die COX-1 mRNA Konzentration wurden durch Flurbiprofen weder in der entzündeten Hinterpfote noch im lumbalen Rückenmark beeinflusst. In der nicht-entzündeten Hinterpfote war COX-2 mRNA kaum messbar. Nach Zymosaninjektion nahm die COX-2 mRNA um etwa das 15fache zu (Abbildung 7A). Eine Behandlung mit 9 mg/kg R- und S-Flurbiprofen führte zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Zymosan-induzierten COX-2 mRNA Expression ($P=0.025$ und 0.007 für 9 mg/kg R- und S-Flurbiprofen).

Beide COX-Isoformen waren im Rückenmark von unbehandelten Tieren nachweisbar. In Abbildung 9 sind die entsprechenden COX-2 Protein-Daten dargestellt:

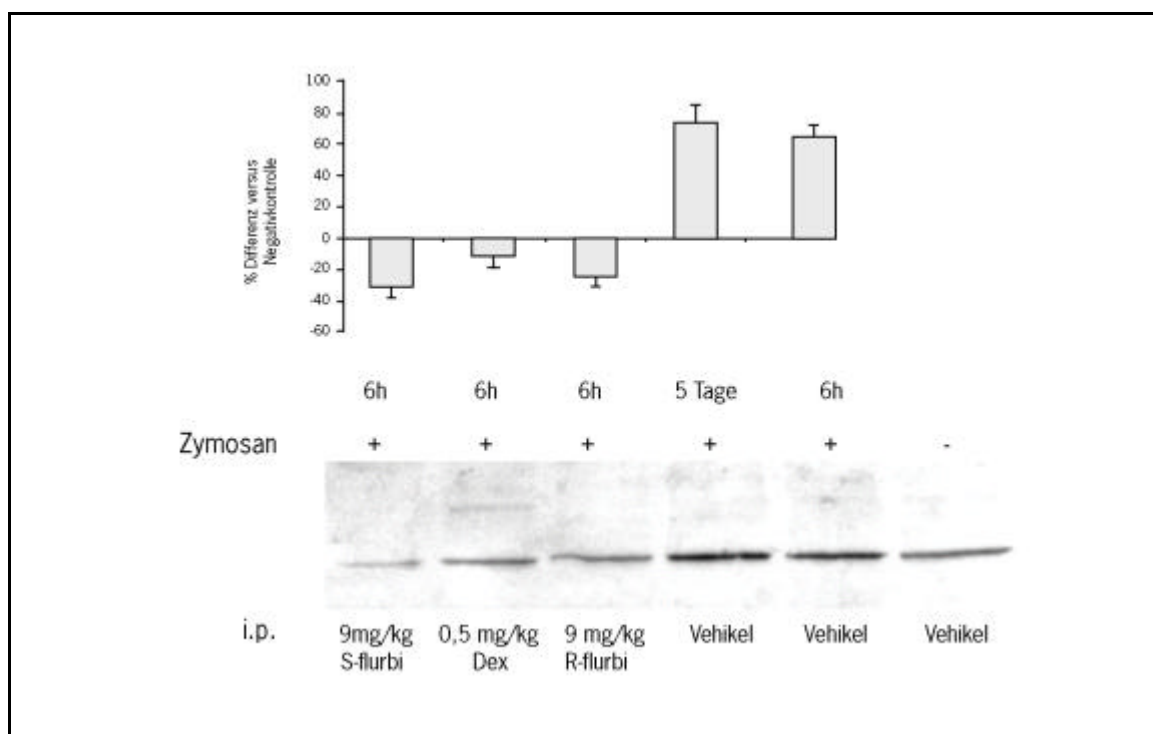


Abbildung 9: Westernblot Analyse der Cyclooxygenase (COX)-2 Proteinexpression im lumbalen Rückenmark. Behandlungen: 9 mg/kg R- oder S-Flurbiprofen i.p. oder 0.5 mg/kg Dexamethason (DEX) i.p., 15 min vor der intraplantaren Injektion von 0.625 mg Zymosan in die Hinterpfote von Ratten. Die Tiere wurden 6 h oder 5 Tage später getötet und das lumbale Rückenmark entnommen. Das Säulendiagramm zeigt die Resultate einer densitometrischen Messung von 5 Experimenten (mittlere prozentuale Zunahme versus Kontrolle +/- SEM).

Eine Reduktion der COX-2 Proteinexpression wurde nach der Behandlung mit 9 mg/kg R- und S-Flurbiprofen und nach Behandlung mit 0.5 mg/kg Dexamethason beobachtet.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sowohl R- als auch S-Flurbiprofen die COX-2 Expression dosisabhängig hemmen.

3.5 Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1

Um der Frage nachzugehen, ob die Hemmung der COX-2 Synthese durch eine Inhibierung der Aktivität von NFκB verursacht wird, wurde die DNA-Bindungsaktivität von Kernextrakten LPS-stimulierter Mausmakrophagen (RAW 264.7) in Abwesenheit oder Gegenwart von S- und R-Flurbiprofen in EMSA-Assays (electro mobility shift assays) untersucht.

Zellen, die mit LPS stimuliert worden waren, wiesen höhere Konzentration von aktivem NFκB auf, das an das markierte κB-Oligonukleotid binden konnte, als unbehandelte Zellen (Abbildung 10A). Zellen, die vor LPS-Stimulation mit S- (0.1, 1, 10, 100, 1000 μM) oder R-Flurbiprofen (0.1, 1, 10, 100, 1000 μM) behandelt wurden, zeigten eine konzentrationsabhängige Unterdrückung der NFκB DNA-Bindungsaktivität (Abbildung 10A). Hierbei unterdrückte R-Flurbiprofen die NFκB DNA-Bindungsaktivität potenter als das S-Enantiomer.

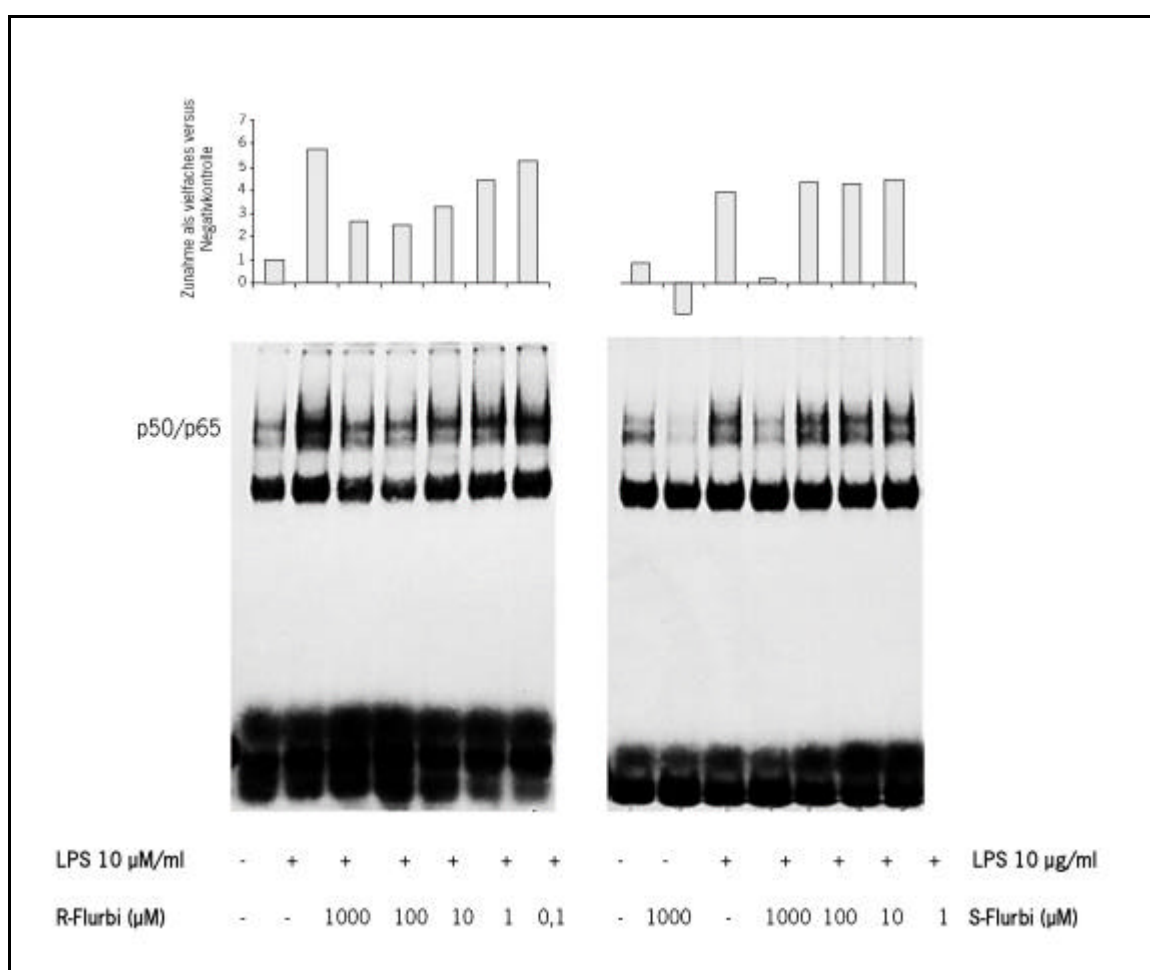


Abbildung 10A: Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay (EMSA), der die R- und S- Flurbiprofen Effekte auf die DNA Bindungsaktivität von NFκB Proteinen in LPS-stimulierten Mäusemakrophagen zeigt. Ein repräsentativer EMSA von 3 Wiederholungsexperimenten ist dargestellt. RAW 264.7 Zellen wurden unbehandelt gelassen oder mit R- und S-Flurbiprofen in den genannten Dosierungen inkubiert gefolgt von einer Stimulation mit 10 μg/ml LPS für 30 min. Das Säulendiagramm zeigt das Mehrfache der Zunahme der DNA-Bindungsaktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen, densitometrisch analysiert.

Um festzustellen, ob Flurbiprofen eine Inhibierung der AP-1 Aktivität verursacht, wurden Kernextrakte von RAW 264.7-Zellen auf ihre AP-1 DNA-Bindungsaktivität (AP-1 übereinstimmendes Oligonukleotid) hin getestet.

Die spezifische AP-1 DNA-Bindungsaktivität nahm signifikant in LPS-stimulierten Zellen gegenüber unstimulierten Zellen zu. Diese wurde durch R-Flurbiprofen (10-1000 μM) konzentrationsabhängig verhindert und bei einer Konzentration von 1000 μM sogar vollständig unterdrückt. Dagegen konnte bei S-Flurbiprofen nur eine Abnahme der Bindungsaktivität bei einer Konzentration von 1000 μM gezeigt werden (Abbildung 10B).

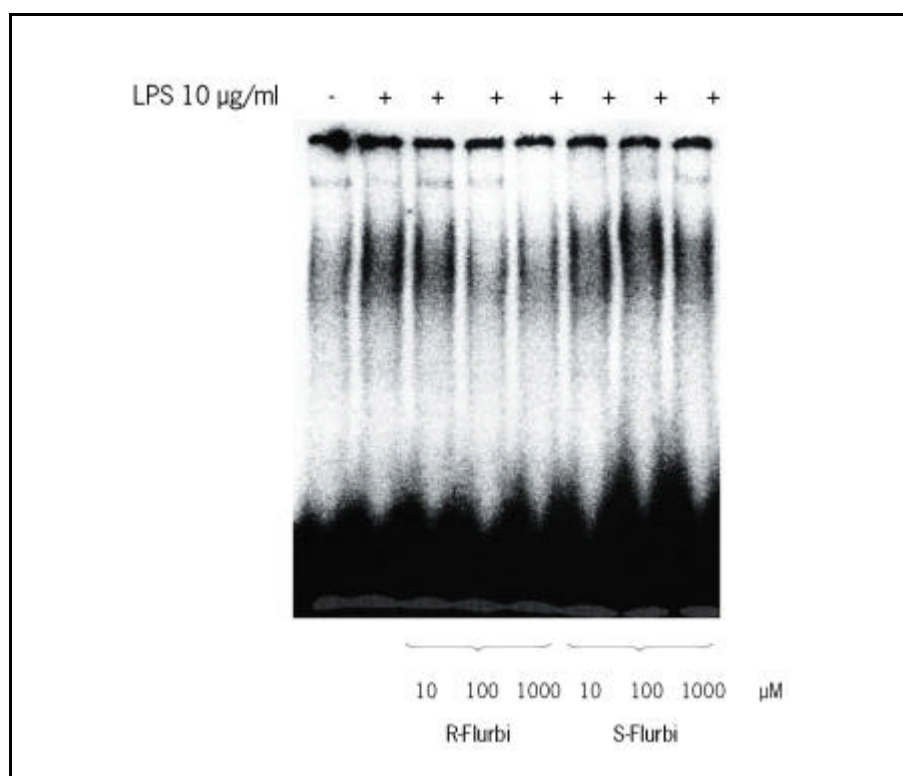


Abbildung 10B: Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay (EMSA), Effekte von R- und S-Flurbiprofen auf die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 in LPS-stimulierten Mausmakrophagen.

3.6 Hemmung der Translokation der p65-Untereinheit von NF κ B

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob R- und S-Flurbiprofen die Translokation der p65 Untereinheit von NF κ B in den Zellkern verhindert, wurden RAW 264.7-Zellen unbehandelt oder mit LPS stimuliert und in der Gegenwart oder Abwesenheit von R- und S-Flurbiprofen untersucht. Dabei wurde die p65 Untereinheit von NF κ B durch einen fluoreszierenden polyklonalen Antikörper gegen p65 in der Zelle lokalisiert.

In unbehandelten Zellen wurde die p65 Untereinheit von NF κ B ausschließlich im Cytoplasma gefunden (Abbildung 11A). In Zellen, die mit LPS stimuliert waren, wurde

hingegen die p65 Untereinheit von NFκB überwiegend im Zellkern gefunden (Abbildung 11B).

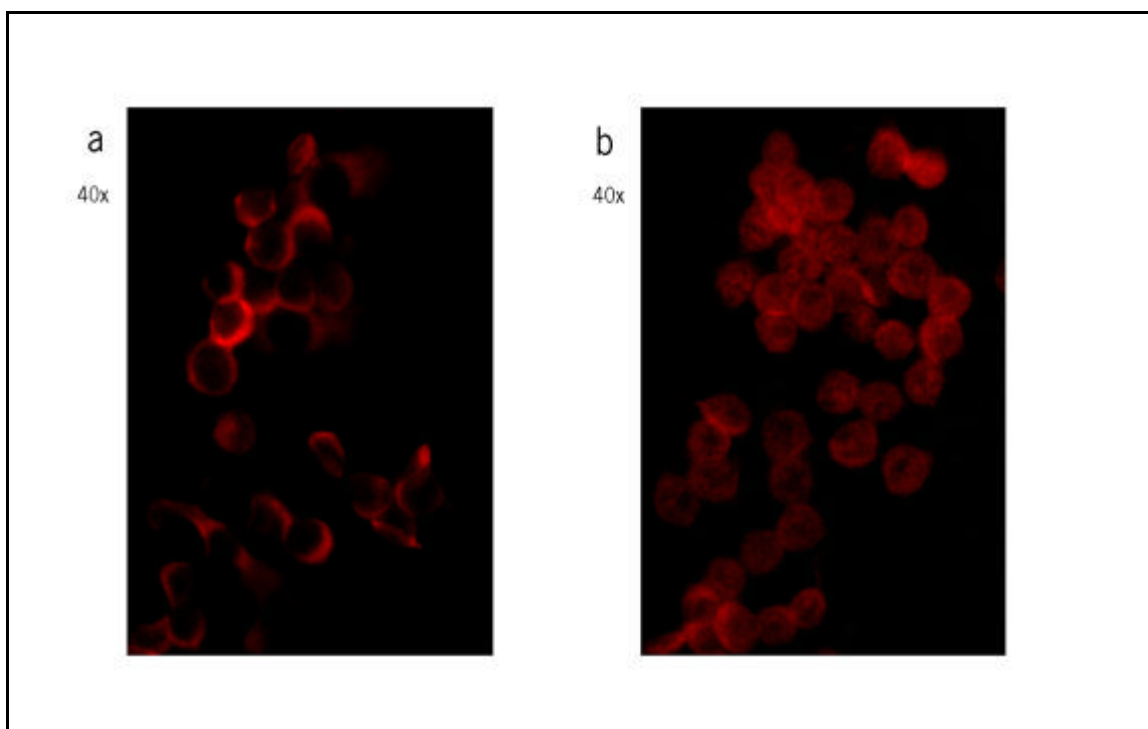


Abbildung 11A und B: Intrazelluläre Lokalisation von p65 durch Immunfluoreszenz mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen p65; Aufnahmen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon Eclipse 600); repräsentative Ergebnisse aus 4 Experimenten: RAW 264.7 Zellen unbehandelt (a), oder stimuliert mit 10 µg/ml LPS (b).

In Zellen, die zuvor mit 1000 μ M R-Flurbiprofen behandelt worden waren, war die Immunreaktivität nur auf das Cytoplasma beschränkt und nicht zu unterscheiden von den unstimulierten Kontrollen (Abbildung 11C, 11D).

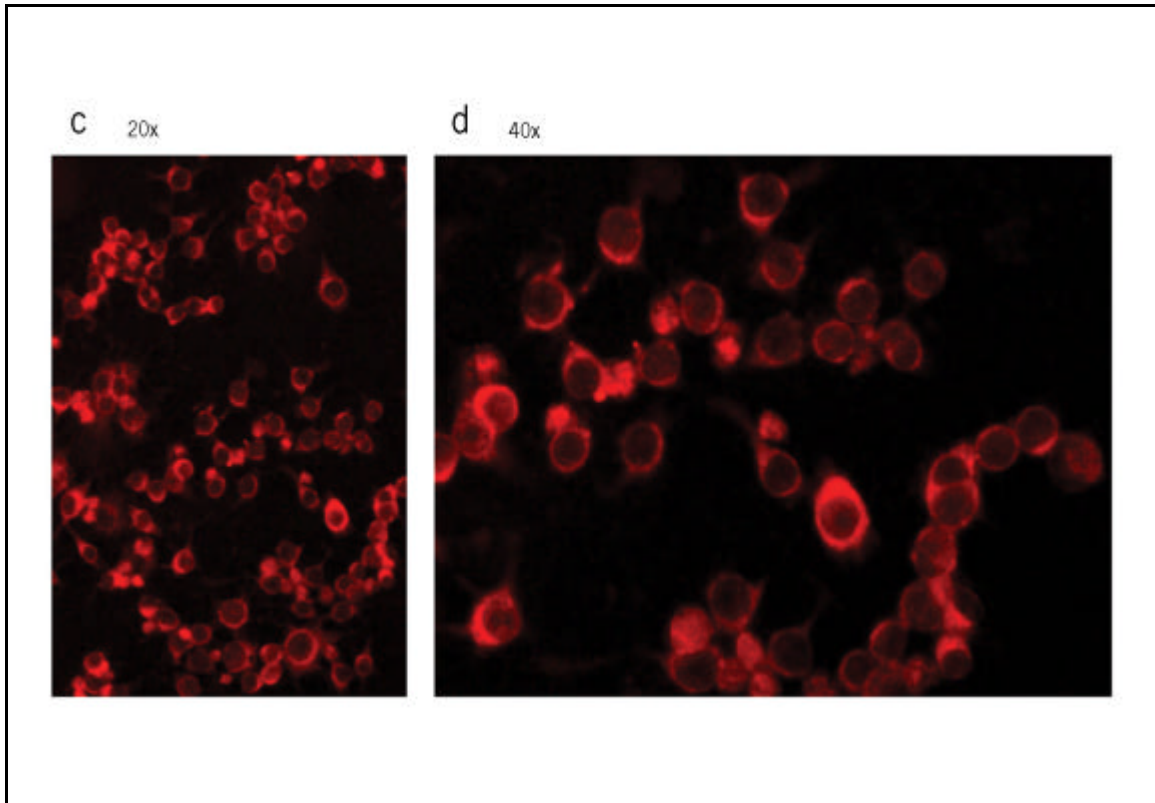


Abbildung 11C und D: Intrazelluläre Lokalisation von p65 durch Immunfluoreszenz mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen p65; Aufnahmen mit einem Fluoreszenz Mikroskop (Nikon Eclipse 600); repräsentative Ergebnisse aus 4 Experimenten: RAW 264.7 stimuliert mit 10 μ g/ml LPS in der Gegenwart von 1000 μ M R-Flurbiprofen.

Hingegen konnte durch die Behandlung mit 1000 μM S-Flurbiprofen nur teilweise eine Immunfluoreszenz-Aktivität im Kern verhindert werden (Abbildung 11E, 11F).

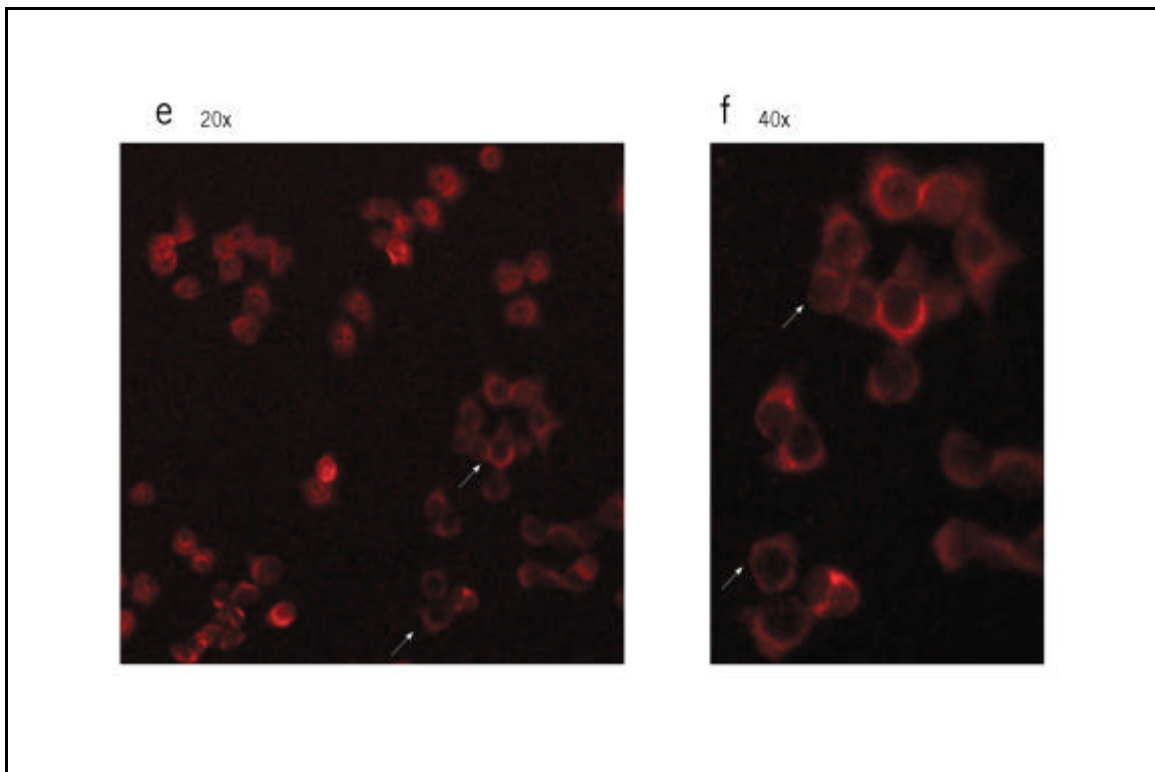


Abbildung 11E und F: Intrazelluläre Lokalisation von p65 durch Immunfluoreszenz mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen p65; Aufnahmen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon Eclipse 600); repräsentative Ergebnisse aus 4 Experimenten: RAW 264.7 stimuliert mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS in der Gegenwart von 1000 μM S-Flurbiprofen. Die Pfeile zeigen Zellen, in denen die p65 Translokation gehemmt wurde, der offene Pfeil zeigt Zellen, in denen die p65 Translokation nicht gehemmt wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Migration von p65 in den Zellkern durch R- und S-Flurbiprofen verhindert werden kann. Dabei ist wiederum R-Flurbiprofen das wirksamere Enantiomer.

3.7 Abbau von $I\kappa B-\alpha$

Zur Beantwortung der Frage, ob der Abbau von $I\kappa B$ durch Flurbiprofen beeinflusst wird, wurden p65 und $I\kappa B$ in Kern- und Zellextrakten von LPS-stimulierten RAW 264.7-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von R- und S-Flurbiprofen mit Westernblots bestimmt.

Eine halbe Stunde nach Stimulation mit LPS wurde eine Abnahme des cytoplasmatischen $I\kappa B-\alpha$ Signals gemessen, im Kern hingegen zeigte sich ein Anstieg von p65

(Abbildung 12A, 12B). Nach einer Stunde fiel das Niveau des I κ B- α Signals auf das Ausgangsniveau.

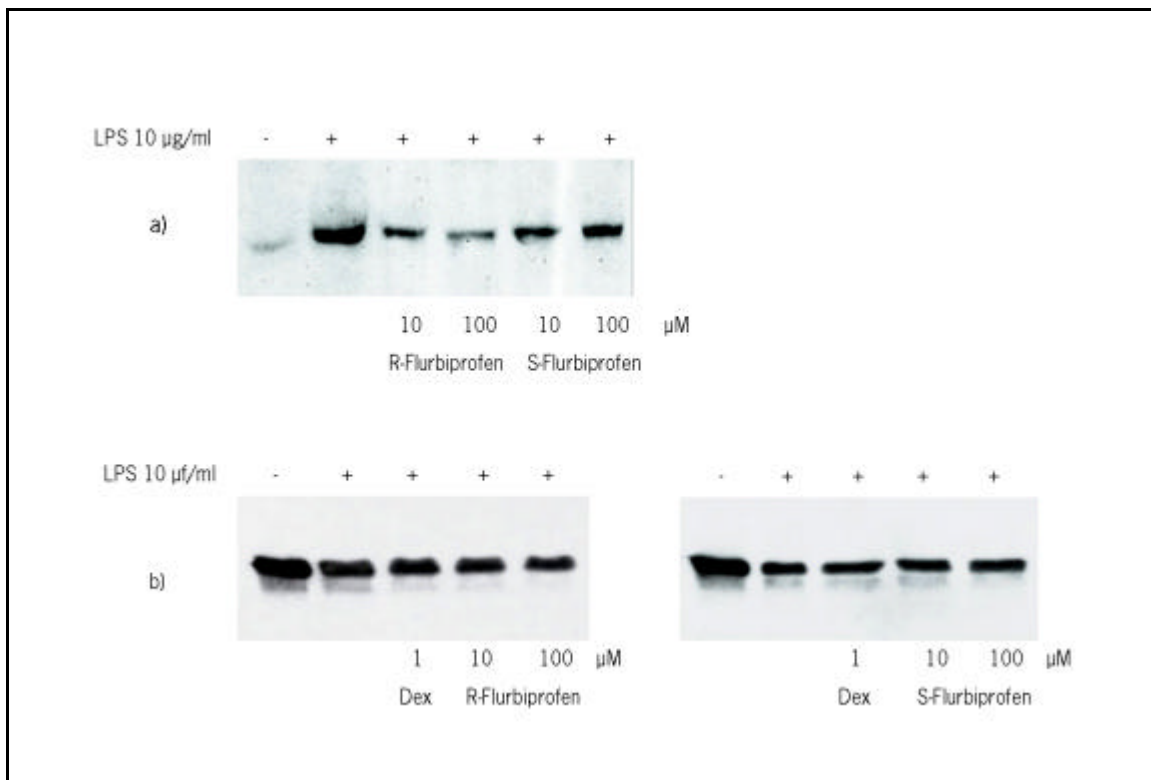


Abbildung 12: Immunblotanalyse von Cytoplasma und Kernextrakten aus RAW 264.7 Zellen. Die Zellen wurden zunächst mit 10 oder 100 μ M R- oder S-Flurbiprofen oder 1 μ M Dexamethason für 1 h inkubiert und anschließend mit 10 μ g/ml LPS für 30 min. stimuliert. Die Membranen wurden mit spezifischen anti p65 (a) und anti I κ B- α (b) Antikörpern inkubiert.

Die Vorbehandlung der Zellen mit R- und S-Flurbiprofen verringerten den zuvor beschriebenen nukleären Anstieg von p65 signifikant (Abbildung 12A), d.h. gehemmt wurde hauptsächlich die Translokation. Dagegen hatte die Präinkubation der Zellen mit R- und S-Flurbiprofen auf den durch LPS-Stimulation folgenden Abfall von I κ B- α im Cytoplasma keinen Einfluss. Dies lässt vermuten, dass R- und S-Flurbiprofen die durch LPS eingeführte Degradation von I κ B- α nicht hemmen. Folglich wäre eine direkte Interaktion der Flurbiprofen-Enantiomere mit NF κ B, wie sie für Glucocorticoide beschrieben wurde, vorstellbar. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Flurbiprofen mit anderen Proteinen in Interaktion steht, die wiederum eine nukleäre Translokation von NF κ B fördern, wie z.B. das Hitzeschock-Protein, dem eine bedeutende Rolle in der Unterdrückung der Immunsuppressionsaktivität von 15-Desoxyspergualin zugesprochen wird.

4 Diskussion

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass R-Flurbiprofen ein potentes Antinozizeptivum ist [28, 30, 32], obwohl es in therapeutisch relevanten Konzentrationen die Cyclooxygenase-Aktivität nicht hemmt [26, 54, 60]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob R-Flurbiprofen antiinflammatorisch wirkt. Es wurde weiterhin der Frage nachgegangen, ob eine verminderte COX-2 Expression und eine Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 an antinozizeptiven und antiinflammatorischen Effekten von R-Flurbiprofen beteiligt ist.

Zu diesem Zweck wurden bei Ratten die Effekte von R-, S-Flurbiprofen und Dexamethason im Vergleich zu Vehikel in der Zymosan-induzierten Hinterpfotenentzündung untersucht. Es wurden Gewebeproben aus der entzündeten Pfote und dem Rückenmark entnommen und evaluiert, ob sich die PGE₂-Freisetzung, die Expression von COX-mRNA und die COX-Synthese unter dem Einfluss der Behandlungen veränderte. Weiterhin wurden die Effekte von R-, S-Flurbiprofen und Dexamethason auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF κ B und AP-1) in RAW 264.7 Mausemakrophagen untersucht.

In der Zymosan-induzierten Hinterpfotenentzündung der Ratte war R-Flurbiprofen weniger potent, jedoch genauso effektiv wie das Glucocorticoid Dexamethason. Sowohl COX-1 als auch COX-2 wurden im Rückenmark von Kontrolltieren nachgewiesen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass COX-1 und COX-2 konstitutiv im zentralen Nervensystem vorhanden sind [61, 62, 63]. Die COX-1 mRNA Level in der Hinterpfote und im Rückenmark wurden weder durch R-, S-Flurbiprofen oder Dexamethason beeinflusst. Dies bestätigt die Annahme, dass während einer Entzündung die COX-1 nicht vermehrt exprimiert wird. Sowohl R- als auch S- Flurbiprofen hemmten die COX-2 mRNA Expression im Rückenmark und der entzündeten Hinterpfote. Dabei war ihre Wirkung etwas stärker im Vergleich zu Dexamethason, wobei sich dieses Phänomen in der entzündeten Pfote ausgeprägter als im Rückenmark zeigte. Weiterhin wurde die Synthese von COX-2 Proteinen durch R-, S- Flurbiprofen und Dexamethason vermindert. Folgende Ergebnisse sprechen dafür, dass die beobachteten antiinflammatorischen Effekte auch auf einer Inhibierung der NF κ B- und der AP-1 Aktivierung zurückzuführen sein könnten:

R-Flurbiprofen inhibierte die NFκB- und AP-1-DNA-Bindungsaktivität, die LPS-induzierte nukleäre Translokation der p65 Untereinheit von NFκB (relA) und die NFκB-abhängige Gentranskription. S-Flurbiprofen hingegen war weniger potent in der Hemmung der NFκB und AP-1 DNA-Bindungsaktivität, der LPS-induzierten nukleären Translokation der p65 Untereinheit und der NFκB abhängigen Gentranskription. Dafür verminderte S-Flurbiprofen die PGE₂-Freisetzung in der entzündeten Rattenhinterpfote und im Rückenmark stärker als R-Flurbiprofen. Dies lässt sich auf die COX-blockierenden Eigenschaften von S-Flurbiprofen zurückführen.

Die Unterdrückung der NFκB-Aktivität durch R-Flurbiprofen ist unabhängig von der Degradation von IκB-α. Die blockierenden Wirkungen der NFκB- und AP-1-Aktivierungen *in vitro* wurden hauptsächlich in Konzentrationen um die 100 – 1000 μM beobachtet. Die intraperitoneale Behandlung mit 9 mg/kg R-Flurbiprofen erzeugte eine beobachtete maximale Plasmakonzentration von 500 μMol/l. Folglich liegen die Konzentrationen, um eine Blockierung der NFκB- und AP-1-Aktivierung *in vitro* zu erreichen, im Bereich der Plasmakonzentrationen, die nach einer intraperitonealen Gabe von R-Flurbiprofen erreicht werden. Des weiteren zeigten Berechnungen aus Mikrodialyse-Experimenten [26], dass bei Verabreichung einer Dosis von 9 mg/kg R-Flurbiprofen, die im Rückenmark erreichten R-Flurbiprofen-Konzentrationen um die 100 μM liegen. Aufgrund dieser Resultate lässt sich schließen, dass die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse über den Mechanismus der Flurbiprofen-Aktivität *in vivo* analog ablaufen könnten.

Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthrose wurde kürzlich eine hohe NFκB- und AP-1-DNA-Bindungsaktivität in der Synovia festgestellt [64]. Bei Mäusen mit einer Collagen-induzierten Arthritis ging eine Aktivierung von NFκB und AP-1 einer klinischen Arthritis und einer Transkription von Collagenasen [64] voraus. Diesen Collagenasen wird eine wichtige Rolle im Abbau von Knorpel und Knochen zugesprochen [65, 66]. Zusammengefasst lässt sich vermuten, dass die Aktivierung von NFκB und AP-1 in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis eine wichtige Rolle spielt. Dies könnte auch die Wirkung von Glucocorticoiden bei rheumatoider Arthritis erklären, weil Glucocorticoide eine NFκB-Aktivierung hemmen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass R-Flurbiprofen Entzündungen genauso effektiv milderte wie Dexamethason. Dabei hat es den Anschein, dass der Wirkungsmecha-

nismus ähnlich verläuft. Die erarbeiteten Ergebnisse lassen die Interpretation zu, dass R-Flurbiprofen die klinischen Symptome und die Gelenkzerstörungen durch eine rheumatoide Arthritis vermindern könnte. Im Falle des S-Enantiomers ist es möglich, dass die Inhibierung von NFκB zu den antiinflammatorischen Effekten, die durch die Blockierung der Cyclooxygenase-Aktivität hervorgerufen sind, beiträgt. Die Wirkungsmechanismen beider Enantiomere in Kombination, könnten zu einer Verbesserung der Behandlung von rheumatoider Arthritis und anderen entzündlichen Erkrankungen führen. Es muss aber festgehalten werden, dass S-Flurbiprofen im Vergleich zum R-Enantiomer weniger effektiv in der Milderung der Zymosan-induzierten Rattenhinterpfotenentzündung war. Diese widersprüchlichen Daten stützen die These, dass die COX-2 nicht nur proinflammatorische, sondern auch antiinflammatorische Prostaglandine [67] synthetisiert, die durch eine Behandlung mit S-Flurbiprofen oder Razemat vermindert werden.

Neben der zentralen Rolle bei entzündlichen Prozessen und Immunantworten ist NFκB an der Regulation der Apoptose beteiligt, und zwar entweder als essentieller Apoptose-Induktor, oder – häufiger – als Apoptose-Inhibitor [68]. Bei verschiedenen humanen Krebszellen ist NFκB konstitutiv aktiv [69], was mit einer Resistenz gegenüber einer zytostatisch oder Strahlen induzierten Apoptose vergesellschaftet ist [70]. Eine Hemmung der NFκB-Aktivierung kann die Sensitivität von Krebszellen gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen verstärken [71, 72]. Acetylsalicylsäure und andere NSAIDs vermindern oder reduzieren das Auftreten von Colon- und Rektumcarcinomen, möglicherweise auch anderer bösartiger Tumoren [73, 74, 75, 76, 77, 78]. Der Mechanismus der anticarcinogenen Wirkung ist bisher nicht bekannt, jedoch die meisten Hypothesen beziehen die COX-inhibierenden Eigenschaften der NSAIDs mit ein. Die Hemmung des Wachstums von ras-transformierten Fibroblasten durch Acetylsalicylsäure ist mit einer Hemmung der NFκB-Aktivität korreliert [79]. Dies könnte zu den antikanzerogenen Wirkungen bestimmter NSAIDs beitragen. Diese Theorie wird durch folgenden Befund gestützt: R-Flurbiprofen hemmte die Tumorentstehung und das Tumorwachstum bei (Min)-Mäuse (APC^{Min/+}) mit multiplen intestinalen Neoplasien; die Anzahl der Tumoren wurde um bis zu 90% bei einer Dosierung von 20 mg/kg pro Tag reduziert [80]. Min-Mäuse ebenso wie Patienten mit einer familiären adenomatösen Polyposis exprimieren einen abnormalen Genotyp für das APC Tumor Supressor Gen und entwickeln multiple intestinale Adenome.

Interessanterweise ist festzustellen, dass 5-Aminosalicylsäure, die keine NFκB hemmenden Eigenschaften aufweist [50], die Tumorentstehung bei APC min + Mäusen [81] nicht reduzierte, wohingegen die Behandlung mit Acetylsalicylsäure die Anzahl der Tumoren um 44% reduzierte [82].

Zu den wichtigsten möglicherweise schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen nicht-steroidaler Antiphlogistika gehören gastrointestinale Nebenwirkungen (z.B. Gastritis, Ulzera, Blutungen). Gegenüber diesen COX-hemmenden Arzneimitteln hat R-Flurbiprofen den Vorteil, dass es die Mucosa des Gastrointestinaltraktes nicht signifikant schädigt [54, 83]. Es wurde gezeigt, dass das Razemat deutlich ulcerogener ist als das S-Enantiomer [83]. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Beobachtung, dass R-Flurbiprofen selbst nicht gastrotoxisch ist. Von Glucocorticoiden ist ebenfalls bekannt, dass sie die ulcerogenen Effekte verschiedener NSAIDs verstärken, wobei ihre eigene gastrointestinale Toxizität bei alleiniger Verabreichung als niedrig einzustufen ist. Aus diesen Ergebnissen heraus kann gefolgert werden, dass eine Kombination von NFκB- und Cyclooxygenase-Inhibierung möglicherweise einen beträchtlichen Mucosa-Schaden nach sich ziehen würde. Weiterhin verursacht R-Flurbiprofen nicht die typischen unerwünschten Wirkungen, die mit einer Langzeitanwendung von Glucocorticoiden verbunden sind. Folglich, könnten die hier beobachteten potenten antinflammatorischen Effekte von R-Flurbiprofen - ohne relevante COX Inhibition, bei fehlender Gastrotoxizität - vorteilhaft für die Behandlung entzündlicher Erkrankungen sein und somit ausgedehnte klinische Studien von R-Flurbiprofen am Menschen rechtfertigen.

5 Schlussfolgerung

R-Flurbiprofen wirkte antiinflammatorisch in der Zymosan-induzierten Hinterpfotenentzündung der Ratte. Dieser antiinflammatorische Effekt lässt sich über eine verminderte COX-2 Expression und eine Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 erklären.

6 Zusammenfassung

R-Flurbiprofen wird als das „inaktive“ Isomer des NSAIDs Flurbiprofen angesehen, weil es *in vitro* die Cyclooxygenase-Aktivität in therapeutischen Konzentrationen nicht hemmt. Dennoch zeigte sich, dass R-Flurbiprofen antinozizeptive und antikanzerogene Effekte hervorruft, obwohl das R-Enantiomer bei Ratte und Mensch nur marginal zum S-Enantiomer epimerisiert wird.

Um diese Effekte näher untersuchen zu können, wurden sowohl *in vivo* als auch molekularbiologische Experimente durchgeführt: R- und S-Flurbiprofen wurden intraperitoneal in den Dosierungen 1, 3, 9 mg/kg und Dexamethason (Kontrolle) in einer intraperitonealen Dosis von 0.5 mg/kg Ratten verabreicht. Die Effekte von R- und S-Flurbiprofen und Dexamethason wurden in der Zymosan-induzierten Hinterpfotenentzündung im Vergleich zu Vehikel untersucht. Die Gruppengröße umfasste 3 – 6 Ratten pro Behandlung. Außerdem wurden Gewebeproben aus der entzündeten Pfote und dem Rückenmark auf eine PGE₂-Freisetzung, Expression von COX mRNA und COX Protein hin untersucht. Weiterhin wurde die Hemmung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NFκB und AP-1) in RAW 264.7 Mausemakrophagen gemessen.

R-Flurbiprofen zeigte in der Zymosan-induzierten Hinterpfotenentzündung der Ratte eine ähnliche antiinflammatorische Aktivität wie Dexamethason. Dieser beobachtete Effekt lässt sich zumindest teilweise über eine Hemmung der NFκB Aktivität erklären. R-Flurbiprofen hemmte:

- 1.) die LPS-induzierte NFκB DNA-Bindungsaktivität in RAW 264.7 Makrophagen,
- 2.) die Translokation der p65 Untereinheit in den Kern dieser Zellen und
- 3.) die Zymosan induzierte NFκB abhängige Gentranskription in der entzündeten Pfote und dem Rückenmark von Ratten.

S-Flurbiprofen zeigte ähnliche Effekte, war jedoch weniger potent. R-Flurbiprofen hemmte ebenfalls die DNA Bindungsaktivität von AP-1, einem anderen wichtigen Transkriptionsfaktor bei Entzündungsprozessen. Da R-Flurbiprofen eine wesentlich geringere gastrointestinale Toxizität aufweist, lässt es sich möglicherweise als antiinflammatorische Substanz bei Erkrankungen einsetzen, in der die vermehrte oder konstitutive NFκB und AP-1 Aktivierung an pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist.

Zusammengefasst lässt sich der antiinflammatorische Effekt von R-Flurbiprofen über eine verminderte COX-2 Expression und eine Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 erklären.

7 Abstract

R-flurbiprofen is considered the 'inactive' isomer of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), flurbiprofen, because it does not inhibit cyclooxygenase (COX) activity in therapeutic concentrations *in vitro*. However, it has been shown that R-flurbiprofen has antinociceptive and antitumor effects although the R-enantiomer is almost not epimerized into the S-enantiomer.

In order to investigate these effects, the following *in vivo* and molecular biological experiments were performed: The effects of R-, S-flurbiprofen (1, 3, 9 mg/kg i.p.), dexamethasone (0.5 mg/kg i.p., positive control) or vehicle were investigated in rats with zymosan-evoked inflammation of the paw, 3 to 6 rats per group. Prostaglandin E₂ release, COX mRNA expression and COX protein were investigated in tissue from the inflamed paw and the lumbar spinal cord. Also the inhibition of the activation of transcription factors (NFκB and AP-1) was investigated in RAW 264.7 mouse macrophages.

R-flurbiprofen had similar anti-inflammatory effects as dexamethasone in the zymosan-evoked inflammation in rats. These observed effects may be explained at least partially by an inhibition of NFκB activity. R-flurbiprofen inhibited:

- i. LPS-induced NFκB DNA binding activity in RAW 264.7 macrophages,
- ii. translocation of the p65 subunit of NFκB into the nucleus of these cells, and
- iii. zymosan-induced NFκB-dependent gene transcription in the inflamed paw and spinal cord of rats.

S-flurbiprofen produced similar effects but was less potent. In addition, R-Flurbiprofen inhibited DNA binding activity of AP-1, another key regulatory transcription factor in inflammatory processes. As R-flurbiprofen does only cause marginal gastrointestinal mucosal damage or other side effects associated with long-term NSAID use, it might be a useful drug in inflammatory or other diseases in which increased or constitutive NFκB and AP-1 activation are involved in the pathophysiological processes.

In summary, R-flurbiprofen's anti-inflammatory effects can be explained by a reduced COX-2 expression and an inhibition of the activation of the transcription factors NFκB and AP-1.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Deeks JJ, Smith LA, Bradley MD. Efficacy, tolerability, and upper gastrointestinal safety of celeCOXib for treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:619-626.
- 2 Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12:1063-1073.
- 3 Blower AL, Brooks A, Fenn GC, Hill A, Pearce MY, Morant S, Bardhan KD. Emergency admissions for upper gastrointestinal disease and their relation to NSAID use. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:183-291.
- 4 Tramer MR, Moore RA, Reynolds DJ, McQuay HJ. Quantitative estimation of rare adverse events which follow a biological progression: a new model applied to chronic NSAID use. *Pain* 2000;85:169-182.
- 5 Tramer MR, Moore RA, Reynolds DJ, McQuay HJ. Quantitative estimation of rare adverse events which follow a biological progression: a new model applied to chronic NSAID use. *Pain*. 2000 Mar;85(1-2):169-82.
- 6 Hinz B and Brune K, Cyclooxygenase-2 – 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:367-375.
- 7 Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 1996;97:2672-2679.
- 8 Vane JR and Botting RM. Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Semin Arthritis Rheum* 1997;26:2-10.
- 9 Masferrer JL, Isakson PC, Seibert K. Cyclooxygenase-2 inhibitors: a new class of anti-inflammatory agents that spare the gastrointestinal tract. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:363-372.
- 10 Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7563-7568.
- 11 Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13926-13931.
- 12 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting. Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2001, S. 229.
- 13 Fachinformation Dynastat® 40 mg, FachInfo Service (www.fachinfo.de), Stand 04/2003.
- 14 Fachinformation Bextra® 10/20/40 mg Filmtabletten, FachInfo Service (www.fachinfo.de), Stand 03/2003

- 15 Fachinformationen Celebrex® 100 mg Hartkapsel und 200 mg Hartkapseln, FachInfo Service (www.fachinfo.de), Stand 01/2003.
- 16 US Prescribing Information for Celebrex™ (celeCOXib), http://www.celebrex.com/healthcare/pdf/CelebrexPI_08_02.pdf.
- 17 Fachinformationen VIOXX® und VIOXX® Dolor, FachInfo Service, Stand 11/2002.
- 18 US Prescribing Information for VIOXX® (rofeCOXib), <http://www.vioxx.com/vioxx/shared/documents/english/pi.pdf>.
- 19 Chan CC, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans J, Ford-Hutchinson AW, Forrest MJ, Gauthier JY, Gordon R, Gresser M, Guay J, Kargman S, Kennedy B, Leblanc Y, Leger S, Mancini J, O'Neill GP, Ouellet M, Patrick D, Percival MD, Perrier H, Prasit P, Rodger I, et al. RofeCOXib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290:551-560.
- 20 Fort J. CeleCOXib, a COX-2--specific inhibitor: the clinical data. *Am J Orthop* 1999;28(Suppl 3):13-18.
- 21 Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther* 199;66:76-84.
- 22 Schmassmann A, Peskar BM, Stettler C, Netzer P, Stroff T, Flogerzi B, Halter F. Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* 1998;123:795-804.
- 23 Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1996;98:2076-2085.
- 24 Geisslinger G, Lotsch J, Menzel S, Kobal G, Brune K. Stereoselective disposition of flurbiprofen in healthy subjects following administration of the single enantiomers. *Br J Clin Pharmacol* 1994;37:392-394.
- 25 Menzel-Soglowek S, Geisslinger G, Beck WS, Brune K. Variability of inversion of (R)-flurbiprofen in different species. *J Pharm Sci* 1992;81:888-891.
- 26 Geisslinger G, Muth-Selbach U, Coste O, Vetter G, Schrodter A, Schaible HG, Brune K, Tegeder I. Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E2 release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study. *J Neurochem.* 2000;74:2094-2100.
- 27 Carabaza A, Cabre F, Rotllan E, Gomez M, Gutierrez M, Garcia ML, Mauleon D. Stereoselective inhibition of inducible cyclooxygenase by chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Pharmacol* 1996;36:505-512.

- 28 Geisslinger G, Ferreira SH, Menzel S, Schlott D, Brune K. Antinociceptive actions of R(-)-flurbiprofen--a non-cyclooxygenase inhibiting 2-arylpropionic acid--in rats. *Life Sci.* 1994;54:PL173-PL177.
- 29 Buritova J, Besson JM. Peripheral and/or central effects of racemic-, S(+)- and R(-)-flurbiprofen on inflammatory nociceptive processes: a c-Fos protein study in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* 1998;125:87-101.
- 30 Malmberg AB, Yaksh TL. Antinociception produced by spinal delivery of the S and R enantiomers of flurbiprofen in the formalin test. *Eur J Pharmacol.* 1994 Apr 21;256(2):205-9.
- 31 Neugebauer V, Geisslinger G, Rumenapp P, Weiretter F, Szelenyi I, Brune K, Schaible HG. Antinociceptive effects of R(-)- and S(+)-flurbiprofen on rat spinal dorsal horn neurons rendered hyperexcitable by an acute knee joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:618-628.
- 32 Lotsch J, Geisslinger G, Mohammadian P, Brune K, Kobal G. Effects of flurbiprofen enantiomers on pain-related chemo-somatosensory evoked potentials in human subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1995;40:339-346.
- 33 Muth-Selbach US, Tegeder I, Brune K, Geisslinger G. Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology.* 1999;91:231-239.
- 34 Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R, Serhan CN. Cox-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:339-343.
- 35 Bauerle PA, Baltimore D. NFκB: ten years after. *Cell* 1996; 87:13-20
- 36 Adcock IM. Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF-kappa B. *Monaldi Arch Chest Dis* 1997;52:178-186.
- 37 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2001.
- 38 Choy EHS and Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344:907-916.
- 39 Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Stroka D, Soares S, Soares M, Bach FH, Winkler H. Glucocorticoid-mediated repression of NF-κB activity in endothelial cells does not involve induction of I-κB-α synthesis. *J Biol Chem* 1996;271:19612-19616.
- 40 De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-κB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13504-13509.

- 41 Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:752-756.
- 42 Simpson CS and Morris BJ. Activation of nuclear factor κ B by nitric oxide in rat striatal neurones: differential inhibition of the p50 und p65 subunits by dexamethasone. *J Neurochem* 1999;73:353-361.
- 43 Auphan N , DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I- κ B synthesis. *Science* 1995;270:286-290.
- 44 Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin Jr AS. Role of transcriptional activation of I κ B in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283-286.
- 45 Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC. Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated endothelial cells. *Circulation* 1995;91:1914-1917.
- 46 Kopp E and Ghosh S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956-959.
- 47 Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T. Salicylates inhibit I κ B- α phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 1996;156:3961-3969.
- 48 Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of I κ B kinase α and NF- κ B in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 1999;18:7389-7394.
- 49 Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science* 1996;274:1383-1385.
- 50 Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor κ . *J Clin Invest* 1998;1163-1174.
- 51 Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nature Med* 2001;12:1291-1297.
- 52 Meller ST and Gebhart. Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur J Pain* 1997; 1:43-52.
- 53 Sawynok J, Zarrindast MR, Reid R, Doak GJ. Adenosine A3 receptor activation produces nociceptive behaviour and edema by release of histamine and 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 1997;333:1-7.
- 54 Brune K, Beck WS, Geisslinger G, Menzel-Soglowek S, Peskar BM, Peskar BA. Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition. *Experientia*. 1991;47:257-261.

- 55 Geisslinger G, Menzel-Soglowek S, Schuster O, Brune K. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of flurbiprofen in human plasma. *J Chromatogr* 1992;573:163-167.
- 56 Tegeder I, Neupert W, Guhring H, Geisslinger G. Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:1161-1168.
- 57 Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Forstermann U. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Mol Pharmacol* 1996; 49:15-21.
- 58 Lo CJ, Cryer HG, Fu M, Lo FR. Regulation of macrophage eicosanoid generation is dependent on nuclear factor κ B. *J Trauma* 1998;45:19-23; discussion 23-24.
- 59 Tarayre JP, Delhon A, Aliaga M, Barbara M, Bruniquel F, Caillol V., Puech L, Consul N, Tisne-Versailles J. Pharmacological studies on zymosan inflammation in rats and mice. 1: Zymosan-induced paw oedema in rats and mice. *Pharmacol Res* 1989; 21:375-384.
- 60 Malmberg AB and Yaksh TL. Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 1994;271:293-299.
- 61 Beiche F, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Strübe M. Expression of cyclooxygenase isoforms in the rat spinal cord and their regulation adjuvant-induced arthritis. *Inflamm Res* 1998;47:482-487.
- 62 Breder CD and Saper CB. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res* 1996;713:64-69.
- 63 Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 1995;355:296-315.
- 64 Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. AP-1 and NF- κ B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 1998;28:197-208.
- 65 Keyszer GM, Heer AH, Kriegsmann J, Geiler T, Trabandt A, Keysser M, Gay RE, Gay S. Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D, and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:976-984.
- 66 Firestein GS, Paine MM, Littmann BH. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum* 1991;34:1094-1005.
- 67 Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999;5:698-701.
- 68 Barkett M and Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6919-6924.

- 69 Rayet B and Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18:6938-6947.
- 70 Paillard F. Induction of apoptosis with I- κ B, the inhibitor of NF- κ B. *Hum Gene Ther* 1999;10:1-3.
- 71 Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 1999; 5:412-417.
- 72 Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274:784-787.
- 73 Reddy BS, Rao CV, Seibert K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996;56:4566-4569.
- 74 Levy GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J* 1997;11:234-247.
- 75 Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med.* 1999;5:1418-1423.
- 76 Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96:491-503.
- 77 Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997;99:2254-2259.
- 78 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716.
- 79 Ljungdahl S, Shoshan MC, Linder S. Inhibition of the growth of 12V-ras-transformed rat fibroblasts by acetylsalicylic acid correlates with inhibition of NF-kappa B. *Anticancer Drugs* 1997;8:62-66.
- 80 Wechter WJ, Kantoci D, Murray ED Jr, Quiggle DD, Leipold DD, Gibson KM, McCracken JD. R-flurbiprofen chemoprevention and treatment of intestinal adenomas in the APC(Min)/+ mouse model: implications for prophylaxis and treatment of colon cancer. *Cancer Res* 1997;57:4316-4324.
- 81 Ritland SR, Leighton JA, Hirsch RE, Morrow JD, Weaver AL, Gendler SJ. Evaluation of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) for cancer chemoprevention: lack of efficacy against nascent adenomatous polyps in the Apc(Min) mouse. *Clin Cancer Res* 1999;5:855-863.
- 82 Mahmoud NN, Dannenberg AJ, Mestre J, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, Newmark H, Bertagnoli MM. Aspirin prevents tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Surgery* 1998;124:225-231.

- 83 Wechter WJ, Bigornia AE, Murray Jr ED, Levine BH, Young JW. Rac-flurbiprofen is more ulcerogenic than its (S)-enantiomer. *Chirality* 1993;5:492-494.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geißlinger für die Bereitstellung des Themas sowie die Möglichkeit, die erforderlichen Experimente in den Laboratorien des Instituts für Klinische Pharmakologie am *pharmazentrum frankfurt* der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchzuführen. Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geißlinger für seine kontinuierliche Unterstützung, für seine Offenheit auch unkonventionellen Ideen gegenüber und die Impulse, die er mir für diese Arbeit und auch darüber hinaus gegeben hat.

Herrn Prof. Dr. W. Korf danke ich für die Bereitstellung von Labor-Ressourcen am Dr. Senckenbergischen Anatomie Institut Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie).

Frau PD Dr. med. Irmgard Tegeder danke ich für ihre intensive Betreuung der experimentellen Arbeit sowie für ihre inhaltliche und logistische Unterstützung.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Euchenhofer danke ich für seine intensive experimentelle Unterstützung sowie die Hilfe bei der Bewältigung von technischen Problemen.

Frau Dr. rer. nat. Sabine Grösch danke ich für ihre experimentelle und logistische Unterstützung.

Frau Dr. rer. nat. Ellen Niederberger danke ich für die experimentelle und logistische Unterstützung.

Herrn Dr. med. Faramarz Deghani danke ich für seine Auswertungen am Konvokalen Laser Scanning Mikroskop am Dr. Senckenbergischen Anatomie Institut Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie).

Frau Dr. rer. nat. Aleksandra Ivanovic danke ich für ihre technische Unterstützung.

Frau Brigitte Käse danke ich für ihre vielfältige Hilfe und Unterstützung sowie für ihre freundliche Begleitung während der Promotionszeit.

Herrn Shawn Leslie danke ich für seine intensive und engagierte Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeit.

Frau Christine Schäfer danke ich für die Mithilfe bei der experimentellen Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Eltahmash Israr
Geboren	21. Januar 1973 in Birmingham, England
Adresse	Meersburger Straße 15, 60386 Frankfurt am Main

Ausbildung & Qualifikation

1979-1983	Grundschule, Freiligrathschule, Frankfurt am Main
1983-1992	Gymnasium, Helmholtzschule, Frankfurt am Main
27. Mai 1992	Abitur, Helmholtzschule, Frankfurt am Main
1992-1994	Grundstudium Biologie, Fachbereich Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
20. Oktober 1994	Vordiplom
1994-1998	Hauptstudium Biologie, Fachbereich Biologie, Hauptfach: Zoologie, Nebenfächer: Botanik, Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
23. Januar 1998	Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologe, Fachbereich Biologie, Johann Wolfgang Goethe- Universität, Frankfurt am Main
1999-2002	Promotionsarbeit am Institut für Klinische Pharmakologie, <i>pharmazentrum</i> Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Leitung. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geisslinger

Berufliche Tätigkeit

Seit 2002	Geschäftsführer Agonist media GmbH, Frankfurt am Main
-----------	---

Frankfurt am Main im April 2004

Eltahmash Israr

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch die Enantiomere von Flurbiprofen“ im Pharmazentrum Frankfurt, Institut für Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geisslinger mit Unterstützung durch Frau Priv.-Doz. Dr. med. Irmgard Tegeder und ihrer Arbeitsgruppe ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

The FASEB Journal.

Frankfurt am Main, den 21. April 2004

Eltahmash Israr