

Molekulare Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von Ibuprofen Enantiomeren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Astrid Jansen
aus Wilhelmshaven

Frankfurt am Main (2007)

D30

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

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

Datum der Disputation: 17.09.2007

meinen Eltern gewidmet

1	Einleitung	1
1.1	Arachidonsäurestoffwechsel	1
1.1.1	Cyclooxygenase-Weg	1
1.1.2	Cyclooxygenasen	4
1.1.3	PGE-Synthasen	6
1.2	Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs)	7
1.2.1	2-Arylpropionsäure-Derivate	7
1.3	Kolorektales Karzinom	10
1.4	COX-2 Expression und PGE ₂ Synthese in kolorektalen Adenomen und Karzinomen	13
1.5	COX unabhängige Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von NSAIDs	15
1.6	Zellzyklus und Apoptose	16
1.6.1	Regulierung des Zellzyklus	16
1.6.2	Apoptose	18
1.7	Transkriptionsfaktor p53	21
1.8	Ziel der vorliegenden Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	25
2.1.3	NSAIDs	26
2.1.4	Restriktionsenzyme	26
2.1.5	Größenmarker	26
2.1.6	Vektoren	26
2.1.7	Oligonukleotide	27
2.1.8	Plasmide	27
2.1.9	Zelllinien	27
2.1.10	Nährmedien, Puffer und Lösungen	28
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellkultur	33
2.2.1.1	Passagieren von eukaryontischen Zellen	33
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	33
2.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen	34
2.2.2	Klonierung von humaner COX-2 cDNA in den pIND Vektor	34
2.2.2.1	Herstellung von chemo-kompetenten Zellen	34
2.2.2.2	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	34
2.2.2.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	35
2.2.2.4	Ligation von DNA	35
2.2.2.5	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	36

2.2.2.6	Anzucht von Bakterien und Lagerung.....	36
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	36
2.2.3.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	37
2.2.3.2	Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen Mini-Kit).....	37
2.2.3.3	Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	37
2.2.4	Isolierung von RNA.....	38
2.2.4.1	RNA-Isolierung aus Tumorzellen.....	38
2.2.5	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	38
2.2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.5.2	Denaturierendes RNA Formaldehyd-Agarosegel.....	39
2.2.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	39
2.2.6.1	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	40
2.2.7	Stabile Transfektion von Plasmiden in eukaryontischen Zellen.....	41
2.2.7.1	Das Ecdyson/Ponasteron-induzierbare Transfektionssystem.....	41
2.2.7.2	Antibiotikasensitivität.....	42
2.2.7.3	Transfektion durch Lipofektion.....	42
2.2.7.4	Überprüfung der Transfektion mit pVgRXR.....	43
2.2.7.5	Induktion durch Ponasteron A Zugabe.....	44
2.2.8	Enzymimmunoassay (EIA).....	44
2.2.8.1	β -Galaktosidase Assay.....	44
2.2.8.2	PGE ₂ -Enzymimmunoassay.....	44
2.2.9	Proliferations-Assays.....	45
2.2.9.1	Koloniebildungs-Assay.....	45
2.2.9.2	Zellzahlbestimmung.....	45
2.2.10	Durchflusszytometrie.....	45
2.2.11	Proteinchemische Methoden.....	46
2.2.11.1	Gesamtproteinextraktion.....	46
2.2.11.2	Extraktion zytosolischer Proteine.....	47
2.2.11.3	Extraktion mikrosomaler und mitochondrialer Proteine.....	47
2.2.11.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	47
2.2.11.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
2.2.11.6	Western-Blot.....	48
2.2.12	Bestimmung der freien und intrazellulären S- oder R-Ibuprofenkonzentration.....	50
2.2.12.1	Bestimmung der freien Ibuprofenkonzentration im Medium.....	50
2.2.12.2	Bestimmung der intrazellulären Ibuprofenkonzentration in den Tumorzellen.....	51
2.2.13	<i>In vivo</i> Maus-Tumormodell.....	51
2.2.13.1	Subkutanes Tumormodell.....	52
2.2.14	mPGES-1 Aktivitäts-Assay.....	52
2.2.15	Statistik.....	53

3 Ergebnisse

55

3.1	Herstellung von Tumorzellen mit Ponasteron A induzierbarer COX-2 Expression.....	55
3.1.1	Herstellung des pIND-hCOX-2 Konstruktes.....	55
3.1.2	Transfektion von HCT-116 Tumorzellen mit pVgRXR und pIND-hCOX-2.....	56
3.2	Untersuchungen zur antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen in humanen Kolonkarzinomzellen.....	57
3.2.1	Verwendete humane Kolonkarzinomzellen.....	57
3.2.2	Antiproliferative Wirkung von S- und R-Ibuprofen in humanen Kolontumorzellen.....	58

3.2.3	Zellzyklusblock in der G ₁ -Phase nach Behandlung der Tumorzellen mit S- und R-Ibuprofen.....	60
3.2.3.1	Bestimmung der Zellzahl in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus nach Behandlung mit S- und R-Ibuprofen.....	60
3.2.3.2	Untersuchung des G ₁ - Zellzyklusblocks anhand von Western-Blot Assays.....	61
3.2.4	Apoptoseinduktion nach Behandlung von Tumorzellen mit S- und R-Ibuprofen	64
3.2.4.1	Bestimmung der apoptotischen Zellen und Untersuchung der PARP-Spaltung nach Behandlung mit S- und R-Ibuprofen	64
3.2.5	Bestimmung der freien und intrazellulären S- oder R-Ibuprofenkonzentration	67
3.2.5.1	Bestimmung der freien S- und R-Ibuprofen Konzentration im Medium.....	67
3.2.5.2	Bestimmung der intrazellulären S- und R-Ibuprofen Konzentrationen in HCT-15 und HCA-7 Zellen	68
3.2.6	Antiproliferative Wirkung von S- und R-Ibuprofen im subkutanen Tumormodell.....	69
3.2.6.1	Hemmung des Tumorwachstums nach Behandlung mit S- und R-Ibuprofen	69
3.3	Molekulare Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen	72
3.3.1	Regulierung des Tumorsuppressors p53 nach Ibuprofenbehandlung.....	72
3.3.2	Verwendetes Zellsystem: p53 exprimierende und p53 defiziente HCT-116 Tumorzellen.....	73
3.3.3	Regulierung des Tumorsuppressors p53 in HCT-116 p53 ^{wt} Zellen nach S- bzw. R-Ibuprofen Behandlung.....	74
3.3.4	Unterschiedliche Hemmung des Wachstums von p53 exprimierenden und p53 defizienten HCT-116 Tumorzellen	75
3.3.5	Zellzyklusverteilung in den HCT-116 p53 ^{wt} und p53 ^{-/-} Zellen nach S- und R-Ibuprofen Behandlung.....	77
3.3.6	Vergleich der beiden HCT-116 Tumorzelllinien mittels Western-Blot Analyse.....	79
3.3.7	Antiproliferative Wirkung von S- und R-Ibuprofen in subkutanen HCT-116 p53 ^{wt} und p53 ^{-/-} Tumoren	81
3.3.8	Induktion von Apoptose über p53 Aktivierung und Regulation von Bax	82
3.3.9	Regulation der Induktion von Zellzyklusblock und Apoptose über den Neurotrophin Rezeptor p75 ^{NTR}	84
3.4	Hemmung der PGE ₂ Synthese durch R-Ibuprofen.....	86
3.4.1	Messung von PGE ₂ in HCA-7 Tumorzellen nach S- und R-Ibuprofen Behandlung.....	86
3.4.2	Aktivität von mPGES-1 und Expression von cPGES, mPGES-1 und mPGES-2 nach Behandlung der Zellen mit beiden Ibuprofen Enantiomeren.....	88
4	Diskussion	91
4.1	COX abhängige und COX unabhängige Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen.....	91
4.2	Unterschiedliche intrazelluläre Konzentrationen an S- und R-Ibuprofen in HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen	97
4.3	Einfluss des Tumorsuppressors p53 auf die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose nach S- und R-Ibuprofen Behandlung.....	98
4.4	Untersuchung zur Rolle von mPGES-1, mPGES-2 und cPGES bei der PGE ₂ Hemmung durch S- und R-Ibuprofen	100
4.5	Relevanz der <i>in vitro</i> Ergebnisse für die <i>in vivo</i> Situation im Menschen.....	102

4.6	Vergleich der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen	103
5	Zusammenfassung	105
6	Abkürzungsverzeichnis	107
7	Literaturverzeichnis	109
8	Anhang	124
8.1	Anhang A: Plasmidkarten (Invitrogen, Karlsruhe)	124
8.2	Anhang B: Konstrukte (modifiziert nach Invitrogen, Karlsruhe).....	125
9	Publikationen und Tagungsbeiträge	126
9.1	Veröffentlichungen aus der vorliegenden Arbeit	126
9.2	Sonstige Veröffentlichungen.....	126
10	Lebenslauf	127
	Persönliche Daten:.....	127
	Hochschulausbildung und Berufsausbildung	127
	Schulausbildung:	127

1 Einleitung

1.1 Arachidonsäurestoffwechsel

Eicosanoide sind Stoffwechselprodukte der Arachidonsäure (all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure), der Timnodonsäure (5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure) oder Dihomolinolensäure (8,11,14-Eicosatriensäure) und werden endogen in jedem Gewebe gebildet. Sie regulieren als hormonähnliche Substanzen eine Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen.

Bei der enzymatischen Metabolisierung der Arachidonsäure wird unter anderem zwischen dem Cyclooxygenase- und dem Lipoxygenase-Weg unterschieden. Beim Lipoxygenase-Weg regulieren 5-, 12- und 15-Lipoxygenasen die Synthese der jeweiligen Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE), aus der 5-Lipoxygenase (5-LO) werden schließlich die Leukotriene (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ und LTE₄) gebildet (Lewis et al., 1990). Die Synthese der Prostaglandine (PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α}), des Prostacyclins (PGI₂) und Thromboxans (TXA) erfolgt über den Cyclooxygenase-Weg.

1.1.1 Cyclooxygenase-Weg

Ungesättigte Fettsäuren werden durch Veresterung mit der C(2)-Position des Glycerins in den Phospholipiden der Plasmamembran gespeichert. Die Freisetzung von Arachidonsäure erfolgt durch cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) oder sekretorische Phospholipase A₂ (sPLA₂), die durch extrazelluläre Signale wie Hormone und Stressfaktoren aktiviert werden (Abbildung 1.1) (Diaz et al., 2003). Von besonderer Bedeutung ist hierbei die cytosolische Phospholipase cPLA₂-α, da sie selektiv nur Arachidonsäure freisetzt (Dessen et al., 1999). Ihre Aktivierung erfolgt durch einen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und durch eine MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase) katalysierte Phosphorylierung (Lin et al., 1993; Lewis et al., 1998).

Schlüsselenzyme der Prostanoidsynthese sind die Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2), die sowohl Cyclooxygenase-Aktivität als auch glutathionabhängige Peroxidase-Aktivität aufweisen. Beide Aktivitäten werden durch Häm vermittelt. Cyclooxygenasen katalysieren die Oxidation von Arachidonsäure und die anschließende Cyclisierung zu dem instabilen Endoperoxid Prostaglandin G₂ (PGG₂). Mittels Peroxidase-Aktivität wird die 15-Hydroperoxidgruppe von PGG₂ zur 15-Hydroxygruppe reduziert (Bildung von Prostaglandin H₂). Das Endoperoxid PGH₂ wird schließlich durch spezifische Prostaglandin-Synthasen (PG-Synthasen) in die unterschiedlichen Prostanoiden umgewandelt (Vane et al., 1998) (Abbildung 1.1).

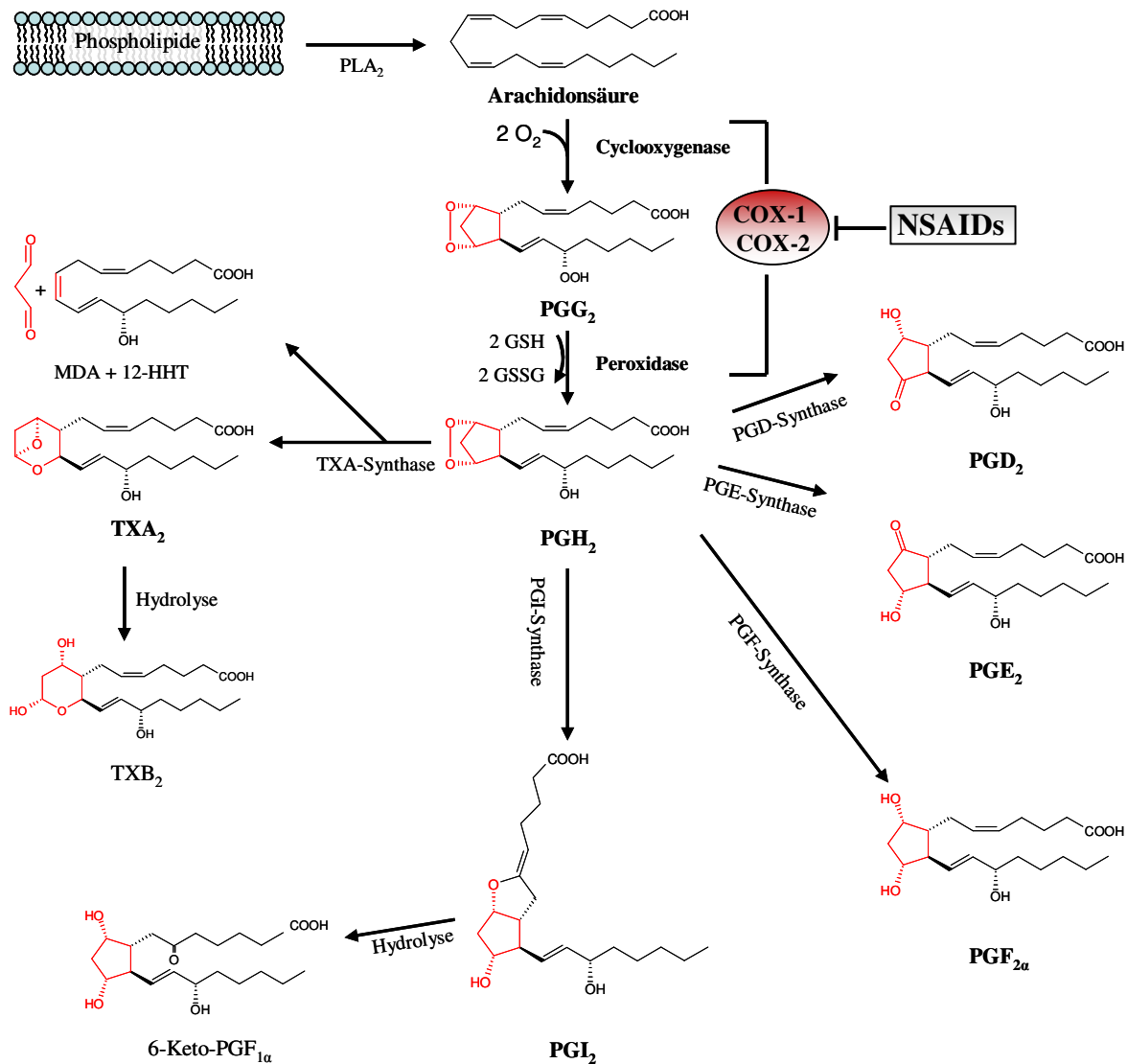
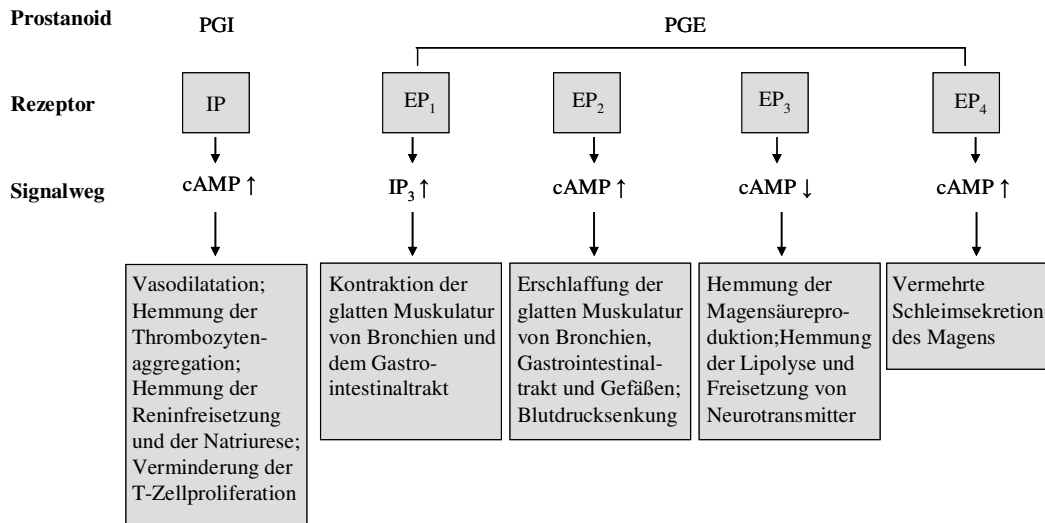


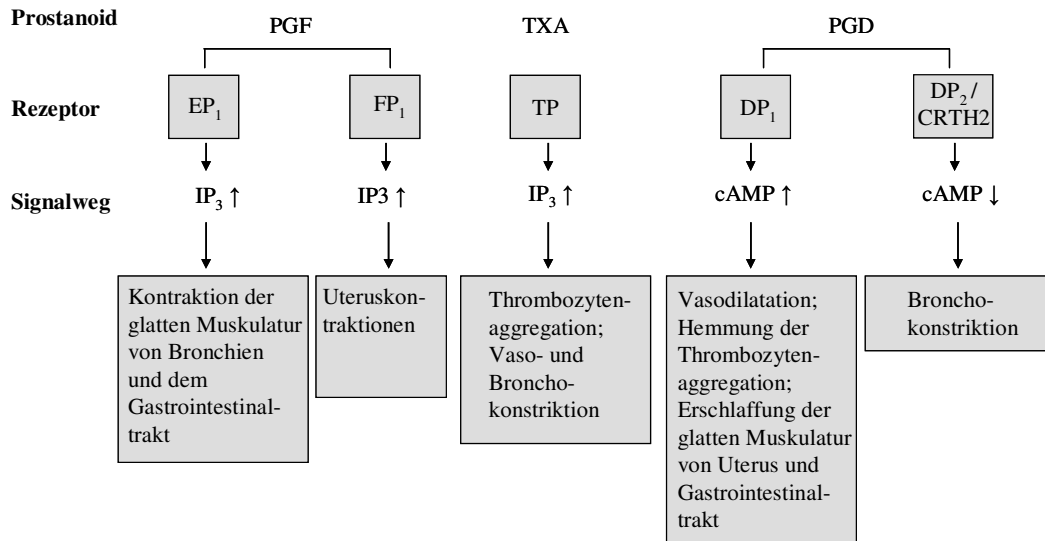
Abbildung 1.1: Cyclooxygenase-Weg: Cyclooxygenasen katalysieren die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂ (PGH₂), das durch verschiedene Synthasen zu den Prostaglandinen (PG), Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan (TX) umgewandelt wird. Die für die Reduktion der Hydroperoxidgruppe benötigten Elektronen werden bei der Oxidation von Gluthathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) geliefert.

In Abbildung 1.2 sind die wichtigsten Effekte von Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxan im menschlichen Organismus dargestellt. Neben ihrer physiologischen Wirkung haben Prostaglandine eine pathophysiologische Funktion bei Entzündung, Fieber und Schmerz, dabei stellen Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Prostaglandin I₂ (PGI₂) die wichtigsten proinflammatorischen Prostaglandine dar. Prostaglandin E-Synthasen katalysieren die Isomerisierung von PGH₂ zu PGE₂, das in den Schleimhäuten des Magen-Darmtraktes und der Lunge freigesetzt wird. Es fördert die Durchblutung und die Schleimproduktion, führt im Magen außerdem zu einer Reduzierung der Magensäuresekretion und reguliert den Tonus der glatte Muskulatur von Bronchien, Gastrointestinaltrakt und Gefäßen (Walch et al., 2001; Davis et al., 2004) (Abbildung 1.2 A). Expression von PGE₂ und PGI₂ während einer akuten Entzündung führt zur Gefäßdilataion und trägt so zu der Entstehung von Ödemen bei

(Williams et al., 1977; Higgs et al., 1978). Außerdem sensibilisiert PGE₂ die Rezeptoren der afferenten Nervenendigungen für Bradykinin und Histamin während der Schmerzentstehung (Ferreira, 1972). Prostaglandine besitzen nur eine kurze Halbwertszeit und werden nach kurzer Zeit zu weniger aktiven Verbindungen abgebaut. So entsteht durch nichtenzymatische Hydrolyse aus TXA₂ das biologisch inaktive Thromboxan B₂ (TXB₂) und PGI₂ wird zu 6-Keto-PGF_{1α} umgewandelt (Abbildung 1.1). Die unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen der Prostanoiden sind abhängig von den Zellen, in denen sie synthetisiert werden und den Prostanoidrezeptoren am Erfolgsorgan (Abbildung 1.2). Prostanoiden werden in fast allen Geweben synthetisiert und wirken autokrin und parakrin am Ort ihrer Synthese durch Bindung an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran. Bei den Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Prostanoidrezeptoren (GPCRs), die sieben hydrophobe Transmembrandomänen aufweisen und über G-Proteine die Bildung von intrazellulären Signalmolekülen wie Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), Diacylglycerol und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) regulieren (Helmreich et al., 1996). Die Bezeichnung der Rezeptoren bezieht sich meistens auf das Prostanoid mit der höchsten Bindungsaffinität für den jeweiligen Rezeptor (DP, IP, EP1-4, FP und TP) (Breyer et al., 2001; Hirai et al., 2001). Außer den Membranrezeptoren sind mittlerweile auch nukleare Rezeptoren für Eicosanoide bekannt. PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) binden als Heterodimere mit 9-cis Retinoidsäurerezeptoren (RXR) an sequenzspezifische DNA-Bindestellen und induzieren so die Genexpression von Zielgenen. Welche Rolle die PPARs als Prostanoidrezeptoren spielen, ist Bestandteil momentaner Untersuchungen (Powell et al., 1992; He et al., 1999; Gupta et al., 2000).



A



B

Abbildung 1.2 A und B: Rezeptoren und Wirkung von Prostanoiden im menschlichen Organismus (nach (Mutschler et al., 2001; FitzGerald, 2003)).

1.1.2 Cyclooxygenasen

Seit Anfang der 90er Jahre sind zwei COX Enzyme bekannt, COX-1 und COX-2, die sich in ihren Expressionsmustern und in der Regulierung ihrer Expression voneinander unterscheiden (O'Banion et al., 1991; Xie et al., 1991). Beide Proteine weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine Homologie von ca. 60 % auf und besitzen ein ähnliches Molekulargewicht um die 71 kDa (Vane et al., 1998; Chandrasekharan et al., 2004). Vereinfacht spricht man bei der COX-1 von einem sogenannten „house-keeping enzyme“, welches konstitutiv in fast allen Geweben exprimiert wird und eine Vielzahl von physiologischen Funktionen reguliert. Das COX-2 Gen gilt als ein „immediate early gene“, das in

vielen Geweben nicht konstitutiv exprimiert wird, sondern durch proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α), Wachstumsfaktoren (FGF, PDGF, EGF), Mitogene und Hormone (LH) induzierbar ist (Vane, 1994; Needleman et al., 1997). Daher wird angenommen, dass die bei Gewebeschädigungen (z.B. Entzündungen), Fieber und bei Schmerzreaktionen beteiligten Prostaglandine durch COX-2 gebildet werden. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass auch COX-2 in einigen Geweben konstitutiv vorkommt, so z.B. in der Niere (macula densa), im ZNS, im Hoden und im Uterus (Harris et al., 1994; Zhang et al., 1997; Warner et al., 2004). Versuche an COX-2 Knockout-Mäusen konnten zudem zeigen, dass COX-2 für die postnatale Nierenentwicklung, bei der Ovulation und Fertilisation von Bedeutung ist. Mäuse ohne COX-1 zeigten interessanterweise im Gegensatz zu den COX-2 Knockout-Tieren keinen pathologischen Phänotyp (DeWitt et al., 1995; Lim et al., 1997). Schließlich ist seit kurzem eine COX-1 Spleißvariante bekannt (COX-3), die von Paracetamol, Phenacetin und Metamizol gehemmt wird (Chandrasekharan et al., 2002; Warner et al., 2002). Im Menschen wurde die mRNA der COX-3 im Herzen und im Cerebralen Cortex nachgewiesen. Es wird jedoch angenommen, dass diese Cyclooxygenase aufgrund eines Frameshift wahrscheinlich nicht exprimiert wird und daher im Menschen keine Rolle spielt.

Bei den Cyclooxygenasen-1 und -2 handelt es sich um membranständige Glykoproteine des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Zellkerns (Spencer et al., 1998). In ihrer Struktur unterscheiden sich beide Enzyme nur gering voneinander. Die Membranbinde-Domänen der COX beinhalten vier amphipatische Helices, die einen hydrophoben Substratkanal bilden, an dessen Ende die Cyclooxygenaseaktivitäts-Domäne liegt und der die Bindestelle für Arachidonsäure darstellt (Abbildung 1.3) (Picot et al., 1994; Vane et al., 1995; Dannenberg et al., 2003). An den hydrophoben Kanal grenzt eine hydrophile Seitentasche, in der sich bei COX-1 an der Position 434 und 523 Isoleucin-Reste (Ile) befinden. Das Protein der COX-2 weist eine hohe Sequenzhomologie mit der Substratbinde-Domäne und der katalytischen Region der COX-1 auf. Sie unterscheidet sich jedoch in wichtigen Aminosäuren voneinander, die ausschlaggebend sind für die spezifische Hemmung durch NSAIDs (Warner et al., 2004). In der COX-2 befindet sich statt der Aminosäure Isoleucin (Ile523) die Aminosäure Valin (Val509). Dieser Austausch bewirkt eine größere und flexiblere Seitentasche in COX-2, an der die Sulfonamid- oder Sulfonylgruppe der COX-2 selektiven Inhibitoren durch Wasserstoffbrücken binden können (Gierse et al., 1996; Wong et al., 1997).

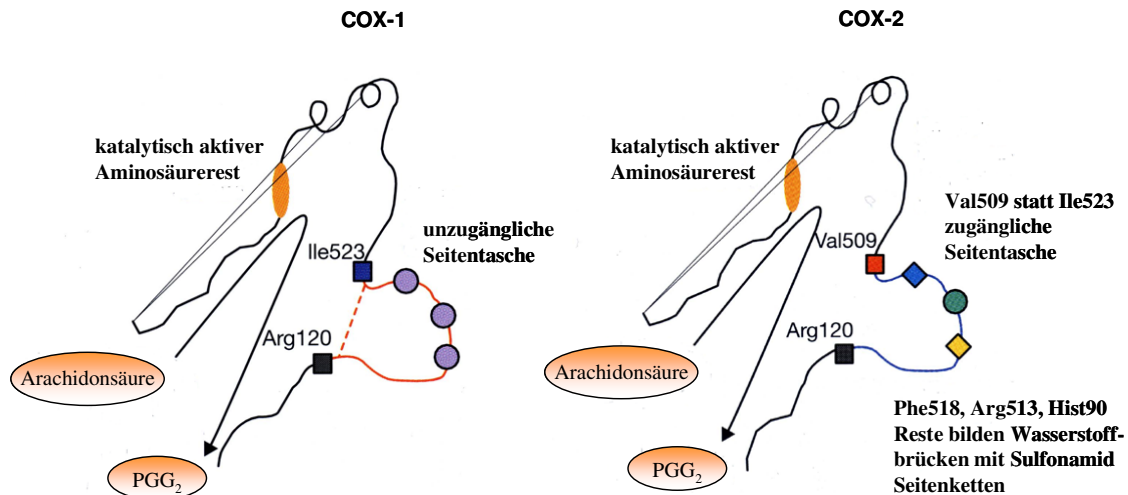


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Cyclooxygenase-aktiven Zentrums der COX-1 und -2 (nach Dannenberg und DuBois, 2003).

1.1.3 PGE-Synthasen

Für die Umwandlung von PGH₂ zu PGE₂ sind mittlerweile drei PGE-Synthasen bekannt, die zytoplasmatische PGE-Synthase (cPGES) und die Membran-gebundene PGE-Synthase-1 und -2 (mPGES-1 und mPGES-2) (Jakobsson et al., 1999; Tanioka et al., 2000; Murakami et al., 2002). Die cPGE-Synthase wird ubiquitär und konstitutiv in vielen Geweben exprimiert (Tanioka et al., 2000). Sie ist überwiegend mit der COX-1 gekoppelt und im Zytosol lokalisiert, möglicherweise ist sie wie die COX-1 für die physiologischen PGE₂ Synthese verantwortlich. Die cPGES ist Glutathion-abhängig und benötigt für die Aktivierung eine Bindung an Hsp90 (heat shock protein 90) (Murakami et al., 2002). Bei der mPGES-2 handelt es sich um eine an der Golgi Membran assoziierte PGE-Synthase. Auch sie wird in vielen Geweben und Zellen hauptsächlich konstitutiv exprimiert und bindet sowohl an COX-1 als auch COX-2 (Murakami et al., 2006). Die induzierbare, Glutathion-abhängige mPGES-1 gehört zu der Familie der MAPEG-Proteine (membrane associated protein in eicosanoid and glutathion metabolism) (Jakobsson et al., 1999). Sie bindet hauptsächlich an die COX-2 und ist wie COX-1 und COX-2 in der perinuklearen Membran lokalisiert (Murakami et al., 2000). Der mPGES-1 wird daher wie der COX-2 eine Rolle bei der Synthese von PGE₂ während der Entstehung von pathologischen Prozessen wie Entzündung, Schmerz und Fieber zugesprochen (Jakobsson et al., 1999; Li et al., 1999; Murakami et al., 2006). Außerdem wurde eine mPGES-1 Überexpression in verschiedenen Tumoren beobachtet (Yoshimatsu et al., 2001; Yoshimatsu et al., 2001; Cohen et al., 2003; van Rees et al., 2003). Trotz der Kolo-kalisation von mPGES-1 mit COX-2 wird die Expression dieser beiden Proteine wahrscheinlich jedoch unterschiedlich reguliert (Yoshimatsu et al., 2001).

1.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs)

Nichtsteroidale Antiphlogistika gehören zu der Gruppe der nicht-opioiden Analgetika und zeigen eine analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkung. Schon vor über 100 Jahren wurde Acetylsalicylsäure bei entzündlichen Erkrankungen eingesetzt. Es folgte die Entdeckung weiterer Substanzen wie Indometacin, Diclofenac, Piroxicam und Ibuprofen in den 60er Jahren. Die Wirkungsweise dieser NSAIDs wurde jedoch erst von Vane et al. gezeigt, der für Acetylsalicylsäure und Indometacin eine Hemmung der Prostaglandinsynthese nachweisen konnte (Vane, 1971). Seitdem gilt die Hemmung der Cyclooxygenase und somit die Hemmung der Prostanoid-Synthese als die wesentliche Wirkungsweise von NSAIDs. Jedoch wird der unselektiven Cyclooxygenase-Hemmung auch die negativen unerwünschten Nebenwirkungen wie gastrointestinale Störungen (z.B Dyspepsie) und Ulzerationen, Nierenfunktionsstörungen, Bronchokonstriktion und Hemmung der Thrombozytenaggregation zugeschrieben. Die Entdeckung der vor allem im entzündlichen Gewebe induzierbaren COX-2 führte zu der Entwicklung von COX-2 selektiven Inhibitoren, die aufgrund ihrer Selektivität nur eine analgetische und antiphlogistische Wirkung hervorrufen sollen, ohne die durch die Hemmung der COX-1 bedingten Nebenwirkungen auszulösen (Vane, 1994). Eingeteilt werden die NSAIDs nach ihren IC₅₀-Werten für die Hemmung der Cyclooxygenasen in COX-1 spezifische, COX unselektive, COX-2 präferentielle und COX-2 selektive Hemmer (Lipsky et al., 1998).

Die Hemmung der Cyclooxygenase erfolgt je nach NSAID unterschiedlich (Kurumbail et al., 1996). Aspirin zeigt eine irreversible Hemmung der COX-1 und, bei hohen Konzentrationen, der COX-2 durch Acetylierung der Cyclooxygenase im aktiven Zentrum an Serin530 bzw. Serin516, es kommt zu einer sterischen Hinderung des Zugangs von Arachidonsäure zum katalytischen Zentrum (Roth et al., 1975). Andere NSAIDs, wie Ibuprofen und Piroxicam, wirken über eine reversible kompetitive Hemmung, sie interagieren mit dem katalytischen Zentrum der COX und verhindern die Bindung von Arachidonsäure. Die zeitabhängigen, reversiblen COX-1 und COX-2 Inhibitoren, wie Flurbiprofen und Indometacin, bilden mit ihrer Carboxylatgruppe ionische Wechselwirkungen mit Arg120 im Substratkanal der Cyclooxygenase aus. NSAIDs besitzen überwiegend eine hohe Plasmaproteinbindung (> 99 %) und werden in der Regel nach oraler Einnahme schnell resorbiert.

1.2.1 2-Arylpropionsäure-Derivate

Bei den 2-Arylpropionsäuren handelt es sich um Substanzen mit einem Chiralitätszentrum in der 2-Position, d.h. sie weisen ein asymmetrisches Kohlenstoffatom in α -Stellung zur Carboxylgruppe auf und bestehen aus einem S- und R-Enantiomer. Nur das S-Enantiomer ist ein potenter COX-1 und -2 Hemmer, das R-Enantiomer weist in therapeutisch eingesetzter Dosierung keine COX-Hemmung auf (Adams et al., 1976; Caldwell et al., 1988; Geisslinger et al., 1989; Berry et al., 1991; Brune et al., 1991; Boneberg et al., 1996). In der Therapie werden die meisten Arylpropionsäuren wie Ibuprofen, Ketoprofen und Flurbiprofen als racemische Mischung ihrer S- und R-Enantiomere (1:1 Mischung)

verabreicht. Im Fall von Naproxen ist nur das S-Enantiomer im Handel erhältlich. Da die R-Enantiomere keinen Effekt auf die Prostanoidsynthese haben, nimmt man an, dass die alleinige Gabe des aktiven S-Enantiomers eine Verringerung der Dosierung des NSAIDs ermöglicht, bei gleichbleibender analgetischer und antiphlogistischer Wirkung. Tatsächlich konnte für Ibuprofen gezeigt werden, dass bei Verabreichung des reinen S-Ibuprofens eine höhere Plasmakonzentration des S-Enantiomers im Blut von Patienten erreicht wird als durch Einnahme des Razemats (Geisslinger et al., 1990), und eine niedrigere Dosierung des S-Enantiomers eine gleiche analgetische Wirkung bewirkt (Stock et al., 1991; Singer et al., 2000; Bonabello et al., 2003). Die europäische Zulassung für Dexibuprofen, das S-Enantiomer von Ibuprofen, erfolgte im Jahr 2000.

Mittlerweile wird jedoch angenommen, dass auch die R-Enantiomere bestimmter 2-Arylpropionsäuren analgetische Wirkungen besitzen, die unabhängig von der Hemmung der Prostaglandinsynthese sind (Evans, 1996). So weist z.B. die systemische Gabe von R-Flurbiprofen im Menschen und in der Ratte eine ähnlich starke antinozizeptive Wirkung auf wie das COX hemmende S-Flurbiprofen (Brune et al., 1991; Brune et al., 1992; Geisslinger et al., 1994; Lotsch et al., 1995). Die meisten Arylpropionsäuren weisen außerdem eine chirale spezies- und substratabhängige Inversion des R-Enantiomers zum aktiven S-Enantiomer auf (Caldwell et al., 1988). Im Fall von Ibuprofen werden ca. 60 % des inaktiven R-Enantiomers im menschlichen Organismus unidirektional zum S-Enantiomer umgewandelt (Lee et al., 1985). Eine metabolische chirale Inversion von R-Ibuprofen tritt nicht nur im Menschen, sondern in allen bisher untersuchten Säugetieren auf und findet systemisch vor allem in der Leber und Niere statt (Chen et al., 1991). Die ATP-abhängige Acyl-CoA-Synthetase aktiviert R-Ibuprofen zum R-Ibuprofenoyl-CoA-Thioester (Menzel et al., 1994), welcher durch eine 2-Arylpropionyl-CoA Epimerase zu dem S-Ibuprofenoyl-CoA-Thioester isomerisiert wird (chirale Inversion; Abbildung 1.4). Der Thioester wird im letzten Schritt zum aktiven S-Ibuprofen hydrolysiert (Tracy et al., 1992; Shieh et al., 1993). In den meisten Säugetieren handelt es sich um eine unidirektionale Inversion der Konfiguration, d.h. es findet keine Umwandlung von S- zu R-Ibuprofen statt (Reichel et al., 1997). Eine bidirektionale chirale Umwandlung für Ibuprofen wurde bisher nur im Meerschweinchen beschrieben (Chen et al., 1991), die aber von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte.

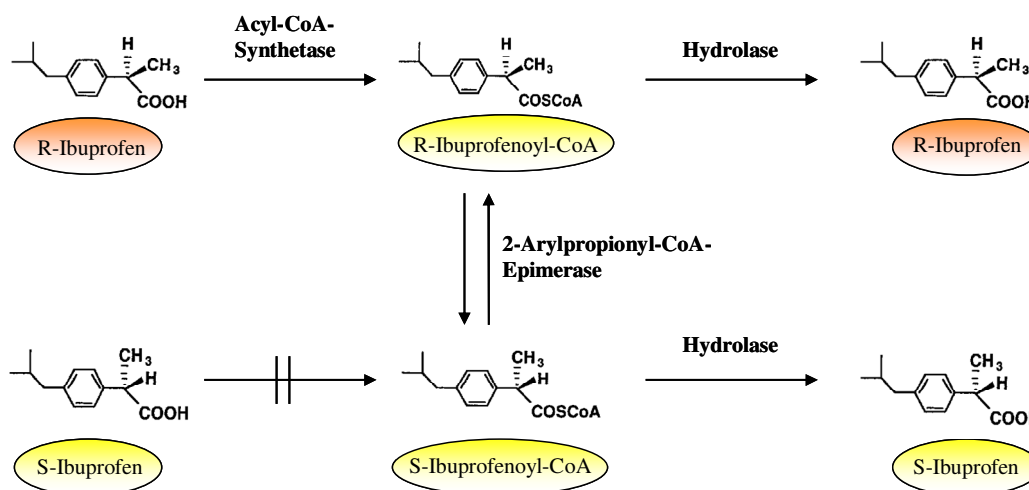


Abbildung 1.4: Unidirektionale chirale Inversion von R-Ibuprofen zum aktiven S-Ibuprofen (Neupert et al., 1997). Der stereoselektive Schritt ist die Bildung des R-Ibuprofenoyl-Adenylats, einem Zwischenprodukt bei der Entstehung des R-Ibuprofenoyl-CoA-Thioesters in Anwesenheit von Coenzym A (CoA), ATP und Mg^{2+} (Menzel et al., 1994; FitzGerald, 2003). Nicht nur das S-Enantiomer, sondern auch die biochemischen Zwischenprodukte der Isomerisierung, die 2-Arylpropionsäuren-CoA-Thioester, hemmen die COX-2. Gelbe Kennzeichnung = COX-2 Hemmer.

Ibuprofen besitzt wie die meisten 2-Arylpropionsäuren eine relativ kurze Verweildauer im Organismus (kurze Eliminationshalbwertszeit), im Gegensatz zu Naproxen mit einer längeren Halbwertszeit von 13-15 h (Tabelle 1.1) (Evans, 1996). Arylpropionsäuren weisen, abhängig von der jeweiligen Applikationsform und galenischen Formulierung, eine schnelle Absorption und eine hohe Bioverfügbarkeit auf (ca. 100 %). Sie werden im Menschen hauptsächlich renal, meist in Form von unwirksamen Metaboliten, eliminiert. Ein geringerer Teil der Ausscheidung erfolgt biliär (Evans, 1996). Ibuprofen unterliegt einer entero-hepatischen Zirkulation (Dietzel et al., 1990), die Metabolisierung erfolgt im Menschen im Wesentlichen in der Leber durch Oxidation und zu weniger als 10 % durch eine stereoselektive Konjugation mit aktivierter Glucuronsäure (Lee et al., 1985). Durch Hydroxylierung und Carboxylierung werden zwei pharmakologisch inaktive Hauptmetabolite (2-Hydroxyibuprofen und Carboxyibuprofen) gebildet (Davies, 1998). Im Menschen erfolgt die renale Ausscheidung des Razemats nach oraler Einnahme zu etwa 74 % als: freies Ibuprofen (< 1 %), 2-Hydroxyibuprofen und Carboxyibuprofen oder als dessen Konjugat mit Glucuronsäure (Davies, 1998; Tan et al., 2002).

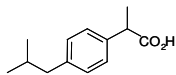
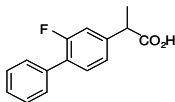
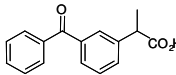
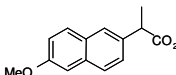
	Ibuprofen	Flurbiprofen	Ketoprofen	Naproxen
Strukturformel				
Ratio IC ₅₀ COX-2/COX-1	1,69	10,27	8,16	0,88
t _{1/2} [h]	1,5 - 2,5	3 - 4	1,5 - 2,5	13 - 15

Tabelle 1.1: IC₅₀-Werte für die COX-Hemmung und Eliminationshalbwertszeiten [t_{1/2}] ausgewählter 2-Arylpropionsäuren (nach Patrignani et al.; 1997; Cryer et al.; 1998). Der Quotient der IC₅₀-Werte gibt Aufschluß darüber, ob es sich bei einer Substanz um einen unspezifischen COX-Inhibitor handelt, oder ob sie eine Präferenz für COX-1 oder COX-2 zeigt. Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte der COX-1 bzw. COX-2 Hemmung wurde die Thromboxan Synthese in Blutplättchen und die Prostaglandin E₂ Produktion in Monozyten in humanen Vollblut-Assays nach Behandlung mit dem jeweiligen NSAID ermittelt (Patrignani et al., 1997; Cryer et al., 1998). t_{1/2}, Eliminationshalbwertszeit (Mutschler et al., 2001); IC₅₀, Konzentration des NSAIDs bei der 50 % der Enzymaktivität gehemmt wird; Ratio > 1 (stärkere COX-1 Hemmung); Ratio < 1 (stärkere COX-2 Hemmung).

1.3 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom gehört mittlerweile weltweit für beide Geschlechter zu den häufigsten Krebserkrankungen. In den USA wird die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2006 auf ca. 106.700 geschätzt, somit steht das kolorektale Karzinom neben dem Prostata- (ca. 234.500), Brust- (ca. 214.600) und Lungenkarzinom (ca. 174.500) in den USA an vierter Stelle der Tumorerkrankungen (Jemal et al., 2006). In Deutschland erkrankten gemäß einer Schätzung des Robert-Koch-Instituts im Jahr 2002 mehr als 35.000 Personen an kolorektalen Tumoren.

Bei einem malignen Tumor ist die normale Balance zwischen Zellteilung, Differenzierung und programmiertem Zelltod (Apoptose) gestört, es kommt zur erhöhten Zellproliferation oder zur Verminderung der Apoptoserate (Pardee, 1989). Eine der wichtigsten Ursachen hierfür sind somatische Mutationen in Genen, die für die Regulierung des Zellzyklus und somit für die Wachstumskontrolle der Zelle verantwortlich sind. Diese Mutationen können durch unterschiedliche exogene Mutagene wie ionisierende Strahlungen (z.B. Röntgenstrahlen), chemische Karzinogene oder Viren ausgelöst werden. Ungefähr 90 % der kolorektalen Karzinome entwickeln sich so sporadisch aus adenomatösen Polypen, nur ca. 10 % der Mutationen sind erblich (hereditär) bedingt (Courtney et

al., 2004). Die vererbaren Syndrome lassen sich anhand der Ausbildung von kolorektalen Polypen in hereditäre Polyposis Syndrome und hereditäre non-Polyposis Syndrome unterscheiden. Zu den seltenen Polyposis Syndromen gehört z.B. die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die nur etwa 1 % aller kolorektalen Karzinome ausmacht. Es handelt sich hierbei um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, bei der sich schon früh multiple adenomatöse Polypen bilden, die sich später zu Karzinomen entwickeln können. Verantwortlich hierfür ist eine Mutation des Tumorsuppressorgens APC (adenomatous polyposis coli tumor-suppressor gene) (Herrera et al., 1986; Groden et al., 1991). Mutationen oder Deletionen im APC-Gen spielen jedoch nicht nur bei der FAP eine Rolle, sondern treten auch in ca. 70 % aller sporadischer Kolonkarzinome auf (siehe Abbildung 1.5).

Eine Gruppe von Genen, die häufig Mutationen aufweisen, sind die Protoonkogene, die erstmals in tumorauslösenden Retroviren nachgewiesen wurden (Varmus, 1984). Dabei handelt es sich um Zellwachstum und Zelldifferenzierung regulierende Gen-Produkte, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Membranrezeptoren, Proteine der intrazellulären Signalübertragung und Transkriptionsfaktoren. Kommt es zu einer Mutation, so führt dies zu einer übermäßigen Aktivität des Onkogens und somit zu einer Steigerung der Zellproliferation und zu einem autonomen Wachstum der Zelle. Die Mutation eines einzigen Allels reicht aus, um die Aktivierung eines Protoonkogens zu einem Onkogen zu bewirken. Mutationen in einer anderen Gruppe, den Tumorsuppressorgenen, führen zum Funktionsverlust der entsprechenden Gene. Hierfür muß eine Inaktivierung beider Allele stattfinden. Nichtmutierte Tumorsuppressorgene hemmen die Zellproliferation und somit die Bildung von Tumoren.

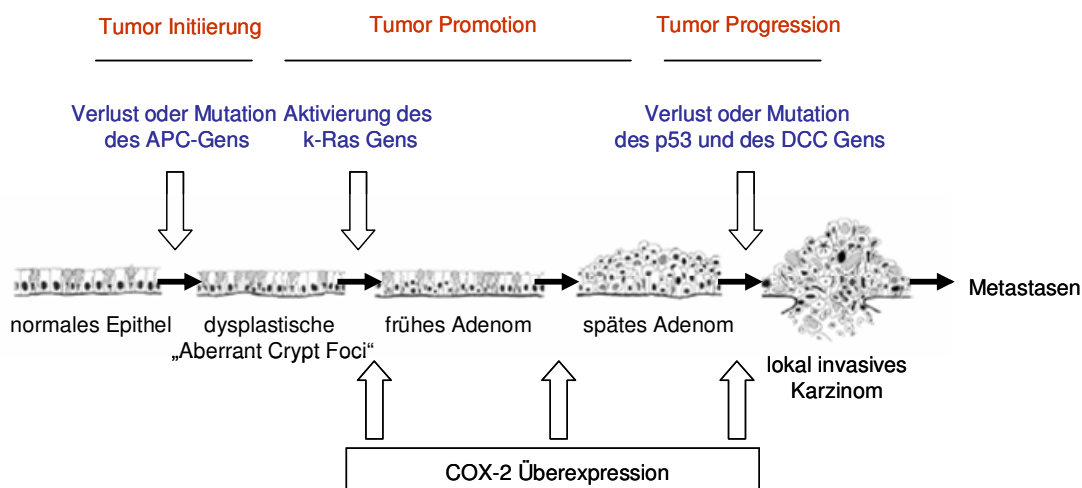


Abbildung 1.5: Modell der Entstehung des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Fearon und Vogelstein, 1990). Dargestellt sind die bei der Entstehung des sporadischen Karzinoms am häufigsten vorkommenden Mutationen und Deletionen. Dabei unterliegen die genetischen Veränderungen keiner Reihenfolge, sondern die Akkumulation von Mutationen und Deletionen führen zur Umwandlung eines benignen Adenoms zum Karzinom.

Für die Entstehung des sporadischen Kolonkarzinoms wird ein mehrstufiger Entwicklungsprozess angenommen, bei dem nach und nach unterschiedliche Gene in einer Zelle mutiert werden. In der Regel reicht hierbei eine Mutation nicht aus, um aus einer normalen Zelle eine Krebszelle zu bilden (Vogelstein et al., 1988; Sugimura, 1992). Vogelstein und Fearon untersuchten das Vorkommen von Mutationen in unterschiedlichen Stadien der Karzinogenese, vom frühen Adenom bis zum kolorektalem Karzinom und stellten in ihrem Modell (Abbildung 1.5) die bei der Entstehung des Kolonkarzinoms am häufigsten vorkommenden Mutationen dar (Fearon et al., 1990).

Mutationen im APC Gen gehören zu den frühen Ereignissen in der Karzinogenese (Powell et al., 1992) (Abbildung 1.5). So findet man in ca. 70 % aller sporadischen kolorektalen Karzinome Mutationen im Tumorsuppressorgen APC, das bei der Regulation von Zelladhäsion und dem Aufbau des Zytoskeletts eine Rolle spielt, aber auch Zellzyklus und Apoptose beeinflusst (Vogelstein et al., 1988; Fearon et al., 1990; Miyoshi et al., 1992). Deaktivierende Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 gehören zu den späten Ereignissen der Tumorentstehung, sie tragen zu der Entwicklung des Adenoms zum Karzinom bei. Mutationen im p53 Gen werden in ca. 50 % aller humanen Tumore gefunden (Hollstein et al., 1994; Soussi, 2000). Häufig kommt es zusätzlich zu der Mutation des p53 Gens auch noch zum Verlust des Wildtyp Allels (Baker et al., 1990; Hollstein et al., 1991). Der Tumorsuppressor p53 reguliert die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion von Apoptose oder DNA-Reparatur beteiligt sind (siehe Abschnitt 1.7). In allen Stadien der Karzinogenese können zudem Mutationen in Reparaturgenen (mismatch repair gens) auftreten, die zur Genominstabilität führen und somit die Entstehung weiterer Mutationen begünstigen.

Die früheste morphologische Veränderung des Kolonepithels ist die Bildung atypischer Krypten (aberrant crypt foci) (McLellan et al., 1991). Ausgehend von diesen Epithelveränderungen kann es zur Entwicklung von Adenomen kommen. Es wird angenommen, dass Adenome sich insbesondere aus atypischen Krypten mit Dysplasie entwickeln, hyperplastische Veränderungen werden dagegen nicht als prämaligne Vorstufen angesehen (Takayama et al., 1998). Über die Bildung von frühen, intermediären und späten Adenomen kommt es schließlich zur Entstehung eines kolorektalen invasiven Karzinoms (Chung, 2000). Kommt es zu ersten Mutationen in den Zellen, so spricht man von Tumor Initiierung. In diesem Stadium liegen meistens noch keine pathologischen Veränderungen der Zelle vor. Führen die Mutationen zur erhöhten Zellproliferation und/oder reduzierten Apoptoserate, so kommt es zur Dysplasie des Kolonepithels und zur Bildung von Adenomen (Stadium der Tumor Promotion), die sich schließlich zu einem lokal, invasiven Karzinom entwickeln können (Tumor Progression) (Hursting et al., 1999). Streuen die Karzinomzellen über die Blut- oder Lymphbahnen in andere Gewebe aus, so spricht man von Metastasierung.

1.4 COX-2 Expression und PGE₂ Synthese in kolorektalen Adenomen und Karzinomen

Der erste Zusammenhang zwischen erhöhten Prostaglandin (PG) Konzentrationen und Tumorerkrankungen wurde bereits 1968 festgestellt, als im Blut und Tumorgewebe von Patienten mit einem medullärem Schilddrüsenkarzinom einen Anstieg von PGE₂ und PGF_{2α} nachgewiesen wurde (Williams et al., 1968). Seitdem konnte auch für viele andere Tumorerkrankungen eine erhöhte Prostaglandin Konzentration im Blut gezeigt werden. In 80 % der kolorektalen Karzinome und auch schon in ca. 40 % der frühen kolorektalen Adenome wird Cyclooxygenase-2 (COX-2), nicht aber Cyclooxygenase-1 (COX-1), überexprimiert (Abbildung 1.5) (Eberhart et al., 1994; Kargman et al., 1995; Sano et al., 1995; DuBois et al., 1996). Auch ein Anstieg der Prostaglandin Konzentration, insbesondere PGE₂, wurde in kolorektalen Adenomen und Karzinomen beobachtet (Bennett et al., 1975; Bennett et al., 1977; Rigas et al., 1993; Pugh et al., 1994). Dagegen wird im normalen Kolonepithel ausschließlich die COX-1 exprimiert. Auch im APC^{+/-}-Mausmodell von Oshima et al. wurde eine erhöhte COX-2 Expression in Vorstufen des Kolonkarzinoms (den frühen Polypen) und in den kolorektalen Karzinomen nachgewiesen (Oshima et al., 1996). Da die COX-2 Expression und die PGE₂ Synthese schon früh in der Karzinomentstehung hochreguliert werden, wird der Cyclooxygenase-Weg als ein wichtiges Ziel (target) in der onkologischen Chemotherapie angesehen (Gupta et al., 2001). Seitdem wird in unterschiedlichen Studien der Zusammenhang zwischen COX-2 Überexpression, Prostaglandin Synthese und dem Kolonkarzinom untersucht. So führt die externe Zugabe von Prostaglandinen *in vitro* zu einem erhöhtem Zellwachstum von Magenepithelzellen (Nakano et al., 1993). Tsujii et al. konnten zeigen, dass eine COX-2 Überexpression in Darmepithelzellen der Ratte phänotypische Veränderungen der Epithelzellen bewirkt, die denen von Karzinomzellen entsprechen. Die Epithelzellen wiesen eine erhöhte Adhäsion an bestimmte extrazellulärer Matrixproteine, eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und eine erniedrigte Expression von E-Cadherin und des in der Einleitung von Apoptose involvierten TGFβ₂ (transforming growth factor β₂) Rezeptors auf (Tsujii et al., 1995). Zudem zeigten die COX-2 überexprimierenden Epithelzellen eine Hemmung von Natriumbutyrat vermittelter Apoptose. Eine erhöhte COX-2 Expression und PG Synthese in Kolonkarzinomzellen beeinflussen außerdem die Angiogenese. Kolonkarzinomzellen (Caco-2 Zellen), die durch stabile Transfektion eine erhöhte COX-2 Expression aufwiesen, stimulierten die Proliferation und Migration von Epithelzellen und förderten die Angiogenese *in vitro*, durch eine erhöhten Expression von Angiogenese stimulierenden Faktoren (VEGF, bFGF, TGF-β und PDGF) (Tsujii et al., 1998). Eine Hemmung der Cyclooxygenase Aktivität und somit der Prostaglandin Synthese durch NSAIDs könnte sich daher protektiv auf die Karzinogenese auswirken. Tatsächlich konnte bisher *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass NSAIDs sowohl die Initiierung als auch die Proliferation von Karzinomen hemmen. So wurde in epidemiologischen Studien nach Einnahme von unselektiven COX-Inhibitoren über einen längeren

Zeitraum eine Senkung des Krebsrisikos von 40-50 % nachgewiesen (Peleg et al., 1994; Peleg et al., 1996; Langman et al., 2000). *In vitro* Studien mit Sulindac und Sulindac Sulfid zeigten eine Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose in Kolonkarzinomzellen (Shiff et al., 1995). In Tierstudien wurde die antikarzinogene Wirkung von unterschiedlichen NSAIDs (Indometacin, Piroxicam, Sulindac und Aspirin) im chemisch induzierten Tumormodell der Maus oder Ratte nachgewiesen (Giardiello et al., 1995), und auch im Mausmodell für die familiäre adenomatöse Polyposis (APC MIN Mausmodell; multiple intestinal neoplasia) führte die Behandlung mit NSAIDs zu einer Reduzierung der Größe und der Anzahl von Polypen (Pereira et al., 1996; Piazza et al., 1997; Barnes et al., 1998; Mahmoud et al., 1998). In Patientenstudien zeigte die Behandlung von FAP-Patienten (familiäre adenomatöse Polyposis) mit unselektiven COX-Inhibitoren wie Sulindac oder mit COX-2 selektiven NSAIDs einen signifikanten Rückgang der Anzahl und Größe der Polypen (Giardiello et al., 1993; Nugent et al., 1993; Keller et al., 1999; Steinbach et al., 2000). In unterschiedliche Studien wurde zudem die verminderte Prostaglandin Produktion nach NSAID Behandlung *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen (Majima et al., 2000; Yao et al., 2005). Jedoch zeigen nicht nur selektive oder unselektive COX-Inhibitoren eine antikarzinogene Wirkung, sondern z.B. auch die R-Enantiomere der 2-Arylpropionssäuren, die keine COX-Hemmung aufweisen.

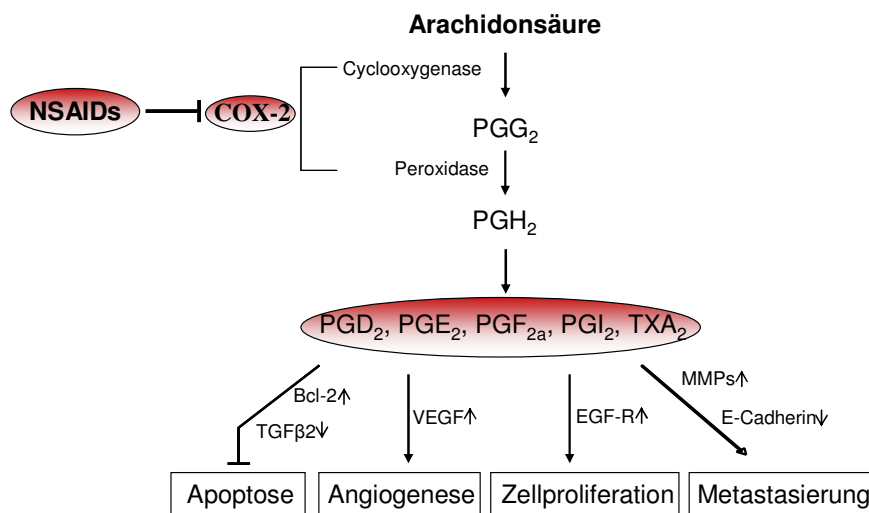


Abbildung 1.6: Beispiele für COX abhängige Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von NSAIDs. EGF-R, epithelial growth factor receptor; MMPs, Matrixmetalloproteinasen; TGFβ2, transforming growth factor β2; VEGF, vascular endothelial growth factor.

1.5 COX unabhängige Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von NSAIDs

Der erste Hinweis für einen COX unabhängigen antikarzinogenen Effekt von NSAIDs kam von Hanif et al., der für Sulindac Sulfid und Piroxicam eine Hemmung der Zellproliferation und eine Induktion von Apoptose in Kolonkarzinomzellen mit geringer Prostaglandinsynthese (HCT-15) und Tumorzellen mit hoher Prostaglandinsynthese (HT-29) zeigen konnte (Hanif et al., 1996). Die antikarzinogene Wirkung wurde dabei nicht durch die externe Zugabe von Prostaglandinen aufgehoben. Mittlerweile gibt es viele Studien, die eine COX unabhängige Wirkung für NSAIDs beschreiben und die hierfür verantwortlichen molekularen Mechanismen untersuchen.

Sulindac Sulfon, ein Derivat von Sulindac, zeigte *in vitro* und im Azoxymethan induzierten Kolonkrebsmodell der Ratten eine vergleichbare Hemmung des Tumorwachstums von Kolonkarzinomen wie die COX-Inhibitoren Sulindac oder Piroxicam, obwohl Sulindac Sulfon keine Hemmung der Cyclooxygenase Aktivität aufweist (Alberts et al., 1995; Piazza et al., 1995; Piazza et al., 1997). Für Sulindac Sulfon konnte eine Induktion der Apoptose durch Aktivierung des Jun-Kinase Signalwegs beobachtet werden (Soh et al., 2000), sowie eine Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor- κ B). Auch für die antikarzinogene Wirkung des selektiven COX-2 Hemmers Celecoxib wurden sowohl COX abhängige als auch COX unabhängige Mechanismen beschrieben (Grosch et al., 2001; Maier et al., 2004). Schließlich weist auch die Tatsache, dass für die Hemmung der Tumorproliferation und Induktion von Apoptose höhere Konzentrationen des NSAIDs notwendig sind als für die Hemmung der Prostaglandinsynthese, auf COX unabhängige Mechanismen hin.

Es wird angenommen, dass auch die antikarzinogenen Effekte der R-Enantiomere von 2-Arylpropionsäuren auf COX unabhängige Mechanismen zurückzuführen sind. So konnte für Flurbiprofen mit Hilfe von *in vitro* Experimenten an Kolonkarzinomzellen und *in vivo* im Tumormausmodell gezeigt werden, dass das bei der COX-Hemmung inaktive R-Enantiomer eine antikarzinogene Wirkung aufweist. Sowohl S- als auch R-Flurbiprofen induzierten gleichermaßen einen G₁-Zellzyklusblock und Apoptose, sowohl in COX-2 exprimierenden als auch in COX-2 defizienten kolorektalen Karzinomzellen. Die Induktion des Zellzyklusarrestes erfolgte dabei durch eine Aktivierung der c-Jun Kinase und des Transkriptionsfaktors AP-1 (transcription factor activator protein 1) (Grosch et al., 2003), wohingegen die Apoptose nach R-Flurbiprofen Behandlung zumindest teilweise durch die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 eingeleitet wurde (Grosch et al., 2005). Auch *in vivo* konnte R-Flurbiprofen eine Hemmung des Tumorwachstums in immundefizienten Nacktmäusen bewirken, und zwar unabhängig von der COX Expression der jeweiligen Tumor-Transplantate. Für Ibuprofen wurde eine Hemmung von Tumor Initiierung und Proliferation beim Prostata-(Nelson et al., 2000; Andrews et al., 2002), Brust- (Harris et al., 1999; Harris et al., 2003) und beim Kolonkarzinom beobachtet (Reddy et al., 1992; Yao et al., 2005). Dabei bezogen sich die Untersuchungen in den meisten Fällen nur auf das Razemat.

1.6 Zellzyklus und Apoptose

Kommt es in einer Zelle zu einer fehlerhaften DNA-Replikation, so wird Apoptose in der Zelle eingeleitet. Sind die Gene selbst betroffen, die für die Regulierung des Zellzyklus oder der Einleitung von Apoptose verantwortlich sind, so fehlt diese Selbstregulierung der Zelle und es kann zur Entstehung von Krebs kommen. Führen Mutationen zu einer unkontrollierten Aktivierung solcher Gene, so kommt es zur Apoptose gesunder Zellen und zur Degeneration eines Gewebes, ein Mechanismus, der bei der Alzheimer- oder Parkinsonerkrankung diskutiert wird.

1.6.1 Regulierung des Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus vier Zellzyklusphasen, in der M-Phase (Mitose) kommt es zur Trennung der Chromosomen und zur Teilung der Zellen in zwei Tochterzellen, in der Synthese-Phase (S-Phase) erfolgt die DNA Replikation. Die Zeitabschnitte zwischen diesen beiden Phasen werden als G_1 - und G_2 -Phase (gap) bezeichnet (Abbildung 1.7). Die G_1 -, S und G_2 -Phasen werden zusammen auch als Interphase bezeichnet, sie macht bei Eukaryontenzellen den größten Teil des Zellzyklus aus (ca. 90 %). Die Zellen in der G_1 -Phase können z.B. bei der Zelldifferenzierung oder bei ungünstigen Wachstumsbedingungen in ein Ruhestadium übergehen (G_0 -Phase) (Pucci et al., 2000).

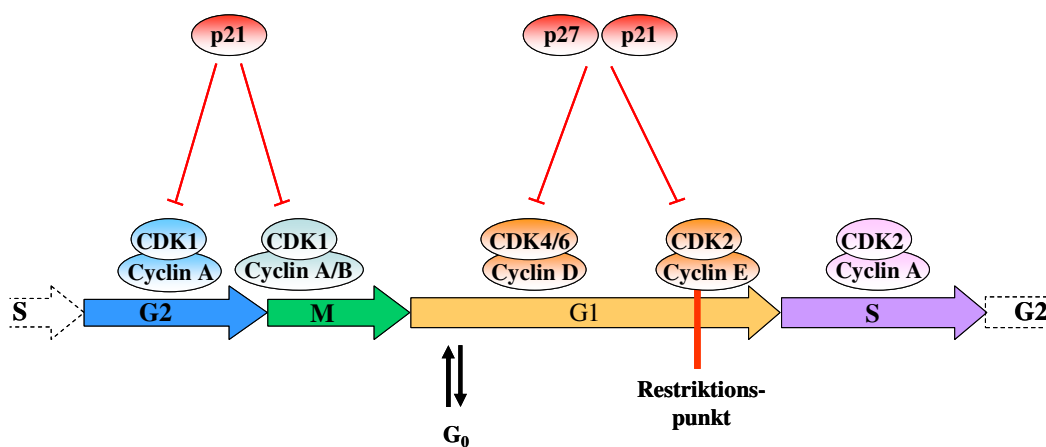


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Zellzyklus.

Reguliert wird die Progression des Zellzyklus durch unterschiedliche Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs; cyclin-dependent kinases), sowie CDK-Inhibitoren (CKIs; cyclin-dependent kinase inhibitors). Bei den CDKs handelt es sich um Serin/Threonin-Proteinkinasen, deren katalytische Untereinheit nur aktiv ist, wenn sie in Komplexen mit spezifischen Cyclinen vorliegen. Die vollständige Aktivierung der meisten CDKs erfordert zudem eine Phosphorylierung an einem konservierten Threoninrest durch CDK-aktivierende Kinasen (CAKs, Cdk-activating kinases) (Morgan, 1997). Während die Expression der CDKs im Verlauf des Zellzyklus nahezu konstant bleibt, werden die regulatorischen Untereinheiten der Cyclin/CDK-Komplexe, die Cycline, in den einzelnen

Zellphasen in ihrer Expression reguliert (Abbildung 1.7) (Murray, 1995; Murray, 2004). Die Regulierung erfolgt dabei durch Transkription und Proteindegradierung, abgebaut werden die Cycline nach Export aus dem Zellkern über das Ubiquitin-Proteasomen-System (Murray, 1995; King et al., 1996). Auch die Lokalisation der Cycline kann eine Rolle spielen, so findet für Cyclin B erst vor dem Eintritt des Zellzyklus in die Mitose eine Translokation vom Zytoplasma in den Nukleus statt (Gallant et al., 1995). Durch die Komplexbildung mit den in den Zellphasen unterschiedlich exprimierten Cyclinen kommt es zu einer Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen, und somit zur zellzyklusspezifischen Phosphorylierung von Proteinen, die eine wichtige Rolle in der Zellzyklusprogression spielen. Mitogene Stimuli wie Wachstumsfaktoren vermitteln den Eintritt der Zelle aus der G₀-Phase in die G₁-Phase, indem sie die Transkription von G₁-Cyclinen (Cyclin D und Cyclin E) fördern und die jeweiligen Cyclin/CDK-Komplexe aktivieren (Malumbres et al., 2001). Die Expression von Cyclin A erfolgt während der S- und G₂-Phase, es bildet dort Komplexe mit CDK2 und CDK1 (Draetta et al., 1989; Pagano et al., 1992). Die Cyclin A/CDK-Komplexe aktivieren Proteine, die für die Progression durch die S-Phase und für die Einleitung der Mitose verantwortlich sind (Furuno et al., 1999). Cyclin B bildet einen Cyclin/CDK-Komplex mit CDK1 und reguliert den Übergang von der G₂- zur M-Phase (Pines et al., 2001). Wachstumshemmende Stimuli regulieren die Transkription von CDK-Inhibitoren, die Cyclin/CDK-Komplexe hemmen und einen Zellzyklusarrest auslösen. Zu den CKIs der CIP/KIP Familie gehören z.B. die Proteine p21^{WAF1} und p27^{Kip1} (Carnero et al., 1998), die ein breites Spektrum an Cyclin/CDK-Komplexe hemmen (Abbildung 1.7) (Hannon et al., 1994; Toyoshima et al., 1994). Die Aktivität von CDKs kann außerdem durch Dephosphorylierung aktiviert oder durch Inhibitor-Tyrosinkinasen vermittelte Phosphorylierung gehemmt werden (Lundgren et al., 1991; Morgan, 1997).

Es gibt unterschiedliche Kontrollpunkte, die den Übergang der Zelle in die nächste Zellphase regulieren. Sie befinden sich beim Übergang von der G₁- zur S-Phase (Restriktionspunkt), in der S-Phase und in der G₂/M-Phase (MacLachlan et al., 1995). An diesen Kontrollpunkten finden eine Reihe von Regulationsmechanismen statt, die bei vorhandenen mitogenen Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren) eine Progression des Zellzyklus einleiten bzw. bei wachstumshemmenden Stimuli (z.B. DNA-Schäden) einen Zellzyklusblock in der G₁- bzw. G₂-Phase oder eine Verlangsamung des Zellzyklus in der S-Phase auslösen. Die Hemmung des Zellzyklus dient der Reparatur von geschädigter DNA oder führt schließlich zur Apoptose der Zelle (Pucci et al., 2000). Somit dienen die Kontrollpunkte der Aufrechterhaltung der Genomstabilität und verhindern Mutationen bei der Replikation (Murray, 1992). Der Übergang von der G₁- zur S-Phase wird durch Phosphorylierung des Rb-Proteins (retinoblastoma) reguliert. In der hypophosphorylierten Form bindet und inaktiviert das Rb-Protein Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und hemmt somit die Expression von Genen, die den Eintritt von der G₁- in die S-Phase vermitteln (Abbildung 1.8) (Hengstschlager et al., 1999). Wachstumsfördernde Stimuli führen zur Aktivierung von Cyclin/CDK-Komplexen, die das Rb-Protein in der frühen und späten G₁-Phase phosphorylieren. Somit können die Proteine der E2F-Familie als

Transkriptionsfaktoren wirken (Weinberg, 1995). CDK-Inhibitoren wie p21^{WAF1} und p27^{Kip1} hemmen Cyclin-abhängige Kinasen und verhindern somit die Phosphorylierungen des nukleären Proteins Rb (Harper et al., 1993; Guan et al., 1994; Hannon et al., 1994; Polyak et al., 1994).

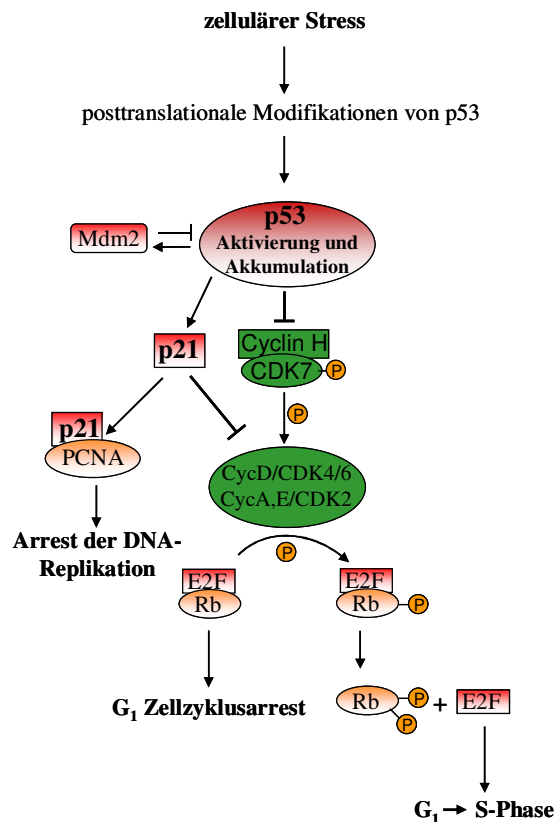


Abbildung 1.8: Durch den Transkriptionsfaktor p53 vermittelte Induktion eines G₁-Zellzyklusblocks (modifiziert nach Sionov et al., 1999). Die Regulierung und Aktivierung von p53 induziert die Transkription von Zielgenen, die in der Regulierung des Zellzyklus eine Rolle spielen. Abkürzungen: CDK, cyclin-dependent kinase; Mdm2, murine double minute-2; P, Phosphatrest; Rb, retinoblastoma protein.

1.6.2 Apoptose

Die Einleitung der Apoptose erfolgt über intrinsische oder extrinsische Signale. Beim extrinsischen Reaktionsweg werden Rezeptoren der TNF (tumor necrosis factor) Superfamilie aktiviert, die zur Aggregation und Autoaktivierung von Initiator-Procaspasen (Caspase-8 und -10) führen. Der intrinsische Weg wird aktiviert, wenn es zur Schädigung der Mitochondrien kommt. Dies kann durch Faktoren wie Mutationen, Strahlung, Änderungen des zellulären pH-Werts oder oxidativen Stress erfolgen. Es kommt zum Ausstrom von proapoptotischen mitochondrialen Faktoren ins Zytoplasma oder in den Zellkern, wie z.B. Cytochrom c, AIF (apoptosis-inducing factor) und Endonuclease G (Abbildung 1.9).

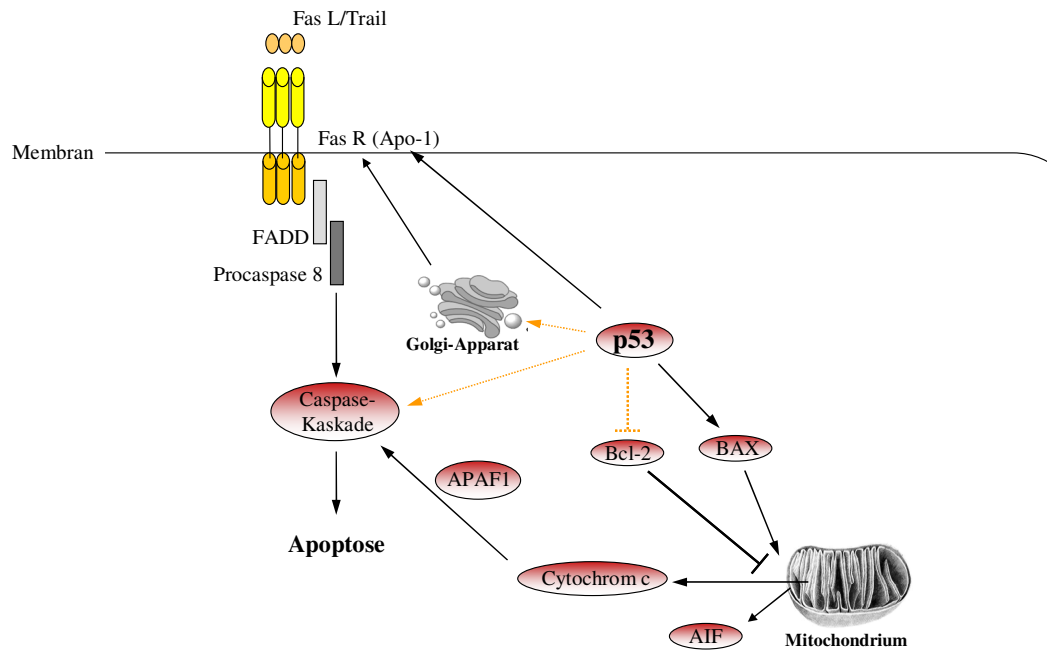


Abbildung 1.9: Schema der p53 induzierten Apoptose. Die p53 vermittelte Induktion von Apoptose kann sowohl durch transkriptionsabhängige (schwarze Pfeile) als auch durch transkriptionsunabhängige Mechanismen (orange Pfeile) erfolgen (modifiziert nach Sionov et al., 1999 und Levine et al, 2006). Abkürzungen: **AIF**, apoptosis-inducing factor; **APAF1**, apoptosis protease activating factor-1; **FADD**, Fas-associated death domain. \longrightarrow Aktivierung; \longleftarrow Hemmung

Eingeleitet wird der extrinsische Apoptose-Signalweg durch Bindung von trimeren Liganden an die Rezeptoren der TNF-Familie, die in ihrem intrazellulären Bereich eine konservierte Domäne (death domain, DD) besitzen (Ashkenazi et al., 1998). Zu ihnen gehören TNF-, Fas (CD95/Apo-1)-, DR-3 (death receptor-3)/Apo-3- und verschiedene TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)-Rezeptoren (Nagata, 1997; Schneider et al., 1997). Die Bindung der als Trimer vorliegenden Liganden an die jeweiligen Rezeptoren induziert deren Trimerisierung und die Rekrutierung von Adaptermolekülen an die C-terminalen „death“-Domänen der Rezeptoren. Im Beispiel des Fas-Rezeptors kommt es nach Bindung des Cytokins Fas zur Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (Fas-associating protein with death domain) (Abbildung 1.9) (Kischkel et al., 1995). Mit der N-terminalen Domäne (death effector domain; DED) interagiert FADD mit Initiator-Procaspase-8 (Boldin et al., 1996), es kommt zur Autoaktivierung der Procaspasen-8 durch Proteolyse und Dimerisierung. Die aktivierten Initiatorcaspasen aktivieren nach Lösung vom Rezeptor weitere Effektor-Procaspasen (Muzio et al., 1997). Außerdem greift Caspase-8 durch Spaltung von Bid und der darauf folgenden Aktivierung von Bak und Bax in den intrinsischen Reaktionsweg ein (Luo et al., 1998; Wei et al., 2001). Zu der Familie der TNF-Rezeptoren gehört auch der Neurotrophin-Rezeptor p75 ($p75^{\text{NTR}}$), der unspezifisch von allen Neurotrophinen (NGF, BDNF, NT-3, NT-4) erkannt und in den unterschiedlichen Nervenzellen, entweder alleine oder zusammen mit einem der Tyrosinkinase-

Neutrophinrezeptoren (Trk-Rezeptoren), exprimiert wird (Chao, 1994; Chapman, 1995). Dort ist er beteiligt an der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung, Wachstum und Apoptose von Neuronen (Huber et al., 1995; Kaplan et al., 2000). Doch nicht nur im Nervensystem, sondern auch in vielen anderen Geweben und Organen, wird der Membranrezeptor p75^{NTR} exprimiert (Vaidyanathan et al., 1998). Mittlerweile wurde für p75^{NTR} außerdem eine Wirkung als Tumorsuppressor in Blasen- und Prostatakrebszellen nachgewiesen (Krygiel et al., 2002; Khwaja et al., 2003). Dabei führte die Überexpression des Membranrezeptors zu einer erhöhten Apoptoserate und zu Hemmung der Zellproliferation durch Zellzyklusarrest in der G₁-Phase (Krygiel et al., 2001). In Neuronen des sympathischen Nervensystems konnte *in vitro* gezeigt werden, dass dort sowohl die Aktivierung des p57^{NTR} Rezeptors wie auch der Entzug von NGF zur erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors p53 und dessen Zielgen Bax führte (Aloyz et al., 1998).

Kommt es zur Veränderung des Membranpotenzials direkt durch Schädigung der Mitochondrien oder zur Deregulation der Membranfunktion durch proapoptotische Moleküle der Bcl-2 Familie wie Bak oder Bax, so wird der intrinsische Apoptoseweg aktiviert. Die Aktivität von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie wird entweder durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Spaltung durch Caspasen) oder transkriptionell reguliert (Breckenridge et al., 2004). So spaltet z.B. die über den Fas- oder TNF-Rezeptor Signalweg aktivierte Caspase-8 das Bid Protein zum aktiven tBid (truncated Bid), das die Aktivierung weiterer proapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie wie Bak und Bax reguliert (Luo et al., 1998; Wei et al., 2001). Die Interaktion von Bid mit Bak und Bax bewirkt eine Konformationsänderung und Homo-Oligomerisierung der Proteine. Das in inaktiver Form als Monomer im Cytosol vorliegende Bax wird nach der Oligomerisierung in die äußere mitochondriale Membran eingebaut. Die Oligomerisierung von proapoptotischen Proteinen in der äußeren Membran führt zur Freisetzung von Apoptose induzierenden Faktoren ins Cytosol und in den Zellkern (Abbildung 1.9) (Eskes et al., 2000). Cytochrom c bildet mit dem aktivierten Apaf-1 das Apoptosom, es kommt zur Aktivierung der Caspase-Kaskade. Diese Aktivierungskette beginnt mit der Autoaktivierung der Initiator-Procaspase-9 am Apoptosom und führt zur Aktivierung weiterer Effektor-Procaspasen (Srinivasula et al., 1998). Der genaue Mechanismus, der zum Austritt der Faktoren aus den Mitochondrien führt, ist nicht bekannt. Eine Modell besagt, dass es durch die Oligomerisierung von Bax in der Membran zur Bildung supramolekularer Membranöffnungen kommt (Kuwana et al., 2002). Antiapoptotische Bcl-2 Proteine hemmen die Freisetzung proapoptotischer Faktoren, indem sie die Bindung von „BH-3 only“ Proteinen wie Bid mit Bax/Bak verhindern, oder direkt die Oligomerisierung der proapoptotischen Proteine regulieren (Breckenridge et al., 2004).

Aber auch andere Faktoren können für die Induktion von Apoptose in den Zellen verantwortlich sein. So kann zellulärer Stress zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führen, der die Transkription pro- und antiapoptotischer Proteine reguliert (siehe Abschnitt 1.7). Auch Fehlregulation des Ca²⁺ Haushalts des Endoplasmatischen Reticulums (ER) oder die Anreicherung fehlerhafter Proteine in diesen

Organellen kann zu einer Aktivierung von Procaspasen und somit zur Induktion von Apoptose führen (Jimbo et al., 2003).

1.7 Transkriptionsfaktor p53

Der Tumorsuppressor p53 reguliert die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion von Apoptose oder DNA-Reparatur beteiligt sind. Mutationen im p53 Gen werden in ca. 50 % aller humanen Tumore gefunden (Hollstein et al., 1994; Soussi, 2000). Das Protein p53 besitzt eine kurze Halbwertszeit und liegt in ungestressten Zellen in inaktiver Form und geringer Menge vor (Blagosklonny, 1997). Die zentrale Domäne des Proteins, die sequenzspezifische DNA-bindende Domäne, vermittelt die spezifische Bindung von DNA an p53 (el-Deiry et al., 1992). In dieser Proteinregion finden sich auch die meisten Mutationen, wobei es sich häufig um Punktmutationen handelt (Hollstein et al., 1991). N-Terminal liegt die Transaktivierungsdomäne, mit der Faktoren interagieren, die wichtig für die Transkriptionsinitiation sind und in der die Bindungsstelle für das Mdm-2 Protein (murine double minute-2) liegt (Horikoshi et al., 1995; Haupt et al., 1996; Kussie et al., 1996). Die Bindung des Protoonkogens Mdm-2 an p53 führt zu dessen Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System und hemmt dessen Transaktivierungsaktivität (Haupt et al., 1997; Sionov et al., 1999). Faktoren, die zellulären Stress auslösen, wie DNA-Schädigung, Hitzeschock, Hypoxie, Hyperoxie, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder metabolische Veränderungen, führen zur Aktivierung und Stabilisierung des p53 Proteins und somit zur p53 induzierten Zellantwort, z. B. in Form von Zellzyklusarrest oder Apoptose. Ob es schließlich zum Zellzyklusblock oder zum programmierten Zelltod kommt, hängt unter anderem von der Art des Stimulus, vom Zelltyp und der Menge an p53 Protein ab (Prives et al., 1999). Die Regulierung von p53 erfolgt zum einen durch Einfluss auf die Proteinsynthese (mRNA Produktion und Stabilität, Translationseffizienz und Proteindegradation), zum anderen durch posttranslationale Mechanismen wie Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Acetylierung (Gu et al., 1997). Außerdem spielen bei der Aktivierung des Tumorsuppressors p53 Protein-Protein Interaktionen und Interaktionen mit geschädigter DNA eine Rolle (Ko et al., 1996; el-Deiry, 1998; Prives et al., 1999).

Während die Aktivierung von Genen, die zum Zellzyklusblock in der G₁- oder G₂-Phase führen, durch sequenzspezifische transkriptionelle Aktivierung erfolgt, kann p53 die Apoptose auch über nicht-transkriptionelle Mechanismen vermitteln (Sionov et al., 1999). Transkriptionell reguliert p53 z.B. den CDK-Inhibitor p21^{WAF1} oder hemmt direkt Cyclin/CDK-Komplexe (CDK7/Cyclin H) und führt so zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase (Abbildung 1.8) (Schneider et al., 1998). Der CDK-Inhibitor p21^{WAF1} verhindert die Phosphorylierung des nukleären Rb-Proteins durch Inhibierung der Kinaseaktivität von Cyclin/CDK-Komplexen. Außerdem führt die Interaktion von p21^{WAF1} mit dem Protein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) zur Hemmung der Aktivierung von DNA-Polymerase δ , die für die DNA-Replikation notwendig ist (Waga et al., 1994).

Bei der durch p53 vermittelten Induktion von Apoptose ergänzen sich sowohl sequenzspezifische Transaktivierung als auch p53 vermittelte, nichttranskriptionelle Mechanismen (Abbildung 1.9) (Amundson et al., 1998; Sionov et al., 1998). Die Aktivierung eines einzigen Zielgens von p53 kann dabei meistens noch keine Apoptose induzieren, sondern erst die Koexpression mehrerer Gene. Zu den durch p53 transkriptionell aktivierten Proteinen gehören z.B. die Todesrezeptoren (Fas/CD95 und KILLER/DR5), die, wie beschrieben, eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion spielen (Owen-Schaub et al., 1995). Transkriptions-unabhängig reguliert p53 zudem den Transport des Fas Liganden aus dem Golgiapparat in die Membran (Bennett et al., 1998). Auch bei der Induktion von Apoptose über den mitochondrialen Signalweg gibt es p53-regulierte Genprodukte. So aktiviert der Transkriptionsfaktor die Expression von proapoptotischen Faktoren wie Bax, das die Freisetzung von AIF und Cytochrom c aus den Mitochondrien fördert (Susin et al., 1999). Cytochrom c bildet mit Apaf-1 das Apoptosom, es kommt zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und zur Induktion von Apoptose. Transkriptions-unabhängig inhibiert p53 zudem die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Ding et al., 1998). Die Freisetzung von mitochondrialen Faktoren wie Cytochrom c und AIF wird schließlich von p53 nicht nur durch die Transkription kontrolliert, sondern auch durch Komplexbildung mit den antiapoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-xL (Mihara et al., 2003).

1.8 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ibuprofen gehört zu den am häufigsten eingesetzten NSAIDs und wird als Standardanalgetikum und zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Aufgrund der unspezifischen COX-Hemmung führt die Behandlung von Ibuprofen, wie bei vielen anderen unspezifischen COX-Hemmern, zu unerwünschten Nebenwirkungen, z.B. zu gastrointestinalen Störungen und Komplikationen (z.B. Dyspepsie und Ulzerationen), Nierenfunktionsstörungen und Bronchokonstriktion. Im Vergleich zu anderen NSAIDs, wie Diclofenac, Indometacin oder Ketoprofen, zeigt Ibuprofen jedoch eine niedrigere Inzidenzrate. Während Ibuprofen meistens als Razemat verabreicht wird, ist mittlerweile auch das reine S-Ibuprofen (Dexibuprofen) als Präparat erhältlich. In unterschiedlichen Studien wurde gezeigt, dass mit Dexibuprofen eine bis zu 50 % niedrigere Dosierung bei gleicher analgetischer und antiphlogistischer Wirkung erreicht wurde. So können durch die Verabreichung des reinen S-Ibuprofens möglicherweise unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden. Seit die antikarzinogene Wirkung von NSAIDs bekannt ist, stellt sich die Frage, ob die Gabe eines reinen Enantiomers Vorteile gegenüber dem Razemat bringt. Über die molekularen Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von Ibuprofen ist bisher wenig bekannt und die meisten Versuche wurden bislang mit dem Razemat durchgeführt.

Die Fragestellung dieser Arbeit war daher:

- Zeigen beide Enantiomere des Ibuprofens *in vitro* und *in vivo* eine vergleichbare antikarzinogene Wirkung?
- Ist auch bei der Behandlung von kolorektalen Tumorzellen die Behandlung mit dem reinen S-Ibuprofen effektiver und wird so die für die antiproliferative Wirkung benötigte Dosis herabgesetzt?
- Welche molekularen Mechanismen sind für die antikarzinogene Wirkung beider Enantiomere verantwortlich und spielen COX unabhängige Mechanismen eine Rolle?

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente mit dem reinen S- und R-Enantiomer geben hierbei wichtige Hinweise auf die Wirkung und die molekularen Mechanismen. Aufgrund der im Menschen beobachteten Konfigurationsinversion von R- zu S-Ibuprofen kann R-Ibuprofen jedoch nur als Modellsubstanz dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Bio-Rad (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen.

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose NEEO	Carl Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
APS	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
BSA	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Complete™*	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coomassie brilliant blue G-250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
DNase	Qiagen, Hilden
EDTA (Idranal®III)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Essigsäure 96 %	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
FCS	Life Technologies, Paisley, Schottland
FeCl ₂	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Geneticinsulfat (G418)	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
L-Glutamat	Gibco, Paisley, Schottland
Glutathion	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe

Kristallviolett	Riedel-de-Haën, Seelze
LB Agar	Life Technologies, Paisley, Schottland
LB Broth Base	Life Technologies, Paisley, Schottland
Leupeptin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Lipopolysaccharide	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Magermilchpulver (Nutaflor [®])	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol 100 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco's	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin G	Gibco, Paisley, Schottland
Pepstatin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Phenol	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
PMSF	Perbio Science, Bonn
Ponasteron A	Invitrogen, Karlsruhe
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
Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley, Schottland
Tween [®] 20	AppliChem, Darmstadt
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Kit

β-Galactosidase Enzyme Assay System

Firma

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Ecdysone-Inducible Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
FuGENE [®] HD Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
PGE ₂ Correlate EIA [™] -Kit	Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA
Qiagen Plasmid Midi-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Tfx [™] -50 Reagent	Promega, Mannheim

2.1.3 NSAIDs

Ibuprofen wurde von PAZ Pharma F & E GmbH (Bad Oeynhausen) synthetisiert und für die Versuche in PBS Puffer gelöst. Die Reinheit von > 99 % wurde mittels stereoselektiver HPLC (high performance liquid chromatography) ermittelt.

2.1.4 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England BioLabs (Beverly, USA) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bezogen.

2.1.5 Größenmarker

Protein Größenmarker

SeeBlue [®] Plus 2	Invitrogen, Karlsruhe
-----------------------------	-----------------------

DNA Größenmarker

1 kb plus DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
----------------------	-----------------------

2.1.6 Vektoren

Die Klonierung von humaner COX-2 (hCOX-2) cDNA wurde mit dem pIND Vektor aus dem Ecdyson/Pronasteron-induzierbaren Expressions-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Für die Expression der hCOX-2 wurde ein zweiter Ecdyson/Pronasteron-induzierbarer Vektor (pVgRXR) benötigt, der konstitutiv die zwei Untereinheiten (RXR und VgEcR) des Drosophila Ecdyson Hormon Rezeptors koexprimiert. Diese enthalten DNA-bindende Domänen, die an speziell hergestellte cis-regulatorische Elemente (E/GRE) im pIND Vektor binden. Somit reguliert die Induktion des pVgRXR Vektors durch Pronasteron A die Expression der hCOX-2 cDNA im pIND Vektor.

Für die Transfektion wurde der *E.coli* Stamm DH5 α verwendet. Die Transformation der beiden Vektoren erfolgte in HCT-116 und HCT-15 Tumorzellen.

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioSpring, Frankfurt, synthetisiert und für die Sequenzierung der in den pIND Vektor einklonierten hCOX-2 cDNA (Ecdyson Fwd, BGH Rev und hCOX-2 1-10) oder für die RT-PCR verwendet (hCOX-2 11-12).

<u>Oligonukleotide</u>	5'-----3'
Ecdyson Fwd	CTCTGAATACTTTCAACAAGTTAC
BGH Rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
hCOX-2 1 Fwd	CCACTTCAAGGGATTTGGAA
hCOX-2 2 Rev	AATCATCAGGCACAGGAGGA
hCOX-2 3 Fwd	CAGCACTTCACGCATCAGTT
hCOX-2 4 Rev	TCAGGGACTTGAGGAGGGTA
hCOX-2 5 Fwd	GCAGTTGTTCCAGACAAGCA
hCOX-2 6 Rev	AAGGGGATGCCAGTGATAGA
hCOX-2 7 Fwd	CCTTCTGCCTGACACCTTTC
hCOX-2 8 Rev	AAGCGTTTGCGGTACTCATT
hCOX-2 9 Fwd	TGCTGTGGAGCTGTATCCTG
hCOX-2 10 Rev	ACAGCCCTTCACGTTATTGC
hCOX-2 11 Fwd	GTTCCCACCCATGTCAAAC
hCOX-2 12 Rev	CAACGTTCCAAAATCCCTTG

2.1.8 Plasmide

<u>Konstrukt</u>	<u>Vektor</u>	
hCOX-2 pcDNA3	pcDNA3	Sabine Grösch, Klinische Pharmakologie, Frankfurt
pIND-hCOX-2	pIND	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

2.1.9 Zelllinien

Bezeichnung der Zelllinie	Gewebe	Herkunft
HCT-116	humanes kolorektales Adenokarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Wesel
HCT-116 p53 ^{-/-}	HCT-116 Zellen, in denen durch homologe Rekombination beide p53 Allele inaktiviert wurden	Arbeitsgruppe Dr. B. Vogelstein (Baltimore, USA)

HCT-15	humanes kolorektales Adenokarzinom	DSMZ, Braunschweig
HCA-7	humanes kolorektales Adenokarzinom	European collection of cell cultures (ECACC), Wiltshire, England.
HeLa	humanes Zervixkarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Wesel

2.1.10 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Die Lösungen wurden mit Wasser, welches über eine Milli-Q-Anlage aufgereinigt wurde, angesetzt und wenn nötig autoklaviert oder sterilfiltriert. Für Versuche mit RNA wurde das Wasser zusätzlich mit 0,1 % DEPC versetzt und autoklaviert.

Nährmedien für Bakterien

LB (Luria Bertani)-Medium	20 g LB Broth Base ad 1 Liter Aqua purificata
LB-Ampicillin-Medium	LB-Medium 50 µg/ml Ampicillin
LB-Ampicillin-Platten	32 g LB Agar 50 µg/ml Ampicillin ad 1 Liter Aqua purificata

Das Ampicillin wurde nach dem Autoklavieren beigelegt (Endkonzentration 50 µg/ml).

Nährmedium für eukaryontische Zellen

<u>Zellen</u>	<u>Medium</u>
HCA-7	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 200 mM L-Glutamine
HCT-116	McCoy's 5 A (mit Glutamax-1, ohne Serum)
HCT-15	RPMI-1640 Medium (mit Glutamax-1)

Jedem Medium wurde 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Das Medium der HCT-116 p53^{-/-} Zellen enthielt zusätzlich 0,75 mg/ml Geneticinsulfat (G418) und 150 µg/ml Zeocin.

Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	in H ₂ O gelöst Endkonzentration 50 mg/ml
Antikörper-Puffer für Wester blot	5 % Magermilchpulver in PBST
Blocking-Puffer für Western-Blot	5 % Magermilchpulver in PBS-Puffer oder Odyssey-Blocking-Puffer (LICOR Biosciences, Bad Homburg)
Bradford-Reagenz	0,01 % Coomassie brilliant blue G 250 5 % Ethanol 10 % Phosphorsäure 85 %
DEPC-H ₂ O	0,1 % Diethylpyrocarbonat in 1 Liter Aqua purificata
6x DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau
EDTA	0,5 M EDTA
Einfriermedium für eukaryontische Zellen	jeweiliges Kulturmedium 20 % FCS 10 % DMSO bei 4 °C aufbewahrt
Elektrophoresepuffer für SDS-Page	25 mM Tris-Base 0,2 M Glycin 0,1 % SDS pH 8,3

Homogenisierungs-Medium	0,1 M Kpi-Puffer, pH 7,4 0,25 M Sucrose 2,5 mM Glutathion 1 x Complete™*
Kpi-Puffer	19 % (v/v) 0,2 M KH ₂ PO ₄ 81 % (v/v) 0,2 M K ₂ HPO ₄ , pH 7,4
Lämmli-puffer (4 fach)	1,0 g SDS 0,24 g Tris 0,1 g Bromphenolblau 4 ml Glycerol ad 10 ml Aqua purificata, pH 6,8 20 % β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
10x MOPS	50 mM NaAc 10 mM EDTA 200 mM MOPS
N3 für Plasmid Mini-Präparation	3 M KAc-HAc, pH 5,5
P1 für Plasmid Mini/Midi-Präparation	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 µg/ml RNase 10 mM EDTA
P2 für Plasmid Mini/Midi-Präparation	200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)
P3 für Plasmid Midi-Präparation	3 M KAc-HAc, pH 5,5
PBS-Puffer	10 g Natriumchlorid 0,25 g Kaliumchlorid 1,77 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,25 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1 Liter Aqua dest.

PBST	10 g Natriumchlorid 0,25 g Kaliumchlorid 1,77 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,25 g Kaliumdihydrogenphosphat 0,1 % Tween 20 ad 1 Liter Aqua dest.
Ponceau-Lösung	3 % Trichloressigsäure 0,1 % Ponceau S
QBT Puffer für Plasmid Midi-Präparation	600 mM NaCl 100 mM Natriumacetat 0,15 mM TritonX-100, pH 5,0
QC Puffer für Plasmid Midi-Präparation	800 mM NaCl 100 mM Natriumacetat, pH 5,0
QF Puffer für Plasmid Midi-Präparation	1,25 M NaCl 100 mM Tris. pH 8,5
RW1 für RNA-Präparation	3 M KAc-HAc, pH 5,5
SDS-Probenpuffer (4 fach) für SDS-Page	0,2 M Tris-HCl (pH 6,8) 10 % SDS 0,004 % Bromphenolblau 40 % Glycerol 20 % 2-Mercaptoethanol
STET-Puffer	8 % Saccharose 0,1 % Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Stopplösung für mPGS-1 Aktivitätstest	40 mM FeCl ₂ 80 mM Zitronensäure

5x TBE-Puffer	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,2
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
Transferpuffer für Western-Blot	39 mM Glycin 48 mM Tris-Base 0,037 % SDS 20 % Methanol
TFB 1 Lösung (für Herstellung kompetenter Zellen)	100 mM Rubidiumchlorid 50 mM Manganchlorid 50 mM Calciumchlorid 15 % Glycerin pH 5,8 sterilfiltriert
TFB 2 Lösung (für Herstellung kompetenter Zellen)	10 mM MOPS 10 mM Rubidiumchlorid 75 mM Calciumchlorid 15 % Glycerin pH 6,8 sterilfiltriert
Ultraschallpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,5) 1 mM EDTA 1 mM 2-Mercaptoethanol 5 % Glycin 1 mM PMSF 3 mM DTT
Waschpuffer für Western-Blot	0,3 % Tween [®] 20 in PBS-Puffer

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

2.2 Methoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wurden, sofern nicht anders vermerkt, nach Protokollen von Ausubel et al. (1987) und Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.2.1 Zellkultur

Die eukaryontische Zelllinien wurden in einem Heraeus Hera Cell Inkubator (Kendro products, Hanau) bei 37 °C, einem CO₂ Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Alle Arbeiten wurden an der Sterilbank durchgeführt, Verbrauchsmaterialien und Medien waren steril verpackt, Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert.

2.2.1.1 Passagieren von eukaryontischen Zellen

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärent wachsende Zellen, die in sterilen Kulturflaschen und dem jeweiligen Medium kultiviert wurden. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit sterilem PBS Dulbecco's gewaschen, mit Trypsin-EDTA vom Boden der Flasche gelöst und in geringerer Dichte neu ausplattiert. Die Medien, das PBS und die Trypsinlösung wurden hierfür vorher auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Um die Zellen vom Trypsin zu befreien, wurden sie in 5 ml Medium aufgenommen, bei 300 g für 3 min abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und in gewünschter Zellzahl für die weitere Kultivierung in einer neuen Zellkulturflasche oder für die Versuche auf Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Trypsinisierte und abzentrifugierte Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen, und 20 µl der Zellsuspension wurde mit 20 µl Trypanblau (0,18 %) vermischt. Mit dieser Methode kann die Lebendzellzahl bestimmt werden, da sich das Trypanblau an Proteinstrukturen des Zytoplasmas anlagert und daher nur in Zellen mit permeabler Zellmembran eindringen kann. Somit färbt es die toten Zellen blau. Die Anzahl der lebenden Zellen konnte mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Zellzahl pro ml Medium bestimmen werden.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert}_{\text{Zellen}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Konstante} (1 \times 10^4)$$

Mittelwert_{Zellen} : Mittelwert der gezählten Zellen in den vier großen Quadraten

Verdünnungsfaktor : Verdünnung mit Trypanblau = Faktor 2

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Die Zellen wurden zum Einfrieren wie vorher beschrieben trypsinisiert und die erhaltene Zellsuspension durch Zentrifugieren vom Trypsin befreit. Das Zellpellet wurde in kaltem (4 °C) Einfriermedium (2.1.10) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellzahl betrug pro Röhrchen ca. 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium. Die Zellen wurden langsam eingefroren, indem sie zuerst 10-15 min auf Eis inkubiert und dann bei -80 °C für 2-3 Tage gelagert wurden. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in den Kryoröhrchen schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort in 5 ml Medium überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 300 g für 3 min vom Einfriermedium und somit vom DMSO befreit, in frischem Medium aufgenommen und in einer kleinen Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.2 Klonierung von humaner COX-2 cDNA in den pIND Vektor

2.2.2.1 Herstellung von chemo-kompetenten Zellen

Da Bakterien Fremd-DNA nur ineffektiv aufnehmen, wurde die Permeabilität der Zellwände von *E. coli* erhöht. Hierfür wurde die Zellmembran mit bivalenten Kationen in Kälte behandelt (Cohen et al., 1972). Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 1 ml einer Übernacht-Kultur von *E. coli* (DH5 α) in 100 ml LB Medium gegeben und so lange bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 erreicht hatten. Die Bakterien wurden zu je 50 ml aliquotiert, 15 min auf Eis inkubiert und dann bei 2500 rpm und 4 °C für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in je 16 ml eiskaltem Transformationspuffer 1 (TFB 1) aufgenommen und in dem Puffer für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert und in je 4 ml eiskaltem Transformationspuffer 2 (TFB 2) aufgenommen. Nach Transformationspuffer 2 Zugabe wurden die Bakterien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA erfolgt mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen vom Typ II und diente zur Isolierung der humanen COX-2 cDNA aus dem pcDNA3 Vektor (2.1.8), der Linearisierung des pIND Vektors für die Ligation mit der humanen COX-2 cDNA und zur Überprüfung der Klonierung. Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren kurze, spezifische Nukleotidsequenzen von

doppelsträngiger DNA (4-8 bp) (Smith et al., 1970). Die dabei entstehenden Enden können, je nach Endonuklease, 3'- bzw. 5'- überhängend (*sticky ends*) oder glatt (*blunt ends*) sein.

Um die Enzymaktivität nicht zu beeinflussen, wurde darauf geachtet, dass die DNA keine organischen Lösungsmittel mehr enthielt und die Salzkonzentration der gelösten DNA gering war. Außerdem wurde max. nur 1/10 Volumen Enzym eingesetzt, da in der Enzymlösung Glycerin enthalten ist und ein zu hoher Glycingehalt die Kapazität des Enzyms erheblich vermindert. Zur Isolierung der humanen COX-2 cDNA aus dem pcDNA3 Vektor und zum Linearisieren des pIND Vektors wurden die Enzyme BamHI und XbaI verwendet, die optimale Temperatur für die Restriktionsspaltung betrug 37 °C.

2.2.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Kontrolle der Restriktion und zur gleichzeitigen Aufreinigung der DNA nach der Restriktionsspaltung wurden beide Restriktionsansätze mit Hilfe eines Agarosegels (2.2.6.1) elektrophoretisch aufgetrennt, die Anzahl und Höhe der DNA-Fragmente kontrolliert und die Bande des linearisierten pIND Vektors und der aus dem pcDNA3 Vektor isolierten humanen COX-2 cDNA mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch Gelextraktion mit dem QIAquick Gel Extraktion System. Das Protokoll basiert auf der selektiven Bindung der DNA an eine Silicagel-Membran (QIAquick Säule) in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und dem pH-Wert (optimale Bindung bei hoher Salzkonzentration und einem $\text{pH} \leq 7,5$).

Nach dem Ausschneiden der Banden aus dem Gel wurden diese in 300 µl Puffer QG (hohe Salzkonzentration) je 100 mg Gel aufgenommen. Dann wurde das jeweilige Gelstück für 10 min bei 50 °C unter leichtem Schütteln bis zu seiner Lösung inkubiert. Durch Zugabe der Lösung auf eine QIAquick Säule und Zentrifugation bei 10.000 g für 1 min wurde die DNA an die Silicagel-Membran gebunden. Mit Puffer QG wurden die Agarosereste von der Säule entfernt, dann wurde die Säule mit Puffer PE gewaschen, um die Salzkonzentration zu erniedrigen. Nach jedem Waschschrift wurde kurz bei 10.000 g zentrifugiert und der Durchfluß gründlich entfernt. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl sterilem Wasser eluiert (10.000 g, 1 min) und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 Ligation von DNA

Nach der Restriktion und Aufreinigung werden Vektor und Insert miteinander legiert.

Da bei einer Ligation das Verhältnis Vektor zu Insert ungefähr 1:3 betragen sollte, wurde je 1 µl der aufgereinigten Ansätze (Vektor und Insert) vor der Ligation auf einem Agarosegel aufgetragen und somit die Konzentrationen der aufgereinigten DNA miteinander verglichen. Die Ligation wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

Ansatz: x µl Insert (hCOX-2 cDNA)
 x µl pIND Vektor
 1 µl 10x Ligase Puffer

1 µl T4-DNA-Ligase (3 U)
ad 10 µl (mit H₂O)

Zur Kontrolle wurde ein Ansatz nur mit Vektor aber ohne Insert angesetzt.

2.2.2.5 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Bei der Transformation wird Fremd-DNA (hier Vektor mit Insert) in kompetente Bakterien (DH5α, 2.2.2.1) eingeschleust. Die Transformation wurde nach einer Methode von Hanahan durchgeführt (Hanahan, 1983). Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut (ca. 150 µl Aliquot) und zu dem jeweiligen Ligationsansatz (10 µl Ansatz) gegeben. Nach einer Inkubation auf Eis von 30 min wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt (2 min bei 42 °C) und schließlich für weitere 5 min wieder auf Eis gestellt. Danach wurde 1 ml auf 37 °C erwärmtes LB-Medium auf den Ligations/Bakterien-Ansatz gegeben und 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Es wurden ca. 100-150 µl jedes Ansatzes auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.6 Anzucht von Bakterien und Lagerung

Die Aufzucht der *E. coli* Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Zur Selektion positiver Bakterien, die das gewünschte Plasmid mit einem bestimmten Resistenzgen tragen, wurde den Agarplatten und dem Flüssigmedium das jeweilige Antibiotikum beigefügt. Einzelne Kolonien von frisch auf Agarplatten ausgestrichenen Bakterien wurden in Vorkulturen (2 ml) angeimpft und über mehrere Stunden bei 37 °C und 250 rpm im Luftschüttler inkubiert. Von diesen Vorkulturen wurden schließlich Flüssigkulturen von 100-500 ml angesetzt. Diese wurden in großen Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37 °C geschüttelt und z.B. für Plasmid-Präparationen verwendet.

Von positiven Kolonien, die das gewünschte Plasmid enthielten, wurde ein Glycerinstock angelegt. Hierfür wurde von der Übernachtskultur 800 µl in ein Eppendorf-Cup überführt und mit 250 µl Glycerin versetzt. Der Glycerinstock wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Nach Transformation mit dem Plasmid wurden die *E. coli* Bakterien auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und wuchsen über Nacht bei 37 °C. Die durch das Antibiotikum selektionierten Einzelkolonien wurden abgeimpft und über Nacht bei 37 °C in LB-Ampicillin-Medium geschüttelt. Diese Übernachtskulturen wurden für die Plasmid-Isolierung verwendet.

2.2.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für die schnelle Überprüfung von rekombinanten *E. coli*-Klonen ist eine geringe Menge an Plasmid-DNA ausreichend. Durchgeführt wurde eine Plasmid-Präparation nach der CTAB-Methode (Del Sal et al., 1988), mit dem eine Plasmid-DNA Qualität erreicht wird, die für Restriktionsanalysen ausreichend ist.

2 ml der *E. coli* Übernacht-Kultur wurden für 1 min bei 10.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, und das Zellpellet wurde in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (50 mg/ml) und einer Inkubation von 5 min wurde das Lysat für 45 sec auf 95 °C erhitzt, um bakterielle Proteine und hochmolekulare DNA zu denaturieren. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Eppendorftube überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 10 µl einer 5 %igen Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Lösung gefällt. Nach Zentrifugation für 5 min wurde die DNA in 300 µl 1,2 M NaCl gelöst und mit 750 µl Ethanol präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE Puffer aufgenommen.

2.2.3.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen Mini-Kit)

Die positiven Bakterien-Kolonien, die nach der DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und anschließender Gelelektrophorese das Plasmid enthielten, wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Hierfür wurde eine Plasmid-Präparation mit dem QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt, mit dem eine Plasmid-DNA Qualität erreicht wird, die für Sequenzanalysen ausreichend ist. Das Verfahren zur DNA-Isolierung aus Bakterien basiert auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse (Birnboim et al., 1979) und der Bindung der DNA an eine Silicagel-Membran (QIAprep spin Säule) in Abhängigkeit von der Salzkonzentration (optimale Bindung bei hoher Salzkonzentration). Die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer ist, soweit sie vom Hersteller bekannt gegeben wird, unter 2.1.10 angegeben. Einzelne *E. coli* Kolonien wurden in LB-Medium über Nacht bei 37 °C hochgezogen, dem Medium wurde dabei das zur Selektion der transformierten *E. coli* Kolonien verwendete Antibiotikum zugegeben. Die Kulturen wurden bei 4 °C durch Zentrifugation (20 min, 3000 g) pelletiert und anschließend die Plasmidaufreinigung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA wird durch eine Midi-Präparation erzielt. Für die Transfektion des hCOX-2 pIND-Plasmids in humane Tumorzellen wurde die Plasmid-DNA aus einem positiven Bakterienklon (getestet mit Hilfe einer Restriktionsanalyse und Sequenzierung des Inserts) mittels Plasmid Midi-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer ist, soweit sie vom Hersteller bekannt gegeben wird, unter 2.1.10 angegeben. Das Prinzip zur DNA-

Isolierung basiert auch hier auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse (Birnboim et al., 1979) und dem anschließendem Binden der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschermatrix unter Niedrigsalzbedingungen. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA unter Hochsalzbedingungen wieder von der Matrix eluiert.

2.2.4 Isolierung von RNA

2.2.4.1 RNA-Isolierung aus Tumorzellen

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei RT durchgeführt, und es wurde RNase frei gearbeitet. Die RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) basiert wie die Präparation von Plasmid-DNA auf Bindung an eine Silicagel-Membran (RNeasy mini spin Säule) in Abhängigkeit von der Salzkonzentration, wobei eine optimale Bindung bei hoher Salzkonzentration erreicht wird.

HCT-116 und HCT-15 Tumorzellen wurden geerntet und in Lyse Puffer (RLT Puffer) aufgenommen. Das Lysat wurde für 10 min bei 5000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Bindung der RNA an die Säulenmembran zu optimieren, wurde dem Lysat 70 % Ethanol zugegeben. Dann wurde das homogenisierte Lysat auf eine „RNeasy mini spin“ Säule gegeben und bei 5000 g für 5 min zentrifugiert, um so die RNA an die Säulenmembran (Silicagel Membran) zu binden. Die Säule wurde mit RW1 Puffer gewaschen und anschließend die RNA mit DNase I für 15 min bei RT behandelt. Für den DNase Verdau wurde vorher 20 µl der DNase I Stocklösung aus dem „RNase-Free DNase Set“ mit 140 µl RDD Puffer durch vorsichtiges Schwenken gemischt und danach auf die Säule gegeben. Die DNase wurde durch Waschen mit RW1 Puffer von der Säulenmembran entfernt und die Säule mit RPE Puffer zweimal gewaschen. Danach wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarosegele unterschiedlicher Konzentration verwendet. Die Konzentration richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Ausgenutzt wird bei diesem Verfahren, dass die DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in einem elektrischen Feld zur Anode wandert. Da das Verhältnis zwischen Ladung und Masse der DNA-Moleküle bei jeder Molekülgröße konstant ist, kann in einer reinen Pufferlösung keine Auftrennung erfolgen. Um eine Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe zu erreichen, wurde eine Gelmatrix aus Agarose hergestellt. Gelöste Agarose bildet nach dem Abkühlen ein Netzwerk aus Zuckerketten, das je nach Agarosekonzentration fein- oder grobmaschiger ist. So wird je nach aufzutrennender Fragmentgröße die Konzentration des Agarosegels festgelegt (McDonnell et al., 1977).

<u>Konzentration [% w/v]</u>	<u>aufzutrennendes Fragment [kb]</u>
0,3	5,0-60
0,6	1,0-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Nicht nur die Größe eines Moleküls beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Gelmatrix, sondern auch dessen Konformation.

Das Agarosegel wurde mit 0,5x TBE angesetzt und mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid (interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht) versetzt. Als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls 0,5x TBE. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Laufpuffer versehen, dessen Farbstoffe in unterschiedlichen Höhen laufen. In einem 1%igen Agarosegel entspricht Bromphenolblau dem Laufverhalten eines 0,3 kb langen dsDNA-Fragments, Xylencyanol dem eines 4,0 kb langen dsDNA-Fragments. Die Zugabe von unterschiedlichen Farbstoffen dient während des Gellaufs der Kontrolle der Geschwindigkeit, mit dem die DNA-Moleküle das Gel durchlaufen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel bei kurzweiligem UV-Licht fotografiert.

2.2.5.2 Denaturierendes RNA Formaldehyd-Agarosegel

Um die in 2.2.8 beschriebene Transfektion von pIND-hCOX-2 und dem dazugehörigen pVgRXR Vektor in die HCT-116 und HCT-15 Tumorzellen zu kontrollieren, wurden die transfizierten Zellklone nach Stimulation geerntet, die RNA isoliert und eine RT-PCR mit spezifischen hCOX-2 Primern durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte mit Hilfe eines Formaldehyd-Agarosegels. Für ein RNA-Gel (200 ml) wurden 2g Agarose in 148 ml DEPC-H₂O und 20 ml 10x MOPS durch Aufkochen gelöst. Nach der Abkühlung der Mischung wurden 33,2 ml Formaldehyd (37 %) hinzugefügt und das Gel gegossen. Als Laufpuffer wurde 1xMOPS verwendet, der mit DEPC-H₂O angesetzt wurde. Die RNA-Proben wurden mit Proben-Puffer (je 2 µl Puffer pro 1 µl RNA-Lösung) versetzt, bei 65 °C denaturiert und anschließend mit 6 µl Ladebuffer auf das Gel aufgetragen.

2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode, DNA *in vitro* enzymatisch zu amplifizieren (Mullis et al., Mullis und Faloona, 1987, Saiki et al., 1988). Hierfür werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer benötigt, von dem einer komplementär zum

kodierenden, der andere komplementär zum kodogenen DNA-Strang ist. Zu der zu amplifizierenden DNA und den Primern wird eine hitzestabile DNA-Polymerase gegeben. In der PCR wird die doppelsträngige DNA zuerst denaturiert, dann binden die Primer an den jeweiligen Strang der zu amplifizierenden DNA (Annealing). Für die folgende Polymerisation (vom 5'-zum 3'-Ende) durch das Enzym werden Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt (Elongation). Dieser Zyklus wird mehrere Male wiederholt, wobei jeder neusynthetisierte Strang wieder als Matrize fungiert.

2.2.6.1 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

(Myers et al., 1991)

Für die RT-PCR wird die Eigenschaft der reversen Transkriptase genutzt, die einzelsträngige mRNA als Matrize zu verwenden und von dieser eine DNA-Kopie herzustellen. Diese cDNA (complementary DNA) dient wiederum als Matrize in der dann folgenden PCR-Reaktion.

Es wurde der OneStep RT-PCR Kit der Firma Qiagen verwendet, dessen Enzym-Mix neben der reversen Transkriptase eine HotStart-Taq DNA-Polymerase enthält. Die RT-PCR wurde an Gesamt-RNA durchgeführt, die aus den mit pIND-hCOX-2 und pVgRXR transfizierten Zellen extrahiert wurde (2.2.4.1) und diente zur Kontrolle der Transfektion.

RT-PCR Anatz: 0,5 µg RNA
 5 µl 5xRT-PCR Puffer
 1 µl dNTPs (10 pmol)
 1,5 µl Primer Fwd.
 1,5 µl Primer Rev.
 1 µl EnzymMix
 Ad 25 µl (DEPC-H₂O)

<u>Standard-Programm:</u>	30 min	50°C	(Reverse Transkriptase Reaktion)	
	15 min	95°C	(RT wird inaktiviert)	
	1 min	94°C	(Denaturierung)	} x 35
	1 min	50-68°C	(Annealing)	
	1 min	72°C	(Extension)	
	10 min	72°C	(Final Extension)	
	Store at 4°C			

2.2.7 Stabile Transfektion von Plasmiden in eukaryontischen Zellen

2.2.7.1 Das Ecdyson/Ponasteron-induzierbare Transfektionssystem

Das Ecdyson/Ponasteron-induzierbare Transfektionssystem ermöglicht eine induzierbare Gentranskription, die sich durch Zugabe des Ecdysonanalogon Ponasteron A regulieren lässt. Dabei wird ausgenutzt, dass das aus *Drosophila Melanogaster* isolierte Insektenhormon Ecdyson nicht in Säugetierzellen vorkommt und somit keine unspezifische Bindung zu Säugetierzellrezeptoren auftritt. Verwendet werden zwei Vektoren, der Expressionsvektor pIND und der pVgRXR Vektor (Anhang A).

Für die Klonierung der humanen COX-2 (hCOX-2) cDNA in den pIND Expressionsvektor wurde die cDNA mit Restriktionsendonukleasen aus dem pcDNA3 Vektor heraus geschnitten (Konstrukt hCOX-2-pcDNA3; 2.1.8 und Anhang B), aufgereinigt und in den linearisierten Expressionsvektor ligiert (Konstrukt pIND-hCOX-2; Anhang B). Der zweite Vektor (pVgRXR) koexprimiert konstitutiv die zwei Untereinheiten des modifizierten *Drosophila* Ecdyson Hormon Rezeptors (VgEcR und RXR) Diese enthalten DNA-bindende Domänen und binden als Heterodimer an speziell hergestellte cis-regulatorische Elemente (E/GRE) im pIND Vektor. Für die Bildung des Heterodimers wird Ponasteron A benötigt (Abbildung 2.1). Die Zugabe des Insektenhormon-Analogon führt zur Bindung des Dimers an die Bindestellen des Expressionsvektors und zur Aktivierung des Promotors, der für die Transkription des in den pIND Vektors klonierten Gens (hCOX-2) verantwortlich ist.

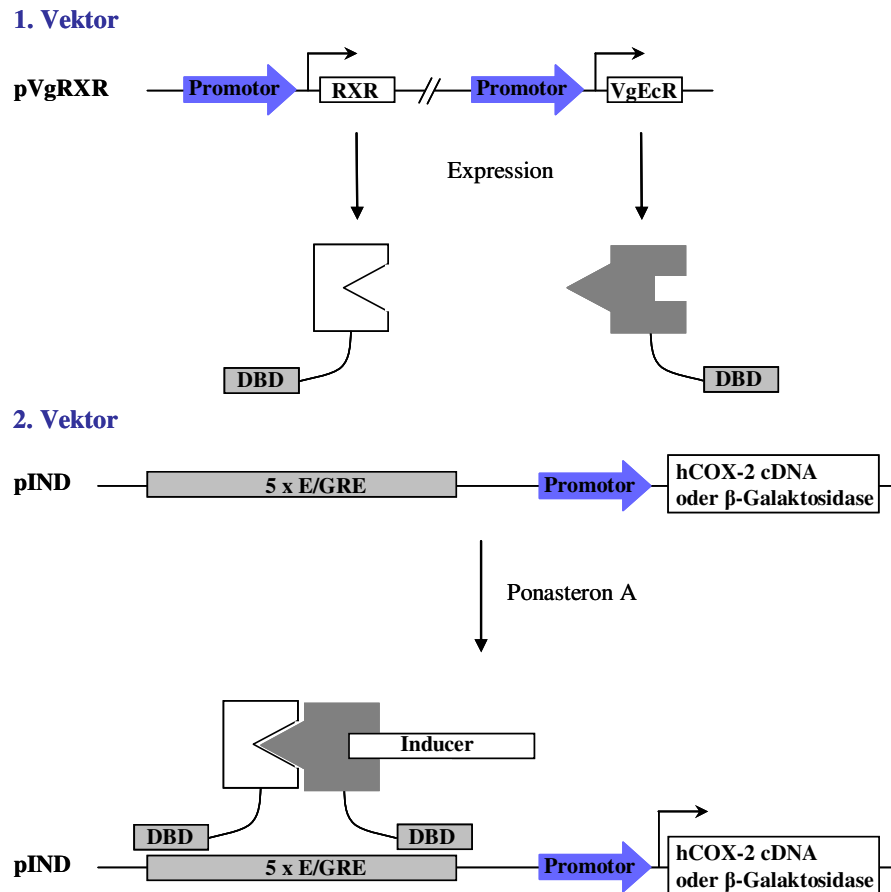


Abbildung 2.1: Schema des Ecdyson-induzierten Transfektionssystems (Invitrogen, Karlsruhe). Das gewünschte Gen wird in den Expressionsvektor (**pIND**) inkloniert, der Ecdyson/Glucocorticoid-Erkennungssequenzen besitzt. Der **pVgRXR** Vektor exprimiert einen modifizierten Ecdyson-Rezeptor (**VgEcR**) und einen Retinoid X-Rezeptor (**RXR**). Diese bilden nach Ponasteronzugabe ein Heterodimer und binden an die Ecdyson/Glucocorticoid-Bindestelle (**E/GRE**) im **pIND** Vektor. Dies führt zur Aktivierung des Promotors und zur Transkription des inklonierten Gens. **DBD**, DNA Bindedomäne; **Inducer**, Ponasteron A.

2.2.7.2 Antibiotikasensitivität

Die beiden Vektoren **pIND** und **pVgRXR** tragen unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene, die für die Selektionierung der transfizierten Zellen verwendet werden. G418 ist ein Aminoglykosid, das die Proteinsynthese hemmt, indem es mit den Ribosomen-Untereinheiten interferiert. Zeocin, ein Bleomycin-Antibiotikum, interkaliert mit der DNA von Eukaryoten, was zur DNA-Restriktion führt. Somit ließen sich die mit dem **pVgRXR** Vektor transfizierten Zellen durch ihre Zeocin-Resistenz, die mit beiden Vektoren transfizierten Zellen durch ihre Resistenz gegen Zeocin und G418 von den untransfizierten Zellen unterscheiden.

2.2.7.3 Transfektion durch Lipofektion

Die Transfektion von HCT-116 und HCT-15 Tumorzellen mit **pVgRXR** und dem Expressionsvektor **pIND-hCOX-2** wurde mit dem nicht-liposomalen FuGENE[®] 6 Transfektionsreagenz (Roche

Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine durch kationische Lipide vermittelte Transfektion (Fraley et al., 1980). Das Transfektionsreagenz ist eine Mischung von Lipiden und anderen Verbindungen in 80 % Ethanol. Da nicht nur die Art der Transfektion, sondern auch die eingesetzten DNA-Mengen eine Rolle bei der Transfektionseffizienz spielen, wurden drei Transfektionsansätze mit jeweils unterschiedlichem DNA/Transfektionsreagenz-Verhältnis verwendet. 5×10^5 HCT-116 oder HCT-15 Zellen wurden auf 5 ml Schalen ausplattiert und für 24 h bei 37 °C kultiviert. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem Medium. Die drei Transfektionsansätze wurden für 45 min bei RT inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden:

1. Ansatz: 100 µl serumfreies Medium + 3 µl FuGENE Reagenz + 1 µg Plasmid-DNA
2. Ansatz: 100 µl serumfreies Medium + 3 µl FuGENE Reagenz + 1,5 µg Plasmid-DNA
3. Ansatz: 100 µl serumfreies Medium + 3 µl FuGENE Reagenz + 2 µg Plasmid-DNA

Das Medium der zur Transfektion vorgesehenen Tumorzellen wurde abgenommen und durch 4 ml serumfreies Medium ersetzt. 6 Stunden nach Zugabe der Transfektionsansätze wurde das Medium gewechselt und durch Medium mit Serum ersetzt. Die Zellen wurden für 3-4 Tage bei 37 °C im Brutschrank kultiviert, bis die Schalen eine Konfluenz von ca. 80 % besaßen. Dann wurden die Zellen abtrypsinisiert und auf neue Schalen in den Verdünnungen 1:4 und 1:8 ausplattiert. Zum Selektionieren wurde das jeweilige Antibiotikum zugegeben. Nach 10 Tagen starben die Zellen ohne Plasmid ab, die positiven, adhären wachsenden Zellklone wurden auf 24 Well-Platten überführt und unter Antibiotikum weiter kultiviert, bis die einzelnen Wells zu 80 % bewachsen waren. Danach wurden die jeweiligen positiven Zellklone auf 5 ml Schalen hochgezogen, bis genug Zellen vorhanden waren zum Einfrieren (2.2.1.3) und zum Austesten, ob die jeweiligen Zellklone das Plasmid enthielten (2.2.7.3). Um Zellen zu erhalten, die beide Plasmide trugen, wurden diese zuerst mit dem pVgRXR-Vektor wie oben beschrieben transfiziert. Die selektionierten Zellklone wurden dann für eine Transfektion mit dem pIND-hCOX-2-Vektor verwendet.

Die Transfektion wurde mit einem zweiten liposomalen Transfektionsreagenz der Firma Promega (TfxTM-50 Reagent) wiederholt, einer Mischung aus L-Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) und kationischem Lipidmolekül.

2.2.7.4 Überprüfung der Transfektion mit pVgRXR

Die Effizienz der ersten Transfektion mit dem Vektor pVgRXR wurde mit Hilfe eines Kontrollvektors (pIND/lacZ) getestet, der wie der pIND Vektor aufgebaut ist, aber in der Klonierungsstelle das für die β -Galaktosidase kodierende lacZ-Gen trägt. Nach der Transfektion mit pVgRXR und der Selektion mit Zeocin wurden die Zellklone mit dem Kontrollvektor transient transfiziert. So konnte mit Hilfe eines β -Galaktosidase Assays (2.2.9.1) getestet werden, ob die Zellklone den gewünschten pVgRXR Vektor enthielten. Klone, die den pVgRXR Vektor trugen und transient mit dem pIND/lacZ Vektor transfiziert wurden, ließen sich durch Ponasterongabe (5 µM) stimulieren und exprimierten

β -Galaktosidase. Diese positiven Klone wurden für die Transfektion mit dem Expressionsvektor pIND-hCOX-2 verwendet.

2.2.7.5 Induktion durch Ponasteron A Zugabe

Die mit beiden Vektoren stabil transfizierten Zellklone wurden auf 5 ml Schalen ausplattiert und für 24 h bei 37 °C in Medium mit Zeozin und G418 kultiviert. Dann erfolgte die Induktion der humanen COX-2 Expression durch Zugabe von 5 μ M Ponasteron A. Als Positivkontrolle wurden die Zellen nur mit dem Vehikel (95 % Ethanol) behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die Proteine aus den Zellen isoliert (2.2.10.1) und die Proben auf humane COX-2 Expression mittels Western-Blot Analyse (2.2.10.6) getestet. Um die Expression auf RNA Ebene zu überprüfen, wurde die Gesamt RNA isoliert (2.2.4.1) und eine RT-PCR (2.2.7) mit Primern für die humane COX-2 cDNA (2.1.7) durchgeführt.

2.2.8 Enzymimmunoassay (EIA)

2.2.8.1 β -Galaktosidase Assay

Von den mit dem pIND/lacZ Vektor transient transfizierten Zellen wurde nach Ponasteron A Zugabe das Zelllysate gewonnen und für den β -Galaktosidase-ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Dieser Assay basiert auf einem Sandwich-Prinzip, bei dem die β -Galaktosidase an Dioxigenin-gekoppelte Antikörper gebunden wird. Nach der Bindung werden die Proben mit einem Dioxigenin-Antikörper inkubiert, der an eine Peroxidase gekoppelt ist. Nach Zugabe des Peroxidase-Substrats ABTS wird dieses durch Peroxidase umgesetzt, der dabei entstehende Farbumschwung wird bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader (SpectraFluor Plus[®]-Instrument) gemessen. Der β -Galaktosidase-Standard wurde zwischen 1250 und 78 pg/ml gewählt.

Die transfizierten und mit Ponasteron A aktivierten Zellen (2.2.8.3) wurden geerntet und lysiert. 200 μ l Zelllysate pro Probe wurde in ein Well einer 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert, die mit β -Galaktosidase Antikörper beschichtet war. Die in den Zellen vorhandene β -Galaktosidase wurde an die Antikörper und somit an die Well-Oberfläche gebunden. Dann wurde eine Lösung mit Digoxigenin-gekoppelten β -Galaktosidase Antikörper (200 μ l) zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach Bindung der Digoxigenin-gekoppelten Antikörper an die β -Galaktosidase wurde jedes Well mit einem mit Peroxidase gebundenen Dioxigenin-Antikörper (200 μ l) für eine weitere Stunde inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Substrat und Inkubation, bis die grüne Färbung eintrat. Die Absorption wurde bei 405 nm und einer Referenz von 490 nm gemessen.

2.2.8.2 PGE₂-Enzymimmunoassay

Mit einem PGE₂ Correlate EIA[™]-Kit von Assay Designs Inc (Ann Arbor, USA) wurde die Konzentration von Prostaglandin E₂ (PGE₂) im Zellmedium bestimmt. Bei diesem Assay ist anti-

Maus-IgG adsorptiv an die Well-Wände der Mikrotiterplatte gebunden. Durch Zugabe von den Mediumproben (100 μ l), Peroxidase-gekoppeltes PGE₂ (50 μ l) und anti-PGE₂ (50 μ l) kommt es zu einer Konkurrenz von Peroxidase-gekoppeltem und ungekoppeltem PGE₂ um den Antikörper. Je größer die Menge an ungekoppeltem PGE₂ ist, desto weniger wird das Peroxidase-gekoppelte PGE₂ an anti-PGE₂ gebunden. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei RT erfolgte die Zugabe des Peroxidasesubstrats (200 μ l). Nach 45 min wurde die Reaktion abgestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen, um so die Menge an umgesetztem Substrat zu bestimmen. Der PGE₂-Standard wurde zwischen 2500 und 39,1 pg/ml gewählt.

2.2.9 Proliferations-Assays

2.2.9.1 Koloniebildungs-Assay

Es wurden 500-600 Zellen pro 5 ml Schalen ausplattiert. Nach einer Kultivierung von 16 h wurde das Medium ausgetauscht und die Schalen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-1000 μ M) S- oder R-Ibuprofen behandelt. Nach einer Inkubation von 11 Tagen wurde das Medium abgenommen, die Schalen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 100 % Methanol fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Giesma-Kristallviolettlösung angefärbt. Die Anzahl der gebildeten Kolonien pro Schale wurde mit der Quantity-Software von Bio-Rad ausgewertet und so die Zell-Überlebensrate für die jeweiligen eingesetzten Ibuprofen Konzentrationen bestimmt. Dabei wurde die Anzahl der Kolonien von unbehandelten Zellen (Kontrollen) als 100 % Überlebensrate definiert und die Zahl der Kolonien in den behandelten Schalen prozentual zu den Kontrollen in Relation gesetzt.

2.2.9.2 Zellzahlbestimmung

Bei einem zweiten Proliferations-Assay wurde die Überlebensrate nach S- oder R-Ibuprofenbehandlung durch Zellzählung ermittelt.

5×10^4 Zellen wurden pro Schale ausplattiert und nach 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an S- und R-Ibuprofen (0-1000 μ M) behandelt. Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen Kultivierungsdauer erfolgte die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer (2.2.1.2). Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin vom Schalenboden gelöst, bei 300 g für 3 min abzentrifugiert und in frischem Medium zum Zählen aufgenommen. Die Zellzahl pro 1 ml Medium wurde ermittelt und die Überlebensrate in Prozent bestimmt. Dabei wurde die Zellzahl von unbehandelten Zellen als 100 % Überlebensrate definiert.

2.2.10 Durchflusszytometrie

Für die Zellzyklusanalyse wurde die Anzahl der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen mittels FACS-(fluorescence-activated cell sorter) Methode ermittelt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der Ethidiumbromid durch Interkalation an DNA bindet und somit über den Gehalt des Farbstoffes der DNA-Gehalt ermittelt wird. Der Gehalt an DNA gibt Aufschluß über die

Zellzyklusphase der Zelle. In der G₀/G₁ Phase besitzen die Zellen den einfachen diploiden DNA-Gehalt. Dieser nimmt bei Eintritt der Zelle von der G₁ in die Synthese Phase (S-Phase) zu. Zellen in der G₂ Phase besitzen den doppelten diploiden DNA-Gehalt. In der Mitose teilt sich dann die Zelle in Tochterzellen und geht wieder in die G₁ Phase. Zellen in Apoptose zeigen nur geringe Fluoreszenz (geringer DNA-Gehalt) im Durchflusszytometer (subG₁-Phase). Gemessen wird mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, Beckton Dickinson, Heidelberg), in dem die Fluoreszenz mit einem Laser angeregt und das von dem Farbstoff emittierte Licht detektiert wird. Die mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Zellen werden hintereinander an dem Laser vorbeigeführt (hydrodynamische Fokussierung). Das Licht des Lasers wird durch die vorbeifließende Zelle gestreut, und durch die Analyse des Streulichts erhält man zusätzlich Information über die Zellgröße (Vorwärtsstreuung) und Granularität (Seitwärtsstreuung). Die Daten wurden mit Hilfe der CellQuest 9.0 Software (Beckton Dickinson, Heidelberg) oder mit WinMDI 2.8 als zweidimensionalen Dot Blot oder als Histogramm dargestellt und ausgewertet.

5x10⁵ Zellen pro 10 ml Schale wurden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gegen Medium ohne Serum ausgetauscht und die Zellen für 24 h (HCA-7) oder 48 h (HCT-116 und HCT-15) gehungert, um diese in der G₁-Phase zu synchronisieren. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen S- oder R-Ibuprofen Konzentrationen in Medium mit Serum behandelt, mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit Trypsin vom Boden gelöst. Nach Zentrifugation bei 300 g für 3 min wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und unter Zugabe von 9 ml eiskaltem 80 % Ethanol bei -80 °C über Nacht fixiert. Die Zellen wurden durch zweimal Waschen mit PBS vom Ethanol befreit und mit PBS/0,125 % Triton-100 für 4 min auf Eis inkubiert, um die Zellwände zu permeabilisieren. Es folgte erneutes Waschen mit PBS, danach wurden die Zellen in Ethidiumbromid-Lösung aufgenommen, die 200 µg/ml RNase A enthält, und bei RT für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die RNase Behandlung wurde durchgeführt, um RNA zu entfernen, da Ethidiumbromid in doppelsträngiger DNA und RNA gleichermaßen eingebaut wird.

2.2.11 Proteinchemische Methoden

2.2.11.1 Gesamtproteinextraktion

Die in der Zellkultur auf Zellkulturschalen gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit einem Zellschaber geerntet. Die in PBS aufgenommenen Zellen wurden für 1 min bei 11.000 g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Ultraschallpuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) lysiert, und die Suspension erneut für 10 min bei 21.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.11.2 Extraktion zytosolischer Proteine

Die Zellen wurden wie bei der Gesamtproteinextraktion geerntet und nach der Zentrifugation (11.000 g und 4 °C) in 200 µl Zytosolextraktionspuffer resuspendiert. Um nur die Zellmembranen, nicht aber die Zellkerne oder die übrigen Organellen, aufzubrechen, wurden die Zellen statt mit Ultraschall mit einem dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation für 20 min bei 21.000 g und 4 °C wurde der Überstand mit den zytosolischen Proteinen in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.11.3 Extraktion mikrosomaler und mitochondrialer Proteine

Die Zellen wurden gewaschen, mit 5 ml PBS abgeschabt und bei 300 g und 4 °C für 3 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff kurz eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut (15 min), um die Zellmembran aufzubrechen. Dann wurden die Zellen in 700 µl Homogenisierungs-Medium (HM) resuspendiert und mittels Ultraschall (3 x 10 Sekunden, niedrige Stärke, keine Intervalle) lysiert. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 21.000 g und 4 °C wurde der Überstand (subzelluläre Fraktion) für die Extraktion der mikrosomalen Fraktion in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt, das Pellet mit der nuklearen und mitochondrialen Fraktion wurde für die Extraktion der mitochondrialen Proteine erneut in HM-Puffer resuspendiert.

Die subzelluläre Fraktion wurde bei 174.000 g für 1 Stunde und 4 °C ultrazentrifugiert und der Überstand (zytosolische Fraktion) verworfen. Das entstandene Pellet mit der mikrosomalen Fraktion wurde in 60 µl Homogenisierungs-Medium aufgenommen und die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

Zum Erhalt der mitochondrialen Fraktion wurde das Pellet mit der nuklearen und mitochondrialen Fraktion nach der Resuspendierung in HM-Puffer bei 1000 g für 15 Minuten und 4 °C zentrifugiert, um die Zellkerne von den Mitochondrien zu trennen. Es folgte eine erneute Zentrifugation des Überstandes bei 10.000 g für 10 Minuten. Das Pellet mit den mitochondrialen Proteinen wurde in 50 µl Homogenisierungs-Medium aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.2.11.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Durch Bindung des Coomassie Brilliant Blau G-250 Farbstoffs an die Proteine tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) ein. Die Menge an Protein wird durch Messen der Absorption bei 595 nm ermittelt. Als Proteinstandard wurde eine BSA-Lösung in den Konzentrationen 0, 1, 2, 3 und 4 µg/µl verwendet. Die Proteinproben wurden mit Aqua purificata 1:10 verdünnt und jeweils 10 µl der verdünnten Proteinlösungen auf eine 96-well Microtiter®-Platte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) überführt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm im ELISA-Reader (SpectraFluor Plus®-

Instrument). Anhand der Standard BSA-Lösung wurde eine Standardgerade erstellt und so die Proteinmenge der Proben bestimmt.

2.2.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse erfolgte mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach einer Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Die Protein-Proben wurden 1:4 mit SDS-Probenpuffer (4 fach Laemmlipuffer) verdünnt. Das anionische Detergenz SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) bindet an die kationischen Proteinreste und verleiht ihnen eine negative Überschussladung. Die Proteinproben wurden danach bei 95 °C für 5 min denaturiert (Thermomixer compact®, Eppendorf, Hamburg) und auf das Gel aufgetragen. Bei einer konstanten Spannung von 120 V wandern die Proteine aufgrund ihrer Ladung zur Anode, wobei ihr Laufverhalten allein von ihrer Größe abhängt.

Das Gel bestand aus einem grobporigen Sammelgel (pH 6,8) und einem feinporigen Trenngel (pH 8,8), wobei die Porengröße der Sammel- und Trenngele durch die Acrylamid-Konzentration bestimmt wurde (5 % Sammelgel, 10-15 % Trenngel). Für die Detektion der meisten Proteine wurden 12 %ige Trenngele verwendet. Bei Proteinen mit einer Molekülgröße über 75 kDa wurden 10 %ige Trenngele, bei kleinen Proteinen unter 40 kDa 15 %ige Trenngele gewählt. Verwendet wurde das vertikale Elektrophoresesystem Mini-Protean® 3 (Bio-Rad, München).

Sammelgel: 3 % Acrylamidlösung (rotiphorese® Gel 30, Roth, Karlsruhe)
 125 mM Tris-HCl (pH 6,8)
 0,1 % SDS
 0,05 % APS
 0,05 % TEMED

10 % iges Trenngel 10-15 % Acrylamidlösung (rotiphorese® Gel 30, Roth, Karlsruhe)
 375 mM Tris-HCl (pH 8,8)
 0,1 % SDS
 0,05 % APS und
 0,05 % TEMED

2.2.11.6 Western-Blot

Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Beim Western-Blot handelt es sich um ein Verfahren, bei dem man die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine (2.2.7) aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS elektrophoretisch von dem Trenngel auf eine Membran aus Nitrozellulose (BioTrace® NT, Pall, Dreieich) überträgt (Burnette, 1981). Dabei wird im Laufe des Transfers das SDS abgetrennt. Auf diese Weise erhält man

eine exakte Kopie des ursprünglichen Gels und kann diese zur Analyse von Proteinen durch Detektion mit spezifischen Antikörpern verwenden.

Gel, Membran und Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) wurden kurz in Transferpuffer äquilibriert, Gel und Membran übereinander gelegt und von beiden Seiten mit Whatman-Papier und je einem Schwamm bedeckt. So geschichtet erfolgte der elektrophoretische Transfer in einem Bio-Rad Blotting-System (MiniTransBlot[®], Bio-Rad, München) bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h. Bei diesem Blotting-System handelt es sich um eine Nasstransferkammer, die vollständig mit Transferpuffer gefüllt ist. Die Schichtung wird so in die Kammer gesetzt, dass die Proteine zur Anode hin auf die Membran transferiert werden. Die Effizienz des Transfers wurde mit Hilfe einer Ponceau-Färbung überprüft und die Membran für 1 h mit Blocking-Puffer bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Detektion durch spezifische Antikörper

Um Proteine auf den Nitrozellulosemembranen detektieren zu können, wurden diese nach dem Blocken mit den jeweiligen spezifischen Primärantikörpern hybridisiert. Der so gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wurde mit einem sekundären Antikörper detektiert, der mit Infrarotfarbstoff gekoppelt und gegen den jeweiligen primären Antikörper gerichtet war.

Der Primärantikörper wurde in 4 ml Antikörper-Puffer gegeben, mit der Membran in Kunststoffolie eingeschweißt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine gleichmäßige Bindung des Antikörpers zu erhalten, fanden die Antikörperinkubationen auf einem Überkopfmischer (Reax[®] 2, Heidolph, Schwabach) statt. Die Membran wurde dreimal für je 10 min in Waschpuffer (PBST) gewaschen und danach mit dem Sekundärantikörper für 1 h inkubiert, der wie der Primärantikörper in Antikörper-Puffer aufgenommen und mit der Membran eingeschweißt wurde. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und der Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplex mit einem Odyssey[®] Infrared Scanner (LI-COR, Lincoln, USA) detektiert.

Verwendete Antikörper:

Primärantikörper

Name		Verdünnung	Firma
β-Actin	Maus, monoklonal	1 : 2000	Sigma, Steinheim
Bax	Kaninchen, polyklonal	1:200	Santa Cruz, Heidelberg
Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Caspase-9	Kaninchen, polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
COX-1	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cayman, Ann Arbor, USA,

COX-2	Maus, monoklonal	1:500	Cayman, Ann Arbor, USA
Cyclin A	Kaninchen, polyklonal	1:250	Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin B1	Kaninchen, polyklonal	1:250	Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin D1	Kaninchen, polyklonal	1:250	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Cytochrom c	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cell Signaling, Massachusetts, USA
ERK-2	Maus, monoklonal	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg
p21	Kaninchen, polyklonal	1:250	Cell Signaling, Massachusetts, USA
p27	Kaninchen, polyklonal	1 :250	Prof. Hofmann
p53	Maus, monoklonal	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
phospho p53ser15	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA
PARP	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cell Signaling, Massachusetts, USA
mPGES-1	Kaninchen, polyklonal	1 : 1000	Santa Cruz, Heidelberg
mPGES-2	Kaninchen, polyklonal	1 : 1000	Cayman, Ann Arbor, USA
cPGES	Kaninchen, polyklonal	1 : 1000	Cayman, Ann Arbor, USA

Sekundärantikörper

anti-Hase IgG IRDye	Ziege	1 : 10.000	Molecular probes, Leiden, Niederlande
anti-Mause IgG IRDye	Ziege	1 : 10.000	Molecular probes, Leiden, Niederlande

2.2.12 Bestimmung der freien und intrazellulären S- oder R-Ibuprofenkonzentration

2.2.12.1 Bestimmung der freien Ibuprofenkonzentration im Medium

Für *in vitro* Experimente wurden die Zellen in der Zellkultur mit unterschiedlichen Konzentrationen an S- und R-Ibuprofen behandelt. Da Ibuprofen eine Proteinbindung von > 99 % besitzt und das in der Zellkultur verwendete Medium mit 10 % Kälberserum angesetzt wird, wurde erst einmal die im Medium ungebunden vorliegende Konzentration und somit die tatsächlich auf die Zellen einwirkende

Ibuprofen Konzentration ermittelt. Um die freie Konzentration an S- oder R-Ibuprofen im Medium zu bestimmen, wurden das jeweilige Medium (McCoy's oder DMDM mit 10 % FCS) mit unterschiedlichen Konzentrationen an S- oder R-Ibuprofen für 24 h inkubiert und danach für 16 Stunden in einer Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery 90 SE, Kendo Laboratory products, Hanau) bei 180.000 g zentrifugiert. Der Überstand mit der Konzentration an ungebundenem und das Pellet mit dem an Protein gebundenen S- oder R-Ibuprofen wurde zur Messung der Ibuprofen Konzentration mittels stereoselektiver HPLC eingesetzt.

2.2.12.2 Bestimmung der intrazellulären Ibuprofenkonzentration in den Tumorzellen

2×10^6 Tumorzellen wurden auf 10 ml Schalen ausplattiert und für 24 h bei 37 °C kultiviert. Danach wurden die Zellen mit 900 μM S- oder R-Ibuprofen für 4, 8, 16 und 24 h behandelt. Nach der Inkubation mit Ibuprofen wurden die Zellen in 1ml PBS mit einem Zellschaber geerntet und bei 2000 g für 1 Minute bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einer Feinwaage (H54AR, Mettler, Giessen) genau bestimmt und danach in 200 μM PBS resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 16 h bei 180.000 g in der Ultrazentrifuge, um die Proteine und festen Zellbestandteile als Pellet von den löslichen Bestandteilen der Zelle zu trennen. Der Überstand mit den löslichen Bestandteilen wurde komplett überführt und für die Messung von S- und R-Ibuprofen mittels stereoselektiver HPLC verwendet. Das Pellet mit den festen Zellbestandteilen und Proteinen wurde erneut gewogen und das Volumen des Zellfiltrates (V_{Filtrat}) berechnet. Aufgrund des wässrigen Charakters des aus der Ultrazentrifugation gewonnenen Filtrats wurde hierbei das Volumen mit der Masse gleichgesetzt:

$$V_{\text{Filtrat}} [\mu\text{l}] \approx m_{\text{vor UZ}} - m_{\text{nach UZ}}$$

$m_{\text{vor UZ}}$ = Zellgewicht vor der Ultrazentrifugation

$m_{\text{nach UZ}}$ = Zellgewicht nach der Ultrazentrifugation

Die intrazelluläre S- oder R-Ibuprofenkonzentration ($C_{\text{Ibu intrazellulär}}$) ließ sich aus dem ermittelten Volumen des Filtrates (V_{Filtrat}), der Verdünnung ($\text{Verdünnung}_{\text{Filtrat}} = [V_{\text{Filtrat}} + 200 \mu\text{l}]/V_{\text{Filtrat}}$), der gemessenen Ibuprofenkonzentration im Überstand ($C_{\text{Ibu im Überstand}}$) und dem Molekulargewicht (MG_{Ibu}) von Ibuprofen ermitteln:

$$C_{\text{Ibu intrazellulär}} [\mu\text{M}] = C_{\text{Ibu im Überstand}} \times \text{Verdünnung}_{\text{Filtrat}} / MG_{\text{Ibu}}$$

2.2.13 *In vivo* Maus-Tumormodell

Für die *in vivo* Experimente wurden 6-8 Wochen alte NMRI (nu/nu) Nacktmäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld) für ein subkutanen Tumormodell verwendet. Diese Tiere besitzen keinen

Thymus und ihnen fehlen daher die thymusabhängigen T-Lymphozyten. Da diese Mäuse immundefizient sind, wachsen subkutan injizierte Tumorzellen so wie auch andere fremde Zellen und Gewebe gut an. Die tägliche Applikation von 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen erfolgte intraperitoneal und die Versuchsdauer betrug für jedes Tierexperiment 3-4 Wochen. Die Versuchstiere wurden unter keimarmen Bedingungen in Kunststoffkäfigen gehalten und täglich mit Wasser und Futter versorgt. In allen Tierversuchen wurden die ethischen Grundsätze und Richtlinien für Tierversuche eingehalten. Die Genehmigung der zuständigen Tierethikkommission in Darmstadt lag vor.

2.2.13.1 Subkutanes Tumormodell

Die HCT-15, HCT-116 und HCA-7 Tumorzellen wurden jeweils in Zellschalen kultiviert, mit Trypsin vom Zellboden abgelöst, nach Abzentrifugation bei 300 g für 4 min und 4 °C in PBS aufgenommen und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Die Anzahl der Zellen wurde hierbei in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (2.2.1.2) und die Zellen in einer PBS-Menge resuspendiert, so dass eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/150 μ l (HCT-116 und HCT-15) oder 3×10^7 Zellen/150 μ l (HCA-7) resultierte.

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran narkotisiert, mit einer Ohrmarke versehen und jeder Maus wurden 150 μ l der in PBS aufgenommenen Tumorzellen subkutan in die rechte und linke dorsale Flanke appliziert (pro Seite 75 μ l der Zellsuspension). Nach drei Tagen wuchsen an der Injektionsstelle Tumore, die ab der nun folgenden täglichen Behandlung der Tiere mit 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen jeden zweiten Tag mit einer Schieblehre vermessen wurden. Als Kontrolle wurden einige Mäuse statt mit Ibuprofen nur mit dem Vehikel PBS behandelt. Vor jeder intraperitonealen Injektion wurden die Tiere gewogen, um den Gesundheitszustand zu kontrollieren und um die richtige Menge an Ibuprofen zu verabreichen. Um die Plasmakonzentrationen von S- und R-Ibuprofen in den Mäusen bestimmen zu können, wurde den Tieren am letzten Versuchstag nach der Ibuprofenbehandlung zu einer bestimmten Zeit Blut entnommen (zwischen 5-120 min nach S- oder R-Ibuprofengabe) und die Tiere getötet. Um die unidirektionale Inversion von R- zu S-Ibuprofen in den nur mit R-Ibuprofen behandelten Tieren kalkulieren zu können, wurden die Flächen unter der Kurve „Plasmakonzentration $S_{\text{Ibuprofen}}$ versus Zeit“ ($AUC_{S\text{-Ibu}}$) für die nur mit S-Ibuprofen ($AUC_{S\text{-Ibu } 2}$) bzw. nur mit R-Ibuprofen ($AUC_{S\text{-Ibu } 1}$) injizierten Tiere berechnet. Die Inversion wurde anhand folgender Formel ermittelt (Geisslinger et al., 1990):

$$\text{Inversion [\%]} = \frac{AUC_{S\text{-Ibu } 1}}{AUC_{S\text{-Ibu } 2}} \cdot 100$$

2.2.14 mPGES-1 Aktivitäts-Assay

In dem von Jakobsson et al. entwickelten Aktivitäts-Assay wird die katalytische Umsetzung von PGH_2 zu PGE_2 durch mPGES-1 gemessen (Jakobsson et al., 1999; Thoren et al., 2000). Hierfür wurden

HeLa Zellen verwendet, in denen nur die mPGES-1 Expression durch Zugabe von 1 ng/ μ l IL-1 β und 5 ng/ml TNF- α stimuliert wird, nicht aber die Expressionen der PGE₂-Synthasen mPGES-2 und cPGES (siehe Abbildung 3.29). Somit kann der beobachtete Anstieg der PGE₂ Synthese nach Stimulation der Zellen der mPGES-1 zugewiesen werden. Da die HeLa Zellen die Cyclooxygenase-1 und -2 exprimieren, wird in dem Assay zudem PGH₂ statt Arachidonsäure verwendet, so dass bei einer Hemmung der PGE₂ Synthese auf eine Hemmung der mPGES-1 Aktivität geschlossen werden kann.

Die Zellen wurden nach 24 h geerntet und die mikrosomale Fraktion gewonnen (2.2.12.3). Unterschiedliche Konzentrationen von S- bzw. R-Ibuprofen (in DMSO gelöst) und 0,1 mg/ml Protein der mikrosomalen Fraktion wurden in jedes Well einer 96-Well Platte pipettiert, die Konzentration der beiden Ibuprofen Enantiomere betrug dabei 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 oder 1000 μ M pro Well. Die Proben wurden für 15-30 Minuten auf Eis vorinkubiert und die Reaktion schließlich durch Zugabe von 40 μ M PGH₂ (in Kaliumphosphat-Puffer gelöst) gestartet. Die Reaktion fand bei einem pH-Wert von 7,4 und auf Eis statt und wurde nach einer Minute mit 100 μ l einer Stopplösung aus 0,04 M FeCl₂ und 0,08 M Zitronensäure beendet. Hierbei wurde die nach einer Minute noch nicht umgesetzte PGH₂ Menge in 12-HHT umgewandelt. Die in dem Assay synthetisierten Prostaglandine wurde schließlich mittels Festphasenextraktion extrahiert und die Konzentration von PGE₂, mittels eines LC-MS/MS-Systems bestimmt (Schmidt, 2006). Als Positivkontrolle wurde die Reaktion nur mit DMSO, der mikrosomalen Fraktion und PGH₂ ohne NSAID durchgeführt (maximal mögliche PGE₂ Synthese), in der Negativkontrolle befanden sich nur PGH₂, Kaliumphosphat-Puffer (Kpi-Puffer) und DMSO ohne Ibuprofen und mikrosomaler Fraktion (nichtenzymatische PGE₂-Bildung). Um die mPGES-1 Hemmung durch S- und R-Ibuprofen zu bestimmen, wurde die PGE₂-Konzentration der Negativkontrolle (Mittelwert aus drei Versuchsdurchführungen) von den PGE₂-Konzentrationen der mit S- bzw. R-Ibuprofen behandelten Proben (Mittelwerte) subtrahiert. Die gebildete PGE₂ Menge wurde im Verhältnis zur PGE₂-Konzentration der Positivkontrolle (Mittelwert) gesetzt, wobei die Konzentration der Proben ohne Ibuprofen mit 100 % gleichgesetzt wurde.

2.2.15 Statistik

Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel[®] 2000, GraphPad Prism 4 und SPSS[®] for Windows 9.01.

Proliferations-Assay: Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die IC₅₀-Werte wurden mit Hilfe eines sigmoidalen E_{max} Modells und mit GraphPad Prism 4 berechnet und die Signifikanz mittels einer univariaten ANOVA und einem T-Test unter Verwendung einer Bonferroni α -Korrektur für multiple Vergleiche ($\alpha = 0,05$) ermittelt.

FACS-Analyse: Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die prozentuale Anzahl der Zellen in den einzelnen Zellphasen nach S- oder R-Ibuprofen Behandlung wurde berechnet und die behandelten mit den unbehandelten Kontrollzellen mittels eines

One Way ANOVA und einem T-Test unter Verwendung einer Bonferroni α -Korrektur für multiple Vergleiche ($\alpha = 0,05$) miteinander verglichen.

In vivo Experimente: Um das Tumorwachstum in den Nacktmäusen nach S-Ibuprofen, R-Ibuprofen oder PBS Behandlung miteinander vergleichen zu können, wurden die Flächen unter den Kurven „Tumorgröße versus Behandlungszeit“ für jedes Tier berechnet. Hierfür wurde die Einzel-AUC zweier benachbarter Messpunkte berechnet und am Ende die Gesamt-AUC als Summe der Einzel-AUC.

$$\text{Einzel-AUC} = (y_1 + y_2) / 2 * (x_2 - x_1)$$

Für jedes der vier Tumorexperimente wurden die Gesamt-AUC aller drei Gruppen (S-Ibuprofen, R-Ibuprofen und Kontrolle) einer univariaten ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) unterzogen.

3 Ergebnisse

Ausgangspunkt der Arbeit war die Suche nach den molekularen Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung beider Ibuprofen Enantiomere. Lange Zeit wurde die antikarzinogene Wirkung der NSAIDs einzig der COX-Inhibierung zugeschrieben, doch mittlerweile sind auch COX unabhängige Mechanismen bekannt. Um die COX-Abhängigkeit zu untersuchen, wurden die Versuche mit Tumorzellen unterschiedlicher COX Expression durchgeführt. Es sollten dabei COX-2 defiziente mit COX-2 exprimierenden Tumorzellen verglichen werden. Außerdem wurde nicht nur die Wirkung des in Bezug auf COX-Inhibierung aktiven S-Ibuprofens, sondern auch die des R-Ibuprofens untersucht.

3.1 Herstellung von Tumorzellen mit Ponasteron A induzierbarer COX-2 Expression

Bei der Verwendung von verschiedenen Tumorzellen unterschiedlicher COX Expression muss beachtet werden, dass sich die Zellen morphologisch (z.B. Differenzierungsgrad, Wachstumsgeschwindigkeit) und auch in der Expression anderer Gene unterscheiden können. Ein optimales Modell wäre eine Tumorzelllinie, in der die COX-2 Expression mittels eines Expressionssystems transient induziert werden kann. Mit Hilfe eines Ecdyson/Ponasteron-induzierbaren Transfektionssystems (2.2.8.1) wurde daher die humane COX-2 cDNA in COX-2 defiziente HCT-116 und HCT-15 Tumorzellen transfiziert.

3.1.1 Herstellung des pIND-hCOX-2 Konstruktes

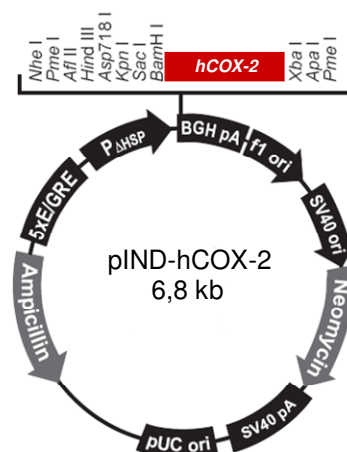


Abbildung 3.1: Schematische Abbildung des pIND-hCOX-2 Konstruktes (modifizierte nach Invitrogen, Karlsruhe). Humane COX-2 cDNA (1,8 kb) wurde über BamHI und XbaI in den pIND Vektor kloniert.

Die humane COX-2 cDNA wurde aus dem hCOX-2-pcDNA3 Vektor mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten (2.2.2.2) und in den pIND Vektor ligiert (2.2.2.4). In Abbildung 3.1 ist der pIND-hCOX-2 Expressionsvektor dargestellt.

3.1.2 Transfektion von HCT-116 Tumorzellen mit pVgRXR und pIND-hCOX-2

COX-2 defiziente HCT-116 Tumorzellen wurden mit dem pVgRXR-Plasmid stabil transfiziert (2.2.8.3), und die Transfektion mit Hilfe eines pIND/lacZ Kontrollvektors und eines β -Galaktosidase Assays überprüft (2.2.8.4). In Tabelle 3.1 sind zwei Zellklone dargestellt, die nach Ponasteron A Gabe eine hohe β -Galaktosidase Expression aufwiesen. Als Negativ-Kontrolle wurden die stabil transfizierten Zellklone ohne vorherige transiente Transfektion (pIND/lacZ-Transfektion) mit Ponasteron behandelt. Mit dieser ersten stabilen Transfektion wurden somit HCT-116 Klone hergestellt, die den modifizierten Ecdyson-Rezeptor (**VgEcR**) und Retinoid X-Rezeptor (**RXR**) exprimierten.

Zellklon	β -Galaktosidase Assay	
	β -Galaktosidase [pg/50 μ g Protein]	Induktionsfaktor
HCT-116 RXR K8 ohne Ponasteron	6,07	
HCT-116 RXR K8 mit Ponasteron	185,49	31
HCT-116 RXR K11 ohne Ponasteron	0,14	
HCT-116 RXR K11 mit Ponasteron	286,07	2043
HCT-116 RXR Kontrolle mit Ponasteron	0	

Tabelle 3.1: Induktion der β -Galaktosidase Expression in HCT-116 und HCT-15 Zellen. HCT-116 Zellen wurden mit dem pVgRXR-Vektor stabil transfiziert und die positiven Klone zur Überprüfung der Transfektion jeweils mit 2 μ g pIND/lacZ Kontrollvektor transient transfiziert. Nach 24 h wurde die Expression der β -Galaktosidase durch Zugabe von 5 μ M Ponasteron A induziert und je 50 μ g Gesamtproteinextrakt pro Zellklon für den β -Galaktosidase Assay eingesetzt.

Der HCT-116 RXR K11 Zellklon wurden aufgrund seiner guten β -Galaktosidase Induzierbarkeit für die nachfolgende zweite stabile Transfektion mit dem pIND-hCOX-2 Expressionsvektor verwendet. Die Selektionierung der Zellklone erfolgte durch Zugabe von Zeozin und Neomycin, da der COX-2 Expressionsvektor ein Neomycin (G418)-Resistenzgen trägt und die Klone bei erfolgreicher Transfektion beide Vektoren (pVgRXR und pIND-hCOX-2) besitzen. Die selektionierten Zellklone (HCT-116 RXR/hCOX-2-pIND) wurden mittels Western-Blot Analyse auf ihre induzierbare COX-2 Expression hin überprüft (2.2.8.5). Bei keinem der Zellklone konnte eine Ponasteron induzierte

COX-2 Expression nachgewiesen werden. Beide Transfektionen wurden mit einem anderen Transfektionsreagenz (liposomales Transfektionsreagenz der Firma Promega) und einem anderen Zellklon HCT-116 RXR K8 wiederholt. Zusätzlich wurde eine Transfektion mit einer anderen COX-2 defizienten Zelllinie (HCT-15) durchgeführt, ohne dass die gewünschte COX-2 Expression im Western-Blot detektieren werden konnte.

3.2 Untersuchungen zur antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen in humanen Kolonkarzinomzellen

3.2.1 Verwendete humane Kolonkarzinomzellen

Da es nicht möglich war, mit Hilfe eines hCOX-2 cDNA-Expressionsvektors eine induzierbare COX-2 Expression in HCT-116 und HCT-15 Tumorzellen zu erhalten, wurden humane Tumorzellen mit unterschiedlicher COX-1 und COX-2 Expression für die weiteren Experimente verwendet.

Um die Cyclooxygenase Expression der verwendeten Tumorzelllinien zu überprüfen, wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt (2.2.12.1), diese elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.12.5) und die Expression mit Hilfe der Western-Blot Analyse getestet (2.2.12.6). Die HCT-15 Tumorzellen zeigten eine COX-1 aber keine COX-2 Expression, HCA-7 Zellen hingegen exprimierten sowohl COX-1 als auch COX-2 konstitutiv (Abbildung 3.2 A).

Die Cyclooxygenase ist als Schlüsselenzym an der Bildung der Prostaglandine (PG) und des Thromboxans (TXA₂) beteiligt. Mittels eines PGE₂-Enzymimmunoassays (2.2.9.1) wurde daher für jede Tumorzelllinie die Prostaglandin E₂ (PGE₂) Produktion bestimmt (siehe Abbildung 3.2 B). Für die COX-2 defizienten HCT-15 Zellen konnte nur eine schwache PGE₂ Synthese nachgewiesen werden (< 5 pg pro 1x10⁶ Zellen), HCA-7 Zellen jedoch bildeten eine deutlich größere Menge an PGE₂ (> 3000 pg pro 1x10⁶ Zellen).

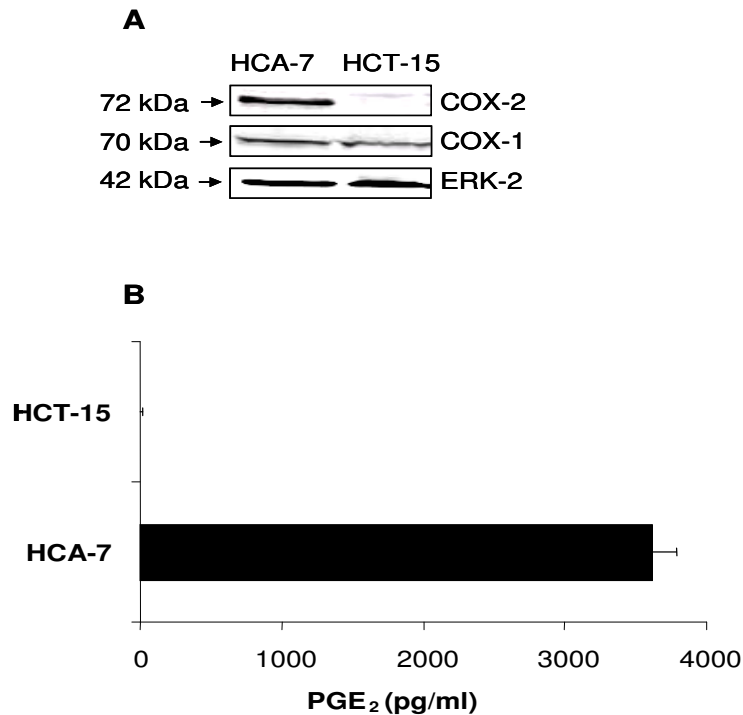


Abbildung 3.2: Western-Blot Analyse von Gesamtproteinextrakten aus unbehandelten HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen und PGE₂ Enzymimmunoassay. (A) Für die Western-Blot Assays wurde Gesamtprotein (30 µg) gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit COX-1 und COX-2 Antikörpern hybridisiert. Der ERK-2 Antikörper diente als Ladekontrolle. (B) Für beide Zelllinien wurde der PGE₂ Gehalt im Medium gemessen, die Zellzahl bestimmt und die Konzentration pro 1x10⁶ Zellen berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Antiproliferative Wirkung von S- und R-Ibuprofen in humanen Kolontumorzellen

Um zu untersuchen, ob die antiproliferative Wirkung von Ibuprofen auf die Inhibierung der Cyclooxygenase zurückzuführen ist, oder ob auch COX unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen, wurde ein Proliferations-Assay mit den zwei sich in der COX Expression unterscheidenden Tumorzelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an S- oder R-Ibuprofen behandelt, und die Anzahl der Zellen nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen bestimmt (2.2.10.2). Sowohl die Behandlungen mit S- als auch mit R-Ibuprofen führten zu einer Hemmung der Proliferation in beiden Zelllinien. Dabei war die Hemmung nach R-Ibuprofen Behandlung sowohl in HCT-15, als auch in HCA-7 Zellen geringer als nach S-Ibuprofen (Abbildung 3.3). Die Auswertung der IC₅₀-Werte (Tabelle 3.2) und die Berechnung der Flächen unter den Kurven „Überlebensrate versus Inkubationszeit“ für jede Zelllinie und Behandlung ergaben, dass der Unterschied in der antiproliferativen Wirkung zwischen S- und R-Ibuprofen jedoch nicht signifikant ist. Einen signifikanten Unterschied gab es jedoch in der Sensitivität der beiden Tumorzelllinien gegenüber der Ibuprofen Behandlung ($p \leq 0,01$). Beide Enantiomere hemmten die Proliferation der COX-2

defizienten HCT-15 Zellen stärker als die der COX-exprimierenden HCA-7 Zellen. Die Ergebnisse des Proliferations-Assays weisen auf einen COX unabhängigen Mechanismus der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen hin, da trotz der unterschiedlichen COX Expression das Wachstum beider Zelllinien gehemmt wurde. Beide Enantiomere waren dabei für jeweils eine Zelllinie gleich reaktiv, obwohl S-Ibuprofen ein potenterer COX-1 und COX-2 Hemmer ist.

Zelllinie	Behandlung	
	S-Ibuprofen [μM]	R-Ibuprofen [μM]
HCA-7	576,9 \pm 45,15	637,9 \pm 24,4
HCT-15	265,4 \pm 36,16	315,8 \pm 42,65

Tabelle 3.2: IC₅₀-Werte (50 % Überlebensrate) für die Behandlung der Tumorzellen mit S- oder R-Ibuprofen. Die IC₅₀-Werte wurden mit GraphPad PRISM durch nichtlineare Regression mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf berechnet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM der IC₅₀-Werte von drei unabhängigen Experimenten.

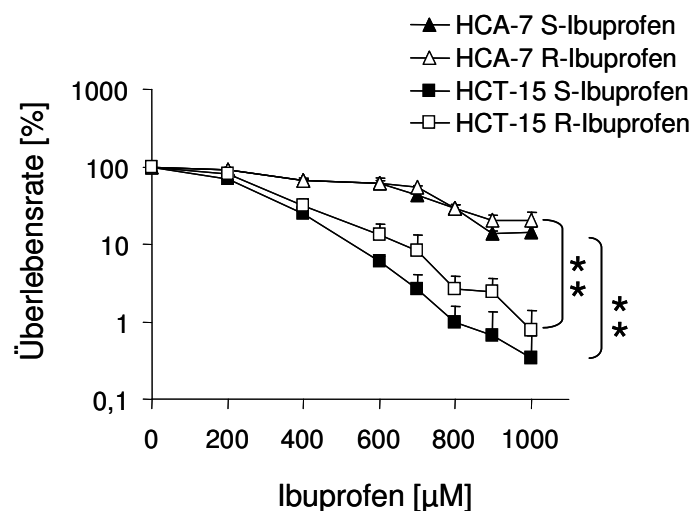


Abbildung 3.3: Proliferations-Assay für HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an S- oder R-Ibuprofen. Beide Zelllinien wurden für 8 Tage in Medium mit unterschiedlichen Ibuprofen Konzentrationen (S- oder R-Ibuprofen) kultiviert. Die nach der jeweiligen Inkubation noch lebenden Zellen wurden ermittelt, die Menge der unbehandelten Zellen wurde als 100 % Überlebensrate definiert und die anderen Zellzahlen in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Es sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm SEM dargestellt. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

3.2.3 Zellzyklusblock in der G₁-Phase nach Behandlung der Tumorzellen mit S- und R-Ibuprofen

3.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus nach Behandlung mit S- und R-Ibuprofen

Ursache für eine Hemmung der Proliferation von HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen durch S- und R-Ibuprofen kann die Induktion eines Zellzyklusarrestes oder Apoptose sein. Um dieses näher zu untersuchen, wurde die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen nach S- oder R-Ibuprofen Behandlung mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. Um die Zellen zu synchronisieren (ca. 70 % der Zellen in der G₀/G₁-Phase) wurden diese für 1-2 Tage in Medium ohne FCS gehalten und erst danach mit unterschiedlichen Konzentrationen S- und R-Ibuprofen behandelt. Nach 20 h (HCA-7) bzw. 24 h (HCT-15) wurden die Zellen geerntet, mit 80 % Ethanol über Nacht fixiert und dann die DNA für die Messung am FACS (fluorescence-activated cell sorter) mit Ethidiumbromid markiert (2.2.11). Die unterschiedlichen Zeiten, die beim Hungern der beiden Zelllinien (siehe Methodenteil) und bei der Inkubation mit Ibuprofen verwendet wurden, resultierten aus der unterschiedlichen Empfindlichkeit beider Zelllinien auf Serumentzug und unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten.

In beiden Zelllinien wurde nach Inkubation mit S- oder R-Ibuprofen ein Zellzyklusblock in der G₁-Phase beobachtet, der mit einer Abnahme der Zellen in der S- und G₂-Phase einherging (Abbildung 3.4). Wie im Proliferations-Assay reagierten auch in diesem Versuch HCT-15 Tumorzellen sensitiver auf die Behandlung mit S- und R-Ibuprofen als HCA-7 Zellen, wobei in beiden Zelllinien kein wesentlicher Unterschied in der antiproliferativen Wirkung zwischen den Enantiomeren beobachtet werden konnte. Ein signifikanter Anstieg der Zellen in der G₁-Phase erfolgte in HCT-15 Zellen nach einer Behandlung mit $\geq 600 \mu\text{M}$ S- bzw. R-Ibuprofen, in HCA-7 Zellen nach einer Inkubation mit $1000 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen bzw. 800 oder $1000 \mu\text{M}$ R-Ibuprofen.

Ein signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellen war nach einer Behandlung der Zellen mit 900 - $1000 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen bzw. $1000 \mu\text{M}$ R-Ibuprofen nur in HCT-15 Zellen zu sehen (Abbildung 3.4 C und D). Jedoch zeigte sich auch in den HCA-7 Zellen eine Zunahme der Zellzahl in der subG₁-Phase (Abbildung 3.4 A und B). Zum besseren Vergleich wurde daher die Apoptose anhand einer längeren Inkubationszeit untersucht (siehe 3.2.4.1) und die Induktion von Zellzyklusblock und Apoptose auf molekularer Ebene mit Hilfe von Western-Blot Analysen bestätigt (Abbildungen 3.5, 3.6, 3.7 und 3.8). Da in der Durchflusszytometrie die Behandlung mit 900 - $1000 \mu\text{M}$ S- bzw. R-Ibuprofen in beiden Zelllinien einen Zellzyklusarrest auslöste, wurde diese Konzentration für die folgenden Western-Blot Experimente und FACS-Analysen eingesetzt.

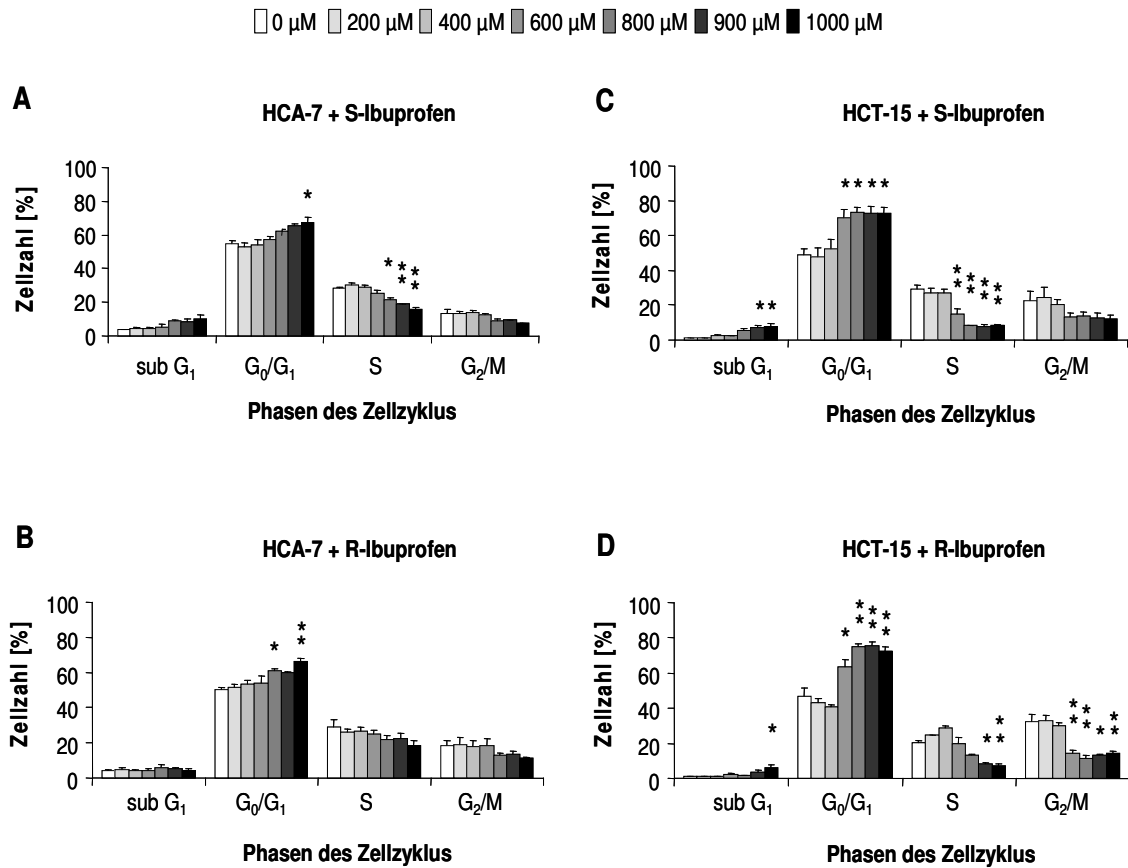


Abbildung 3.4: Durchflusszytometrische Messungen zur Detektion von Zellzyklusblock und Apoptose nach Behandlung der Tumorzellen mit S- oder R-Ibuprofen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-Ibuprofen (**A und C**) oder R-Ibuprofen (**B und D**) für 24 h (HCT-15) oder 20 h (HCA-7) inkubiert, und die Anzahl der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen mit Hilfe eines Durchflusszytometers ermittelt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm SEM. Die subG₁ Phase entspricht den apoptotischen Zellen, der Zellzyklusblock erfolgte in beiden Zelllinien in der G₁-Phase. Die statistischen Signifikanzen beziehen sich in jeder Zellphase auf die Anzahl der unbehandelten Zellen in der jeweiligen Phase. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

3.2.3.2 Untersuchung des G₁- Zellzyklusblocks anhand von Western-Blot Assays

Der Zellzyklus wird anhand von Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDK) reguliert, die durch Serin- oder Threoninphosphorylierung bestimmter Proteine nachgeschaltete Prozesse auslösen, die zur Bildung von für den Zellzyklus wichtigen Proteinen führen. Reguliert werden die Cyclin-abhängigen Kinasen durch die Bindung an Cyclin und durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Während die CDKs kontinuierlich exprimiert werden, werden die Cycline während des Zellzyklus periodisch gebildet und abgebaut. Die Expression von Cyclin A und B wurde daher mittels Western-Blot Analyse näher untersucht. Die HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen wurden ausplattiert und mit 900 µM S- bzw. R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen und der Herstellung von Gesamtproteinextrakten (2.2.12.1) wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.12.5) und die Expression der Cycline durch Hybridisierung der Membran mit Cyclin A und Cyclin B

Antikörpern detektiert (2.2.12.6). Als Positivkontrolle wurden unbehandelte HCT-15 bzw. HCA-7 Zellen zu den gleichen Zeiten geerntet.

In beiden Zelllinien konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Cyclin A und Cyclin B Expression nach Behandlung mit S-Ibuprofen (3.5 A und 3.6 A) oder R-Ibuprofen (3.5 B und 3.6 B) festgestellt werden. In den unbehandelten Kontrollzellen blieb die Zellverteilung in den jeweiligen Zellzyklusphasen aufgrund einer fehlenden Zellzyklusblockade konstant, und die Expression beider Cycline zeigte über den gewählten Zeitraum keine Veränderung (Abbildungen 3.5 C und 3.6 C). Im Gegensatz zum Proliferations-Assay und den FACS-Analysen war bei der Expression von Cyclin A und B kein Unterschied in der Sensitivität der Zellen gegenüber S- oder R-Ibuprofen zu erkennen (vgl. Abbildungen 3.3 und 3.4). Die Expression von Cyclin A und B nahm nach einer Inkubation von 16 h mit S- oder R-Ibuprofen in beiden Zelllinien deutlich ab, eine Inkubationszeit, bei der auch im Durchflusszytometer der Zellzyklusblock schon nachgewiesen werden konnte.

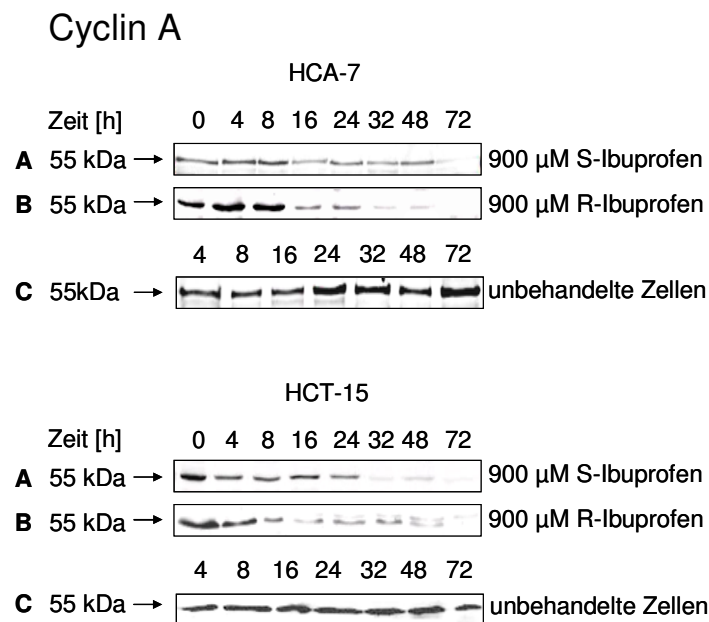


Abbildung 3.5: Cyclin A Expression nach Behandlung der Tumorzellen mit S-Ibuprofen (A) und R-Ibuprofen (B). Beide Tumorzellen wurden mit 900 μM S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert, geerntet und 30 μg Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von Cyclin A wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers detektiert. Die Expression der unbehandelten Zellen diente als Kontrolle (C). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

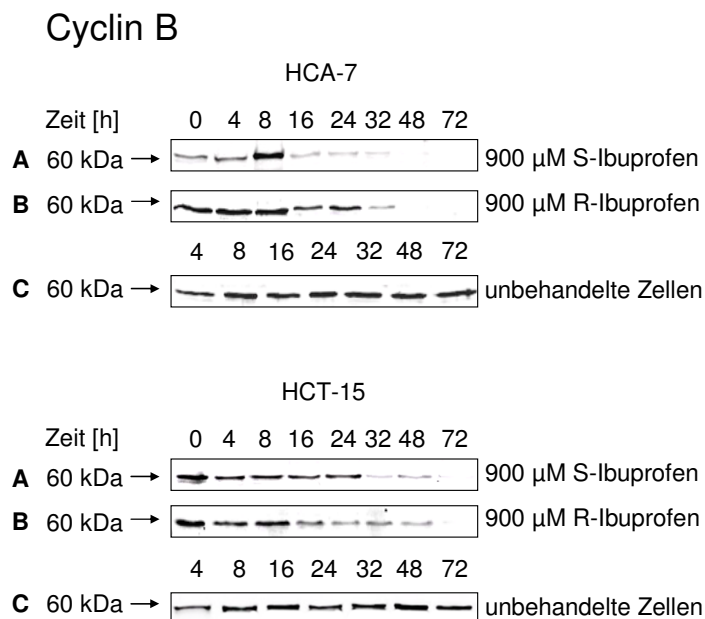


Abbildung 3.6: Cyclin B Expression nach Behandlung der Tumorzellen mit S-Ibuprofen (A) und R-Ibuprofen (B). Beide Tumorzellen wurden mit 900 μM S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert, geerntet und 30 μg Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von Cyclin B wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers detektiert. Die Expression der unbehandelten Zellen diente als Kontrolle (C). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

An der Regulation des Zellzyklus sind außerdem Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKIs) beteiligt, die durch Bindung an Cyclin-abhängigen Proteinkinasen deren Aktivität negativ regulieren. Ihre Expression während des Zellzyklus findet periodisch statt. Die maximale Expression des CDK-Inhibitors $p27^{KIP1}$ findet in der G_1 -Phase statt, und die Überexpression führt zu einem G_1 -Block im Zellzyklus (Polyak et al., 1994). Als nächstes wurde daher das Expressionsmuster von $p27^{KIP1}$ in den behandelten Zellen untersucht. In den COX-2 defizienten HCT-15 Zellen stieg die Expression von $p27^{KIP1}$ nach einer Inkubation mit 900 μM S- oder R-Ibuprofen für 24 h sichtbar an (Abbildung 3.7). Die HCA-7 Zellen zeigten einen schwächeren Anstieg der Expression, aber auch bei diesen fand nach 32 h eine Hochregulation der $p27^{KIP1}$ Expression statt.

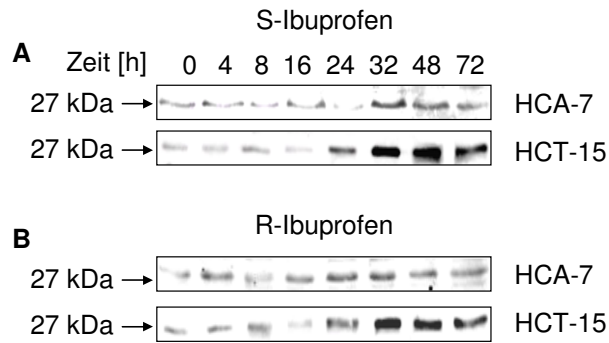


Abbildung 3.7: Expression von p27^{KIP1} nach Behandlung der Tumorzellen mit S- oder R-Ibuprofen. Beide Tumorzellen wurden mit 900 μ M S- bzw. R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert, geerntet und 30 μ g Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Die Induktion des G₁-Zellzyklusblocks wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie in beiden Zelllinien nach einer Behandlung mit S- bzw. R-Ibuprofen für 24 h beobachtet. Außerdem wurde in beiden Zelllinien eine Abnahme der Cyclin Expression und eine Zunahme an p27^{KIP1} Protein mittels Western-Blot Analyse detektiert. Die Induktion des Zellarrestes in der G₁-Phase nach Behandlung beider Zelllinien mit S- und R-Ibuprofen ist folglich unabhängig von der COX Expression der Tumorzellen und der unterschiedlichen COX hemmenden Wirkung der Enantiomere. Somit weisen auch die Ergebnisse der FACS-Analyse und der Western-Blots auf eine COX unabhängige antiproliferative Wirkung von S- und R-Ibuprofen hin.

3.2.4 Apoptoseinduktion nach Behandlung von Tumorzellen mit S- und R-Ibuprofen

3.2.4.1 Bestimmung der apoptotischen Zellen und Untersuchung der PARP-Spaltung nach Behandlung mit S- und R-Ibuprofen

Um zu untersuchen, ob die Hemmung des Zellwachstums nur durch die Induktion eines Zellzyklusarrestes erfolgt, oder ob auch Apoptose eine Rolle spielt, wurde als ein typischer Apoptosemarker die Spaltung der Poly(ADP)-Ribose Polymerase (PARP) mittels Western-Blot Analyse detektiert. Als weiterer Apoptosemarker wurde die Apoptoserate in HCT-15 und HCA-7 Zellen nach Ibuprofen Behandlung mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

PARP ist ein 112 kDa großes, nukleares DNA-Reparaturenzym. Während der Apoptose werden verschiedene Caspasen aktiviert, darunter auch Caspase-3, -6 und -7. Diese sind verantwortlich für die Spaltung von PARP in ein 85 kDa und ein 29 kDa großes apoptotisches Fragment. Somit kann die Spaltung des Enzyms als Marker für die Apoptose verwendet werden. Beide Zelllinien wurden mit 900 μ M S-Ibuprofen (Abbildung 3.8 A) oder R-Ibuprofen (3.8 B) für 0-72 h inkubiert, das Gesamt-

protein elektrophoretisch aufgetrennt und die PARP-Spaltung mittels Western-Blot Assay detektiert. In den HCT-15 Zellen konnten die apoptotischen Fragmente nach einer Behandlung von 32 h mit S- und R-Ibuprofen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde die PARP Spaltung in HCA-7 Zellen erst nach 48 h (Behandlung mit S-Ibuprofen) und 72 h (Behandlung mit R-Ibuprofen) beobachtet.

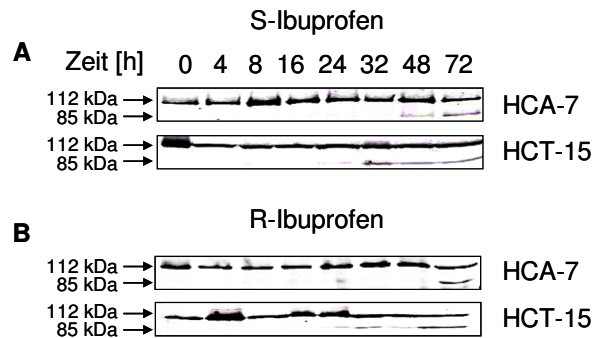


Abbildung 3.8: PARP-Spaltung nach Behandlung der Tumorzellen mit S-Ibuprofen (A) und R-Ibuprofen (B). Beide Tumorzellen wurden mit 900 μM S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert, geerntet und 30 μg Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Das ungespaltene Enzym (112 kDa) und das apoptotische 85 kDa Fragment wurden mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines PARP-Antikörpers detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Für die durchflusszytometrische Messung wurden die gehungerten Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-Ibuprofen (Abbildung 3.9 A und C) oder R-Ibuprofen (Abbildung 3.9 B und D) für 72 h behandelt. Die behandelten Zellen wurden geerntet, mit 80 % Ethanol fixiert und die DNA für die Messung am FACS mit Ethidiumbromid markiert (2.2.11). Zellen in Apoptose zeigen nur geringe Fluoreszenz (geringer DNA-Gehalt) im Durchflusszytometer, sie werden in der Durchflusszytometrie als subG₁-Phase dargestellt. Ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate wurde in den HCA-7 Zellen nach einer Konzentration von 800-1000 μM R-Ibuprofen (Abbildung 3.9 B), in den HCT-15 Zellen nach einer Behandlung mit ≥ 800 μM S- oder 900 μM R-Ibuprofen (Abbildung 3.9 C und D) beobachtet. Auch in den HCA-7 Zellen stieg die Zahl der apoptotischen Zellen nach S-Ibuprofen Behandlung an, jedoch war hier die Zunahme nicht signifikant (Abbildung 3.9 A).

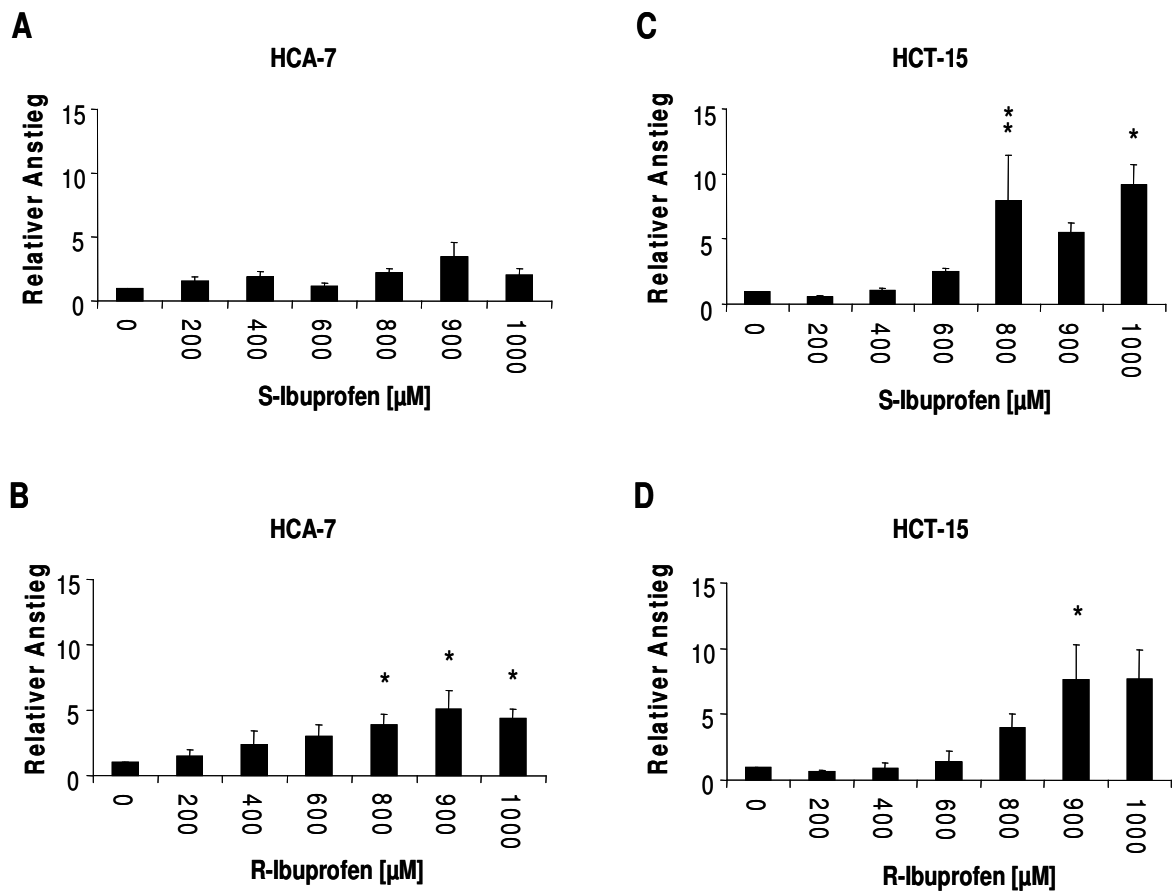


Abbildung 3.9: Durchflusszytometrische Messungen zur Detektion von Apoptose nach Behandlung der Tumorzellen mit S- oder R-Ibuprofen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-Ibuprofen (A und C) oder R-Ibuprofen (B und D) für 72 h inkubiert, und die Anzahl der Zellen in der subG₁-Phase mit Hilfe eines Durchflusszytometers ermittelt. Dargestellt ist der relative Anstieg der apoptotischen Zellen, wobei die Apoptosezahl der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt wurde. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm SEM. Die statistischen Signifikanzen beziehen sich auf die Anzahl der unbehandelten Zellen. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Die Induktion von Apoptose erfolgte wie der Zellzyklusblock in den COX-2 defizienten und COX-2 exprimierenden Tumorzellen, wobei in der Durchflusszytometrie die HCT-15 Zellen erneut etwas sensitiver auf eine S- oder R-Ibuprofen Behandlung reagierten. Programmierter Zelltod und Zellzyklusarrest wurden unabhängig der COX Expression der Zellen durch die Behandlung mit S- oder R-Ibuprofen ausgelöst, d.h. nicht nur durch COX abhängige, sondern auch COX unabhängige Mechanismen. Um die Frage zu klären, warum aber gerade die COX-2 exprimierende Zelllinie weniger sensitiv auf die Behandlung mit Ibuprofen reagierte, wurde die intrazelluläre S- und R-Ibuprofen Konzentration nach Behandlung der Zellen mit den beiden Enantiomeren bestimmt.

3.2.5 Bestimmung der freien und intrazellulären S- oder R-Ibuprofenkonzentration

In vitro wurden Konzentrationen von 600–1000 μM S- und R-Ibuprofen benötigt, um Zellzyklusarrest und Apoptose in Tumorzellen auszulösen. Um herauszufinden, welche Ibuprofen Konzentrationen in den verwendeten Zelllinien tatsächlich erreicht werden, wurden die intrazellulären Konzentrationen an S- und R-Ibuprofen bestimmt.

3.2.5.1 Bestimmung der freien S- und R-Ibuprofen Konzentration im Medium

Da Ibuprofen eine Proteinbindung von $> 99\%$ besitzt und das in der Zellkultur verwendete Medium mit 10% Kälberserum versetzt wird, wurde die im Medium ungebunden vorliegende und somit auf die Zellen tatsächlich einwirkende Ibuprofen Konzentration ermittelt. Das Medium wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an S- oder R-Ibuprofen inkubiert und schließlich frei vorliegendes und Protein gebundenes Ibuprofen durch Ultrazentrifugation getrennt (2.2.13.1). Mittels stereoselektiver HPLC wurden die freien Konzentrationen sowie auch Proben ohne vorherige Ultrazentrifugation (d.h. mit an Protein gebundenem und frei vorliegendem Ibuprofen) gemessen und der prozentuale Anteil an freiem Ibuprofen im Medium berechnet. Im Medium lagen nach Behandlung mit $200\ \mu\text{M}$ S- und R-Ibuprofen jeweils ca. 45% der eingesetzten Menge ungebunden vor (siehe Abbildung 3.10). Mit steigender Ibuprofen Konzentration stieg auch die freie Konzentration von S- und R-Ibuprofen im Medium an. Bei $1000\ \mu\text{M}$ S- bzw. R-Ibuprofen betrug die Menge an freiem Ibuprofen etwa 75% . Die in der Zellkultur eingesetzten Ibuprofen Konzentrationen waren also wesentlich höher als die tatsächlich freien Konzentrationen im Medium mit 10% FCS, wobei der Anteil an freiem Ibuprofen mit steigender Konzentration zunahm.

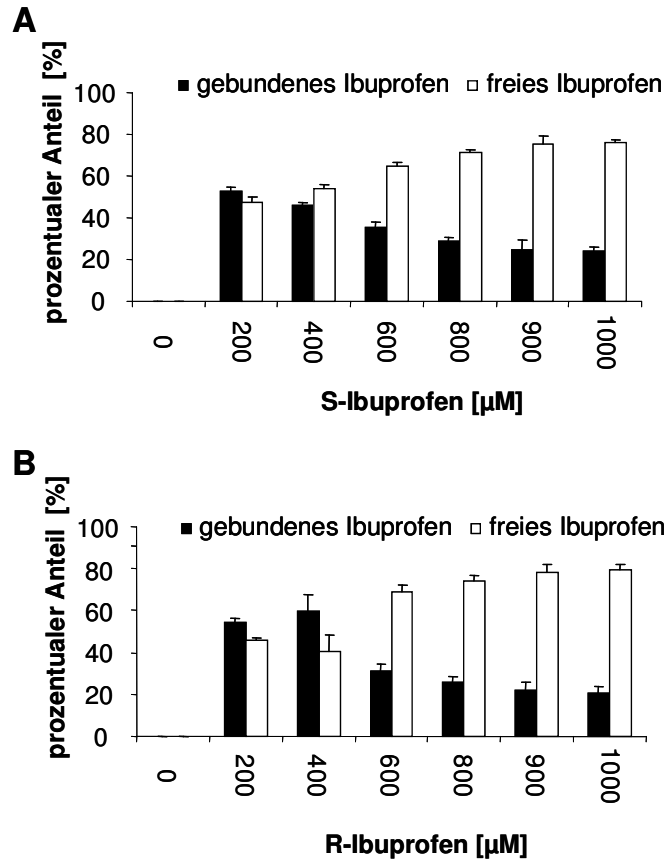


Abbildung 3.10: Anteil an Protein gebundenem und freiem S- und R-Ibuprofen im Medium. Dem Medium (mit 10 % FCS) wurden unterschiedliche Konzentrationen an S-Ibuprofen (A) bzw. R-Ibuprofen (B) zugegeben und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die freien und gebundenen Ibuprofen Konzentrationen wurden mit stereoselektiver HPLC gemessen und der prozentuale Anteil im Verhältnis zur eingesetzten Ibuprofenmenge berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 6 Experimenten \pm SEM.

3.2.5.2 Bestimmung der intrazellulären S- und R-Ibuprofen Konzentrationen in HCT-15 und HCA-7 Zellen

HCT-15 und HCA-7 Zellen wurden ausplattiert und für 0, 4, 8, 16 und 24 h mit 900 μM S- bzw. R-Ibuprofen inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, die Proteine und festen Bestandteile durch Ultrazentrifugation von den löslichen Bestandteilen getrennt und die intrazelluläre Konzentration von S- und R-Ibuprofen mittels stereoselektiver HPLC bestimmt (2.2.13.2). Die in den weniger sensitiven HCA-7 Zellen erreichten S- und R-Ibuprofen Konzentrationen waren, verglichen mit denen in den HCT-15 Zellen, erheblich niedriger (Abbildung 3.11). So wurde in HCT-15 Zellen nach Behandlung mit entweder 900 μM S- oder R-Ibuprofen für 24 h jeweils eine Konzentration von $363,3 \pm 51,1 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen oder $442,2 \pm 66,3 \mu\text{M}$ R-Ibuprofen gemessen. Dagegen betrug die intrazelluläre Konzentration in den HCA-7 Zellen nach gleicher S- oder R-Ibuprofen Behandlung und Inkubation für 24 h nur $43,5 \pm 8,1 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen bzw. $173,6 \pm 25,6 \mu\text{M}$ R-Ibuprofen. Aus diesen Werten lässt sich schließen, dass die im Vergleich zu den HCA-7 Zellen beobachtete höhere Sensitivität der HCT-15 Zellen gegenüber S- und R-Ibuprofen unter anderem auf die unterschiedlichen intrazellulären

Ibuprofen Konzentrationen zurückzuführen sein könnte. Festzuhalten ist auch, dass *in vitro* keine unidirektionale Inversion von R- zu S-Ibuprofen stattfand.

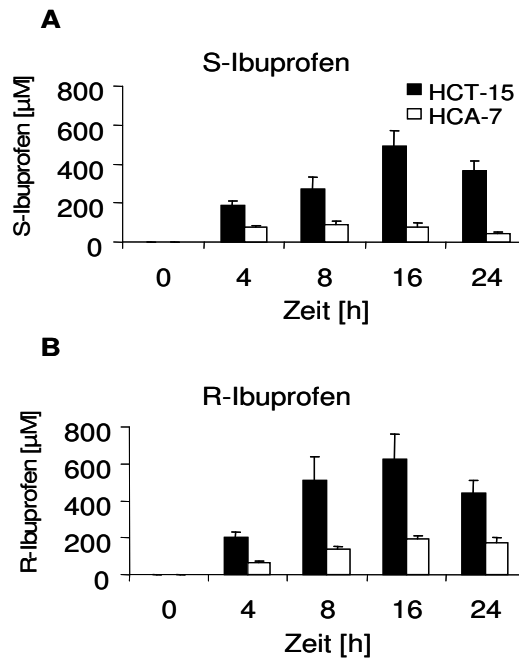


Abbildung 3.11: Intrazelluläre S- und R-Ibuprofen Konzentrationen in HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen. Die Tumorzellen wurden mit 900 µM S-Ibuprofen (A) oder 900 µM R-Ibuprofen (B) für 0-24 h inkubiert. Die Ibuprofen Konzentrationen wurden mit stereoselektiver HPLC gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 5 unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.2.6 Antiproliferative Wirkung von S- und R-Ibuprofen im subkutanen Tumormodell

3.2.6.1 Hemmung des Tumorwachstums nach Behandlung mit S- und R-Ibuprofen

In vitro konnte gezeigt werden, dass sowohl S- als auch R-Ibuprofen eine antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen besitzen, die mit einem Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose einhergeht. Um diesen antikarzinogenen Effekt *in vivo* zu bestätigen, wurden HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen in die rechte und linke Flanke von immundefizienten NMRI/nu Nacktmäusen appliziert (2.2.14.1). 3 Tagen nach der Tumorzellenapplikation waren die ersten Tumore sichtbar, und es konnte mit der Behandlung begonnen werden. Die Mäuse bekamen 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen täglich intraperitoneal verabreicht. Sowohl die Applikation von S-Ibuprofen als auch die von R-Ibuprofen führte, verglichen mit den Kontrollmäusen (nur PBS Behandlung), zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums in beiden Versuchsgruppen (HCT-15 und HCA-7) (Abbildung 3.12). Die Tumore der injizierten HCA-7 Zellen (A) zeigten ein langsames Wachstum als die der HCT-15 Zellen (B). Die Versuche wurden daher nach unterschiedlichen Zeiten beendet (nach 25 Tagen für das HCT-15 Tumormodell und nach 27 Tagen für die HCA-7 Tumore). Auch *in vivo* konnte kein Unterschied in der antiproliferativen Wirkung zwischen S- und R-Ibuprofen gezeigt werden. Ob das Tumorwachstum

der HCT-15 Zellen stärker durch die Behandlung mit den Ibuprofen Enantiomeren gehemmt wurde als das der HCA-7 Zellen, ließ sich aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumore nicht feststellen. Der in HCT-15 Zellen vorkommende größere Unterschied zwischen dem Volumenmittelwert der behandelten und der unbehandelten Tumore kann entweder, wie in der Zellkultur schon beobachtet, ein Hinweis auf unterschiedliche intrazelluläre Ibuprofenkonzentrationen in den Tumorzellen sein, oder auf die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten zurückgeführt werden.

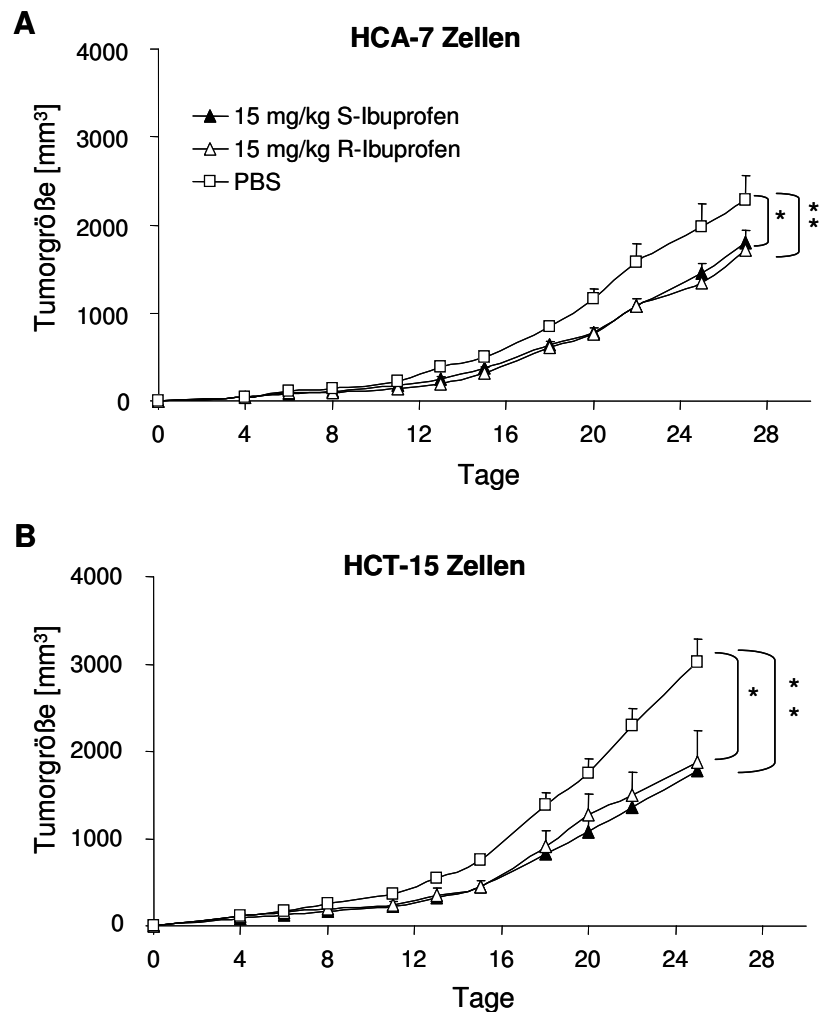


Abbildung 3.12: Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen nach einer täglichen Behandlung mit 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen. HCA-7 (A) und HCT-15 (B) Zellen wurden subkutan in die rechte und linke dorsale Flanke injiziert. Nach drei Tagen erfolgte eine tägliche i.p. Applikation mit 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen. Jede Gruppe bestand aus 6–8 Tieren. Die Kontrolltiere wurden mit dem Vehikel PBS behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorumfänge aus jeder Gruppe \pm SEM. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Am letzten Versuchstag wurde den Tieren nach der Ibuprofen Applikation zu unterschiedlichen Zeiten (5-120 min) Blut entnommen, um den Ibuprofen Plasmaspiegel zu ermitteln, der bei der Behandlung mit 15 mg/kg S- bzw. R-Ibuprofen in den Mäusen erreicht wurde. R-Ibuprofen wird im Menschen und in der Maus, wie auch bei vielen anderen Tierarten, im Körper unidirektional zu S-Ibuprofen

umgewandelt. Daher wurde für jede Plasmaprobe sowohl die S-Ibuprofen als auch die R-Ibuprofen Konzentration mittels stereoselektiver HPLC bestimmt, auch wenn die Tiere mit nur jeweils einem Enantiomer behandelt worden waren. Die maximal gemessene S- bzw. R-Ibuprofen Konzentration im Plasma wurde nach 5 min erreicht (Abbildung 3.13). Bei den mit S-Ibuprofen behandelten Tieren sank die Plasmakonzentration von $332 \pm 51 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen (nach 5 min) innerhalb von 2 Stunden auf $34 \pm 9 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen (Abbildung 3.13 A). Fünf Minuten nach der letzten R-Ibuprofen Applikation konnte eine Plasmakonzentration von $364 \pm 44 \mu\text{M}$ R-Ibuprofen und $106 \pm 20 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen ermittelt werden. Nach 2 Stunden betrug sie nur noch $34 \pm 2 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen und eine nicht mehr zu detektierende Menge an R-Ibuprofen (Abbildung 3.13 B). Die Inversion von R- zu S-Ibuprofen wurde mit Hilfe der Flächen unter der Kurve „Plasmakonzentration_{S-Ibuprofen} versus Zeit“ ($\text{AUC}_{\text{S-Ibu}}$) für die nur mit S-Ibuprofen ($\text{AUC}_{\text{S-Ibu } 2}$) bzw. nur mit R-Ibuprofen ($\text{AUC}_{\text{S-Ibu } 1}$) injizierten Tiere kalkuliert (Geisslinger et al., 1990). Sie betrug in den *in vivo* Experimenten bei i.p. Applikation von R-Ibuprofen 54 %. Somit kann die in Abbildung 3.12 gezeigte Hemmung des Tumorwachstums nach R-Ibuprofen Behandlung nicht alleine der antiproliferativen Wirkung von R-Ibuprofen zugeschrieben werden. Dennoch findet keine schwächere Wachstumshemmung mit R-Ibuprofen statt, obwohl diese Tiere, verglichen mit den ausschließlich mit S-Ibuprofen behandelten Tieren, eine geringere S-Ibuprofen Plasmakonzentration besaßen.

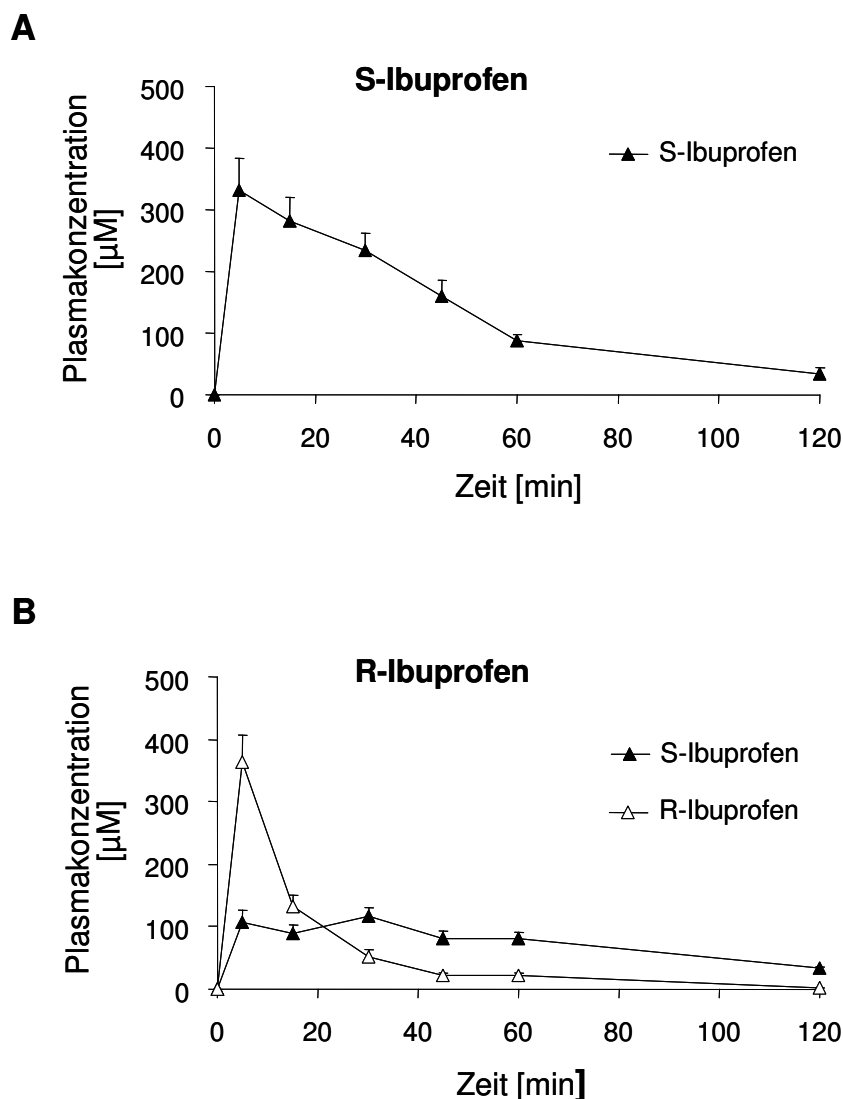


Abbildung 3.13: Plasmaspiegel nach i.p. Gabe von 15 mg/kg S-Ibuprofen (A) oder R-Ibuprofen (B). Nach der letzten Applikation von S- oder R-Ibuprofen wurde den Mäusen zu unterschiedlichen Zeiten (5-120 min) Blut entnommen und mittels HPLC die Ibuprofen Plasmaspiegel bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 5-8 Tieren pro Entnahmezeitpunkt.

3.3 Molekulare Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen

3.3.1 Regulierung des Tumorsuppressors p53 nach Ibuprofenbehandlung

Der Transkriptionsfaktor p53 wird durch zellulären Stress aktiviert und führt in der Zelle zur p53 vermittelten Induktion eines G₁- bzw. G₂-Zellzyklusblocks oder Apoptose. Um herauszufinden, ob der Zellzyklusarrest und die Induktion von Apoptose nach S- oder R-Ibuprofen Behandlung p53 vermittelt ist, wurde die Expression des Tumorsuppressors p53 mittels Western-Blot Analyse untersucht. Tumorzellen wurden ausplattiert und mit 900 µM S- bzw. R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert. Nach dem

Ernten der Zellen und der Herstellung von Gesamtproteinextrakten (2.2.12.1) wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.12.5) und mittels Western-Blot Analyse die Expression durch Hybridisierung der Membran mit Antikörper gegen p53 detektiert. In beiden Zelllinien konnte nach Behandlung mit S- oder R-Ibuprofen eine Akkumulation des p53 Proteins nach 16-24 h beobachtet werden (Abbildung 3.14).

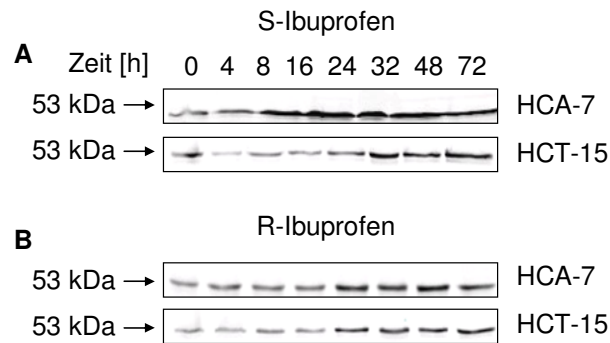


Abbildung 3.14: Regulierung der p53 Expression nach Behandlung der Tumorzellen mit S-Ibuprofen (A) und R-Ibuprofen (B). Beide Tumorzellen wurden mit 900 μ M S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert, geerntet und 30 μ g Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von p53 wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen p53-Antikörpers detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

3.3.2 Verwendetes Zellsystem: p53 exprimierende und p53 defiziente HCT-116 Tumorzellen

Um die Frage zu klären, inwieweit der Tumorsuppressor p53 eine Rolle in dem durch S- und R-Ibuprofen vermittelten Zellzyklusarrest oder in der Apoptose spielt, wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 verwendet, die keine Mutation im p53 Gen trägt und COX-2 defizient ist (Abbildung 3.15). In der Arbeitsgruppe von Dr. B. Vogelstein (Baltimore, USA) wurden beide Allele des p53 Gens in dieser Zelllinie durch homologe Rekombination gezielt inaktiviert (Bunz et al., 1998). Somit konnten die folgenden Versuche anhand von zwei isogenen HCT-116 Zelllinien durchgeführt werden, die sich nur in der Expression des p53^{wt} Gens unterschieden.

Sowohl die p53 exprimierenden (HCT-116 p53^{wt}) als auch die p53 defizienten (HCT-116 p53^{-/-}) Zellen wiesen im Western-Blot eine COX-1 Expression auf (Abbildung 3.15), ein p53 Protein wurde im Western-Blot sowohl in den Kontrollzellen (HCA-7) als auch in den HCT-116 p53^{wt} Zellen detektiert. Die HCT-116 p53^{-/-} Zellen zeigten, wie erwartet, keine p53 Expression.

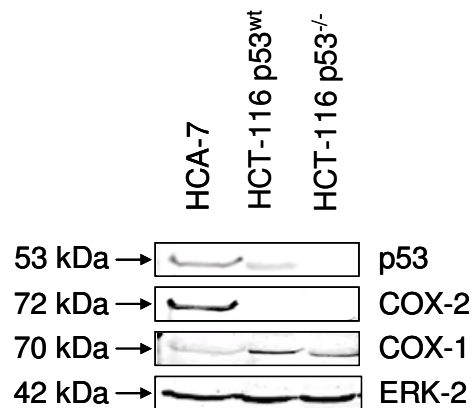


Abbildung 3.15: Western-Blot Analyse von Gesamtproteinextrakten aus p53 exprimierenden (HCT-116 p53^{wt}) und p53 defizienten (HCT-116 p53^{-/-}) Zellen. Das Gesamtprotein (30 µg) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und die Membran mit einem polyklonalem COX-1, sowie mit monoklonalen COX-2 und p53 Antikörpern hybridisiert. Der ERK-2 Antikörper diente zur Ladekontrolle. Die schon vorher verwendeten COX-1 und COX-2 exprimierenden HCA-7 Zellen wurden als Positivkontrolle aufgetragen.

3.3.3 Regulierung des Tumorsuppressors p53 in HCT-116 p53^{wt} Zellen nach S- bzw. R-Ibuprofen Behandlung

Mit Hilfe von Western-Blot Analysen wurde die Regulation des Transkriptionsfaktors p53 in HCT-116 p53^{wt} Zellen nach Behandlung mit S- oder R-Ibuprofen näher untersucht. Hierfür wurden die Tumorzellen mit 900 µM S- bzw. R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen und der Herstellung von Gesamtproteinextrakten (2.2.12.1) wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.12.5) und mittels Western-Blot Analyse die Expression durch Hybridisierung der Membran mit Antikörper gegen p53 detektiert. In den HCT-116 Kolonkarzinomzellen konnte nach einer Inkubation von 8 h (900 µM R-Ibuprofen) und 16 h (900 µM S-Ibuprofen) eine Akkumulation von p53 Protein detektiert werden (Abbildung 3.16). Verglichen mit HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen, die beide eine Mutation im p53 Gen aufweisen und in denen erst nach einer Ibuprofen Behandlung von 24 h eine Zunahme des p53 Proteins in den Zellen gezeigt werden konnte (vergleiche Abbildung 3.14), findet in HCT-116 Zellen offenbar eine frühere Stabilisierung des Proteins nach Ibuprofen Behandlung statt.

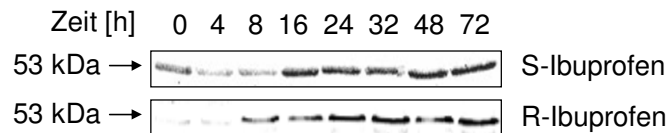


Abbildung 3.16: Akkumulation von p53 nach Behandlung der HCT-116 p53^{wt} Zellen mit S- und R-Ibuprofen. Die Zellen wurden mit 900 μ M S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert, geerntet und 30 μ g Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von p53 wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen p53 Antikörper detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Da die Akkumulation von p53 in den Zellen unter anderem durch posttranslationale Modifikationen am p53 Protein vermittelt wird, wurde nach möglichen Phosphorylierungen des Proteins gesucht. In der Western-Blot Analyse konnte eine Phosphorylierung von p53 in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne an Serin15 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.17). Es wird angenommen, dass eine Phosphorylierung von p53 an Serin15 durch verschiedene Proteinkinasen, z.B. DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), JNK (c-jun kinase) oder ATM, die Interaktion von p53 an das Onkoprotein Mdm2 unterdrückt und somit eine Stabilisierung des p53 Proteins bewirkt (Shieh, 1997 #206; Fuchs, 1998 #208).

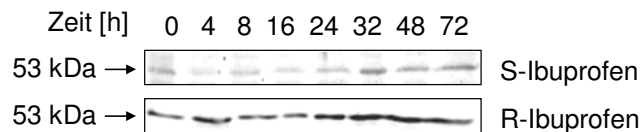


Abbildung 3.17: Phosphorylierung von p53 im N-terminalen Bereich an Serin15 nach Behandlung der HCT-116 p53^{wt} Zellen mit S- und R-Ibuprofen. Nach Behandlung der Zellen mit 900 μ M S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h wurde 30 μ g Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet und mit einem polyklonalen Antikörper, gerichtet gegen die N-terminale Phosphorylierung an Serin15, hybridisiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

3.3.4 Unterschiedliche Hemmung des Wachstums von p53 exprimierenden und p53 defizienten HCT-116 Tumorzellen

Beide Zelllinien wurden für einen Koloniebildungs-Assay ausplattiert, mit unterschiedlichen Konzentrationen an S- oder R-Ibuprofen für 11 Tage behandelt und die Kolonien nach Fixierung und Färbung ausgezählt (2.2.10.1).

Die Behandlung der Zellen mit S- und R-Ibuprofen führte sowohl in p53 exprimierenden als auch in p53 defizienten HCT-116 Zellen zur Hemmung der Proliferation (siehe Abbildung 3.18), wobei die antiproliferative Wirkung von S- und R-Ibuprofen in HCT-116 p53^{wt} Zellen signifikant stärker war als in Zellen ohne p53 Protein ($p \leq 0,01$). Im Gegensatz zu den HCT-116 p53^{-/-} war die Wachstumshemmung in den p53 wildtyp Zellen nach R-Ibuprofen Behandlung außerdem deutlich geringer als nach S-Ibuprofen. Ein Vergleich der IC₅₀-Werte (Tabelle 3.3) zeigt jedoch, dass der

Unterschied in der antiproliferativen Wirkung zwischen den beiden Enantiomeren in beiden Zelllinien nicht signifikant war. Beide Enantiomere hemmen die Proliferation der HCT-116 p53^{wt} Zellen signifikant stärker als die der Zellen ohne p53 Expression, wobei der Unterschied in der Wachstumshemmung zwischen beiden Zelllinien nach Behandlung mit S-Ibuprofen am größten war.

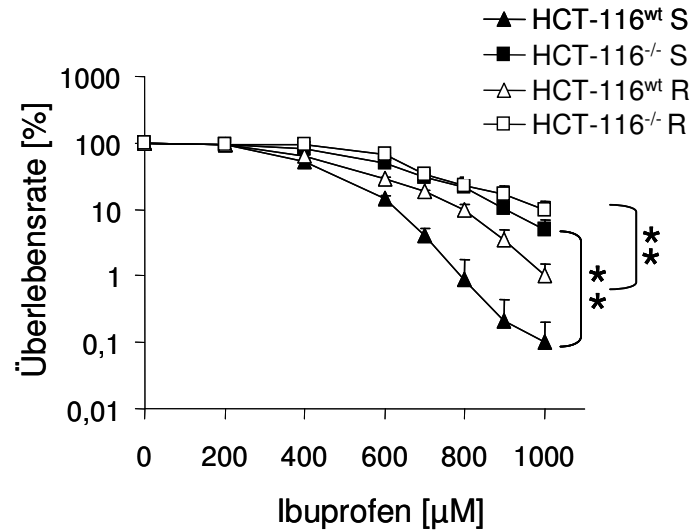


Abbildung 3.18: Proliferations-Assay für wt p53 exprimierende (HCT-116^{wt}) oder p53 defiziente HCT-116 Zellen (HCT-116^{-/-}) nach Behandlung mit 0-1000 µM S- oder R-Ibuprofen. 500 Zellen pro 5 cm Schale wurden ausplattiert und für 11 Tage in Medium mit unterschiedlichen Ibuprofen Konzentrationen (S- oder R-Ibuprofen) kultiviert. Die nach der Inkubation gewachsenen Kolonien wurden gezählt, die Anzahl der Kolonien der unbehandelten Zellen wurde als 100 % Überlebensrate definiert und der Prozentsatz von Zellkolonien in den behandelten Schalen in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ± SEM. *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01.

Zelllinie	Behandlung	
	S-Ibuprofen [µM]	R-Ibuprofen [µM]
HCT-116 p53 ^{wt}	401 ± 25,0	467 ± 10,9
HCT-116 p53 ^{-/-}	582 ± 31,5	653 ± 19,8

Tabelle 3.3: IC₅₀-Werte für die Behandlung der Tumorzellen mit S- oder R-Ibuprofen Die IC₅₀-Werte wurden mit GraphPad PRISM durch nichtlineare Regression mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf berechnet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM der IC₅₀-Werte von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.5 Zellzyklusverteilung in den HCT-116 p53^{wt} und p53^{-/-} Zellen nach S- und R-Ibuprofen Behandlung

Die p53 exprimierenden und die p53 defizienten HCT-116 Zellen wurden ausplattiert, durch Serum-Entzug synchronisiert und schließlich mit unterschiedlichen S- bzw. R-Ibuprofen Konzentrationen (0-1000 μ M) für 24 h (Zellzyklusblock) oder 72 h (Apoptose) inkubiert. Die geernteten Zellen wurden über Nacht mit 80 % Ethanol bei -20 °C fixiert und die DNA für die Messung am FACS mit Ethidiumbromid markiert (2.2.11).

In HCT-116 p53^{wt} Zellen wurde nach einer Behandlung mit $\geq 800 \mu$ M S- oder R-Ibuprofen für 24 h ein signifikanter Anstieg der Zellen in der G₁-Phase beobachtet (Abbildung 3.19 A und B). In den p53 defizienten Kolontumorzellen war die Zunahme der Zellen in der G₁-Phase nach Inkubation mit S- oder R-Ibuprofen geringer und statistisch nicht signifikant (Abbildung 3.19 C und D).

Wie schon für die HCT-15 und HCA-7 Zellen gezeigt wurde (Abbildung 3.4), war die Apoptoserate nach einer Behandlungszeit von 24 h mit $\geq 800 \mu$ M S- oder R-Ibuprofen noch gering, bei einer Behandlung der HCT-116 p53^{wt} Zellen mit $\geq 800 \mu$ M S-Ibuprofen jedoch schon signifikant erhöht (subG₁-Phase, Abbildung 3.19 A). In den mit R-Ibuprofen behandelten HCT-116 p53^{-/-} Zellen stieg die Zahl der Zellen in Apoptose bei diesem Versuch von 4 % auf bis zu 15 % signifikant an. Jedoch waren in den durch homologe Rekombination hergestellten p53 defizienten Zellen schon 4-5 % der Zellen ohne vorherige Behandlung mit Ibuprofen in Apoptose, verglichen mit < 2 % in den p53 wildtyp Zellen. Betrachtet man daher die relative Zunahme der apoptotischen Zellen nach S- und R-Ibuprofen Inkubation, so erhält man in den HCT-116 p53^{-/-} mit 900 μ M R-Ibuprofen einen ca. 3 fachen relativen Anstieg der Apoptoserate. Nach Behandlung mit 900 μ M S-Ibuprofen stieg die Apoptose um das 1,4 fache. In p53^{wt} Zellen wurde ein ca. 4 facher bzw. 2 facher Anstieg der apoptotischen Zellen nach S- bzw. R-Ibuprofen Behandlung beobachtet.

Die Ergebnisse des Proliferations-Assays und der Durchflusszytometrie weisen auf eine wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors p53 bei der Induktion des durch S- und R-Ibuprofen vermittelten Zellzyklusarrestes hin. Da jedoch auch in den Zellen ohne p53 nach Ibuprofen Behandlung ein, wenn auch geringerer, G₁-Block zu erkennen war, müssen zusätzlich auch p53 unabhängige Signalwege für die Induktion verantwortlich sein.

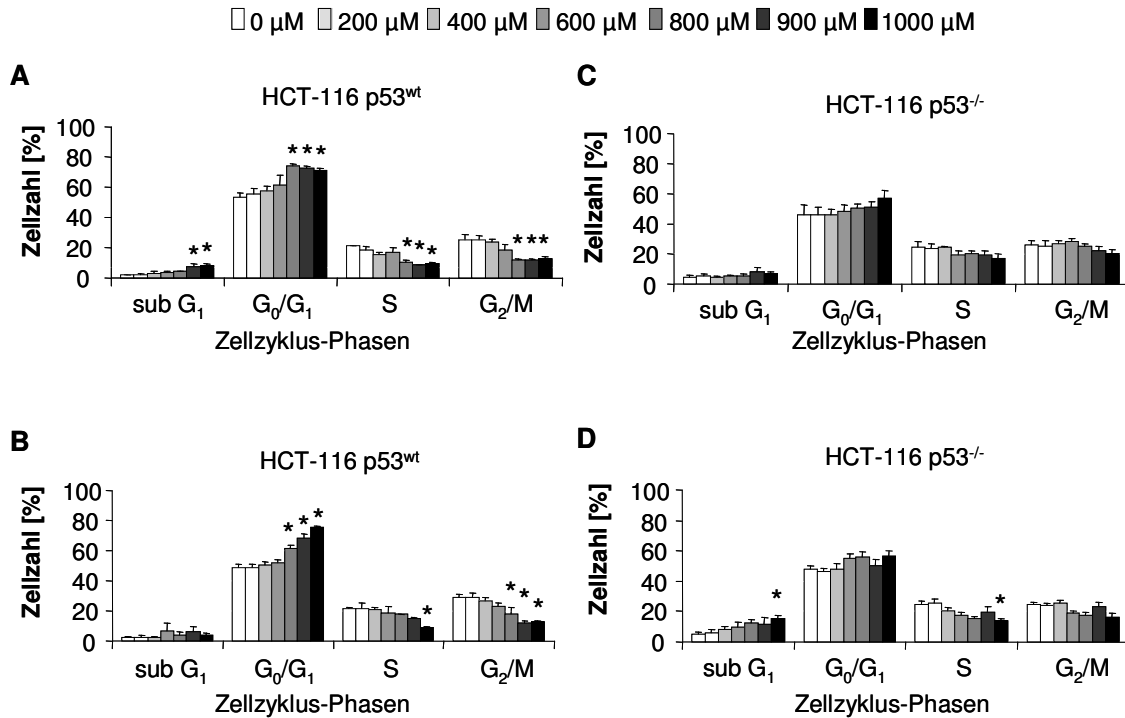


Abbildung 3.19: Bestimmung der Zellzahl in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mittels durchflusszytometrischer Messung nach Behandlung von HCT-116 p53^{wt} und HCT-116 p53^{-/-} Zellen mit S-Ibuprofen (A und C) bzw. R-Ibuprofen (B und D). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-Ibuprofen (A und C) oder R-Ibuprofen (B und D) für 24 h inkubiert und die Anzahl der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen mit Hilfe eines Durchflusszytometers ermittelt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimente \pm SEM. Die statistischen Signifikanzen beziehen sich in jeder Zellphase auf die Anzahl der unbehandelten Zellen in der jeweiligen Phase. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Für die genauere Untersuchung der Apoptoserate wurde die Inkubation mit S- und R-Ibuprofen auf 72 h verlängert, die Anzahl der Zellen in Apoptose (subG₁-Phase) mittels Durchflusszytometrie gemessen und der relative Anstieg der apoptotischen Zellen ermittelt. Die p53 exprimierenden Zellen zeigten eine signifikante Apoptosezunahme nach Behandlung mit 800–1000 μM S- oder R-Ibuprofen (Abbildung 3.20 A und B). Nach Inkubation der HCT-116 p53^{wt} Zellen mit 1000 μM S-Ibuprofen nahm die Zahl der apoptotischen Zellen um das 7 fache zu, nach 800–1000 μM R-Ibuprofen ca. um das fünffache. In den p53 defizienten HCT-116 Zellen konnte dagegen nur eine 2,5 fache maximale Erhöhung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie nach Behandlung mit beiden Enantiomeren ermittelt werden (Abbildung 3.20 C und D). In den p53 exprimierenden Zellen löste die Behandlung mit S- und R-Ibuprofen einen stärkeren Zellzyklusarrest aus, und die Apoptoserate stieg deutlich stärker an als in HCT-116 p53^{-/-} Zellen. Daraus lässt sich folgern, dass nicht nur die Induktion des G₁-Blocks, sondern auch die Apoptose in den Kolonkarzinomzellen nach S- oder R-Ibuprofen Behandlung zum Teil über p53 vermittelte Signalwege erfolgt, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Enantiomeren bezüglich der Induktion des Zellzyklusarrestes oder von Apoptose zu erkennen war.

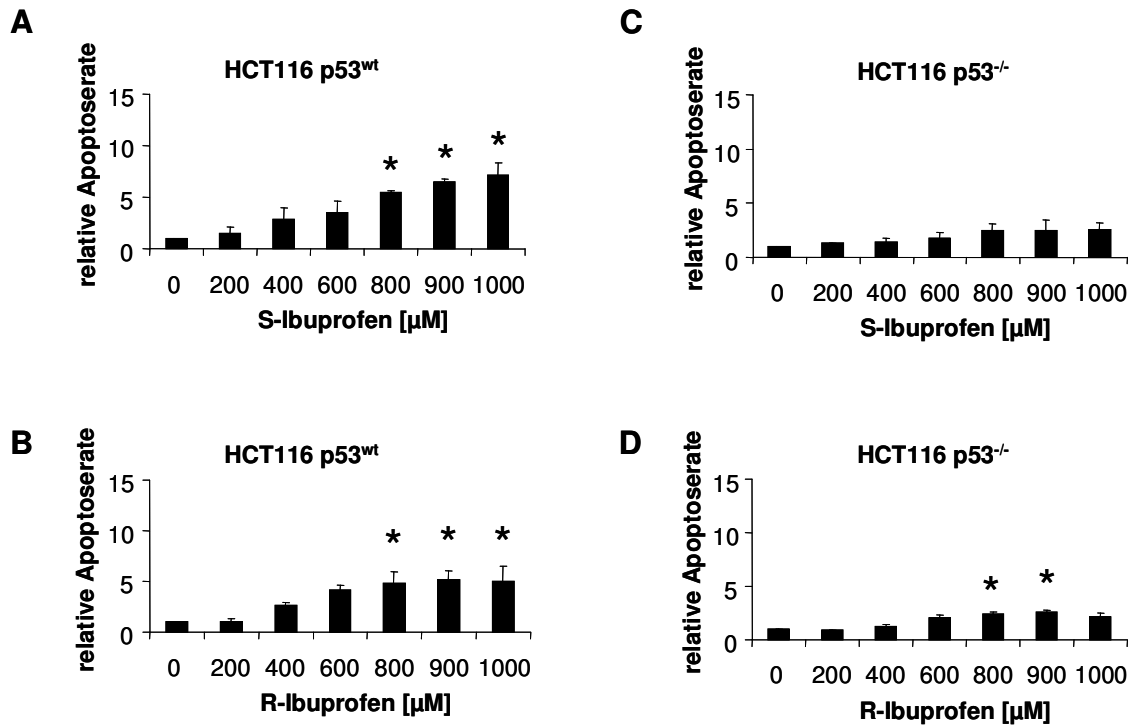


Abbildung 3.20: Durchflusszytometrische Messungen zur Detektion von Apoptose nach Behandlung der Tumorzellen mit S- oder R-Ibuprofen. HCT-116 p53^{wt} und p53^{-/-} Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-Ibuprofen (**A** und **C**) oder R-Ibuprofen (**B** und **D**) für 72 h inkubiert und die Anzahl der Zellen in der subG₁-Phase mit Hilfe eines Durchflusszytometers ermittelt. Dargestellt ist der relative Anstieg der apoptotischen Zellen, wobei die Apoptosezahl der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt wurde. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ± SEM. Die statistischen Signifikanzen beziehen sich auf die Anzahl der unbehandelten Zellen. *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01.

3.3.6 Vergleich der beiden HCT-116 Tumorzelllinien mittels Western-Blot Analyse

Sowohl der Proliferations-Assay (Abbildung 3.18) als auch die FACS-Messungen (Abbildung 3.19 und 3.20) zeigten einen Unterschied in der Sensitivität der beiden HCT-116 Zelllinien gegenüber der Behandlung mit S- und R-Ibuprofen. Um diese Ergebnisse im Western-Blot zu überprüfen, wurden HCT-116 p53^{wt} und p53^{-/-} Zellen ausplattiert und mit 900 μM S- bzw. R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.12.5) und im Western-Blot die Expression durch Hybridisierung der Membran mit Cyclin-Antikörpern detektiert (2.2.12.6). Obwohl eine signifikant größere Anzahl von HCT-116 p53^{wt} Zellen nach S- oder R-Ibuprofen Behandlung im Zellzyklus arretiert waren, war der Unterschied in der Cyclin A (Abbildung 3.21 A und B) und Cyclin B (Abbildung 3.21 C und D) Regulation nur gering. In p53^{wt} Zellen wurde nach Inkubation für 16 h mit 900 μM S- bzw. R-Ibuprofen kein Cyclin A Protein mehr detektiert, in p53^{-/-} Zellen erst nach einer Inkubation mit S-Ibuprofen für 24 h und R-Ibuprofen für 48 h. Auch die Abnahme von Cyclin B konnte nach Behandlung mit S-Ibuprofen in p53^{wt} Zellen etwas früher beobachtet werden (C). Der an der Zellzyklusregulation beteiligte Cyclin-abhängige Kinase

Inhibitor $p27^{KIP1}$ nahm nach einer Inkubationszeit von 16 h mit S- bzw. R-Ibuprofen in beiden Zelllinien zu (Abbildung 3.22).

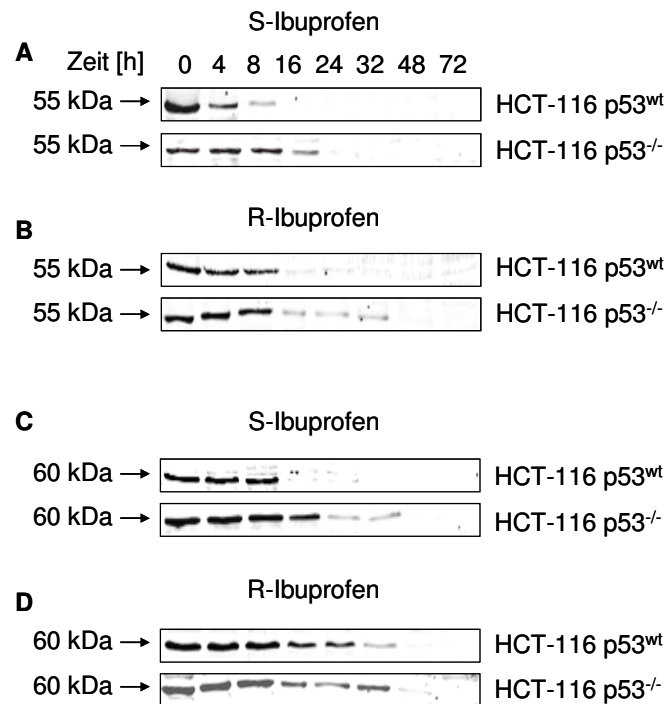


Abbildung 3.21: Cyclin A (A und B) und Cyclin B (C und D) Expression nach Behandlung der Tumorzellen mit S- oder R-Ibuprofen. Beide Tumorzelltypen wurden mit 900 μ M S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert, geerntet und 30 μ g Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von Cyclin A und B wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines monoklonalem Cyclin A und einem polyklonalem Cyclin B Antikörper detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

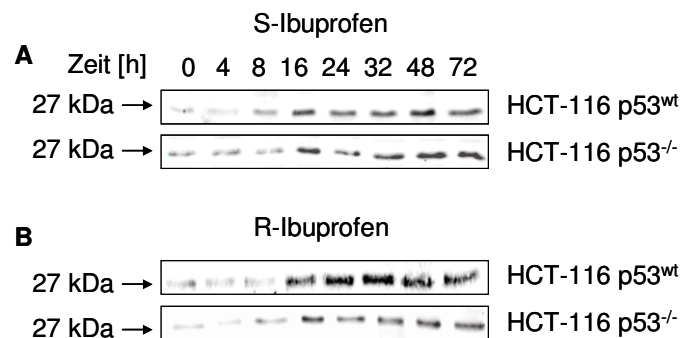


Abbildung 3.22: $p27^{KIP1}$ Expression nach Behandlung der Tumorzellen mit S-Ibuprofen (A) und R-Ibuprofen (B). Nach Inkubation mit 900 μ M S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h wurden die Zellen geerntet und 30 μ g Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von $p27^{KIP1}$ wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

3.3.7 Antiproliferative Wirkung von S- und R-Ibuprofen in subkutanen HCT-116 p53^{wt} und p53^{-/-} Tumoren

Die schwächere antiproliferative Wirkung beider Enantiomere in HCT-116 p53^{-/-} Zellen wurde *in vivo* im Tumormausmodell mit NMRI-nu Nacktmäusen bestätigt. Wie schon im vorherigen Tierexperiment (3.2.6.1) wurden den Mäusen die Tumorzellen (in diesem Fall HCT-116 p53^{wt} oder p53^{-/-}) in die rechte und linke dorsale Flanke injiziert (2.2.14.1). Die Tiere wurden mit 15 mg/kg S- bzw. R-Ibuprofen täglich intraperitoneal behandelt. In den Mäusen mit implantierten HCT-116 p53^{wt} Zellen führte, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren, sowohl die Behandlung mit S-Ibuprofen als auch die mit R-Ibuprofen zu deutlich kleineren Tumoren. Der Unterschied zwischen Kontroll- und behandelten Tieren war jedoch nur in der R-Ibuprofen Gruppe signifikant (Abbildung 3.23 A). Das Wachstum der HCT-116 p53^{-/-} Tumore konnte weder mit S- noch mit R-Ibuprofen signifikant gehemmt werden (Abbildung 3.23 B).

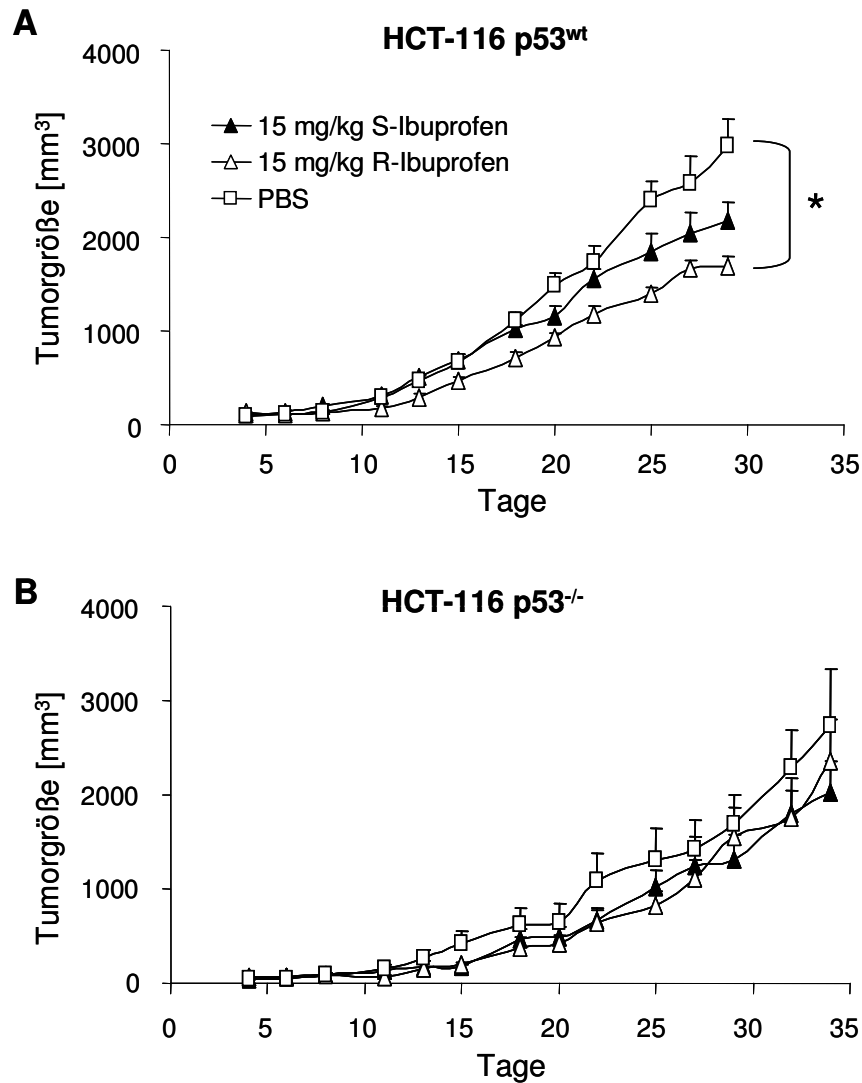


Abbildung 3.23: Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen nach einer täglichen Behandlung mit 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen. HCT-116 p53^{wt} (A) und p53^{-/-} (B) Zellen wurden subkutan in die dorsale Flanke injiziert. Nach drei Tagen erfolgte eine tägliche Applikation von 15 mg/kg S-Ibuprofen, 15 mg/kg R-Ibuprofen oder nur PBS (Kontrolle). Jede Gruppe bestand aus 8 Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorgroßen aus jeder Gruppe \pm S.E.M. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

3.3.8 Induktion von Apoptose über p53 Aktivierung und Regulation von Bax

Der Tumorsuppressor p53 vermittelt Apoptose durch Aktivierung der Transkription von proapoptotischen Genen oder über nicht-transkriptionelle Mechanismen. So führt die Aktivierung von p53 zur erhöhten Expression von Bax, einem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2 Familie (1.6.2). In der inaktiven Form liegt Bax als Monomer im Cytosol vor. Die Aktivierung erfolgt durch das Bcl-2 Protein Bid, es kommt zur Homo-Oligomerisierung von Bax und Einbau in die äußere mitochondriale Membran. Die Oligomerisierung in der äußeren Membran führt zur Freisetzung von Apoptose induzierenden Faktoren wie Cytochrom c, Smac, Endonuclease G und AIF ins Cytosol. Um die Expression von Bax in den beiden Tumorzelltypen zu untersuchen, wurden die Zellen nach dem

Ausplattieren mit 900 μM S- oder R-Ibuprofen behandelt, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-72 h) geerntet und sowohl die zytosolische als auch die mitochondriale Proteinfraction gewonnen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine (2.2.12.5) erfolgte die Detektion von Bax mittels Western-Blot Analyse. Mit dem verwendeten polyklonalem Antikörper konnte in der zytosolischen und in der mitochondrialen Fraction eine Bande bei 23 kDa detektiert werden (Abbildungen 3.24 und 3.25). In den HCT-116 p53^{wt} Zellen stieg die Bax Expression im Zytosol nach einer S- bzw. R-Ibuprofen Inkubation von 16 Stunden deutlich an (Abbildung 3.24). Die p53^{-/-} Zellen zeigten im Vergleich dazu eine schwächere Zunahme der Bax Expression im Zytosol.

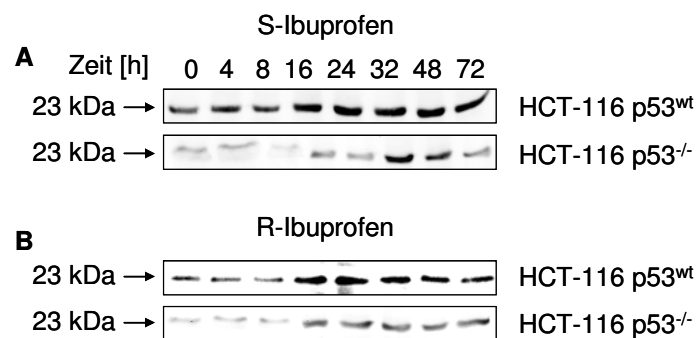


Abbildung 3.24: Western-Blot Analyse der Bax Expression im Zytosol nach Behandlung der Tumorzellen mit S-Ibuprofen (A) und R-Ibuprofen (B). HCT-116 p53^{wt} und p53^{-/-} Zellen wurden mit 900 μM S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert. Für jede Inkubationszeit wurden 30 μg Protein der zytosolischen Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt und die Bax Expression mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Auch in der mitochondrialen Fraction konnte nach Inkubation mit S- und R-Ibuprofen für 16 h ein Anstieg an Bax Protein in den p53 wildtyp Zellen gezeigt werden (Abbildung 3.25). In den p53 defizienten Zellen hingegen wurde nur eine geringe Menge an Bax Proteinen in der mitochondrialen Fraction nachgewiesen. Die Behandlung mit S- bzw. R-Ibuprofen führte in diesen Zellen zu keinem Anstieg der Bax Proteinmenge.

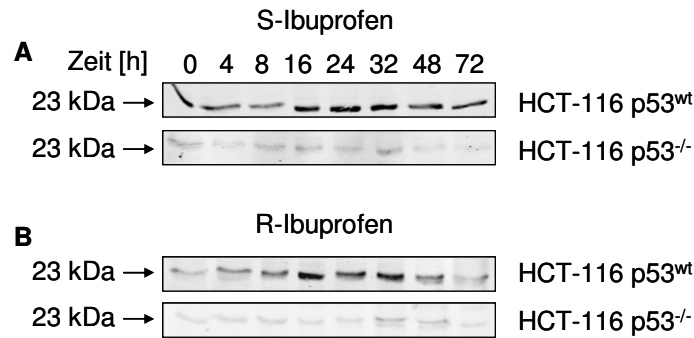


Abbildung 3.25: Translokation von Bax in die mitochondriale Membran nach Behandlung der Zellen mit S-Ibuprofen (A) und R-Ibuprofen (B). HCT-116 p53^{wt} und p53^{-/-} Zellen wurden mit 900 μ M S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert, 30 μ g Protein der mitochondrialen Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot Analyse die Proteinmenge an Bax detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass nach Inkubation der HCT-116 p53^{wt} Zellen mit S- oder R-Ibuprofen eine Zunahme an Bax im Zytosol und eine Translokation vom Zytosol in die Membran der Mitochondrien stattfand. Die Expression von Bax im Zytosol nahm in beiden Zelltypen zu, jedoch war die Zunahme in den p53 exprimierenden Zellen stärker als in den p53 defizienten. In den Membranen der Mitochondrien wurde in den p53 defizienten Zellen nur eine geringe Menge an Bax Protein mittels Western-Blot Assay nachgewiesen die nicht durch die Behandlung mit S- bzw. R-Ibuprofen beeinflusst wurde.

Die Expression von Bax wird also zu einem großen Teil durch den Tumorsuppressor p53 reguliert. Es findet jedoch scheinbar auch eine p53 unabhängige Regulierung der Bax Expression statt, was zu der geringeren zytosolischen Erhöhung der Bax Expression in den p53^{-/-} Zellen führt.

3.3.9 Regulation der Induktion von Zellzyklusblock und Apoptose über den Neurotrophin Rezeptor p75^{NTR}

Die Aktivierung von Rezeptoren der TNF (tumor necrosis factor) Superfamilie führt, wie schon beschrieben, zur Einleitung des extrinsischen Apoptosewegs (1.6.2). Zu dieser Familie gehört auch der Neurotrophin-Rezeptor p75 (p75^{NTR}), für den eine Funktion als Tumorsuppressor in Blasen- und Prostatakarzinomzellen nachgewiesen wurde (Krygiel et al., 2001; Khwaja et al., 2003). Die Überexpression des Membranrezeptors führte zu einem G₁-Zellzyklusblock und einer erhöhten Apoptoserate (Krygiel et al., 2001). *In vitro* konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivierung des p75^{NTR} Rezeptors zur erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors p53 und dessen Zielgen Bax führt (Aloyz et al., 1998).

Um zu untersuchen, ob S- und R-Ibuprofen ihre antiproliferative Wirkung in den kolorektalen Karzinomzellen über Aktivierung des Membranrezeptors p75^{NTR} vermitteln, wurden die HCT-116 p53 exprimierenden und p53 defizienten Zellen mit 900 μ M S- oder R-Ibuprofen für 0-72 h inkubiert.

Die Gesamtproteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.12.5) und die Expression des Membranrezeptors mit einem polyklonalen p75^{NTR} Antikörper detektiert. In beiden Zellen wurde die Expression des Rezeptors bei einer Inkubation von ≥ 16 h mit S- oder R-Ibuprofen hochreguliert (Abbildung 3.26).

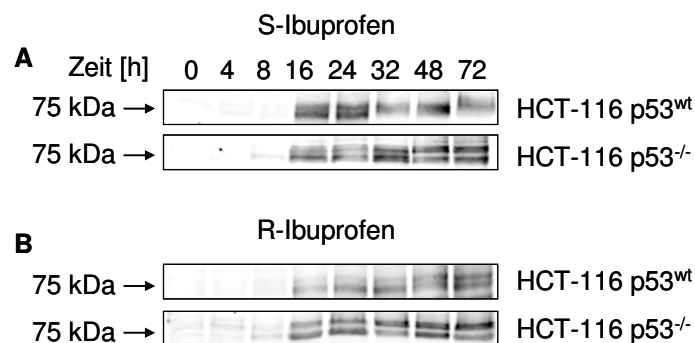


Abbildung 3.26: Expression im Western-Blot von p75^{NTR} nach Behandlung mit 900 μ M S- bzw. R-Ibuprofen. Beide HCT-116 Zelllinien wurden mit 900 μ M S-Ibuprofen (A) oder R-Ibuprofen (B) für 0-72 h inkubiert und 30 μ g Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von p75^{NTR} wurde mit einem polyklonalem Antikörper detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Um den Zusammenhang zwischen Aktivierung des TNF-Rezeptors p75^{NTR} und den erhöhten Proteinkonzentrationen an Transkriptionsfaktor p53 in den Tumorzellen zu untersuchen, wurden die HCT-116 p53^{wt} Zellen für 48 h mit S- oder R-Ibuprofen behandelt. Während ein Teil der Zellen nur mit den Ibuprofen Enantiomeren behandelt wurde (Abbildung 3.27, Spur 3 und 5), wurde der andere Teil zusätzlich auch noch mit einem Liganden des p75^{NTR} Rezeptors (100 ng/ml NGF; nerve growth factor) stimuliert (Spur 4 und 6). Als Kontrolle dienten Zellen ohne oder nur mit NGF Behandlung (Abbildung 3.27, Spur 1 und 2). In den mit S-Ibuprofen und R-Ibuprofen behandelten Zellen konnte eine Abnahme der p53 Proteinmenge nach NGF Zugabe beobachtet werden. Dies stimmt mit einem anderen Versuch überein, bei dem die externe Zugabe von NGF zu einer Aufhebung der p75^{NTR} vermittelten Hemmung der Zellproliferation von Blasen-tumorzellen führte (Khwaja et al., 2003). Die p75^{NTR}-vermittelte Induktion der Expression oder/und Stabilisierung von p53 nach S- und R-Ibuprofen Behandlung wurde also durch Zugabe des Liganden NGF teilweise wieder aufgehoben. In den ohne Ibuprofen behandelten Zellen führte die Behandlung mit NGF zu keiner Abnahme der p53 Proteinmenge in den HCT-116 p53^{wt} Zellen.

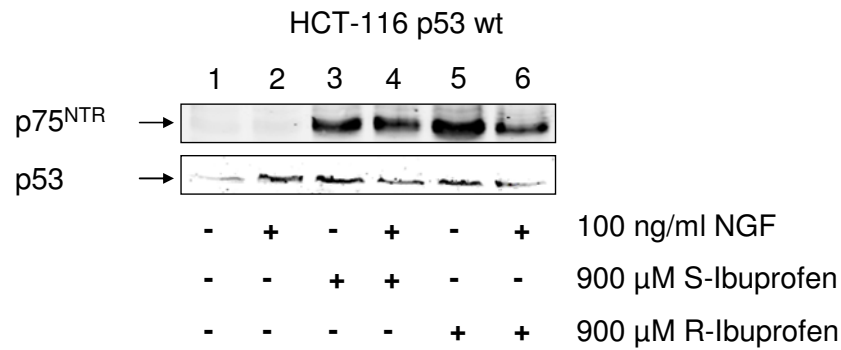


Abbildung 3.27: Expression von p53 und p75^{NTR} nach Behandlung von p53^{wt} Zellen mit beiden Ibuprofen Enantiomeren und NGF. HCT-116 p53^{wt} Zellen wurden mit 900 µM S-Ibuprofen (3,4) oder R-Ibuprofen (5,6) für 48 h behandelt. Dabei wurde ein Teil der Zellen nur mit den Enantiomeren, ein anderer Teil gleichzeitig mit NGF inkubiert. Als Kontrolle dienten HCT-116 p53^{wt} Zellen, die unbehandelt waren oder nur mit NGF stimuliert wurden (1,2). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

3.4 Hemmung der PGE₂ Synthese durch R-Ibuprofen

3.4.1 Messung von PGE₂ in HCA-7 Tumorzellen nach S- und R-Ibuprofen Behandlung

Obwohl R-Ibuprofen keine wesentliche Hemmung der COX-Aktivität aufweist, zeigten die COX exprimierenden HCA-7 Zellen nach Inkubation mit dem R-Enantiomer eine geringere PGE₂ Synthese als die unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 3.28 B). Für die Messung von PGE₂ wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an S- bzw. R-Ibuprofen (1-1000 µM) für 24 h inkubiert und der Gehalt an PGE₂ im Medium mittels PGE₂-ELISA bestimmt (2.2.9.2). Im Vergleich mit S-Ibuprofen (Abbildung 3.28 A) zeigte die Behandlung mit R-Ibuprofen (Abbildung 3.28 B) eine schwächere Hemmung der PGE₂ Synthese, dennoch wurde nach einer Behandlung mit 75 µM R-Ibuprofen für 24 h mehr als 50 % der PGE₂ Synthese gehemmt ($IC_{50 \text{ R-Ibuprofen}} = 70,9 \mu\text{M} \pm 16,2$). Nach einer Inkubation mit 800-1000 µM R-Ibuprofen betrug die Hemmung der PGE₂ Synthese sogar über 80 %. Im Vergleich hierzu wurde nach einer Inkubation mit 200-1000 µM S-Ibuprofen im Medium der HCA-7 Zellen nur noch eine PGE₂-Konzentration von $\leq 100 \text{ pg/ml}$ (Hemmung der PGE₂ Synthese von $> 97 \%$) gemessen (Abbildung 3.28 A; $IC_{50 \text{ S-Ibuprofen}} = 3,0 \mu\text{M} \pm 0,7$). In den unbehandelten Kontrollzellen betrug die im Medium gemessene PGE₂ Menge ca. 3400 pg/ml (100 %).

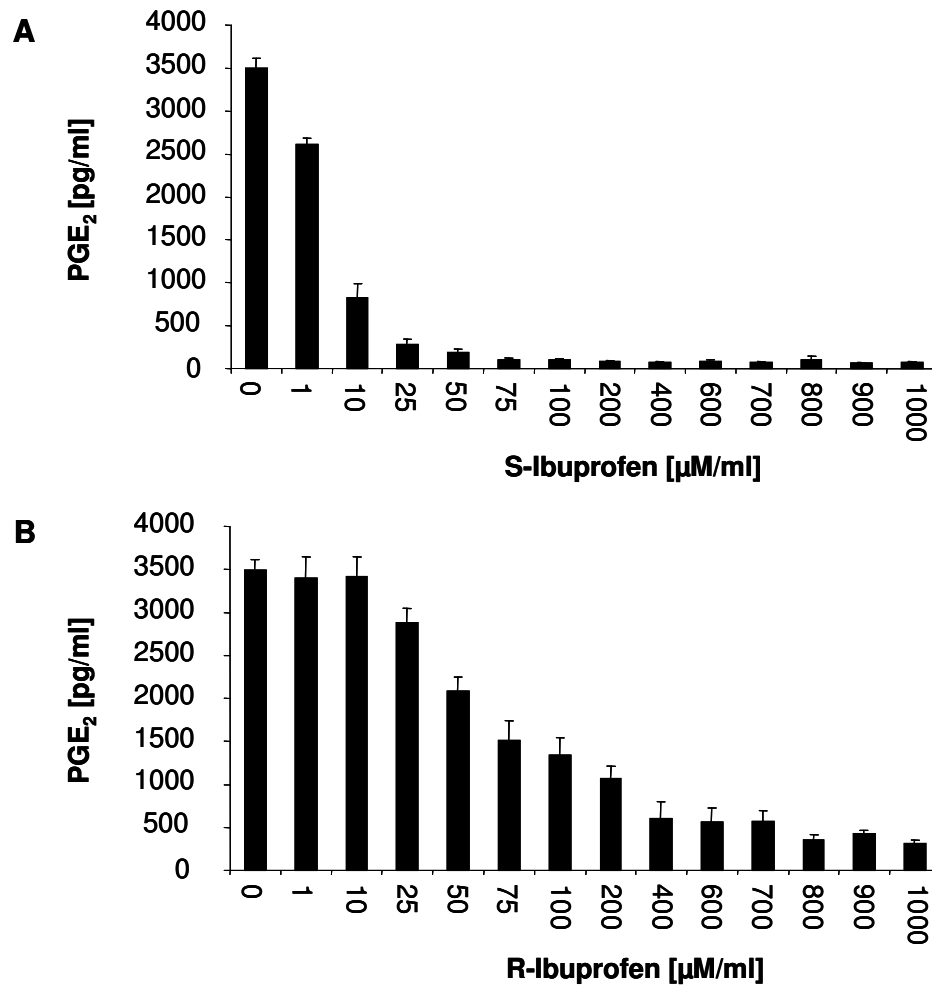


Abbildung 3.28: PGE₂-Messung in HCA-7 Zellen nach S- und R-Ibuprofen Behandlung. HCA-7 Zellen wurden für 24 h mit 1-1000 μM S-Ibuprofen (A) oder R-Ibuprofen (B) behandelt und die Menge an PGE₂ im PGE₂-ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Experimente.

Zelllinie	Behandlung	
	S-Ibuprofen [μM]	R-Ibuprofen [μM]
HCA-7	$3,0 \pm 0,7$	$70,9 \pm 16,2$

Tabelle 3.4: IC₅₀-Werte (50 % PGE₂ Hemmung) für die Behandlung der Tumorzellen mit S- oder R-Ibuprofen. Die IC₅₀-Werte wurden mit GraphPad PRISM durch nichtlineare Regression mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf berechnet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM der IC₅₀-Werte von drei unabhängigen Experimenten.

3.4.2 Aktivität von mPGES-1 und Expression von cPGES, mPGES-1 und mPGES-2 nach Behandlung der Zellen mit beiden Ibuprofen Enantiomeren

An der Synthese von Prostaglandin E₂ aus Arachidonsäure sind nicht nur die Cyclooxygenasen, sondern auch spezifische Prostaglandin E-Synthasen (PGE-Synthasen) beteiligt. Sie wandeln das Endoperoxid PGH₂ in PGE₂ um. Mittlerweile sind drei PGE-Synthasen bekannt, die zytoplasmatische PGE-Synthase (cPGES) und die Membran-gebundenen PGE-Synthasen-1 und -2 (mPGES-1 und mPGES-2) (Jakobsson et al., 1999; Murakami et al., 2000; Tanioka et al., 2000). Die konstitutiv exprimierte cPGE-Synthase ist überwiegend mit der COX-1 gekoppelt und im Zytosol lokalisiert. Möglicherweise ist sie zusammen mit COX-1 hauptsächlich für die physiologische PGE₂ Synthese verantwortlich. Die induzierbare mPGES-1 ist überwiegend an die COX-2 gebunden (beide Enzyme sind in der perinuklearen Membran lokalisiert).

Um zu überprüfen, ob S- und R-Ibuprofen die Prostaglandin E₂ Synthese COX unabhängig durch Inhibierung der Expression oder Aktivität von PGE-Synthasen hemmen, wurden HeLa Zellen verwendet, die sich in ihrer PGE₂ Produktion und mPGES-1 Expression durch Zugabe von IL-1 β und TNF- α stimulieren lassen. Die Zellen wurden mit 1 ng/ μ l IL-1 β und 5 ng/ml TNF- α für 24 h behandelt und gleichzeitig mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-Ibuprofen (Abbildung 3.29 A und B) oder R-Ibuprofen (Abbildung 3.29 C und D) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die HeLa Zellen wurden geerntet und die mikrosomale Proteinfraction (für die mPGES-1 und mPGES-2) bzw. zytosolische Fraktion (cPGES) gewonnen (2.2.12.2 und 2.2.12.3). Von den jeweiligen Proben wurden je 30 μ g Protein elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.12.5) und die Expression der PGE-Synthasen mit den jeweiligen polyklonalen Antikörpern im Western-Blot Assay detektiert (A und C). Für jede Behandlung wurde außerdem die PGE₂ Menge im Medium mittels PGE₂-ELISA bestimmt (B und D). In den mit 0-80 μ M S-Ibuprofen behandelten Zellen wurde keine Hemmung der cPGES, mPGES-1 und mPGES-2 Expression beobachtet (3.29 A). Im PGE₂-ELISA zeigten die HeLa Zellen bei einer Behandlung von 10 μ M S-Ibuprofen nur noch eine PGE₂ Produktion von $\leq 1,8$ % (Abbildung 3.29 B). Auch durch die Behandlung mit R-Ibuprofen wurden weder die cPGES noch die mPGES-2 Expression gehemmt. Die mPGES-1 Expression nahm nur gering bei einer Behandlung mit 400 μ M R-Ibuprofen ab, eine Konzentration, bei der die PGE₂ Produktion der Zellen, verglichen mit der PGE₂ Menge von unbehandelten Zellen, nur noch ca. 2,9 % betrug (Abbildung 3.29 D).

Schließlich wurde anhand eines mPGES-1 Aktivitätsassay, der von Jakobsson et al. entwickelt wurde, die Aktivität der mPGES-1 nach S- und R-Ibuprofen Inkubation gemessen (Jakobsson et al., 1999; Thoren et al., 2000). HeLa Zellen wurden wie vorher beschrieben mit 1 ng/ μ l IL-1 β und 5 ng/ml TNF- α für 24 h stimuliert und die mikrosomale Fraktion geerntet. Die gewonnenen Proteinfractionen wurden mit PGH₂ und den jeweiligen Konzentrationen an S- oder R-Ibuprofen inkubiert und die umgesetzte Menge an PGE₂ mittels LC-MS/MS gemessen (2.2.15). Weder S- noch R-Ibuprofen

zeigten eine Hemmung der mPGES-1 Aktivität (Abbildung 3.30). Die bei der Behandlung von HeLa Zellen mit R-Ibuprofen beobachtete Hemmung der PGE₂ Synthese kann daher weder durch die Hemmung der mPGES-1 Aktivität noch durch Hemmung der Expression von cPGES, mPGES-1 oder mPGES-2 erklärt werden.

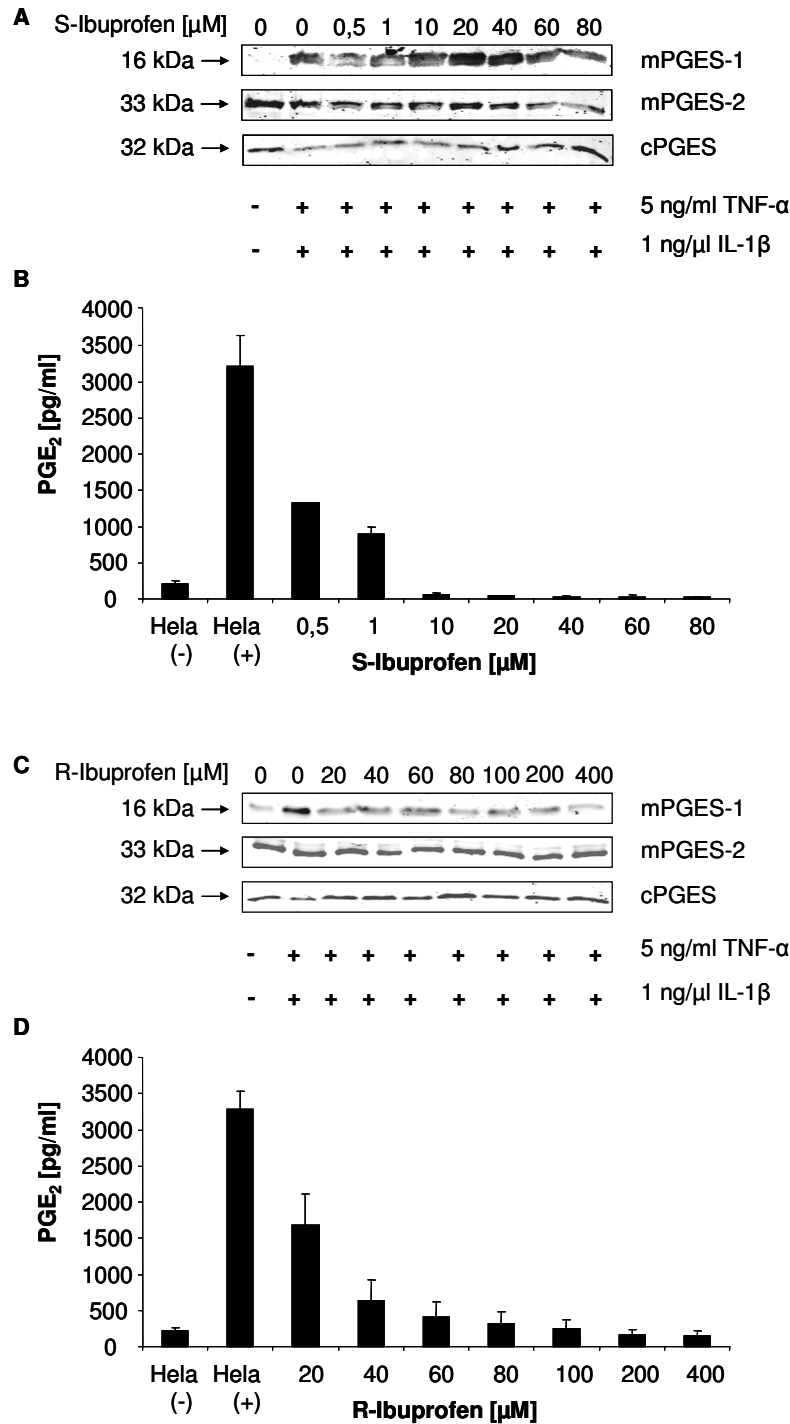


Abbildung 3.29: Expression von cPGES, mPGES-1 und -2 nach Behandlung von HeLa Zellen mit S-Ibuprofen (A) und R-Ibuprofen (C). HeLa Zellen wurden für 24 h mit TNF- α und IL-1 β stimuliert und gleichzeitig mit S- oder R-Ibuprofen behandelt. 30 μ g Protein der zytosolischen Fraktion (cPGES) bzw. mikrosomalen Fraktion (mPGES) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Expression der PGE-Synthasen

mittels Western-Blot Analyse detektiert. Die PGE₂ Synthese in den Zellen nach S-Ibuprofen (**B**) und R-Ibuprofen (**D**) Behandlung wurde mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten (ELISA) ± SD oder ein repräsentativer Western-Blot. (**HeLa (-)**, Kontrollzellen; **HeLa (+)**, stimulierte Zellen).

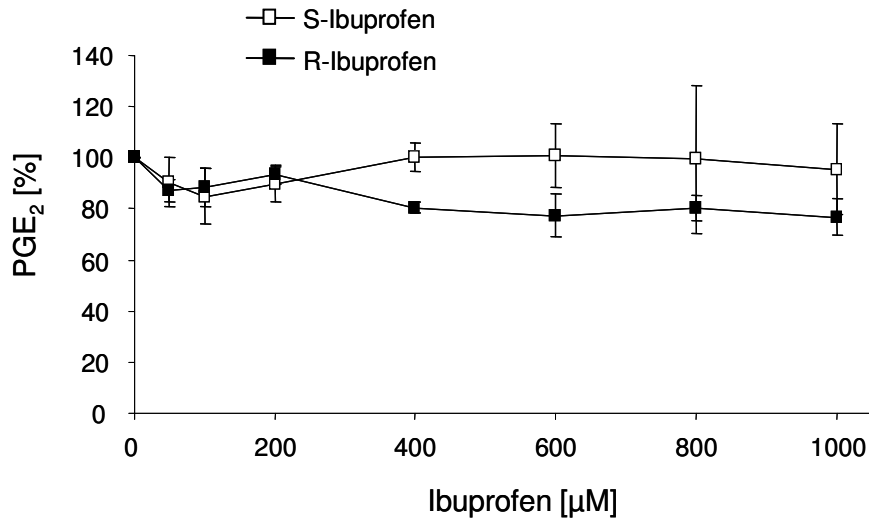


Abbildung 3.30: Aktivität von mPGES-1 nach Behandlung von Tumorzellen mit S- bzw. R-Ibuprofen. HeLa Zellen wurden für 24 h mit TNF- α und IL-1 β stimuliert und die mikrosomale Proteinfraction gewonnen. Nach Inkubation der Fraction mit PGH₂ und S- bzw. R-Ibuprofen wurde die Konzentration an umgesetzten PGE₂ mittels LC-MS/MS bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ± SD.

4 Diskussion

4.1 COX abhängige und COX unabhängige Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) gehören zu den weltweit am meisten eingesetzten Pharmaka. Ibuprofen wird aufgrund der guten antiphlogistischen und analgetischen Wirkung überwiegend als Antiphlogistikum (z.B. bei rheumatoider Arthritis und Arthrose) oder als Analgetikum bei leichten bis mittelstarken Schmerzen eingesetzt. Mittlerweile weiß man, dass NSAIDs nicht nur eine analgetische und entzündungshemmende Wirkung aufweisen, sondern sich außerdem bei kontinuierlicher Einnahme über einen längeren Zeitraum protektiv auf die Karzinogenese auswirken können. So wurde in einer Fall-Kontroll-Studie bei einer regelmäßigen Einnahme von Ibuprofen in nicht verschreibungspflichtigen Dosen (schon bei $PPD \leq 1$ und bei $PPD \geq 1$; $PPD = \text{pills per day}$), sowie bei Einnahme von anderen "over the counter" NSAIDs ($PPD \geq 1$) ein vermindertes Prostatakrebsrisiko nachgewiesen (Nelson et al., 2000). Ein geringeres Brustkrebsrisiko konnte bei einer Einnahme des Razemats über mehrere Jahre in prospektiven Studien von Harris et al. gezeigt werden (Harris et al., 1999; Harris et al., 2003). Auch für das Kolonkarzinom wurde eine verminderte Inzidenzrate nach Ibuprofengabe im Maus- und Rattenmodell beobachtet (Reddy et al., 1992; Yao et al., 2005). Die dem Futter zugesetzte Ibuprofen Konzentration im Mausmodell betrug 1360 ppm (parts per million), dabei wurde in den Tieren eine mittlere Ibuprofen Plasmakonzentration nachgewiesen, die noch unter der maximalen Plasmakonzentration lag, die im Menschen nach Einnahme von Ibuprofen in therapeutischen Dosen erreicht wird. Im Rattenmodell betrug die verabreichte Menge an Ibuprofen 80 % der maximal verträglichen Dosis (MTD; maximum tolerated dose). Während die antiphlogistische und analgetische Wirkung von Ibuprofen hauptsächlich auf die Hemmung der Cyclooxygenasen zurückgeführt wird, wird inzwischen für die antikarzinogene Wirkung von Ibuprofen angenommen, dass neben der COX-Hemmung auch COX unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen. Um zu untersuchen, inwieweit die Hemmung der Cyclooxygenasen für die antikarzinogene Wirkung von Ibuprofen verantwortlich ist, wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit mit zwei humanen Kolonkarzinom-Zelllinien durchgeführt, die sich in ihrer COX Expression voneinander unterscheiden. Während HCT-15 Tumorzellen ausschließlich die COX-1 konstitutiv exprimieren, zeigen HCA-7 Adenokarzinomzellen eine konstitutive COX-1 und COX-2 Expression. Außerdem wurden an Stelle des Razemats die gereinigten Ibuprofen Enantiomere verwendet, von denen in therapeutisch relevanten Konzentrationen nur das S-Ibuprofen ein potenter COX-Inhibitor ist (Adams et al., 1976).

Im Proliferations-Assay wurde nach Behandlung mit S- oder R-Ibuprofen eine Hemmung des Zellwachstums sowohl in den HCA-7 als auch in den HCT-15 Zellen beobachtet. Dabei führt die

Zugabe von $\geq 600 \mu\text{M}$ S- oder R-Ibuprofen in den HCT-15 und HCA-7 Zelllinien nach 24 h zu einem Zellzyklusblock in der G₁-Phase und nach 72 h zu einem Anstieg der Apoptoserate. Diese Ergebnisse bestätigen jene aus *in vitro* Untersuchungen von Andrews et al. an humanen Prostatakarzinomzellen (Andrews et al., 2002). Hier wurde nach einer Inkubation von 1 mM Ibuprofen Razemat für 48 h ein G₁-Zellzyklusblock und Apoptose sowohl in Androgen-sensitiven als auch in Androgen-insensitiven Prostatakarzinomzellen nachgewiesen, nicht aber in normalen Fibroblasten. Im Vergleich zu 1 mM Acetylsalicylsäure und 1 mM Naproxen führte die Behandlung mit 1 mM Ibuprofen zu einer stärkeren Hemmung der Zellproliferation (Andrews et al., 2002). Auch die Proliferation der Kolonkarzinomzellen MC-26 und HT-29 wurde *in vitro* durch die Inkubation mit 1000 μM Ibuprofen Razemat für 48 h signifikant gehemmt (Yao et al., 2005).

Die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose erfolgte in der vorliegenden Arbeit in beiden Zelllinien, unabhängig von deren COX Expressionstatus. Zudem zeigten beide Ibuprofen Enantiomere die gleiche antiproliferative und apoptotische Wirkung auf die Kolonkarzinomzellen, obwohl R-Ibuprofen in therapeutisch relevanten Konzentrationen keine COX Hemmung aufweist. Im Proliferations-Assay wurde zwar nach Behandlung mit dem COX hemmenden S-Enantiomer im Vergleich zum R-Enantiomer eine sichtbar stärker Wachstumshemmung beobachtet (Abbildung 3.3), dieser Effekt konnte jedoch auch in den COX-2 defizienten Zellen beobachtet werden und war zudem nicht signifikant. Somit lässt sich aus den vorliegenden *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit ableiten, dass nicht nur die Hemmung der Cyclooxygenase für die antikarzinogene Wirkung von S-Ibuprofen verantwortlich ist, sondern dass beide Ibuprofen Enantiomere auch über COX unabhängige Mechanismen einen Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren.

In einer Studie von Sheng et al. wurde für den COX-2 selektiven Inhibitor SC-58125 in den gleichen Kolonkarzinomzellen nur eine Hemmung der Zellproliferation (*in vitro*) und des Tumorwachstums (Tumormausmodell) in den COX-2 exprimierenden HCA-7 Zellen nachgewiesen, die COX-2 defizienten HCT-116 Zellen wurden nicht in ihrem Wachstum beeinflusst (Sheng et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden für einen weiteren COX-2 selektiven Hemmer, Meloxicam, in HCA-7 und HCT-116 Kolonkarzinomzellen gezeigt, dabei ging die Hemmung des Tumorwachstums von HCA-7 Zellen im Maustumormodell einher mit einer Hemmung der COX-2 (Goldman et al., 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass die COX-2 Hemmung ein wichtiger Mechanismus für die Inhibierung der Zellproliferation in COX-2 exprimierenden Karzinomzellen ist, COX unabhängige Mechanismen wurden hier nicht beobachtet. Für das Ibuprofen Razemat wurde bei einer täglichen Einnahme von 300 mg eine Senkung der PGE₂ Konzentration in der rektalen Mukosa von Patienten mit vorhergegangener Polypenresektion beschrieben (Chow et al., 2000). In einer Studie von Yao et al. wurden COX-2 exprimierende MC-26 und HT-29 Kolonkarzinomzellen *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ibuprofen Razemat (250 - 1000 μM) für 1-3 Tage inkubiert. Die Behandlung mit 1000 μM Ibuprofen führte in beiden Zelllinien nach 24 h zu einer signifikanten Hemmung von PGE₂ und nach 48 h zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation. *In vivo* wurde in MC-26 Tumore

von BALB/c Mäusen, deren Futter mit Ibuprofen versetzt worden war (1360 ppm), eine Abnahme an PGE₂ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren beobachtet. Diese PGE₂ Hemmung ging einher mit einer Abnahme an kleinen Blutgefäßen (Yao et al., 2005). Die alleinige Zugabe von PGE₂ führte zu einem deutlichen, wenn auch nicht signifikanten, Anstieg an VEGF in diesem Zellsystem (Yao et al., 2005). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch für Ibuprofen die Hemmung der Cyclooxygenase ein wichtiger Mechanismus ist für dessen antiproliferative Wirkung in COX-2 exprimierenden Zellen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in den COX-2 exprimierenden HCA-7 und HeLa Zellen eine verminderte PGE₂ Produktion und eine Hemmung der Zellproliferation nach Inkubation mit S-Ibuprofen beobachtet. Jedoch zeigte das S-Enantiomer auch eine antiproliferative Wirkung in Zellen, die keine PGE₂ aufwiesen. Das NSAIDs möglicherweise nicht nur durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese, sondern auch durch einen anderen COX abhängigen Mechanismus antiproliferativ wirken, zeigte eine Studie mit den Kolonkarzinomzellen HCT-116 und SW480 (Chan et al., 1998). Hier wurde nach Behandlung mit 125 µM (HCT-116) bzw. 200 µM (SW480) Sulindac Sulfid ein Anstieg der Arachidonsäure, eine Abnahme von Sphingomyelin und ein Anstieg an Ceramid beobachtet. Es wurde angenommen, dass die erhöhte Menge an Arachidonsäure in den Kolonkarzinomzellen die Umsetzung von Sphingomyelin zu Ceramid stimuliert, was zur erhöhten Apoptose in den Zellen führte. Die COX-2 defizienten HCT-116 Zellen weisen eine COX-1 Expression auf, möglicherweise führt die Hemmung der COX-1 nach Behandlung der HCT-116 Zellen mit S-Ibuprofen zu einer erhöhten Menge an nicht umgesetzter Arachidonsäure und somit nach S-Ibuprofen Behandlung zu einer COX abhängigen, erhöhten Apoptoserate.

Die vorher erwähnte Studie von Yao et al. weist, genau wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, jedoch auch auf einen COX unabhängigen Mechanismus für die antikarzinogene Wirkung von Ibuprofen hin (Yao et al., 2005). So konnte die signifikante Hemmung der VEGF Expression nach Behandlung der MC-26 Zellen mit 1000 µM Ibuprofen Razemat nicht durch die externe Zugabe von 10 µM PGE₂ aufgehoben werden, im Gegensatz zu der nicht signifikanten aber dennoch deutlich sichtbaren VEGF Hemmung nach Behandlung mit 100 µM Ibuprofen (Yao et al., 2005). Auch für eine andere 2-Arylpropionsäure, Flurbiprofen, wurden COX unabhängige antikarzinogene Mechanismen beschrieben. So konnte mit Hilfe von *in vitro* Studien an Kolonkarzinomzellen und *in vivo* im Maustumormodell gezeigt werden, dass das bei der COX-Hemmung inaktive R-Enantiomer eine antikarzinogene Wirkung aufweist. Sowohl S- als auch R-Flurbiprofen induzieren gleichermaßen einen G₁-Zellzyklusarrest und Apoptose, und zwar sowohl in COX-2 exprimierenden als auch in COX-2 defizienten kolorektalen Karzinomzellen (Wechter et al., 2000; Grosch et al., 2003). Die Induktion des Zellzyklusblocks erfolgte dabei durch Aktivierung der c-Jun Kinase und des Transkriptionsfaktors AP-1 (transcription factor activator protein 1) (Grosch et al., 2003). Die Apoptose wurde nach Behandlung der Zellen mit R-Flurbiprofen zumindest teilweise durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 eingeleitet (Grosch et al., 2005). Mittlerweile sind auch einige COX unabhängige Angriffspunkte von Ibuprofen identifiziert worden (Abbildung 4.1). Einer ist

der heterodimere Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor-kappa B). Er reguliert die Expression von Genen, die in immunologischen Prozessen und Entzündungen involviert sind, z.B. Zytokine, Adhäsionsmoleküle, COX-2, iNOS und PLA₂ (Degitz et al., 1991; Neish et al., 1992). Die Aktivierung von NF- κ B führt außerdem zur Transkription von antiapoptotischen Genen (Wang et al., 1996; Wang et al., 1998). Scheuren et al. konnten zeigen, dass sowohl die Behandlung mit S- als auch mit R-Ibuprofen die Aktivierung von NF- κ B in mit Phorbol ester (TPA) stimulierten T-Zellen hemmte. Dabei kam es in den behandelten Zellen zu einer Inhibierung der Translokation von NF- κ B in den Zellkern (Scheuren et al., 1998). Die Behandlung mit Ibuprofen führte zu einer erhöhten I κ B- α Proteinkonzentration, einer verminderten IKK α Aktivität und somit zur Stabilisierung des NF- κ B/I κ B- α Komplexes (Scheuren et al., 1998; Palayoor et al., 1999). In diesem Komplex liegt der Transkriptionsfaktor inaktiv im Zytosol vor. Erst nach Phosphorylierung des Inhibitorproteins I κ B- α durch die Kinase IKK α kommt es zur Lösung des Komplexes, zum Abbau von I κ B- α über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg und zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern (Verma et al., 1995; Zandi et al., 1998). Die Hemmung der Translokation von NF- κ B durch Ibuprofen führte zu einer verminderten COX-2 und Cyclin D1 Expression und zur Hemmung der Proliferation von Tumorzellen (Takada et al., 2004). Eine fehlende Aktivitätshemmung des NF- κ B Transkriptionsfaktors durch R-Ibuprofen nach PGE₂ Stimulation konnte außerdem zeigen, dass die Inhibierung von NF- κ B nicht COX abhängig aus der Hemmung der Prostaglandin Synthese resultierte (Scheuren et al., 1998). In Prostatakarzinomzellen konnten Palayoor et al. nachweisen, dass die Behandlung mit 2 mM Ibuprofen die Expression von α -Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) und HIF-2 reduziert (Palayoor et al., 2003). Diese regulieren die Expression von Genen, die für Angiogenese (z.B. VEGF), Zellproliferation oder Apoptose verantwortlich sind (Shweiki et al., 1992; Jones et al., 2001; Harris, 2002). Die Ibuprofen induzierte Abnahme der HIF-Expression resultierte in einer verminderten Expression von VEGF und somit geringerer Angiogenese. Ein weiterer COX unabhängiger Mechanismus für die antikarzinogene Wirkung von Ibuprofen ist die Hemmung der Arylamin-N-Acetyltransferase (NAT) Aktivität in Kolonkarzinomzellen (Chung et al., 1999). NAT stellt ein Enzymsystem der Phase-II-Reaktionen dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Biotransformation von unterschiedlichen Medikamenten, Präkanzerogenen und anderen Fremdstoffen mit Arylamin- und Hydralazinstruktur (Grant et al., 1990; Grant et al., 1992).

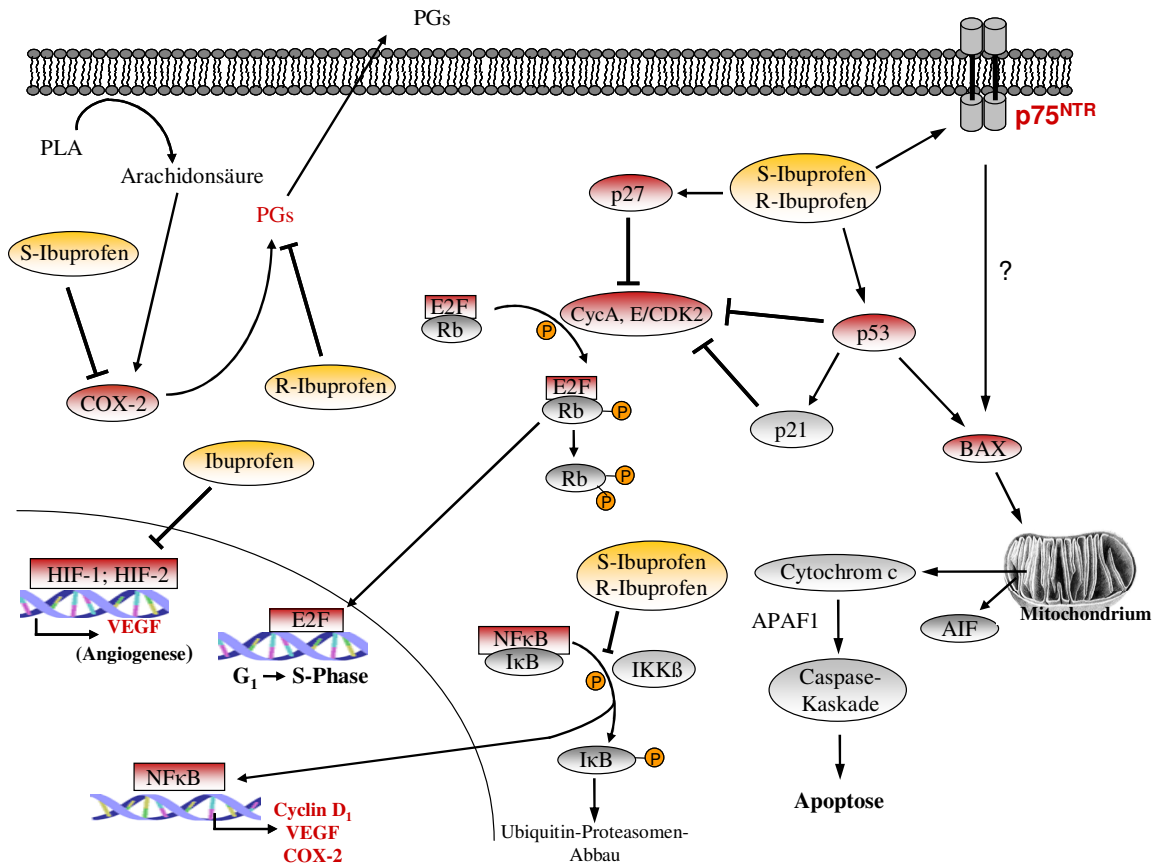


Abbildung 4.1: Zusammenfassung von einigen bekannten COX abhängigen und unabhängigen Mechanismen für die antikarzinogene Wirkung von Ibuprofen. In Rot sind die Proteine dargestellt, für die eine Beeinflussung durch Ibuprofen in unterschiedlichen Studien bzw. in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. AIF, apoptosis-inducing factor; APAF1, apoptosis protease activating factor-1; CDK, cyclin-dependent kinase; Cyc, Cyclin; HIF, hypoxia inducible factor; IKKβ, IκB-kinase-β; NF-κB; nuclear factor-kappa B; p75^{NTR}, Neurotrophin-Rezeptor p75.

Ob in den Experimenten der vorliegenden Arbeit hauptsächlich COX unabhängige Mechanismen bei der beobachteten Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose eine Rolle spielen, oder ob auch die Hemmung der Cyclooxygenasen zum antikarzinogenen Effekt von S-Ibuprofen beiträgt, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig geklärt werden. Bei einem Zusammenwirken von COX-Hemmung und COX unabhängigen Mechanismen würde man in den COX-2 exprimierenden Zellen (HCA-7) mit S-Ibuprofen eine stärkere antiproliferative und apoptotische Wirkung erwarten als bei Behandlung mit dem R-Enantiomer. Außerdem müßte dann die Hemmung der Zellproliferation und/oder die Induktion von Apoptose in den COX-2 exprimierenden HCA-7 Zellen nach S-Ibuprofen Behandlung stärker ausgeprägt sein als in den COX defizienten HCT-15 Zellen. So konnte Maier et al. zeigen, dass mit einem COX-2-cDNA-antisense Vektor transfizierte, COX-2 defiziente Caco Zellen eine signifikant niedrigere Apoptoserate nach Behandlung mit Celecoxib aufwiesen als COX-2

überexprimierte Caco Zellen, die einen COX-2-cDNA-sense Vektor enthielten (Maier et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch keine signifikant stärkere Induktion von Zellzyklusarrest oder Apoptose in den HCA-7 Zellen nach S-Ibuprofen Behandlung beobachtet. Eine Messung der interzellulären S- und R-Ibuprofen Konzentrationen in beiden Zelllinien ergab jedoch, dass in den COX-2 defizienten Zellen bei gleicher S- und R-Ibuprofen Inkubation eine 3fach höhere Menge an S- und R-Ibuprofen vorhanden war als in den COX-2 exprimierenden HCA-7 Zellen (siehe auch Abschnitt 4.2). Somit könnten die unterschiedlichen interzellulären Ibuprofen Konzentrationen ein Grund dafür sein, dass nicht die COX-2 exprimierenden Zellen sensitiver auf die Behandlung mit S-Ibuprofen reagierten, sondern stattdessen umgekehrt die COX-2 defizienten HCT-15 Zellen. Um die Frage nach der COX Hemmung besser zu beantworten, wäre möglicherweise ein Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen S-Ibuprofen Konzentrationen sinnvoll, bei denen eine vergleichbare interzelluläre Ibuprofen Konzentration in beiden Zellen erreicht wird. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass auch das R-Enantiomer in den HCA-7 und in den HeLa Zellen eine deutliche, wenn auch im Vergleich zum S-Ibuprofen wesentlich geringere Hemmung der PGE₂ Produktion zeigt. Es konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, welcher Mechanismus für die beobachtete Hemmung der PGE₂ Synthese verantwortlich ist (siehe Abschnitt 4.4). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass aufgrund der beim R-Ibuprofen beobachteten PGE₂ Hemmung kein signifikanter Unterschied zwischen der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen in den COX exprimierenden Zellen existiert.

Aufgrund der unidirektionalen Inversion von R-Ibuprofen zum COX hemmenden S-Ibuprofen kann die Hemmung des Tumorstwachstums im Mausmodell nach Injektion von R-Ibuprofen nicht allein der Wirkung des R-Enantiomers zugeschrieben werden. Nach einer i.p. Applikation von 15 mg/kg R-Ibuprofen wurde in der Maus eine Inversion von ca. 54 % ermittelt, eine Inversionsrate, die vergleichbar ist mit der beim Menschen (Lee et al., 1985). Außerdem ist mittlerweile bekannt, dass nicht nur das S-Enantiomer, sondern auch die biochemischen Zwischenprodukte der Isomerisierung, die 2-Arylpropionsäuren-CoA-Thioester, die COX-2 hemmen (Neupert et al., 1997). Somit kann für die *in vivo* Situation nicht ausgeschlossen werden, dass die antikarzinogene Wirkung des R-Ibuprofens zum großen Teil auf die Hemmung der Cyclooxygenasen zurückzuführen ist. In den *in vitro* Experimente wurde jedoch keine Inversion zum aktiven S-Enantiomer beobachtet, weder in den HCA-7, HCT-15 noch in den HCT-116 Kolonkarzinomzellen. Viele Untersuchungen beschreiben die systemische Inversion von R- zu S-Ibuprofen im Menschen und anderen Säugetieren (Beck et al., 1991; Hall et al., 1993; Cheng et al., 1994; Davies, 1998). Andere Arbeitsgruppen gehen zusätzlich von einer präsystemischen Inversion von Ibuprofen und anderen 2-Arylpropionsäuren aus (Mehvar et al., 1988). Diese soll vor allem in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes (Jujenum, Ileum und Kolon) stattfinden und bei einer Formulierung erfolgen, in der das R-Enantiomer bzw. das Razemat langsam absorbiert wird (Berry et al., 1991; Sattari et al., 1994; Doki et al., 2003). In einer kürzlich erschienenen Untersuchung wurde eine unidirektionale Inversion von R-Ibuprofen *in vitro* in humanen

Caco-2 Kolonkarzinomzellen beschrieben (Hao et al., 2005). Während bei Hao et al. die S- und R-Ibuprofen Konzentration nur im Medium gemessen wurde, konnte in den Zellkulturexperimenten der vorliegenden Arbeit weder durch Bestimmung der Ibuprofen Konzentration im Medium, noch durch eine intrazelluläre Konzentrationsbestimmung eine Inversion von R- zum aktiven S-Ibuprofen bestätigt werden.

4.2 Unterschiedliche intrazelluläre Konzentrationen an S- und R-Ibuprofen in HCT-15 und HCA-7 Tumorzellen

Interessant war, dass in unseren Versuchsdurchführungen die COX-2 defizienten HCT-15 Zellen sowohl in den FACS-Analysen als auch im Proliferations-Assay deutlich sensitiver auf die Behandlung mit Ibuprofen reagierten als die COX-2 exprimierenden HCA-7 Zellen, und zwar unabhängig davon, welches Ibuprofen-Enantiomer eingesetzt wurde. Messungen der intrazellulären Ibuprofen Konzentrationen mit Hilfe einer HPLC (chirale Säule) ergaben, dass die HCT-15 Zellen nach Behandlung mit 900 μ M S- oder R-Ibuprofen intrazellulär eine ca. 3-fach höhere Konzentration an S- bzw. R-Ibuprofen aufwiesen als die HCA-7 Zellen. Die höhere Sensitivität der HCT-15 Zellen kann daher möglicherweise auf eine höhere intrazelluläre Ibuprofenkonzentration zurückgeführt werden. Welche molekularen Mechanismen für die unterschiedliche Ibuprofenaufnahme der Zellen verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt. Die Aufnahme von Ibuprofen erfolgt *in vivo* nichtstereoselektiv über passive transzelluläre Absorption (Jamali et al., 1989; Yee, 1997). Khamdang et al. konnten zeigen, dass darüber hinaus organische Anionen-Transporter (hOAT, human organic anion transporter) in den Transport von NSAIDs wie Ibuprofen involviert sind (Khamdang et al., 2002). Dabei handelt es sich um Transporterproteine der SLC (solute carrier)-Familie, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und auch schon im normalen Kolongewebe und in humanen Kolonkarzinomen nachgewiesen wurden (Calcagno et al., 2006). Die Transporterproteine hOAT1 und hOAT3 zeigten hierbei eine hohe Affinität für NSAIDs, eine geringe Affinität für Ibuprofen, Indometacin, Ketoprofen und Naproxen konnte hingegen für das hOAT2 Transporterprotein gezeigt werden (Khamdang et al., 2002). Außerdem wurden im Epithel des Gastrointestinaltraktes weitere Transporterproteine nachgewiesen, die zur Familie der ABC-Transporter gehören, so z.B. die MDR (multidrug resistance)-assoziierten Proteine (MRP) (Kool et al., 1997; König et al., 1999; Kool et al., 1999; Abrahamse et al., 2001; Calcagno et al., 2006). Sie sind verantwortlich für den Transport von nicht modifizierten Substanzen oder von Substanzen in Konjugation mit Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfat (Kool et al., 1999; Haimeur et al., 2004). Hirohashi et al. detektierte mittels Northern-Blot Analyse in einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie (Caco-2) eine hohe Expression an MRP2 und MRP3 und eine geringe an MRP1 und MRP5 (Hirohashi et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche intrazelluläre Konzentration könnte

daher ein unterschiedliches Expressionsmuster von an der Aufnahme bzw. dem Auswärtstransport von Ibuprofen beteiligten Transporterproteinen in den verwendeten Tumorzelllinien sein.

4.3 Einfluss des Tumorsuppressors p53 auf die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose nach S- und R-Ibuprofen Behandlung

In allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien wurde nach der Behandlung mit S- bzw. R-Ibuprofen im Western-Blot eine Akkumulation des Tumorsuppressors p53 beobachtet. In den HCT-116 p53^{wt} Zellen erfolgte dieser Anstieg bereits nach einer Inkubationszeit von 8-16 h. Nach einer Behandlung der Zellen mit 800-1000 μ M S- bzw. R-Ibuprofen für 24 h wurde eine signifikante Akkumulation an HCT-116 p53^{wt} Zellen in der G₁-Phase gemessen und nach 72 h ein ebenfalls signifikanter Anstieg an apoptotischen Zellen.

Der Tumorsuppressor p53 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellzyklusregulation und der Induktion von Apoptose. Faktoren, die zellulären Stress auslösen, wie DNA-Schädigung, Hitzeschock oder Hypoxie, führen zur Aktivierung und Stabilisierung des p53 Proteins und somit zur p53 induzierten Zellantwort in Form von Zellzyklusarrest oder Apoptose. Ob es zum Zellzyklusblock oder zum programmierten Zelltod kommt, hängt unter anderem von der Art des Stimulus, vom Zelltyp und der Menge an p53 Protein ab (Prives et al., 1999). Um zu untersuchen, ob der beobachtete Zellzyklusarrest und die Induktion von Apoptose in den untersuchten Tumorzellen nach Ibuprofen Behandlung durch den Transkriptionsfaktor p53 vermittelt wurden, verwendeten wir eine Kolonkarzinom-Zelllinie, in der mittels homologer Rekombination beide Allele des p53 Gens gezielt inaktiviert wurden (HCT-116 p53^{-/-}) (Bunz et al., 1998). Tatsächlich war in diesen Zellen nach einer Behandlung mit S- oder R-Ibuprofen für 24 h kein signifikanter Zellanstieg in der G₁-Zellzyklusphase zu beobachten und nach einer Inkubation für 72 h eine schwächere Zunahme der Apoptoserate als in den p53 exprimierenden HCT-116 Zellen. Auch *in vivo* zeigte die tägliche Verabreichung von 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen in Mäusen mit p53^{-/-} Tumoren keine signifikante Wachstumshemmung, im Gegensatz zu den p53^{+/+} Tumoren, deren Wachstum deutlich gehemmt wurde. Die Ergebnisse aus den FACS-Analysen und dem Maustumormodell lassen daher darauf schließen, dass beide Ibuprofen Enantiomere ihre antiproliferative und apoptotische Wirkung zum Teil über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 induzieren. Aber auch andere, p53 unabhängige Signalwege spielen möglicherweise eine Rolle, da trotz fehlender p53 Expression in den p53 defizienten Zellen dennoch ein, wenn auch geringerer, Anstieg an Zellen in der G₁-Zellzyklusphase und an apoptotischen Zellen beobachtet wurde.

Der Tumorsuppressor p53 vermittelt Apoptose unter anderem durch Aktivierung der Transkription von proapoptotischen Genen (Sionov et al., 1999; Levine et al., 2006). In den folgenden Experimenten wurde daher die Expression von Bax, einem proapoptotischen Zielgen des Tumorsuppressors p53, nach S- und R-Ibuprofen Behandlung näher untersucht. Während in den p53 exprimierenden Zellen

die Bax Expression im Zytosol nach 900 μM S- oder R-Ibuprofen stark anstieg, wurde in den p53 defizienten HCT-116 Zellen eine deutlich schwächere Expressionszunahme beobachtet. Untersuchungen haben gezeigt, dass Bax in inaktiver Form als Monomer im Zytosol vorliegt. Erst die Interaktion mit einem weiteren Bcl-2 Protein (Bid) bewirkt eine Konformationsänderung, die zur Oligomerisierung und zum Einbau von Bax in die äußere mitochondriale Membran führt (Eskes et al., 2000). Tatsächlich wurde in den HCT-116 p53^{wt} Zellen nach einer S- bzw. R-Ibuprofen Inkubation für ≥ 16 h ein Anstieg der Bax-Proteinmenge in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen. In den p53 defizienten Zellen war die mitochondriale Bax-Proteinmenge gering, und sie wurde nicht durch die Inkubation mit S- oder R-Ibuprofen reguliert. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Yu et al. überein, in denen die Behandlung mit Adriamycin eine stärkere Induktion der Bax Expression in p53^{wt} Zellen bewirkt als in Zellen mit Mutation im p53 Gen (Yu et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor p53 spielt auch bei der Induktion von Apoptose in neuronalen Zellen eine wichtige Rolle (Aloyz et al., 1998). Dabei führt sowohl der Entzug des NGF (nerve growth factor) als auch die Aktivierung des Neurotrophin-Rezeptors p75^{NTR} zu einer erhöhten Expression von p53 und Bax, so wie zur Apoptose von sympathischen Neuronen (Abbildung 4.2). Der Neurotrophin-Rezeptor p75^{NTR} gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und wird meistens zusammen mit einem der Tyrosinkinase-Neurotrophinrezeptoren (Trk-Rezeptoren) exprimiert (Chao, 1994; Chapman, 1995). Dort ist er an der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung, Wachstum und Apoptose von Neuronen beteiligt (Huber et al., 1995; Kaplan et al., 2000). Das Zusammenspiel von Trk und p75^{NTR} ist dabei ausschlaggebend dafür, ob eine Nervenzelle in Apoptose geht oder nicht. Die p75^{NTR} vermittelte Induktion von Apoptose erfolgt dabei wahrscheinlich Trk-unabhängig und kann durch die Aktivierung von Trk-Rezeptoren gehemmt werden und umgekehrt (Kaplan et al., 2000). Mittlerweile wurde der Neurotrophin-Rezeptor p75^{NTR} außerdem in vielen anderen Geweben nachgewiesen, so auch in Blasen- und Prostatakrebszellen, wo er die Funktion eines Tumorsuppressors besitzt (Krygiel et al., 2001; Krygiel et al., 2002; Khwaja et al., 2003). Die Überexpression des Membranrezeptors führte dort zu einer vermehrten Apoptoserate und zur Hemmung der Zellproliferation durch Zellzyklusarrest in der G₁-Phase (Krygiel et al., 2001). Die erhöhte p75^{NTR} Expression ging einher mit einer reduzierten Expression von Cyclinen (Cyclin D1 und E), der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (CDK2) und verminderten Expression des Transkriptionsfaktors E2F1. Die beobachtete Hemmung der Zellproliferation konnte schließlich durch externe Zugabe des Liganden NGF wieder aufgehoben werden (Khwaja et al., 2003). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde außerdem gezeigt, dass die Behandlung von Blasenkrebszellen (T24) mit unterschiedlichen NSAIDs zu einer dosisabhängigen Erhöhung der p75^{NTR} Expression führt, die mit einer Hemmung des Zellwachstums einhergeht (Khwaja et al., 2004). Dabei zeigte die Inkubation mit dem Ibuprofen Razemat einen vergleichbaren Anstieg der p75^{NTR} Expression wie die mit R-Flurbiprofen und Indometacin. Tatsächlich wurde auch in den beiden HCT-116 Kolontumorzelllinien eine Zunahme der p75^{NTR} Expression nach 16 h S- bzw. R-Ibuprofen Behandlung beobachtet.

Wie die Ergebnisse zeigen, erfolgte die Induktion von Apoptose in den HCT-116 Tumorzellen nach Behandlung mit beiden Ibuprofen Enantiomeren zum großen Teil über die Stabilisierung (z.B. durch Phosphorylierung des Proteins) und Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Dabei kommt es zu einer erhöhten Transkription des proapoptotischen Bax Gens und zum Einbau von Bax in die mitochondriale Membran. Welche p53-regulierten proapoptotischen Proteine darüber hinaus eine Rolle spielen, muss noch weiter untersucht werden. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die erhöhte p53 Konzentration in den Zellen zumindest teilweise über den $p75^{\text{NTR}}$ Rezeptor reguliert wird, indem durch die externe Zugabe des $p75^{\text{NTR}}$ -Liganden NGF die Ibuprofen-induzierte Akkumulation von p53 in den HCT-116 $p53^{\text{wt}}$ Zellen teilweise wieder aufgehoben wurde.

Die genauen Mechanismen, die in den HCT-116 Zellen zur p53 vermittelten Apoptose nach S- oder R-Ibuprofen Behandlung führten, müssen jedoch noch näher untersucht werden. In neuronalen Zellen wird der JNK (Jun amino-terminal kinase)-p53-Bax Signalweg als ein möglicher Mechanismus angenommen über den der $p75^{\text{NTR}}$ Rezeptor Apoptose induziert (Abbildung 4.2) (Aloyz et al., 1998; Kaplan et al., 2000).

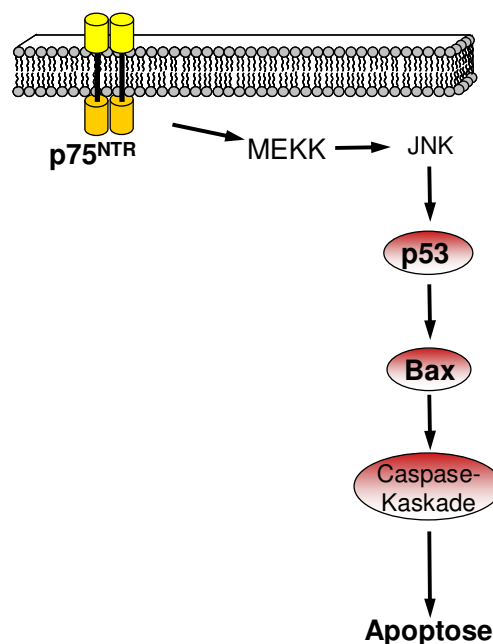


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Induktion von Apoptose in neuronalen Zellen durch $p75^{\text{NTR}}$ -vermittelte Aktivierung des JNK-p53-Bax Signalwegs. Auch die Behandlung der HCT-116 $p53^{\text{wt}}$ Zellen mit S- bzw. R-Ibuprofen führte zu einer erhöhten Expression des Neurotrophin-Rezeptors $p75^{\text{NTR}}$, einer Aktivierung der Tumorsuppressors p53, einer erhöhten Bax Expression und vermehrten Apoptoserate. **JNK**, Jun amino-terminal kinase; **MAPK**, mitogen activated protein kinase; **MEK**, MAPK kinase.

4.4 Untersuchung zur Rolle von mPGES-1, mPGES-2 und cPGES bei der PGE_2 Hemmung durch S- und R-Ibuprofen

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei therapeutischen Konzentrationen nur beim S-Ibuprofen um einen wirksamen COX-Inhibitor handelt (Geisslinger et al., 1989; Boneberg et

al., 1996; Neupert et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde in den COX exprimierenden HCA-7 Tumorzellen auch nach Inkubation mit dem reinen R-Enantiomer eine geringere PGE₂ Menge im Medium gemessen als in unbehandelten Kontrollzellen. Im Vergleich zum S-Ibuprofen führte die Inkubation mit R-Ibuprofen jedoch zu einer deutlich schwächeren Inhibierung der PGE₂ Synthese. Es wurde nach einer Behandlung mit 75 µM R-Ibuprofen für 24 h über 50 % und nach 800-1000 µM über 80 % der PGE₂ Synthese gehemmt. Im Vergleich hierzu wurde in den HCA-7 Zellen bereits nach einer Inkubation mit 200 µM S-Ibuprofen über 97 % der PGE₂-Produktion inhibiert. Die in verschiedenen Untersuchungen beschriebenen IC₅₀-Werte für die Hemmung der COX-1 und der COX-2 Aktivität unterscheiden sich je nach verwendeter Methode voneinander. So bestimmte Boneberg et al. die Hemmung der COX-1 in humanen Blutplättchen (Synthese von Thromboxan B₂) und die COX-2 Hemmung in mit IL-1β behandelten Mesangialzellen (PGE₂ Synthese). Für die Inhibierung der COX-1 und COX-2 Aktivität wurde für R-Ibuprofen in diesen Zellsystemen eine IC_{50 COX-1} von 6,5 mM und eine IC_{50 COX-2} von 2 mM bestimmt (Boneberg et al., 1996). Im Vergleich hierzu zeigte die Inkubation mit S-Ibuprofen für die COX-1 und COX-2 Hemmung wesentlich niedrigere IC₅₀-Werte (IC_{50 COX-1} = 70 µM; IC_{50 COX-2} = 150 µM). Unabhängig von den jeweils verwendeten Methoden wurde jedoch in allen beschriebenen Assays bei einer Konzentration von 75 µM R-Ibuprofen keine bzw. nur geringe COX-1 bzw. COX-2 Hemmung beobachtet. Auch die in der vorliegenden Arbeit maximal eingesetzte Konzentration von 1000 µM R-Ibuprofen zeigten dort nur eine geringe Reduzierung der COX Aktivität von ca. 20 % (Boneberg et al., 1996; Neupert et al., 1997). In unseren *in vitro* Experimenten wurde außerdem gezeigt, dass aufgrund des im Medium vorhandenen FCS und der hohen Proteinbindung von Ibuprofen die Menge an freiem, den HCA-7 Zelle tatsächlich zur Verfügung stehendem S- und R-Ibuprofen wesentlich geringer war, als die in der Zellkultur jeweils eingesetzten Ausgangskonzentration. Da die für das R-Ibuprofen beobachtete PGE₂-Hemmung mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf eine Inhibierung der COX-1 und COX-2 zurückgeführt werden kann, wurde die Regulation von weiteren Enzymen untersucht, die an der Synthese von Prostaglandin E₂ beteiligt sind.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass in den unterschiedlichsten Tumorarten nicht nur die COX-2, sondern auch die mPGES-1 überexprimiert wird (Yoshimatsu et al., 2001; Yoshimatsu et al., 2001; Cohen et al., 2003; van Rees et al., 2003). In mehr als 80 % der kolorektalen Adenome und Karzinome wurde eine erhöhte mPGES-1 Expression beobachtet. In ca. 50 % der Adenome und 85 % der Karzinome fand außerdem eine erhöhte COX-2 Transkription statt (Yoshimatsu et al., 2001). Auch andere Experimente lassen vermuten, dass mPGES-1 wie COX-2 an der Tumorentstehung involviert sind. So zeigten mit COX-2 und mPGES-1 cotransfizierte HEK293 Zellen, nicht aber COX-1/mPGES-1 Zellen, *in vitro* ein erhöhte Proliferation und, in immundefizienten Nacktmäusen implantiert, ein aggressives Tumorwachstum (Murakami et al., 2000; Kamei et al., 2003). In mPGES-1 *knock out* Mäusen konnte schließlich ein reduziertes Tumorwachstum und eine geringere Metastasierung von implantierten Lungenkarzinomzellen beobachtet werden (siehe Review Murakami

et al. 2006). *In vitro* Studien mit den COX exprimierenden HCA-7 Zellen zeigten, dass die mPGES-1 in dieser Zelllinie zumindest teilweise an der PGE₂ Synthese und der Zellproliferation beteiligt ist. So bewirkte die Behandlung mit einem mPGES-1 Inhibitor (MK-886) bzw. einem mPGES-1 antisense-Oligonukleotid in den HCA-7 Zellen eine verminderte Prostaglandinsynthese von ca. 60 % und eine Hemmung des Tumorwachstums von 40 % (Kamei et al., 2003).

In den folgenden *in vitro* Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob nach einer Inkubation mit S- und R-Ibuprofen eine Veränderung der mPGES-1, mPGES-2 oder cPGES Expression bzw. eine Hemmung der mPGES-1 Aktivität in den Zellen erfolgt. Die Stimulation von HeLa Zellen mit TNF- α und IL-1 β führte zu einer erhöhten mPGES-1 Expression und PGE₂ Produktion. Sowohl mPGES-2 als auch cPGES waren in den HeLa Zellen nicht stimulierbar und somit nicht an der erhöhten PGE₂ Synthese beteiligt. Die gleichzeitig mit der Stimulation durchgeführte Inkubation mit S- bzw. R-Ibuprofen führte weder zu einer Hemmung der mPGES-1 Expression, noch wurde die Expression der beiden anderen PGE-Synthasen beeinflusst. Dennoch zeigte in den HeLa Zellen nicht nur die Behandlung mit dem COX inhibierenden S-Ibuprofen, sondern auch die mit dem R-Enantiomer eine deutliche Hemmung der PGE₂-Produktion. Thoren et al. konnten in einem mPGES-1 Aktivitätsassay mit bakterieller Membran nachweisen, dass der selektive COX-2 Inhibitor NS-398 und Sulindac Sulfid die mPGES-1 Aktivität inhibieren (Thoren et al., 2000). Im Gegensatz dazu war mit anderen untersuchten NSAIDs, unter anderem auch S-Ibuprofen und Flurbiprofen, keine Hemmung der Enzymaktivität zu beobachten. Auch in unserem verwendeten mPGES-1 Aktivitätsassay wurde die mPGES-1 Aktivität weder durch S- noch durch R-Ibuprofen gehemmt. Über welche COX-2 unabhängigen Mechanismen es durch R-Ibuprofen zu einer reduzierten PGE₂ Synthese in den HCA-7 und HeLa Zellen kommt, bleibt daher weiterhin zu klären. Eine Hemmung der mPGES-1 Expression oder Aktivität durch S- oder R-Ibuprofen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden, und auch die Expression der mPGES-2 und cPGES wurde nicht beeinflusst.

Interessanterweise wurde in einer *in vitro* Studie mit LL-Karzinomzellen aus der Maus nach Inkubation mit 50 μ M Sulindac und einer anschließenden Behandlung mit Arachidonsäure ebenfalls eine 60 - 70 %ige Hemmung der PGE₂ Synthese in diesen Zellen beobachtet, obwohl Sulindac wie R-Ibuprofen keine COX Hemmung aufweist. (Raz, 2002). Außerdem wurde die geringere PGE₂-Produktion nach Sulindac Behandlung in den Studien auf eine Hemmung der durch Ca²⁺-Ionophore stimulierten Freisetzung von Arachidonsäure zurückgeführt.

4.5 Relevanz der *in vitro* Ergebnisse für die *in vivo* Situation im Menschen

Betrachtet man die Ergebnisse von *in vitro* Studien mit NSAIDs, so taucht auch immer wieder die Frage nach der Relevanz dieser Studien für die *in vivo* Situation im Menschen auf. Für die antiproliferative und apoptotische Wirkung von NSAIDs wird *in vitro* oft eine Konzentration benötigt,

die 10-250 fach höher ist als die für die Hemmung der Cyclooxygenase Aktivität. So wird oft kritisiert, dass die in den Studien beobachteten COX unabhängigen antikarzinogenen Mechanismen von NSAIDs in der Zellkultur erst bei Konzentrationen auftreten, die *in vivo* im Menschen nicht erreicht werden. Auch die in dieser Arbeit beobachtete Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose traten *in vitro* erst bei hohen Konzentrationen auf. So wurde ein signifikanter Zellzyklusarrest erst bei einer Inkubation der Zellen von 600 - 1000 μM S- und R-Ibuprofen (HCT-15) bzw. 800 und 1000 μM S- und R-Ibuprofen (HCA-7) für 24 h beobachtet. Ein signifikanter Anstieg an Apoptose trat bei einer Behandlung der Tumorzellen mit einer Ibuprofen Konzentration zwischen 800 und 1000 μM für 72 h auf. Hingegen wurde für die Hemmung der PGE_2 Synthese in den HCA-7 Tumorzellen nach Behandlung mit S-Ibuprofen ein IC_{50} Wert von $3,0 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die in der Zellkultur eingesetzten Ibuprofen Konzentrationen aufgrund der hohen Proteinbindung von Ibuprofen (> 99 %) wesentlich höher waren als die tatsächlich freien Konzentrationen im Medium. Dabei nahm der Anteil an freiem Ibuprofen mit steigender Konzentration an eingesetztem Ibuprofen zu. So betrug die Menge an freiem, den Zellen tatsächlich zur Verfügung stehendem Ibuprofen nach einer Zugabe von 900 μM S- bzw. R-Ibuprofen ungefähr 75 % der eingesetzten Konzentration. Zudem wurde gezeigt, dass die in der Zellkultur tatsächlich intrazellulär erreichten S- und R-Ibuprofen Konzentrationen mit denen im Blutplasma der Mäuse zu vergleichen sind. In den HCT-15 Zellen wurde nach Behandlung der Zellen mit 900 μM S- bzw. R-Ibuprofen für 24 h eine Konzentration von $363,3 \pm 51,1 \mu\text{M}$ (S-Ibuprofen) bzw. $442,2 \pm 66,3 \mu\text{M}$ (R-Ibuprofen) gemessen. Die in den Mäusen erreichte maximale Plasmakonzentration bei einer einmal täglichen Gabe von 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen betrug $332 \pm 51 \mu\text{M}$ S-Ibuprofen und $364 \pm 44 \mu\text{M}$ R-Ibuprofen. Auch im Menschen wird nach einer oralen Gabe von 400 - 600 mg Ibuprofen Razemat eine maximale Ibuprofen Konzentration zwischen 150 - 300 μM erreicht (Fachinformation von Contraneural[®]600 (Pfleger) und IbuprofenSTADA[®]400mg (STADA)). Somit lassen sich die S- und R-Ibuprofen Konzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit benötigt werden, um *in vitro* einen Zellzyklusarrest und Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, mit den Plasmakonzentrationen vergleichen, die im Menschen und in den Mausversuchen erreicht werden.

4.6 Vergleich der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen

In der Therapie wird Ibuprofen meistens als Razemat verabreicht. Mittlerweile ist jedoch auch das reine S-Ibuprofen (Dexibuprofen) als Medikament auf dem Markt. In der Annahme, dass R-Ibuprofen aufgrund der fehlenden COX-Hemmung nicht an der antiphlogistischen und analgetischen Wirkung des Razemats beteiligt ist, wird durch die alleinige Gabe des aktiven S-Enantiomers eine Verringerung der Dosierung angestrebt. Die Gabe des Razemats hat zudem den Nachteil, dass zwei Substanzen mit unterschiedlichen pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften verabreicht werden, die in unterschiedlichen metabolischen Prozessen involviert sind (Williams et al., 1986). So werden

beim reinen S-Ibuprofen z.B. weniger Metabolite gebildet als beim Razemat (Evans, 1996). Tatsächlich wurde in Studien bestätigt, dass bei alleiniger Gabe des S-Enantiomers eine höhere Plasmakonzentration an S-Ibuprofen im Blut von Patienten erreicht wird als mit dem Razemat (Geisslinger et al., 1990), und dass eine niedrigere Dosierung von Dexibuprofen (halbe Dosis des Razemats) die gleiche analgetische Wirkung aufweist (Stock et al., 1991; Singer et al., 2000; Bonabello et al., 2003). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, spielen auch COX unabhängige Mechanismen eine Rolle bei der antikarzinogenen Wirkung von Ibuprofen. Außerdem wurde nicht nur mit S-Ibuprofen, sondern auch mit R-Ibuprofen eine verminderte PGE₂-Produktion in den HCA-7 und HeLa Zellen beobachtet. Tatsächlich zeigten beide Ibuprofen Enantiomere sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in der Zellkultur eine vergleichbare antikarzinogene Wirkung, obwohl während der *in vitro* Experimente in den Zellen keine Konfigurationsinversion vom R-Ibuprofen zum COX hemmenden S-Ibuprofen stattfand. Unsere Studien konnten zeigen, dass beide Enantiomere speziell hinsichtlich ihrer antikarzinogenen Wirkung keinen signifikanten Unterschied aufweisen und dem reinen S-Enantiomer von Ibuprofen daher hinsichtlich seiner antikarzinogenen Wirkung keinen Vorzug gegenüber dem Razemat gegeben werden kann.

5 Zusammenfassung

Ibuprofen gehört zu den am meisten verwendeten nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) und ist in niedriger Dosierung von 200-400 mg als sogenanntes OTC (over the counter) Analgetikum frei erhältlich. Obwohl es in den meisten Fällen als racemische Mischung aus S- und R-Ibuprofen verabreicht wird, ist mittlerweile auch das reine S-Ibuprofen (Dexibuprofen) als Medikament erhältlich. Während S-Ibuprofen ein potenter COX-Inhibitor ist, zeigt R-Ibuprofen in den klinisch relevanten Konzentrationen keine COX-Hemmung. Seit längerem ist bekannt, dass NSAIDs bei einer kontinuierlichen Einnahme über mehrere Jahre die Initiierung und Proliferation von Tumoren hemmen. Die Hemmung der Cyclooxygenase wird dabei als ein wichtiger Mechanismus für die antikarzinogene Wirkung angesehen, doch für viele NSAIDs sind auch schon COX unabhängige Mechanismen beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung zweier Tumorzelllinien mit unterschiedlicher COX-2 Expression und dem Einsatz von beiden Ibuprofen Enantiomeren untersucht, inwieweit COX unabhängige Mechanismen für die antikarzinogenen Effekte von S- und R-Ibuprofen verantwortlich sind. Sowohl die COX-2 defizienten HCT-15 als auch die COX-2 exprimierenden HCA-7 Zellen wurden durch Behandlung mit S- oder R-Ibuprofen in ihrer Proliferation gehemmt. Dabei führte die Behandlung mit S- und R-Ibuprofen für 24 h zu einem G₁-Zellzyklusblock und nach 72 h zu einem signifikanten Anstieg von apoptotischen Zellen, was im Western-Blot Assay durch eine verminderte Cyclin A und B Expression, einer erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors p27^{KIP1} und PARP-Spaltung bestätigt wurde. Dabei zeigten beide Enantiomere in den Tumorzellen eine gleich starke antiproliferative und apoptotische Wirkung. Eine Messung der intrazellulären S- und R-Ibuprofen Konzentrationen ergab außerdem, dass in den verwendeten Tumorzellen keine unidirektionale Konfigurationsinversion von R- zu S-Ibuprofen stattgefunden hat. In den COX-2 exprimierenden HCA-7 Zellen waren die antikarzinogenen Effekte von S- und R-Ibuprofen schwächer ausgeprägt als in den HCT-15 Zellen, was jedoch auf eine niedrigere intrazelluläre S- bzw. R-Ibuprofen Konzentration zurückzuführen war. Diese Ergebnisse zeigen auf jeden Fall, dass COX unabhängige Mechanismen bei der antikarzinogenen Wirkung von S- und R-Ibuprofen eine Rolle spielen. Dass auch COX abhängige Mechanismen an der antikarzinogenen Wirkung von Ibuprofen beteiligt sind, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abnahme an PGE₂ nach S-Ibuprofen Behandlung in den COX-2 exprimierenden Tumorzellen beobachtet. In welchem Ausmaß aber die COX Hemmung an der antikarzinogenen Wirkung von S-Ibuprofen in den COX-2 exprimierenden (Hemmung der PGE₂ Synthese) und möglicherweise auch in den COX-2 defizienten Zellen (Anstieg an Arachidonsäure und daraus resultierend an Ceramid) beteiligt war, konnte anhand der Ergebnisse nicht geklärt werden. Es kann jedoch angenommen werden, dass S-Ibuprofen zumindest in den COX exprimierenden HCA-7 Zellen sowohl über COX Hemmung als auch über COX unabhängige Mechanismen antiproliferativ

und apoptotisch wirkt. Auch im Tumormodell der Maus wurde bei einer täglichen i.p. Applikation von 15 mg/kg S- oder R-Ibuprofen eine Hemmung des Tumorwachstums beobachtet. Dabei betrug die unidirektionale Inversion von R- zu S-Ibuprofen ca. 54 %.

Die Inkubation mit S- bzw. R-Ibuprofen führte in beiden Zelllinien außerdem zu einer Akkumulation des Tumorsuppressors p53, der an der Regulierung von Zellzyklus und Apoptose beteiligt ist. Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, ob S- und R-Ibuprofen die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 und dessen Zielgene vermitteln. Verwendet wurde eine HCT-116 Zelllinie, in der beide p53 Allele durch homologe Rekombination inaktiviert waren (p53^{-/-}). Im Gegensatz zu den HCT-116 p53^{wt} Zellen führte die Behandlung mit S- bzw. R-Ibuprofen in den p53 defizienten Zellen zu keinem signifikanten G₁-Zellzyklusblock und auch die Apoptoserate war in diesen Zellen deutlich geringer als in p53^{wt} Zellen. *In vivo* zeigte eine tägliche i.p. Injektion von 15 mg/kg S- bzw. R-Ibuprofen bei den Mäusen mit p53^{-/-} Tumoren keine signifikante Wachstumshemmung. Im Vergleich dazu wurde die Proliferation der HCT-116 p53^{wt} Tumore durch die R-Ibuprofen Behandlung signifikant gehemmt, und auch die mit S-Ibuprofen behandelten Tieren zeigten deutlich kleinere Tumore als die Gruppe mit den p53 defizienten Tumoren. Nach der Inkubation mit S- bzw. R-Ibuprofen wurde in beiden HCT-116 Zelllinien eine erhöhte Expression des Membranrezeptors p75^{NTR} beobachtet. Außerdem führte die Behandlung mit S- bzw. R-Ibuprofen in den p53^{wt} Zellen, im Gegensatz zu den p53 defizienten Zellen, zu einer vermehrten Bax Expression und einem Anstieg an Bax Protein in der mitochondrialen Fraktion. Schließlich wurde gezeigt, dass die erhöhte p53 Konzentration in den Zellen zumindest teilweise über den p75^{NTR} Rezeptor reguliert wird, da durch die externe Zugabe des Liganden NGF die Ibuprofen induzierte Akkumulation von p53 in den HCT-116 p53^{wt} Zellen wieder aufgehoben wurde.

Da *in vitro* in den HCA-7 Zellen nicht nur die Behandlung mit S-Ibuprofen, sondern auch die mit R-Ibuprofen zu einer Hemmung der PGE₂ Synthese führte, wurde im dritten Teil der Arbeit die Wirkung von S- und R-Ibuprofen auf die Expression der PGE-Synthasen und auf die mPGES-1 Aktivität untersucht. Dabei wurden HeLa Zellen verwendet, deren mPGES-1 Expression durch die Zugabe von IL-1 β und TNF- α stimuliert wurde. Nach gleichzeitiger Inkubation mit S- bzw. R-Ibuprofen wurde keine Inhibierung der mPGES-1, mPGES-2 oder cPGES Expression beobachtet. Auch die Enzymaktivität von mPGES-1 wurde weder durch die Inkubation mit S-Ibuprofen noch mit R-Ibuprofen beeinflusst. Die bei der Inkubation mit R-Ibuprofen auftretende Hemmung der PGE₂ Synthese konnte in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend erklärt werden und bietet somit einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AIF	apoptosis-inducing factor
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
Apaf	apoptotic protease-activating factor
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BSA	Rinder-Albumin (bovine serum albumin)
CAK	Cyclin-activating kinase
Caspase	Cysteiny-Aspartase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	Cyclin-dependent kinase inhibiting protein
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	enzyme-linked immunoassay
ERK-2	extracellular-signal-regulated protein kinase-2
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FADD	FAS-associated death domain
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis (familial adenomatous polyposis)
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
HCl	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
I κ B	inhibiting protein κ B
IKK	I κ B kinase
IL-1	Interleukin-1
i.p.	intraperitoneal
JNK	c-jun N-terminal kinase-1
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
MEK	MAPK kinase
MAPK	mitogen activated protein kinase
min	Minute

mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NSAIDs	Nicht-steriodale Antiphlogistika
nNOS	neuronale NO-Synthase
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PGS	Prostaglandin-Synthase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
Ser	Serin
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transforming growth factor- β
Thr	Threonin
TNF- α	tumor necrosis factor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Val	Valin
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

- Abrahamse S. L. und Rechkemmer G. Identification of an organic anion transport system in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. *Pflugers Arch* **441**(4): 529-37, 2001.
- Adams S. S., Bresloff P. und Mason C. G. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer. *J Pharm Pharmacol* **28**(3): 256-7, 1976.
- Alberts D. S., Hixson L., Ahnen D., Bogert C., Einspahr J., Paranka N., Brendel K., Gross P. H., Pamukcu R. und Burt R. W. Do NSAIDs exert their colon cancer chemoprevention activities through the inhibition of mucosal prostaglandin synthetase? *J Cell Biochem Suppl* **22**: 18-23, 1995.
- Aloyz R. S., Bamji S. X., Pozniak C. D., Toma J. G., Atwal J., Kaplan D. R. und Miller F. D. p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol* **143**(6): 1691-703, 1998.
- Amundson S. A., Myers T. G. und Fornace A. J., Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* **17**(25): 3287-99, 1998.
- Andrews J., Djakiew D., Krygier S. und Andrews P. Superior effectiveness of ibuprofen compared with other NSAIDs for reducing the survival of human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **50**(4): 277-84, 2002.
- Ashkenazi A. und Dixit V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**(5381): 1305-8, 1998.
- Baker S. J., Preisinger A. C., Jessup J. M., Paraskeva C., Markowitz S., Willson J. K., Hamilton S. und Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **50**(23): 7717-22, 1990.
- Barnes C. J. und Lee M. Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin. *Gastroenterology* **114**(5): 873-7, 1998.
- Beck W. S., Geisslinger G., Engler H. und Brune K. Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in dogs. *Chirality* **3**(3): 165-9, 1991.
- Bennett A. und Del Tacca M. Proceedings: Prostaglandins in human colonic carcinoma. *Gut* **16**(5): 409, 1975.
- Bennett A., Tacca M. D., Stamford I. F. und Zebro T. Prostaglandins from tumours of human large bowel. *Br J Cancer* **35**(6): 881-4, 1977.
- Bennett M., Macdonald K., Chan S. W., Luzio J. P., Simari R. und Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**(5387): 290-3, 1998.
- Berry B. W. und Jamali F. Presystemic and systemic chiral inversion of R-(-)-fenoprofen in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **258**(2): 695-701, 1991.
- Birnboim H. C. und Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23, 1979.
- Blagosklonny M. V. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* **15**(16): 1889-93, 1997.
- Boldin M. P., Goncharov T. M., Goltsev Y. V. und Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**(6): 803-15, 1996.
- Bonabello A., Galmozzi M. R., Canaparo R., Isaia G. C., Serpe L., Muntoni E. und Zara G. P. Dexibuprofen (S+-isomer ibuprofen) reduces gastric damage and improves analgesic and antiinflammatory effects in rodents. *Anesth Analg* **97**(2): 402-8, table of contents, 2003.

- Boneberg E. M., Zou M. H. und Ullrich V. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(-)- and S(+)-ibuprofen. *J Clin Pharmacol* **36**(12 Suppl): 16S-19S, 1996.
- Bradford M. M. 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, 1976.
- Breckenridge D. G. und Xue D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 647-52, 2004.
- Breyer R. M., Bagdassarian C. K., Myers S. A. und Breyer M. D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 661-90, 2001.
- Brune K., Beck W. S., Geisslinger G., Menzel-Soglowek S., Peskar B. M. und Peskar B. A. Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition. *Experientia* **47**(3): 257-61, 1991.
- Brune K., Geisslinger G. und Menzel-Soglowek S. Pure enantiomers of 2-arylpropionic acids: tools in pain research and improved drugs in rheumatology. *J Clin Pharmacol* **32**(10): 944-52, 1992.
- Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J. P., Sedivy J. M., Kinzler K. W. und Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**(5393): 1497-501, 1998.
- Burnette W. N. "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**(2): 195-203, 1981.
- Calcagno A. M., Ludwig J. A., Fostel J. M., Gottesman M. M. und Ambudkar S. V. Comparison of drug transporter levels in normal colon, colon cancer, and Caco-2 cells: impact on drug disposition and discovery. *Mol Pharm* **3**(1): 87-93, 2006.
- Caldwell J., Hutt A. J. und Fournel-Gigleux S. The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. *Biochem Pharmacol* **37**(1): 105-14, 1988.
- Carnero A. und Hannon G. J. The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol* **227**: 43-55, 1998.
- Chan T. A., Morin P. J., Vogelstein B. und Kinzler K. W. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 681-6, 1998.
- Chandrasekharan N. V., Dai H., Roos K. L., Evanson N. K., Tomsik J., Elton T. S. und Simmons D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13926-31, 2002.
- Chandrasekharan N. V. und Simmons D. L. The cyclooxygenases. *Genome Biol* **5**(9): 241, 2004.
- Chao M. V. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* **25**(11): 1373-85, 1994.
- Chapman B. S. A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett* **374**(2): 216-20, 1995.
- Chen C. S., Shieh W. R., Lu P. H., Harriman S. und Chen C. Y. Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals. *Biochim Biophys Acta* **1078**(3): 411-7, 1991.
- Cheng H., Rogers J. D., Demetriades J. L., Holland S. D., Seibold J. R. und Depuy E. Pharmacokinetics and bioinversion of ibuprofen enantiomers in humans. *Pharm Res* **11**(6): 824-30, 1994.
- Chow H. H., Earnest D. L., Clark D., Mason-Liddil N., Kramer C. B., Einspahr J. G., Guillen-Rodriguez J. M., Roe D. J., Malone W., Crowell J. A. und Alberts D. S. Effect of subacute ibuprofen dosing on rectal

- mucosal prostaglandin E2 levels in healthy subjects with a history of resected polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**(4): 351-6, 2000.
- Chung D. C. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* **119**(3): 854-65, 2000.
- Chung J. G., Chang H. L., Lin W. C., Yeh F. T. und Hung C. F. Effects of ibuprofen on arylamine N-acetyltransferase activity in human colon tumor cells. *J Appl Toxicol* **19**(1): 1-6, 1999.
- Cohen E. G., Almahmeed T., Du B., Golijanin D., Boyle J. O., Soslow R. A., Subbaramaiah K. und Dannenberg A. J. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**(9): 3425-30, 2003.
- Cohen S. N., Chang A. C. und Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2110-4, 1972.
- Courtney E. D., Melville D. M. und Leicester R. J. Review article: chemoprevention of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* **19**(1): 1-24, 2004.
- Cryer B. und Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* **104**(5): 413-21, 1998.
- Dannenberg A. J. und DuBois R. N. *COX-2: a new target for cancer prevention and treatment*, 2003.
- Davies N. M. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinet* **34**(2): 101-54, 1998.
- Davis R. J., Murdoch C. E., Ali M., Purbrick S., Ravid R., Baxter G. S., Tilford N., Sheldrick R. L., Clark K. L. und Coleman R. A. EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol* **141**(4): 580-5, 2004.
- Degitz K., Li L. J. und Caughman S. W. Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *J Biol Chem* **266**(21): 14024-30, 1991.
- Del Sal G., Manfioletti G. und Schneider C. A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res* **16**(20): 9878, 1988.
- Dessen A., Tang J., Schmidt H., Stahl M., Clark J. D., Seehra J. und Somers W. S. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* **97**(3): 349-60, 1999.
- DeWitt D. und Smith W. L. Yes, but do they still get headaches? *Cell* **83**(3): 345-8, 1995.
- Diaz B. L. und Arm J. P. Phospholipase A(2). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**(2-3): 87-97, 2003.
- Dietzel K., Beck W. S., Schneider H. T., Geisslinger G. und Brune K. The biliary elimination and enterohepatic circulation of ibuprofen in rats. *Pharm Res* **7**(1): 87-90, 1990.
- Ding H. F. und Fisher D. E. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Crit Rev Oncog* **9**(1): 83-98, 1998.
- Doki K., Hayakawa T., Lin W., Yanaguimoto H., Ding G. und Inotsume N. Effects of absorption rate on the pre-systemic chiral inversion of ibuprofen in rabbits. *J Pharm Pharmacol* **55**(8): 1091-7, 2003.
- Draetta G. und Beach D. The mammalian cdc2 protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl* **12**: 21-7, 1989.
- DuBois R. N., Radhika A., Reddy B. S. und Entingh A. J. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* **110**(4): 1259-62, 1996.

- Eberhart C. E., Coffey R. J., Radhika A., Giardiello F. M., Ferrenbach S. und DuBois R. N. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* **107**(4): 1183-8, 1994.
- el-Deiry W. S. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* **8**(5): 345-57, 1998.
- el-Deiry W. S., Kern S. E., Pietenpol J. A., Kinzler K. W. und Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**(1): 45-9, 1992.
- Eskes R., Desagher S., Antonsson B. und Martinou J. C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**(3): 929-35, 2000.
- Evans A. M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: enantioselectivity, clinical implications, and special reference to S(+)-ibuprofen. *J Clin Pharmacol* **36**(12 Suppl): 7S-15S, 1996.
- Fearon E. R. und Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**(5): 759-67, 1990.
- Ferreira S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* **240**(102): 200-3, 1972.
- FitzGerald G. A. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* **2**(11): 879-90, 2003.
- Fraley R., Subramani S., Berg P. und Papahadjopoulos D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem* **255**(21): 10431-5, 1980.
- Furuno N., den Elzen N. und Pines J. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* **147**(2): 295-306, 1999.
- Gallant P., Fry A. M. und Nigg E. A. Protein kinases in the control of mitosis: focus on nucleocytoplasmic trafficking. *J Cell Sci Suppl* **19**: 21-8, 1995.
- Geisslinger G., Ferreira S. H., Menzel S., Schlott D. und Brune K. Antinociceptive actions of R(-)-flurbiprofen-- a non-cyclooxygenase inhibiting 2-arylpropionic acid--in rats. *Life Sci* **54**(10): PL173-7, 1994.
- Geisslinger G., Schuster O., Stock K. P., Loew D., Bach G. L. und Brune K. Pharmacokinetics of S(+)- and R(-)-ibuprofen in volunteers and first clinical experience of S(+)-ibuprofen in rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol* **38**(5): 493-7, 1990.
- Geisslinger G., Stock K. P., Bach G. L., Loew D. und Brune K. Pharmacological differences between R(-)- and S(+)-ibuprofen. *Agents Actions* **27**(3-4): 455-7, 1989.
- Giardiello F. M., Hamilton S. R., Krush A. J., Piantadosi S., Hyland L. M., Celano P., Booker S. V., Robinson C. R. und Offerhaus G. J. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **328**(18): 1313-6, 1993.
- Giardiello F. M., Offerhaus G. J. und DuBois R. N. The role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. *Eur J Cancer* **31A**(7-8): 1071-6, 1995.
- Gierse J. K., McDonald J. J., Hauser S. D., Rangwala S. H., Koboldt C. M. und Seibert K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* **271**(26): 15810-4, 1996.
- Goldman A. P., Williams C. S., Sheng H., Lamps L. W., Williams V. P., Pairet M., Morrow J. D. und DuBois R. N. Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **19**(12): 2195-9, 1998.
- Grant D. M., Blum M. und Meyer U. A. Polymorphisms of N-acetyltransferase genes. *Xenobiotica* **22**(9-10): 1073-81, 1992.

- Grant D. M., Morike K., Eichelbaum M. und Meyer U. A. Acetylation pharmacogenetics. The slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Clin Invest* **85**(3): 968-72, 1990.
- Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M. und et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**(3): 589-600, 1991.
- Grosch S., Schilling K., Janssen A., Maier T. J., Niederberger E. und Geisslinger G. Induction of apoptosis by R-flurbiprofen in human colon carcinoma cells: involvement of p53. *Biochem Pharmacol* **69**(5): 831-9, 2005.
- Grosch S., Tegeder I., Niederberger E., Brautigam L. und Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J* **15**(14): 2742-4, 2001.
- Grosch S., Tegeder I., Schilling K., Maier T. J., Niederberger E. und Geisslinger G. 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**(10): 1316-8, 2003.
- Gu W. und Roeder R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**(4): 595-606, 1997.
- Guan K. L., Jenkins C. W., Li Y., Nichols M. A., Wu X., O'Keefe C. L., Matera A. G. und Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* **8**(24): 2939-52, 1994.
- Gupta R. A. und Dubois R. N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* **1**(1): 11-21, 2001.
- Gupta R. A., Tan J., Krause W. F., Geraci M. W., Willson T. M., Dey S. K. und DuBois R. N. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13275-80, 2000.
- Haimeur A., Conseil G., Deeley R. G. und Cole S. P. Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol* **65**(6): 1375-85, 2004.
- Hall S. D., Rudy A. C., Knight P. M. und Brater D. C. Lack of presystemic inversion of (R)- to (S)-ibuprofen in humans. *Clin Pharmacol Ther* **53**(4): 393-400, 1993.
- Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-80, 1983.
- Hanif R., Pittas A., Feng Y., Koutsos M. I., Qiao L., Staiano-Coico L., Shiff S. I. und Rigas B. 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**(2): 237-45, 1996.
- Hannon G. J. und Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**(6494): 257-61, 1994.
- Hao H., Wang G., Sun J., Ding Z., Wu X. und Roberts M. Unidirectional inversion of ibuprofen in Caco-2 cells: developing a suitable model for presystemic chiral inversion study. *Biol Pharm Bull* **28**(4): 682-7, 2005.
- Harper J. W., Adami G. R., Wei N., Keyomarsi K. und Elledge S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**(4): 805-16, 1993.
- Harris A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**(1): 38-47, 2002.
- Harris R. C., McKanna J. A., Akai Y., Jacobson H. R., Dubois R. N. und Breyer M. D. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* **94**(6): 2504-10, 1994.

- Harris R. E., Chlebowski R. T., Jackson R. D., Frid D. J., Ascenseo J. L., Anderson G., Loar A., Rodabough R. J., White E. und McTiernan A. Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative. *Cancer Res* **63**(18): 6096-101, 2003.
- Harris R. E., Kasbari S. und Farrar W. B. Prospective study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer. *Oncol Rep* **6**(1): 71-3, 1999.
- Haupt Y., Barak Y. und Oren M. Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *Embo J* **15**(7): 1596-606, 1996.
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A. und Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**(6630): 296-9, 1997.
- He T. C., Chan T. A., Vogelstein B. und Kinzler K. W. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**(3): 335-45, 1999.
- Helmreich E. J. und Hofmann K. P. Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer. *Biochim Biophys Acta* **1286**(3): 285-322, 1996.
- Hengstschlager M., Braun K., Soucek T., Milolozza A. und Hengstschlager-Ottnd E. Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res* **436**(1): 1-9, 1999.
- Herrera L., Kakati S., Gibas L., Pietrzak E. und Sandberg A. A. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* **25**(3): 473-6, 1986.
- Higgs E. A., Moncada S. und Vane J. R. Inflammatory effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-oxo-PGF₁alpha in the rat paw. *Prostaglandins* **16**(2): 153-62, 1978.
- Hirai H., Tanaka K., Yoshie O., Ogawa K., Kenmotsu K., Takamori Y., Ichimasa M., Sugamura K., Nakamura M., Takano S. und Nagata K. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* **193**(2): 255-61, 2001.
- Hirohashi T., Suzuki H., Chu X. Y., Tamai I., Tsuji A. und Sugiyama Y. Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J Pharmacol Exp Ther* **292**(1): 265-70, 2000.
- Hollstein M., Rice K., Greenblatt M. S., Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Smith-Sorensen B., Montesano R. und Harris C. C. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* **22**(17): 3551-5, 1994.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. und Harris C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**(5015): 49-53, 1991.
- Horikoshi N., Usheva A., Chen J., Levine A. J., Weinmann R. und Shenk T. Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **15**(1): 227-34, 1995.
- Huber L. J. und Chao M. V. Mesenchymal and neuronal cell expression of the p75 neurotrophin receptor gene occur by different mechanisms. *Dev Biol* **167**(1): 227-38, 1995.
- Hursting S. D., Slaga T. J., Fischer S. M., DiGiovanni J. und Phang J. M. Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice. *J Natl Cancer Inst* **91**(3): 215-25, 1999.
- Jakobsson P. J., Thoren S., Morgenstern R. und Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7220-5, 1999.
- Jamali F., Mehvar R. und Pasutto F. M. Enantioselective aspects of drug action and disposition: therapeutic pitfalls. *J Pharm Sci* **78**(9): 695-715, 1989.

- Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C. und Thun M. J. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* **56**(2): 106-30, 2006.
- Jimbo A., Fujita E., Kouroku Y., Ohnishi J., Inohara N., Kuida K., Sakamaki K., Yonehara S. und Momoi T. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res* **283**(2): 156-66, 2003.
- Jones A., Fujiyama C., Blanche C., Moore J. W., Fuggle S., Cranston D., Bicknell R. und Harris A. L. Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in human bladder tumors and cell lines. *Clin Cancer Res* **7**(5): 1263-72, 2001.
- Kamei D., Murakami M., Nakatani Y., Ishikawa Y., Ishii T. und Kudo I. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem*, 2003.
- Kaplan D. R. und Miller F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **10**(3): 381-91, 2000.
- Kargman S. L., O'Neill G. P., Vickers P. J., Evans J. F., Mancini J. A. und Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* **55**(12): 2556-9, 1995.
- Keller J. J., Offerhaus G. J., Polak M., Goodman S. N., Zahurak M. L., Hylind L. M., Hamilton S. R. und Giardiello F. M. Rectal epithelial apoptosis in familial adenomatous polyposis patients treated with sulindac. *Gut* **45**(6): 822-8, 1999.
- Khamdang S., Takeda M., Noshiro R., Narikawa S., Enomoto A., Anzai N., Piyachaturawat P. und Endou H. Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **303**(2): 534-9, 2002.
- Khwaja F., Allen J., Lynch J., Andrews P. und Djakiew D. Ibuprofen inhibits survival of bladder cancer cells by induced expression of the p75NTR tumor suppressor protein. *Cancer Res* **64**(17): 6207-13, 2004.
- Khwaja F. und Djakiew D. Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor. *Mol Carcinog* **36**(3): 153-60, 2003.
- King R. W., Deshaies R. J., Peters J. M. und Kirschner M. W. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**(5293): 1652-9, 1996.
- Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H. und Peter M. E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**(22): 5579-88, 1995.
- Ko L. J. und Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**(9): 1054-72, 1996.
- Konig J., Nies A. T., Cui Y., Leier I. und Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**(2): 377-94, 1999.
- Kool M., de Haas M., Scheffer G. L., Scheper R. J., van Eijk M. J., Juijn J. A., Baas F. und Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* **57**(16): 3537-47, 1997.
- Kool M., van der Linden M., de Haas M., Baas F. und Borst P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* **59**(1): 175-82, 1999.
- Krygiel S. und Djakiew D. Neurotrophin receptor p75(NTR) suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells. *Int J Cancer* **98**(1): 1-7, 2002.
- Krygiel S. und Djakiew D. The neurotrophin receptor p75NTR is a tumor suppressor in human prostate cancer. *Anticancer Res* **21**(6A): 3749-55, 2001.

- Kurumbail R. G., Stevens A. M., Gierse J. K., McDonald J. J., Stegeman R. A., Pak J. Y., Gildehaus D., Miyashiro J. M., Penning T. D., Seibert K., Isakson P. C. und Stallings W. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**(6610): 644-8, 1996.
- Kussie P. H., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A. J. und Pavletich N. P. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**(5289): 948-53, 1996.
- Kuwana T., Mackey M. R., Perkins G., Ellisman M. H., Latterich M., Schneider R., Green D. R. und Newmeyer D. D. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**(3): 331-42, 2002.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5, 1970.
- Langman M. J., Cheng K. K., Gilman E. A. und Lancashire R. J. Effect of anti-inflammatory drugs on overall risk of common cancer: case-control study in general practice research database. *Bmj* **320**(7250): 1642-6, 2000.
- Lee E. J., Williams K., Day R., Graham G. und Champion D. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. *Br J Clin Pharmacol* **19**(5): 669-74, 1985.
- Levine A. J., Hu W. und Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* **13**(6): 1027-36, 2006.
- Lewis R. A., Austen K. F. und Soberman R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* **323**(10): 645-55, 1990.
- Lewis T. S., Shapiro P. S. und Ahn N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139, 1998.
- Li S., Wang Y., Matsumura K., Ballou L. R., Morham S. G. und Blatteis C. M. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res* **825**(1-2): 86-94, 1999.
- Lim H., Paria B. C., Das S. K., Dinchuk J. E., Langenbach R., Trzaskos J. M. und Dey S. K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91**(2): 197-208, 1997.
- Lin L. L., Wartmann M., Lin A. Y., Knopf J. L., Seth A. und Davis R. J. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**(2): 269-78, 1993.
- Lipsky L. P., Abramson S. B., Crofford L., Dubois R. N., Simon L. S. und van de Putte L. B. The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol* **25**(12): 2298-303, 1998.
- Lotsch J., Geisslinger G., Mohammadian P., Brune K. und Kobal G. Effects of flurbiprofen enantiomers on pain-related chemo-somatosensory evoked potentials in human subjects. *Br J Clin Pharmacol* **40**(4): 339-46, 1995.
- Lundgren K., Walworth N., Booher R., Dembski M., Kirschner M. und Beach D. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**(6): 1111-22, 1991.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. und Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**(4): 481-90, 1998.
- MacLachlan T. K., Sang N. und Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **5**(2): 127-56, 1995.
- Mahmoud N. N., Boolbol S. K., Dannenberg A. J., Mestre J. R., Bilinski R. T., Martucci C., Newmark H. L., Chadburn A. und Bertagnolli M. M. The sulfide metabolite of sulindac prevents tumors and restores

- enterocyte apoptosis in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* **19**(1): 87-91, 1998.
- Maier T. J., Schilling K., Schmidt R., Geisslinger G. und Grosch S. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **67**(8): 1469-78, 2004.
- Majima M., Hayashi I., Muramatsu M., Katada J., Yamashina S. und Katori M. 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**(3): 641-9, 2000.
- Malumbres M. und Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**(3): 222-31, 2001.
- McDonell M. W., Simon M. N. und Studier F. W. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* **110**(1): 119-46, 1977.
- McLellan E. A., Medline A. und Bird R. P. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res* **51**(19): 5270-4, 1991.
- Mehvar R. und Jamali F. Pharmacokinetic analysis of the enantiomeric inversion of chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Pharm Res* **5**(2): 76-9, 1988.
- Menzel S., Waibel R., Brune K. und Geisslinger G. Is the formation of R-ibuprofenyl-adenylate the first stereoselective step of chiral inversion? *Biochem Pharmacol* **48**(5): 1056-8, 1994.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P. und Moll U. M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**(3): 577-90, 2003.
- Miyoshi Y., Nagase H., Ando H., Horii A., Ichii S., Nakatsuru S., Aoki T., Miki Y., Mori T. und Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* **1**(4): 229-33, 1992.
- Morgan D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-91, 1997.
- Murakami M. und Kudo I. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* **12**(8): 943-54, 2006.
- Murakami M., Nakatani Y., Tanioka T. und Kudo I. Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 383-99, 2002.
- Murakami M., Naraba H., Tanioka T., Semmyo N., Nakatani Y., Kojima F., Ikeda T., Fueki M., Ueno A., Oh S. und Kudo I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275**(42): 32783-92, 2000.
- Murray A. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* **81**(2): 149-52, 1995.
- Murray A. W. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* **359**(6396): 599-604, 1992.
- Murray A. W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**(2): 221-34, 2004.
- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K. und Schäfer-Korting M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart, 2001.
- Muzio M., Salvesen G. S. und Dixit V. M. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* **272**(5): 2952-6, 1997.

- Myers T. W. und Gelfand D. H. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**(31): 7661-6, 1991.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**(3): 355-65, 1997.
- Nakano O., Sakamoto C., Konda Y., Matsuda K., Matozaki T., Nishisaki H., Wada K., Suzuki T., Uchida T., Nagao M. und et al. [Effect of prostaglandin E2 on the proliferation of cultured guinea pig gastric mucous cells]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* **90**(1): 9-15, 1993.
- Needleman P. und Isakson P. C. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl* **49**: 6-8, 1997.
- Neish A. S., Williams A. J., Palmer H. J., Whitley M. Z. und Collins T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* **176**(6): 1583-93, 1992.
- Nelson J. E. und Harris R. E. Inverse association of prostate cancer and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): results of a case-control study. *Oncol Rep* **7**(1): 169-70, 2000.
- Neupert W., Brugger R., Euchenhofer C., Brune K. und Geisslinger G. Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases. *Br J Pharmacol* **122**(3): 487-92, 1997.
- Nugent K. P., Farmer K. C., Spigelman A. D., Williams C. B. und Phillips R. K. Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* **80**(12): 1618-9, 1993.
- O'Banion M. K., Sadowski H. B., Winn V. und Young D. A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* **266**(34): 23261-7, 1991.
- Oshima M., Dinchuk J. E., Kargman S. L., Oshima H., Hancock B., Kwong E., Trzaskos J. M., Evans J. F. und Taketo M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **87**(5): 803-9, 1996.
- Owen-Schaub L. B., Zhang W., Cusack J. C., Angelo L. S., Santee S. M., Fujiwara T., Roth J. A., Deisseroth A. B., Zhang W. W., Kruzel E. und et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* **15**(6): 3032-40, 1995.
- Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W. und Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* **11**(3): 961-71, 1992.
- Palayoor S. T., Tofilon P. J. und Coleman C. N. Ibuprofen-mediated reduction of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**(8): 3150-7, 2003.
- Palayoor S. T., Youmell M. Y., Calderwood S. K., Coleman C. N. und Price B. D. Constitutive activation of I-kappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* **18**(51): 7389-94, 1999.
- Pardee A. B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**(4930): 603-8, 1989.
- Patrignani P., Panara M. R., Sciulli M. G., Santini G., Renda G. und Patrono C. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* **48**(4): 623-31, 1997.
- Peleg I., Lubin M. F., Cotsonis G. A., Clark W. S. und Wilcox C. M. Long-term use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and other chemopreventors and risk of subsequent colorectal neoplasia. *Dig Dis Sci* **41**(7): 1319-26, 1996.
- Peleg I., Maibach H. T., Brown S. H. und Wilcox C. M. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of subsequent colorectal cancer. *Arch Intern Med* **154**(4): 394-9, 1994.

- Pereira M. A., Barnes L. H., Steele V. E., Kelloff G. V. und Lubet R. A. Piroxicam-induced regression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci and prevention of colon cancer in rats. *Carcinogenesis* **17**(2): 373-6, 1996.
- Piazza G. A., Alberts D. S., Hixson L. J., Paranka N. S., Li H., Finn T., Bogert C., Guillen J. M., Brendel K., Gross P. H., Sperl G., Ritchie J., Burt R. W., Ellsworth L., Ahnen D. J. und Pamukcu R. Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. *Cancer Res* **57**(14): 2909-15, 1997.
- Piazza G. A., Rahm A. L., Krutzsch M., Sperl G., Paranka N. S., Gross P. H., Brendel K., Burt R. W., Alberts D. S., Pamukcu R. und et al. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* **55**(14): 3110-6, 1995.
- Picot D., Loll P. J. und Garavito R. M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **367**(6460): 243-9, 1994.
- Pines J. und Rieder C. L. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* **3**(1): E3-6, 2001.
- Polyak K., Lee M. H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J. M., Tempst P. und Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**(1): 59-66, 1994.
- Powell S. M., Zilz N., Beazer-Barclay Y., Bryan T. M., Hamilton S. R., Thibodeau S. N., Vogelstein B. und Kinzler K. W. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359**(6392): 235-7, 1992.
- Prives C. und Hall P. A. The p53 pathway. *J Pathol* **187**(1): 112-26, 1999.
- Pucci B., Kasten M. und Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* **2**(4): 291-9, 2000.
- Pugh S. und Thomas G. A. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* **35**(5): 675-8, 1994.
- Raz A. Is inhibition of cyclooxygenase required for the anti-tumorigenic effects of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs)? In vitro versus in vivo results and the relevance for the prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol* **63**(3): 343-7, 2002.
- Reddy B. S., Tokumo K., Kulkarni N., Aligia C. und Kelloff G. Inhibition of colon carcinogenesis by prostaglandin synthesis inhibitors and related compounds. *Carcinogenesis* **13**(6): 1019-23, 1992.
- Reichel C., Brugger R., Bang H., Geisslinger G. und Brune K. Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-coenzyme A epimerase: a key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen. *Mol Pharmacol* **51**(4): 576-82, 1997.
- Rigas B., Goldman I. S. und Levine L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* **122**(5): 518-23, 1993.
- Roth G. J., Stanford N. und Majerus P. W. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(8): 3073-6, 1975.
- Sano H., Kawahito Y., Wilder R. L., Hashiramoto A., Mukai S., Asai K., Kimura S., Kato H., Kondo M. und Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* **55**(17): 3785-9, 1995.
- Sattari S. und Jamali F. Evidence of absorption rate dependency of ibuprofen inversion in the rat. *Chirality* **6**(5): 435-9, 1994.
- Scheuren N., Bang H., Munster T., Brune K. und Pahl A. Modulation of transcription factor NF-kappaB by enantiomers of the nonsteroidal drug ibuprofen. *Br J Pharmacol* **123**(4): 645-52, 1998.
- Schmidt R. LC-MS/MS-Analyse von Eicosanoiden. *Dissertation*, 2006.

- Schneider E., Montenarh M. und Wagner P. Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene* **17**(21): 2733-41, 1998.
- Schneider P., Bodmer J. L., Thome M., Hofmann K., Holler N. und Tschopp J. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* **416**(3): 329-34, 1997.
- Sheng H., Shao J., Kirkland S. C., Isakson P., Coffey R. J., Morrow J., Beauchamp R. D. und DuBois R. N. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* **99**(9): 2254-9, 1997.
- Shieh W. R. und Chen C. S. Purification and characterization of novel "2-arylpropionyl-CoA epimerases" from rat liver cytosol and mitochondria. *J Biol Chem* **268**(5): 3487-93, 1993.
- Shiff S. J., Qiao L., Tsai L. L. und 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* **96**(1): 491-503, 1995.
- Shweiki D., Itin A., Soffer D. und Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**(6398): 843-5, 1992.
- Singer F., Mayrhofer F., Klein G., Hawel R. und Kollenz C. J. Evaluation of the efficacy and dose-response relationship of dexibuprofen (S(+)-ibuprofen) in patients with osteoarthritis of the hip and comparison with racemic ibuprofen using the WOMAC osteoarthritis index. *Int J Clin Pharmacol Ther* **38**(1): 15-24, 2000.
- Sionov R. V. und Haupt Y. Apoptosis by p53: mechanisms, regulation, and clinical implications. *Springer Semin Immunopathol* **19**(3): 345-62, 1998.
- Sionov R. V. und Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**(45): 6145-57, 1999.
- Smith H. O. und Wilcox K. W. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* **51**(2): 379-91, 1970.
- Soh J. W., Mao Y., Kim M. G., Pamukcu R., Li H., Piazza G. A., Thompson W. J. und Weinstein I. B. Cyclic GMP mediates apoptosis induced by sulindac derivatives via activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1. *Clin Cancer Res* **6**(10): 4136-41, 2000.
- Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* **910**: 121-37; discussion 137-9, 2000.
- Spencer A. G., Woods J. W., Arakawa T., Singer, II und Smith W. L. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* **273**(16): 9886-93, 1998.
- Srinivasula S. M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T. und Alnemri E. S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* **1**(7): 949-57, 1998.
- Steinbach G., Lynch P. M., Phillips R. K., Wallace M. H., Hawk E., Gordon G. B., Wakabayashi N., Saunders B., Shen Y., Fujimura T., Su L. K. und Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **342**(26): 1946-52, 2000.
- Stock K. P., Geisslinger G., Loew D., Beck W. S., Bach G. L. und Brune K. S-ibuprofen versus ibuprofen-racemate. A randomized double-blind study in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **11**(4-5): 199-202, 1991.
- Sugimura T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science* **258**(5082): 603-7, 1992.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Abersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M. und Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**(6718): 441-6, 1999.

- Takada Y., Bhardwaj A., Potdar P. und Aggarwal B. B. 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**(57): 9247-58, 2004.
- Takayama T., Katsuki S., Takahashi Y., Ohi M., Nojiri S., Sakamaki S., Kato J., Kogawa K., Miyake H. und Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* **339**(18): 1277-84, 1998.
- Tan S. C., Patel B. K., Jackson S. H., Swift C. G. und Hutt A. J. Stereoselectivity of ibuprofen metabolism and pharmacokinetics following the administration of the racemate to healthy volunteers. *Xenobiotica* **32**(8): 683-97, 2002.
- Tanioka T., Nakatani Y., Semmyo N., Murakami M. und Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* **275**(42): 32775-82, 2000.
- Thoren S. und Jakobsson P. J. Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* **267**(21): 6428-34, 2000.
- Toyoshima H. und Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**(1): 67-74, 1994.
- Tracy T. S. und Hall S. D. Metabolic inversion of (R)-ibuprofen. Epimerization and hydrolysis of ibuprofenyl-coenzyme A. *Drug Metab Dispos* **20**(2): 322-7, 1992.
- Tsuji M. und DuBois R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* **83**(3): 493-501, 1995.
- Tsuji M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M. und DuBois R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* **93**(5): 705-16, 1998.
- Vaidyanathan S., Krishnan K. R., Mansour P., Soni B. M. und McDicken I. p75 nerve growth factor receptor in the vesical urothelium of patients with neuropathic bladder: an immunohistochemical study. *Spinal Cord* **36**(8): 541-7, 1998.
- van Rees B. P., Sivula A., Thoren S., Yokozaki H., Jakobsson P. J., Offerhaus G. J. und Ristimaki A. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in intestinal type gastric adenocarcinoma and in gastric cancer cell lines. *Int J Cancer* **107**(4): 551-6, 2003.
- Vane J. Towards a better aspirin. *Nature* **367**(6460): 215-6, 1994.
- Vane J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**(25): 232-5, 1971.
- Vane J. R., Bakhle Y. S. und Botting R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 97-120, 1998.
- Vane J. R. und Botting R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res* **44**(1): 1-10, 1995.
- Varmus H. E. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet* **18**: 553-612, 1984.
- Verma I. M., Stevenson J. K., Schwarz E. M., Van Antwerp D. und Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* **9**(22): 2723-35, 1995.
- Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M. und Bos J. L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**(9): 525-32, 1988.

- Waga S., Hannon G. J., Beach D. und Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**(6481): 574-8, 1994.
- Walch L., de Montpreville V., Brink C. und Norel X. Prostanoid EP(1)- and TP-receptors involved in the contraction of human pulmonary veins. *Br J Pharmacol* **134**(8): 1671-8, 2001.
- Wang C. Y., Mayo M. W. und Baldwin A. S., Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* **274**(5288): 784-7, 1996.
- Wang C. Y., Mayo M. W., Korneluk R. G., Goeddel D. V. und Baldwin A. S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**(5383): 1680-3, 1998.
- Warner T. D. und Mitchell J. A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13371-3, 2002.
- Warner T. D. und Mitchell J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J* **18**(7): 790-804, 2004.
- Wechter W. J., Murray E. D., Jr., Kantoci D., Quiggle D. D., Leipold D. D., Gibson K. M. und McCracken J. D. Treatment and survival study in the C57BL/6J-APC(Min)/+(Min) mouse with R-flurbiprofen. *Life Sci* **66**(8): 745-53, 2000.
- Wei M. C., Zong W. X., Cheng E. H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A. J., Roth K. A., MacGregor G. R., Thompson C. B. und Korsmeyer S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517): 727-30, 2001.
- Weinberg R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**(3): 323-30, 1995.
- Williams E. D., Karim S. M. und Sandler M. Prostaglandin secretion by medullary carcinoma of the thyroid. A possible cause of the associated idarrhoea. *Lancet* **1**(7532): 22-3, 1968.
- Williams K., Day R., Knihinicki R. und Duffield A. The stereoselective uptake of ibuprofen enantiomers into adipose tissue. *Biochem Pharmacol* **35**(19): 3403-5, 1986.
- Williams T. J. und Peck M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature* **270**(5637): 530-2, 1977.
- Wong E., Bayly C., Waterman H. L., Riendeau D. und Mancini J. A. Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His513 --> Arg and Ile523 --> val mutation. *J Biol Chem* **272**(14): 9280-6, 1997.
- Xie W. L., Chipman J. G., Robertson D. L., Erikson R. L. und Simmons D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(7): 2692-6, 1991.
- Yao M., Zhou W., Sangha S., Albert A., Chang A. J., Liu T. C. und Wolfe M. M. Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**(4): 1618-28, 2005.
- Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm Res* **14**(6): 763-6, 1997.
- Yoshimatsu K., Altorki N. K., Golijanin D., Zhang F., Jakobsson P. J., Dannenberg A. J. und Subbaramaiah K. Inducible prostaglandin E synthase is overexpressed in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **7**(9): 2669-74, 2001.
- Yoshimatsu K., Golijanin D., Paty P. B., Soslow R. A., Jakobsson P. J., DeLellis R. A., Subbaramaiah K. und Dannenberg A. J. Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer. *Clin Cancer Res* **7**(12): 3971-6, 2001.

Yu J., Zhang L., Hwang P. M., Rago C., Kinzler K. W. und Vogelstein B. Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14517-22, 1999.

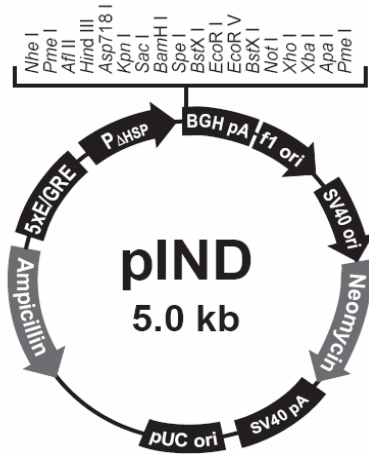
Zandi E., Chen Y. und Karin M. Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science* **281**(5381): 1360-3, 1998.

Zhang M. Z., Wang J. L., Cheng H. F., Harris R. C. und McKanna J. A. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): F994-1002, 1997.

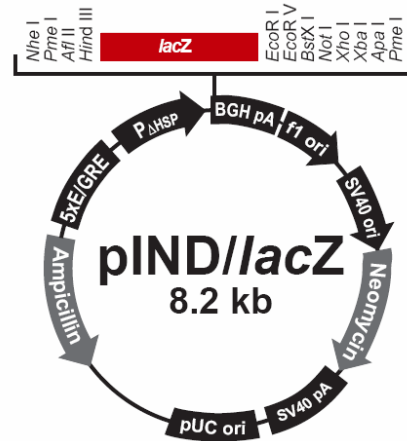
8 Anhang

8.1 Anhang A: Plasmidkarten (Invitrogen, Karlsruhe)

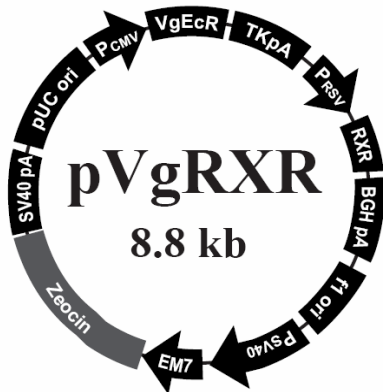
A)



B)

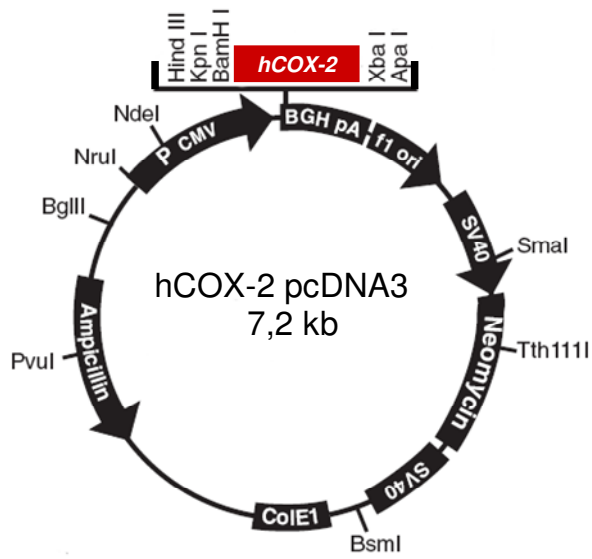


C)

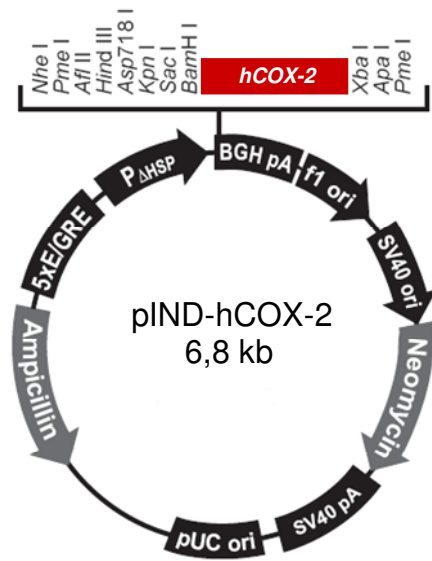


8.2 Anhang B: Konstrukte (modifiziert nach Invitrogen, Karlsruhe)

A)



B)



9 Publikationen und Tagungsbeiträge

9.1 Veröffentlichungen aus der vorliegenden Arbeit

Janssen A., Maier T.; Schiffmann S.; Coste O.; Seegel M.; Geisslinger G. and Groesch S.; Evidence of COX-2 independent induction of apoptosis and cell cycle block in human colon carcinoma cells after S- or R-ibuprofen treatment. *European Journal of Pharmacology* 2006 May 3; 540(1-3):24-33.

Janssen A.; Maier T.; Schiffmann S.; Coste O.; Seegel M.; Geisslinger G. und Groesch S.; Ibuprofen Enantiomere vermitteln ihre antikanzerogene Wirkung in humanen Kolonkarzinomzellen durch Hemmung der Zellzyklusprogression und Induktion von Apoptose. 47. *Frühjahrstagung der DGPT* 2006 April 4-6; Bereich molekulare und biochemische Pharmakologie.

Janssen A.; Maier T.; Schiffmann S.; Wobst I.; Geisslinger G. and Grösch S.; Activation of p53 via the p75^{NTR} receptor is one mechanism by which ibuprofen enantiomers mediate their anticarcinogenic effect in human colon carcinoma cell lines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (eingereicht).

9.2 Sonstige Veröffentlichungen

Groesch S., Schilling K., Janssen A., Maier T.J., Niederberger E. und Geisslinger G.; Induction of apoptosis by R-flurbiprofen in human colon carcinoma cells: involvement of p53. *Biochem. Pharmacol.* 2005 Mar 1; 69(5):831-9.

Maier T., Janssen A., Schmidt R., Geisslinger G and Groesch S.; 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 August; 19(10):1353-5. Epub 2005 Jun 9.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Astrid Janssen

geboren am 01.01.1973 in Wilhelmshaven

ledig

Hochschulausbildung und Berufsausbildung

- 2002 - 2006 Promotion im Fachbereich klinische Pharmakologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main; Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Geißlinger
- 2000 – 2001 Diplomarbeit im Fachbereich Humangenetik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W. Engel am Zentrum für Hygiene und Humangenetik der Georg-August Universität Göttingen
- 1995 – 2001 Diplomstudiengang Biologie an der Georg August Universität Göttingen. Abschluss: Diplom-Biologin
- 1992 – 1995 Krankenpflegeschule am Nordwest-Krankenhaus Sanderbusch, Sande. Abschluss: examinierte Krankenschwester

Schulbildung:

- 1985 – 1992 Besuch des Gymnasiums Humboldtschule, Wilhelmshaven. Abschluss: Abitur
- 1983 – 1985 Besuch der Orientierungsstufe/Kath. Schule Wilhelmshaven
- 1979 – 1983 Besuch der Kath. Grundschule Wilhelmshaven

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität angefertigt. Sie wurde von der Strathmann AG, Hamburg und teilweise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG GR 2011/1-2) und das Europäische Graduiertenkolleg "Roles of Eicosanoids in Biology and Medicine" (DFG GRK 757/1) gefördert. Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Geißlinger möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit bedanken.

Dr. Sabine Grösch danke ich für die Unterstützung und Betreuung während meiner Promotionszeit.

Außerdem möchte ich meiner ganzen Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und die schöne Zeit danken, die ich bei Euch hatte. Ivonne Wobst danke ich zudem für die Anfertigung des mPGES-1 Aktivitäts Assays. Besonderen Dank auch an meinen Kollegen Dr. Thorsten Maier für die anregenden Diskussionen.

Dem ehemaligen Mitarbeiter Maic Seegel und Carlo Angioni danke ich für die HPLC Messungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich natürlich bei allen Mitarbeitern unserer Abteilung für das angenehme Arbeitsklima und die gegenseitige Unterstützung bedanken.