



# **Untersuchungen zum Einfluss von Dimethylcelecoxib auf die Prostanoid-Biosynthese**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Ivonne Wobst**  
aus Zeulenroda

Frankfurt am Main 2009  
(D 30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

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

Datum der Disputation: 04.11.2009

*„Die signifikanten Probleme, die sich uns stellen, können  
nicht mit dem gleichen Grad des Denkens gelöst werden,  
den wir hatten als wir sie kreiert haben.“*

Albert Einstein

*meinen Eltern*

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Biosynthese von Prostanoiden über den Cyclooxygenase-Stoffwechselweg .....	1
1.2	Der Prostaglandin E <sub>2</sub> -Syntheseweg in der Tumorentstehung .....	4
1.2.1	Phospholipase A <sub>2</sub> -Enzyme .....	5
1.2.1.1	cPLA <sub>2</sub> .....	6
1.2.1.2	sPLA <sub>2</sub> .....	7
1.2.1.3	iPLA <sub>2</sub> .....	9
1.2.2	Cyclooxygenasen .....	10
1.2.3	Prostaglandin E <sub>2</sub> -Synthasen .....	12
1.2.3.1	mPGES-1 .....	12
1.2.3.2	cPGES .....	13
1.2.3.3	mPGES-2 .....	14
1.3	Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) .....	15
1.3.1	Selektive Cyclooxygenase-Inhibitoren .....	15
1.3.2	Die antikarzinogene Wirkung von NSAIDs .....	18
1.3.3	COX-unabhängige Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von NSAIDs .....	19
1.3.4	Das Struktur analogon von Celecoxib: Dimethylcelecoxib (DMC) .....	21
1.4	Zielstellung der vorliegenden Arbeit .....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	Material .....	24
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien .....	24
2.1.2	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme .....	26
2.1.3	Zelllinien .....	27
2.1.4	Test- und Referenzsubstanzen .....	27
2.1.5	Nährmedien, Puffer und Lösungen .....	28
2.1.6	Primer .....	31
2.1.7	Antikörper .....	32
2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	32
2.2.1.1	Passagieren von eukaryotischen Zellen .....	33
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl .....	33
2.2.1.3	Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen .....	33
2.2.2	RNA-Analytik .....	34
2.2.2.1	RNA-Extraktion aus humanen Krebszellen .....	34
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
2.2.2.3	RT-PCR-Analytik .....	34
2.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	35
2.2.2.5	Quantitative TaqMan™ RT-PCR-Analytik .....	35
2.2.3	Proteinanalytik .....	37

2.2.3.1	Gesamtproteinextraktion.....	37
2.2.3.2	Extraktion cytosolischer Proteine .....	38
2.2.3.3	Extraktion mikrosomaler Proteine.....	38
2.2.3.4	Trennen von Proteinen in Cytosol-und Membranfraktion.....	38
2.2.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	38
2.2.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
2.2.3.7	Western Blot .....	39
2.2.3.8	Antikörper-Inkubation und -Detektion .....	40
2.2.4	Immunzytochemie der mPGES-1 in HeLa-Zellen.....	40
2.2.5	Aktivitätsassays .....	41
2.2.5.1	In vitro COX-Inhibitor-Screening-Assay .....	41
2.2.5.2	COX-2-Vollblutassay .....	42
2.2.5.3	In vitro mPGES-1-Assay .....	43
2.2.5.4	In vitro cPLA <sub>2α</sub> -Assay .....	44
2.2.6	Analytik der Prostanoiden .....	45
2.2.6.1	Bestimmung der PGE <sub>2</sub> -Konzentration im Medium mittels PGE <sub>2</sub> -EIA .....	45
2.2.6.2	Bestimmung der Prostanoiden im Medium mittels LC-MS/MS .....	45
2.2.7	WST-Proliferationsassay .....	46
2.2.8	Analytik der zellulären Coxib-Konzentration .....	46
2.2.8.1	Bestimmung der intrazellulären Coxib-Konzentration.....	46
2.2.8.2	Bestimmung der Coxib-Konzentration in löslicher Fraktion und Membranfraktion .....	48
2.2.8.3	Bestimmung von Coxib-Membran-Interaktionen mittels <sup>1</sup> H MAS-NOESY NMR-Spektroskopie .....	48
2.2.8.4	Bestimmung der Membranintegrität und Membranfluidität.....	49
2.2.9	Statistik .....	50

### 3 Ergebnisse

51

3.1	Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Hemmung der PGE <sub>2</sub> -Synthese durch DMC in humanen Krebszellen.....	51
3.1.1	DMC hemmt die PGE <sub>2</sub> -Synthese in humanen Krebszellen.....	51
3.1.2	DMC zeigt keine Beeinflussung der COX-Isoenzyme im niedrigen mikromolaren Bereich .....	54
3.1.2.1	In vitro COX-Inhibitor-Screening-Assay .....	54
3.1.2.2	COX-2-Vollblutassay für DMC und Celecoxib .....	55
3.1.2.3	COX-1- und COX-2-Proteinexpression nach Behandlung mit DMC .....	56
3.1.3	Einfluss von DMC auf die Prostaglandin-E <sub>2</sub> -Synthasen .....	57
3.1.3.1	In vitro mPGES-1-Aktivitätsassay für DMC und MK-886.....	58
3.1.3.2	In vitro mPGES-1-Aktivitätsassay für Coxibe und Diclofenac.....	61
3.1.3.3	mPGES-1-, mPGES-2- und cPGES-Proteinexpression nach Behandlung mit DMC .....	63
3.1.3.4	mPGES-1-mRNA-Expression nach Behandlung mit DMC.....	66
3.1.4	DMC hemmt die Prostanoid-Synthese in humanen Krebszellen .....	68
3.1.5	Externe Arachidonsäure verhindert die PGE <sub>2</sub> -Synthesehemmung durch DMC .....	70
3.1.6	Einfluss von DMC auf die cPLA <sub>2α</sub> .....	71

---

3.1.6.1	In vitro cPLA <sub>2α</sub> -Aktivitätsassay für DMC.....	71
3.1.6.2	cPLA <sub>2α</sub> -Proteinexpression, -Phosphorylierung und -Translokation nach Behandlung mit DMC. ....	73
3.1.7	Die antiproliferative Wirkung von DMC ist unabhängig von der PGE <sub>2</sub> -Synthesehemmung .....	76
3.2	Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme der Coxibe in die Zelle und zur intrazellulären Verteilung .....	78
3.2.1	DMC und Celecoxib zeigen deutlich höhere intrazelluläre Konzentrationen .....	78
3.2.2	DMC und Celecoxib zeigen eine Anreicherung in der Membranfraktion.....	81
3.2.3	DMC und Celecoxib zeigen eine starke Wechselwirkung mit der POPC-Modellmembran.....	83
3.2.4	DMC und Celecoxib beeinflussen die Membranintegrität in intakten Zellen.....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1	Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Hemmung der PGE <sub>2</sub> -Synthese durch DMC in humanen Krebszellen.....	87
4.1.1	Die mPGES-1 als mögliches molekulares Zielprotein von DMC .....	88
4.1.2	Die cPLA <sub>2α</sub> als mögliches molekulares Zielprotein von DMC .....	92
4.1.3	Einfluss der PGE <sub>2</sub> -Hemmung auf die antiproliferativen Eigenschaften von DMC.....	97
4.2	Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme der Coxibe in die Zelle und zur intrazellulären Verteilung .....	98
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>119</b>
8.1	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit.....	119
8.2	Sonstige Veröffentlichungen.....	119
8.3	Förderung und Danksagung .....	120
8.4	Lebenslauf .....	121

# 1 Einleitung

Eicosanoide [griechisch „eikosa“, zwanzig] sind hydrophobe hormonähnliche Substanzen, die sich von mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub> Fettsäuren ableiten [1]. Zu diesen zählen hauptsächlich Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (DGLA), Arachidonsäure (AA) und die Eicosapentaensäure (EPA) [2]. In Abhängigkeit von der Enzymausstattung der Zelle werden daraus Prostaglandine (PG), Thromboxan (TX), Prostacyclin (PGI), Leukotriene (LT), Epoxyeicosatriensäuren (EET), Lipoxine (LX), Hepoxiline (HX), Isoprostane (IP) und Endocannabinoide gebildet, welche an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind.

Die ersten Experimente zur Entdeckung der Prostaglandine sind auf die 30er Jahre zurückzuführen. 1930 untersuchten Kurzrok und Lieb die Wirkung von Samenflüssigkeit auf den isolierten Uterus und konnten sowohl kontrahierende als auch relaxierende Effekte beschreiben [3]. In den Jahren 1933-1934 demonstrierten Goldblatt [4, 5] und von Euler [6, 7] unabhängig voneinander, dass die Extrakte aus menschlicher Samenflüssigkeit oder aus dem Samenbläschen des Schafes blutdrucksenkend wirken und die glatten Muskelzellen verschiedener Organe stimulieren können. Von Euler erkannte, dass die aktiv wirkenden Substanzen ungesättigte Fettsäuren darstellten und bezeichnete diese als Prostaglandine [8]. 1962 gelang Bergström und Samuelsson mit Hilfe neu entwickelter chromatographischer Techniken die Strukturaufklärung der Prostaglandine E<sub>1</sub> und F<sub>1 $\alpha$</sub>  [9-11]. Ab diesem Zeitpunkt begann die Ära der Eicosanoidforschung. Ein weiterer Meilenstein auf dem Gebiet wurde 1971 von Vane gelegt, als er für die „Aspirin-ähnlichen Substanzen“, heute als Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) bezeichnet, eine Hemmung der Prostaglandinsynthese entdeckte und so ihre analgetische, antipyretische und antiinflammatorische Wirkung erklärte (siehe Kapitel 1.2.3) [12]. Für ihre einschlägigen Arbeiten erhielten Bergström, Samuelsson und Vane 1982 den Nobelpreis für Medizin.

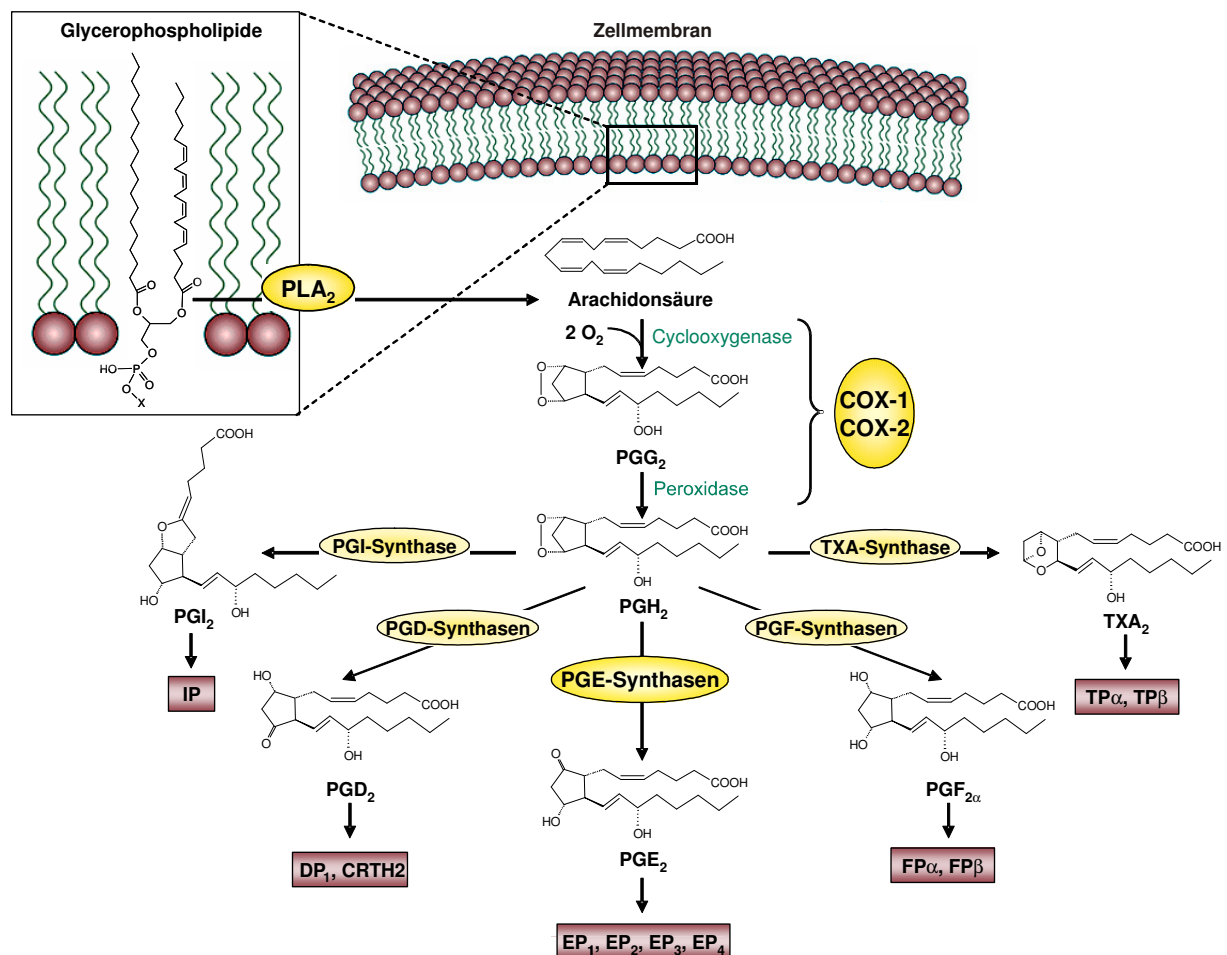
Als autokrin oder parakrin wirkende Lipid-Mediatoren werden Prostaglandine in fast allen Geweben gebildet [13]. Ihre physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen entfalten sie am Ort ihrer Entstehung durch die Bindung an spezifische Rezeptoren, auf welche im folgenden Abschnitt noch ausführlicher eingegangen wird.

## 1.1 Biosynthese von Prostanoiden über den Cyclooxygenase-Stoffwechselweg

Prostaglandine, die aus der essentiellen Fettsäure Arachidonsäure (all-cis- $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure) gebildet werden, bezeichnet man als Prostaglandine der Serie 2, da sie 2 Doppelbindungen in der Seitenkette besitzen [14, 15]. Erfolgt die Synthese über die Cyclooxygenasen (COX), werden sie auch

als Prostanoiden bezeichnet. Dazu zählen Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan (TXA<sub>2</sub>).

Arachidonsäure wird überwiegend mit der Nahrung aufgenommen und in die Zellmembran als Glycerophospholipidbestandteil eingebaut, so dass die freie Konzentration im Zytoplasma sehr gering ist [16, 17]. Die Freisetzung der Arachidonsäure in das Zytoplasma erfolgt durch Hydrolyse der sn-2-Esterbindung durch Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme (PLA<sub>2</sub>) (Abb. 1-1) [13]. Während die meisten derzeit bekannten PLA<sub>2</sub>-Enzyme zur Freisetzung von Arachidonsäure befähigt sind, konnte gezeigt werden, dass nur cytosolische PLA<sub>2α</sub> (cPLA<sub>2α</sub>) hoch selektiv für Arachidonsäure in sn-2-Position von Glycerophospholipiden ist. cPLA<sub>2α</sub> wird in fast allen Zellen exprimiert und stellt Stimulus-aktiviert ein Schlüsselenzym für die Eicosanoidbildung dar [18, 19] (siehe auch Kapitel 1.2.1.1). Daneben konnte für die sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme (sPLA<sub>2</sub>) ebenfalls nachgewiesen werden, dass sie an der Freisetzung von Arachidonsäure beteiligt sind [18, 20] (siehe auch Kapitel 1.2.1.2).



**Abb. 1-1: Biosynthese der Prostanoiden durch Cyclooxygenasen:** Durch die Aktivität der Phospholipasen A<sub>2</sub> wird Arachidonsäure aus Glycerophospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Die Cyclooxygenasen-1 und -2 (COX-1, COX-2) katalysieren die Synthese zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), welches anschließend durch die gewebespezifischen PG-Synthasen zu Prostaglandinen (PG), Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) umgewandelt wird. Nach der Freisetzung aus der Zelle entfalten die Prostanoiden ihre Wirkung meist über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (nach [21, 22]).



Die freigesetzte Arachidonsäure wird anschließend durch die bifunktionalen Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) in ein labiles 15-Hydroperoxid, das PGG<sub>2</sub>, oxidiert, wobei der für Prostaglandine charakteristische Cyclopentanring entsteht [23]. Ein zweites katalytisches Zentrum der COX, die Peroxidase, reduziert das reaktive Intermediat PGG<sub>2</sub> zum PGH<sub>2</sub>, welches durch die gewebespezifischen Synthasen in die biologisch aktiven Prostanoiden PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> überführt wird [24] (Abb. 1-1).

Die Expression der verschiedenen PG-Synthasen ist dabei sehr stark gewebe- und organabhängig. Zurzeit sind drei PGE<sub>2</sub>-Synthasen bekannt: die mikrosomalen PGE<sub>2</sub>-Synthasen-1 und -2 (mPGES-1, mPGES-2) sowie die cytosolische PGE<sub>2</sub>-Synthase (cPGES), die in fast allen Zellen exprimiert werden. Im Unterschied dazu findet man die Lipokalin-PGD-Synthase (L-PGDS) überwiegend im ZNS, die hämatopoietische PGD-Synthase (H-PGDS) in Mastzellen und die PGF-Synthase im Uterus. Die Thromboxansynthase ist charakteristisch für Blutplättchen und Makrophagen und die Prostacyclinsynthase für Endothelzellen [13].

Unmittelbar nach der Bildung erfolgt die Freisetzung der Prostanoiden aus der Zelle. Ein spezifischer Prostaglandin-Transporter (PGT) konnte identifiziert werden. Daneben erfolgt vermutlich auch eine passive Diffusion und ein Transport über das Multidrug-Resistenz-Protein MRP4 [25-27].

Die Wirkung der Prostanoiden ist überwiegend auf ihre Bindung an spezifische G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren (GPCRs) zurückzuführen. Diese weisen sieben hydrophobe Transmembrandomänen auf und vermitteln ihre Wirkung über G-Proteine und die Bildung von intrazellulären Signalstoffen, wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), Diacylglycerol (DAG) sowie der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration [28]. Namensgebend für die Rezeptoren ist das jeweilige Prostanoid mit der höchsten Bindungsaffinität [29]. Fünf verschiedene Prostanoidrezeptoren für die fünf Prostanoiden aus dem Cyclooxygenase-Stoffwechselweg konnten identifiziert werden: E-Prostanoid (EP)-, DP-, FP-, IP- und TP-Rezeptor. Für den EP-Rezeptor sind 4 Subtypen charakterisiert (EP<sub>1</sub>-EP<sub>4</sub>) und für den DP-Rezeptor 2 Subtypen (DP<sub>1</sub>, DP<sub>2</sub>), wobei der DP<sub>2</sub> Rezeptor aufgrund seiner Lokalisation auf T-Helferzellen und seiner abweichenden Struktur auch als CRTH2-Rezeptor (*chemoattractant receptorhomologous molecule expressed on T Helper type 2*) bezeichnet wird [30]. Von den TP- und FP-Rezeptoren konnten jeweils zwei Splicevarianten gefunden werden (TP<sub>α</sub>, TP<sub>β</sub> und FP<sub>α</sub>, FP<sub>β</sub>). In Tabelle 1-1 sind die Prostanoidrezeptoren mit den entsprechenden Liganden, den Signalwegen sowie die häufigsten rezeptorvermittelten Effekte zusammengefasst.

Neben den membrangekoppelten Rezeptoren konnte auch gezeigt werden, dass einige Prostanoiden über nukleare Rezeptoren Effekte vermitteln. Nach Aktivierung werden Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren (PPAR) als Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (PXR) an sequenzspezifische DNA-Promotorregionen gebunden und induzieren so die Genexpression von Zielgenen für den Energiehaushalt, Zelldifferenzierung, Apoptose und Entzündungsreaktionen [31]. So binden beispielsweise Prostacyclinanaloga an PPAR<sub>δ</sub> und aktivieren diesen. Für 15d-PGJ<sub>2</sub>, ein Metabolit des

PGD<sub>2</sub>, wurde eine antiinflammatorische Wirkung beschrieben, die durch Bindung an PPAR<sub>γ</sub> und eine damit verbundene Inhibierung der Expression proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB, AP-1 und STAT, vermittelt wird [32-34]. Die PPARs sind momentan Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Rezeptor	Liganden	Signalweg	Beispiele für rezeptorvermittelte Effekte
IP	PGI	cAMP ↑	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Hemmung der Reninfreisetzung und Natriurese, Verminderung der T-Zellproliferation
DP <sub>1</sub>	PGD	cAMP ↑ Ca <sup>2+</sup> ↑	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Erschlaffung der glatten Muskulatur von Uterus und Gastrointestinaltrakt, Stimulation der Ausschüttung von Zytokinen
DP <sub>2</sub> / CRTH2	PGD	cAMP ↓ Ca <sup>2+</sup> ↑	Bronchokonstriktion, Induktion der Chemotaxis von T-Helferzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten
EP <sub>1</sub>	PGE, PGF, PGD	IP <sub>3</sub> ↑ Ca <sup>2+</sup> ↑	Kontraktion der glatten Muskulatur von Bronchien und des Gastrointestinaltrakts
EP <sub>2</sub>	PGE	cAMP ↑	Erschlaffung der glatten Muskulatur von Bronchien, Blutgefäßen und des Gastrointestinaltrakts, Blutdrucksenkung
EP <sub>3</sub>	PGE	cAMP ↓	Hemmung der Magensäuresekretion, verstärkte Uteruskontraktion in Schwangerschaft, Hemmung der Lipolyse, Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung
EP <sub>4</sub>	PGE	cAMP ↑	Steigerung der Schleimsekretion im Magen, Offenhaltung des Ductus arteriosus Botalli
FP <sub>α</sub> / FP <sub>β</sub>	PGF	IP <sub>3</sub> ↑	Uteruskontraktion
TP <sub>α</sub> / TP <sub>β</sub>	TXA, PGD	IP <sub>3</sub> ↑	Thrombozytenaggregation, Vaso- und Bronchokonstriktion, Modulation der T-Zell-Aktivierung

**Tab. 1-1:** Prostanoidrezeptoren: die Liganden, der Signalweg sowie die häufigsten rezeptorvermittelten Effekte. Nach Mutschler, E. Arzneimittelwirkungen 2008

## 1.2 Der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Syntheseweg in der Tumorentstehung

Neben ihren physiologischen Wirkungen zeigen Prostanoide auch eine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. Entzündung, Schmerz und Fieber. Dabei stellen PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> die wichtigsten proinflammatorischen Prostanoide dar. Eine herausragende Stellung nimmt das Prostaglandin E<sub>2</sub> ein, da es im menschlichen Organismus in fast allen Geweben gebildet wird und zahlreiche biologische Funktionen besitzt [35]. Pathophysiologisch wurde eine Beteiligung an Krankheiten, wie akuter und neuropathischer Schmerz, Fieber, rheumatoide Arthritis, Osteoporose, entzündlichen Darmerkrankungen (Cholitis ulcerosa), Morbus Alzheimer sowie an verschiedenen Tumorerkrankungen (z.B. Brust-, Lungen-, Darm- und Prostatakrebs) nachgewiesen [36-42]. Es

konnte gezeigt werden, dass PGE<sub>2</sub> Tumorwachstum und Angiogenese stimuliert, Apoptose inhibiert und immunsuppressiv wirkt [42]. Das Zusammenspiel der am PGE<sub>2</sub>-Syntheseweg beteiligten Enzyme, besonders während der Tumorentwicklung, sowie ihre Beeinflussung soll deshalb in den folgenden Kapiteln etwas ausführlicher erläutert werden.

### 1.2.1 Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme

Die Biosynthese von PGE<sub>2</sub> wird durch drei enzymatische Reaktionen reguliert. Der erste Schritt ist die Bereitstellung der Arachidonsäure durch Phospholipase A<sub>2</sub>, gefolgt von der Bildung des instabilen Intermediärproduktes PGH<sub>2</sub> durch die Cyclooxygenasen mit anschließender Bildung des PGE<sub>2</sub> durch die spezifischen Prostaglandin E-Synthasen.

Familie	Gruppe	Molekulargewicht	Ca <sup>2+</sup>	Synonyme
sPLA <sub>2</sub>	IB	13-15	mM	Pancreatic PLA <sub>2</sub>
	IIA	13-15	mM	Synovial PLA <sub>2</sub>
	IID	14-15	mM	
	IIE	14-15	mM	
	IIF	16-17	mM	
	V	14	mM	
	X	14	mM	
	XII	19	mM	
cPLA <sub>2</sub>	III	55	mM	
	IVA	85	< μM	cPLA <sub>2α</sub>
	IVB	114	< μM	cPLA <sub>2β</sub>
	IVC	61	--	cPLA <sub>2γ</sub>
iPLA <sub>2</sub>	IVD	92-93	< μM	cPLA <sub>2δ</sub>
	VIA-1	84-85	--	iPLA <sub>2</sub>
	VIA-2	88-90	--	iPLA <sub>2β</sub>
	VIB	88-91	--	iPLA <sub>2γ</sub>
	VIC	146	--	iPLA <sub>2δ</sub>
	VID	53	--	iPLA <sub>2ε</sub>
	VIE	57	--	iPLA <sub>2ζ</sub>
VIF	28	--	iPLA <sub>2η</sub>	
PAF-AH	VIIA	45	--	Lp-PLA <sub>2</sub> (Lipoprotein-assoziiert)
	VIIIB	40	--	PAF-AH II
	VIIIA	26	--	PAF-AH Ib (α1 Untereinheit)
	VIIIB	26	--	PAF-AH Ib (α2 Untereinheit)
LPLA <sub>2</sub>	XV	45 (deglykosyliert)	--	ACS; lysosomal PLA <sub>2</sub>

**Tab. 1-2:** Klassifizierung der humanen Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme nach [20, 43, 44]

Die „Superfamilie“ der Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme vergrößert sich Jahr für Jahr und besteht zurzeit aus 15 Hauptgruppen. Sie enthält 5 klar definierte Enzymfamilien: die sekretorische (sPLA<sub>2</sub>), die cytosolische (cPLA<sub>2</sub>), die Calcium-unabhängige (iPLA<sub>2</sub>) und die lysosomale Phospholipase A<sub>2</sub> (LPLA<sub>2</sub>) sowie die Plättchen-aktivierender-Faktor-Acylhydrolase (PAF-AH) [43]. 25 verschiedene

Phospholipase A<sub>2</sub> Enzyme konnten bisher im Menschen identifiziert werden (Tab. 1-2), wobei nur die cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> und iPLA<sub>2</sub> eine Rolle bei der Eicosanoid-Biosynthese spielen [18].

Aufgrund der Gruppenvielfalt werden den PLA<sub>2</sub>s auch eine Beteiligung an unterschiedlichsten Mechanismen, wie Entzündung, Zelltod, Zellwachstum, Zellsignalübertragung und Aufrechterhaltung der Membranzusammensetzung, zugeschrieben [45].

#### 1.2.1.1 cPLA<sub>2</sub>

Eine herausragende Rolle aus der Gruppe der cytosolischen Phospholipasen A<sub>2</sub> hat die cPLA<sub>2α</sub> aufgrund ihrer Substratspezifität für Arachidonsäure in sn-2-Position von Glycerophospholipiden erlangt [46]. Die 85 kDa große Serinesterase wird in fast allen Zellen und Geweben mit Ausnahme von Lymphozyten gebildet und zeigt eine Hydrolyseaktivität in Gegenwart von submikromolaren Calciumkonzentrationen [47]. cPLA<sub>2α</sub> besitzt zwei katalytische Domänen A und B sowie eine C2-Domäne [48]. Im inaktiven Zustand befindet sich das Enzym im Cytosol. Die Aktivierung der cPLA<sub>2α</sub> erfolgt durch exogene Stimuli, wie z.B. proinflammatorische Zytokine (IL-1β, TNFα), Wachstumsfaktoren (EGF, CSF) oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) [49]. Durch Bindung von Wachstumsfaktoren an den entsprechenden Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) mit anschließender Mobilisierung intrazellulären Calciums. Alternativ wird eine Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration auch durch die Aktivierung rezeptorgekoppelter Calciumkanäle erreicht (Abb. 1-2, Weg 1).

Ein Anstieg der Calciumkonzentration führt zu einer Translokation der cPLA<sub>2α</sub> vom Cytosol zum Endoplasmatischen Retikulum, Golgi und der Kernmembran, wo sich die Glycerophospholipide als Substrate befinden. Dieser Schritt ist essentiell für die Einleitung der Arachidonsäurefreisetzung und wird durch die C2-Domäne vermittelt, welche zwei Bindungsstellen für Calciumionen besitzt [18, 49, 50]. Das Vorhandensein von Calcium stabilisiert den Komplex mit den perinuklearen Membranen, was eine effiziente Kopplung zwischen der cPLA<sub>2α</sub> und den nachgeschalteten Enzymen der Eicosanoid-Biosynthese, wie COX-1 und COX-2 zur Folge hat [47]. Eine maximale Aktivität der cPLA<sub>2α</sub> wird durch die Phosphorylierung von zwei Serinresten (Ser<sup>505</sup>, Ser<sup>727</sup>) erreicht, welche durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und durch MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MAPKAPK) vermittelt werden (Abb. 1-2, Weg 2) [18, 51]. Die cPLA<sub>2α</sub>-Expression wird hingegen eher mäßig durch proinflammatorische Zytokine gesteigert (Abb. 1-2, Weg 6) [52, 53].

Es konnte gezeigt werden, dass die cPLA<sub>2α</sub>-Expression in verschiedenen humanen Krebsformen, wie kolorektales Karzinom, Dünndarm- [54] und Lungenkrebs [55] ansteigt. Hiermit übereinstimmend werden größere Mengen an Arachidonsäure und resultierendes PGE<sub>2</sub> gefunden, wo eine gesteigerte Aktivität der cPLA<sub>2α</sub> und COX-2 auftritt [56]. Für onkogenes Ras, welches an intrazellulären Signalwegen beteiligt ist, die in Proliferations- und Transformationsprozesse involviert sind, konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Expression im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom mit einem

Anstieg der cPLA<sub>2α</sub>-Expression und -Aktivität verbunden ist [57]. Daneben reguliert die cPLA<sub>2α</sub> im Prostatakrebs die Aktivität der sPLA<sub>2</sub>, welche selbst hochreguliert wird [58, 59]. Auch in APC<sup>Δ716</sup>-knockout-Mäusen, die ein Tiermodell für die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) im Menschen darstellen, steigt neben der COX-2 die cPLA<sub>2α</sub>-Expression in Polypen. Dies korreliert mit der Polypengröße im Dünndarm. Durch eine cPLA<sub>2α</sub>-Genmutation wurde die Größe der Polypen verringert, aber nicht deren Anzahl, so dass man die cPLA<sub>2α</sub> als Tumorpromotor und nicht als Tumorinitiator einordnet [18, 53, 60]. Daneben existieren aber auch zahlreiche Studien, die der cPLA<sub>2α</sub> proapoptotische Eigenschaften zuordnen. Durch eine gesteigerte Arachidonsäuremenge kommt es beispielsweise zu ansteigenden Ceramidkonzentrationen, die potente apoptoseinduzierende Stoffe darstellen. Dies erfolgt durch Aktivierung der Sphingomyelinasen (SMase), welche folglich Sphingomyelin zu Ceramiden verstoffwechseln [61, 62]. Um die genaue Rolle der cPLA<sub>2α</sub> in der Krebsentwicklung *in vivo* einordnen zu können, sind jedoch weitere Studien erforderlich.

### 1.2.1.2 sPLA<sub>2</sub>

Die sPLA<sub>2</sub>-Enzyme bilden die größte Gruppe der Phospholipasen A<sub>2</sub>. Bisher konnten in Säugern 10 Untergruppen gefunden werden, wobei im Menschen 9 exprimiert sind (Tab. 1-2). Mit Ausnahme der sPLA<sub>2</sub>-III haben sie ein Molekulargewicht zwischen 14-19 kDa, ein hoch konserviertes katalytisches Zentrum und eine ebenfalls hoch konservierte Calcium-Bindetasche. Die Gruppen IIA-F und Gruppe V bezeichnet man auch als Gruppe II-Unterfamilie. sPLA<sub>2s</sub> werden nach der Bildung sezerniert und stellen somit extrazelluläre Enzyme dar. Sie hydrolysieren die Esterbindung in sn-2-Position von Glycerophospholipiden in Gegenwart von millimolaren Calciumkonzentrationen. Dabei weisen sie keine Fettsäureselektivität auf [18, 20, 63]. Im Allgemeinen wurde gezeigt, dass die Gruppe II-Unterfamilie bevorzugt anionische Phospholipide, wie Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin, hydrolysiert. Neutrale Phospholipide wie Phosphatidylcholin werden nicht angegriffen. sPLA<sub>2</sub>-V und -X zeigen hingegen keine Präferenz für bestimmte Kopfgruppen. Daneben beeinflussen auch oxidative Modifikationen der Phospholipide die Hydrolyseaktivität der sekretorischen Phospholipasen. Einige sPLA<sub>2s</sub> haben kationischen Charakter und binden daher fest an anionische Heparinoide, wie Heparin oder Heparinsulfat (sPLA<sub>2</sub>-IIA, -IID, -V). Dadurch wird ebenfalls die Aktivität und somit die zelluläre Funktion beeinflusst [64]. Aufgrund der genannten Eigenschaften induzieren sPLA<sub>2</sub>-Enzyme die Freisetzung von Arachidonsäure über zwei getrennte Mechanismen: über den externen Plasmamembran-Weg sowie über den Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG)-vermittelten Weg [18, 20].

Für die Heparin-bindenden sPLA<sub>2s</sub> der Gruppe II Unterfamilie wird überwiegend der HSPG-vermittelte Weg postuliert. Dabei lagert sich das Enzym an Heparinsulfat-haltige Seitenketten der Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten HSPG-Glypicane in der Zellmembran an, die sich in speziellen Strukturen, den Caveolae, einer besonderen Form von so genannten Lipid Rafts, befinden (Abb. 1-2, Weg 3). Es erfolgt eine Internalisierung der sPLA<sub>2</sub> und eine Freisetzung der

Arachidonsäure aus gestörten Mikrodomänen der Zellmembran bzw. Membranamordnungen, welche durch Zellaktivierung entstehen [65, 66]. Der HSPG-vermittelte Weg führt somit zu einer Anreicherung der sPLA<sub>2</sub> in bestimmten Membrankompartimenten, was eine zeitlich begrenzte Kolo-kalisierung mit den perinuklearen Arachidonsäure-metabolisierenden Enzymen, wie den Cyclooxygenasen-1 und -2, bewirkt. Dies gewährleistet eine effektive Eicosanoidproduktion in aktivierten Zellen [64]. Anzumerken ist, dass sPLA<sub>2</sub>s, die den HSPG-Mechanismus anwenden, häufig auch die Expression der COX-2 steigern [18].

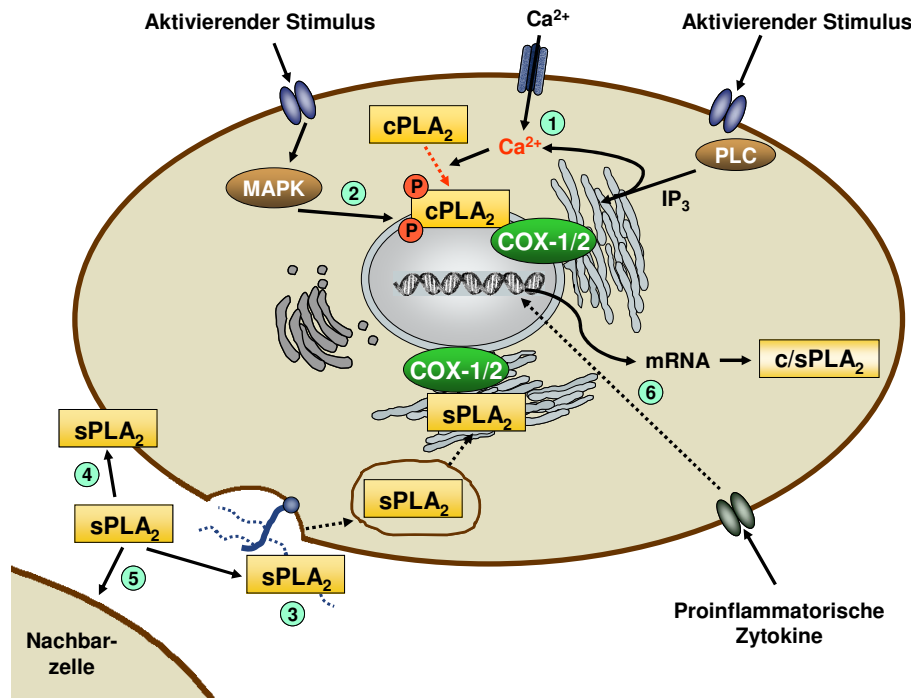
sPLA<sub>2</sub>s mit einer hohen Aktivität an neutralen Phospholipiden, wie Phosphatidylcholin (PC), bedienen sich überwiegend des externen Plasmamembran-Weges zur Arachidonsäurefreisetzung, wobei PC von der Zellaußenseite hydrolysiert wird (Abb. 1-2, Weg 4). Die freigesetzte Arachidonsäure diffundiert in das Zellinnere zu den perinuklearen Gebieten an die metabolisierenden Enzyme COX-1 und -2. Da für diesen Mechanismus keine Membranamordnungen erforderlich sind, kann auf diesem Weg Arachidonsäure von unstimulierten Zellen freigesetzt werden [18, 20].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Freisetzung von Arachidonsäure aus ruhenden, unstimulierten Zellen von der Fähigkeit der Bindung der sPLA<sub>2</sub>s an PC der Membranaußenseite abhängig ist (X>V>IIF~III>>IIA). Es erfolgt so eine Stimulus-unabhängige unspezifische Fettsäurefreisetzung. sPLA<sub>2</sub>s, die kaum oder gar nicht PC hydrolysieren, können die Arachidonsäurefreisetzung HSPG-vermittelt in stimulierten Zellen bewirken (IIA~V>IID>IIE, X inaktiv) und zusätzlich die COX-2 Expression induzieren.

Daneben können sPLA<sub>2</sub>-Enzyme auch an Nachbarzellen agieren und hier den transzellulären Arachidonsäuremetabolismus induzieren (Abb. 1-2, Weg 5) [18]. Proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , stimulieren ebenfalls rezeptorvermittelt die Expression bestimmter sPLA<sub>2</sub>s. Zu nennen sind hier hauptsächlich sPLA<sub>2</sub>-IIA und -V (Abb. 1-2, Weg 6).

Die Expression und Aktivität der Gruppe II sekretorischer PLA<sub>2</sub> steigt in einer Vielzahl von Krebsarten an. Dazu zählen Brust- [67], Bauchspeicheldrüsen- [68], Prostata- [59] und Leberkrebs [69]. Meist fehlt jedoch die genaue Enzymbezeichnung. Im Prostatakarzinom ist die sPLA<sub>2</sub>-IIA hochreguliert. Eine erhöhte Gen- und Proteinexpression konnte für diese auch in kolorektalen Adenomen von FAP-Patienten nachgewiesen werden, Dies stützt die Hypothese, dass eine Dysregulation der sPLA<sub>2</sub>-IIA bereits im frühen Stadium der Tumorentstehung stattfindet [70]. Die sPLA<sub>2</sub>-IIA besitzt daneben aber auch antibakterielle Eigenschaften, die teilweise als physiologische Hauptfunktion angesehen wird [71]. In Patienten mit Magenkarzinom konnte gezeigt werden, dass die sPLA<sub>2</sub>-IIA-Expression mit einer längeren Überlebenszeit und weniger Metastasierungen einhergeht [72]. Dieser antikarzinogene Effekt der sPLA<sub>2</sub>-IIA könnte mit ihrer bakteriziden Aktivität gegen gastrointestinale Mikroorganismen einhergehen. Die sPLA<sub>2</sub>-X ist in Kolon-Adenokarzinomzellen überexprimiert und steht im engen Zusammenhang mit einer gesteigerten COX-2 Expression. Eine Zugabe von sPLA<sub>2</sub>-X zu Darmkrebszellen resultiert in einem starken Anstieg der COX-2 abhängigen

Produktion von  $\text{PGE}_2$  [73]. Zur Klärung der Bedeutung der  $\text{sPLA}_2$ -Isoenzyme in der Tumorentstehung bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.



**Abb. 1-2: Regulationsmechanismen für die  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ - und  $\text{sPLA}_2$ -vermittelte Arachidonsäure (AA)-Freisetzung:** Nach Rezeptoraktivierung produzieren Phospholipase C (PLC)-Enzyme Diacylglycerol und Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ). Letzteres mobilisiert cytosolisches Calcium aus Speichern. Alternativ wird die intrazelluläre Calciumkonzentration auch durch rezeptorgekoppelte Aktivierung von Calciumkanälen gesteigert. Als Reaktion auf den Calciumanstieg wandert die  $\text{cPLA}_{2\alpha}$  zum ER und zu den perinuklearen Membranen, wo sich die COX-Isoenzyme befinden (Weg 1). Daneben wird die so genannte MAPK-Kaskade aktiviert, die zu einer Phosphorylierung der  $\text{cPLA}_{2\alpha}$  und damit zu einer Aktivitätssteigerung führt (Weg 2). Für die  $\text{sPLA}_2$ s werden 2 Mechanismen postuliert. Beim Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG)-vermittelten Weg lagert sich das Enzym an Heparinsulfat-haltige Seitenketten des Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten HSPG Glypicans in Caveolae-Strukturen der Zellmembran an, wird internalisiert und setzt AA in unmittelbarer Nähe zur COX frei. (Weg 3). Beim externen Plasmamembran-Weg werden Phosphatidylcholin (PC)-reiche Strukturen von der Zellaußenseite hydrolysiert. Die freigesetzte AA diffundiert nach Aufnahme in die Zelle zu den metabolisierenden COX-Enzymen (Weg 4).  $\text{sPLA}_2$ s können auch an Nachbarzellen agieren und so den transzellulären AA-Metabolismus induzieren (Weg 5). Durch proinflammatorische Stimuli wird die Neusynthese von  $\text{sPLA}_2$  und gering auch von  $\text{cPLA}_{2\alpha}$  induziert (Weg 6). Siehe auch Kapitel 1.2.1., nach [18]

### 1.2.1.3 iPLA<sub>2</sub>

Von den  $\text{iPLA}_2$ -Enzymen sind besonders  $\text{iPLA}_2$ -VIA und -VIB charakterisiert. Sie besitzen ein Molekulargewicht zwischen 84 und 91 kDa und sind ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert. Beide zeigen volle Enzymaktivität in Abwesenheit von Calcium und besitzen keine Fettsäure-Spezifität [18].  $\text{iPLA}_2$ -VIA (und eventuell auch -VIB) spielt eine entscheidende Rolle bei Phospholipid-Umbauprozessen der Membranen. Durch Deacylierungen der Phospholipide wird die

Phospholipid-Homöostase aufrechterhalten [74]. Neben dieser so genannten „*housekeeping*“-Rolle gibt es mehrere Hinweise darauf, dass die iPLA<sub>2</sub>-VIA ebenfalls Stimulus-gekoppelt Arachidonsäure freisetzen kann [75, 76]. Daneben wird iPLA<sub>2</sub>-VIA in apoptotischen Zellen von Caspase-Proteasen gespalten, was mit einer Enzymaktivierung verbunden ist und zu einer gesteigerten Fettsäurefreisetzung führt [77]. Obwohl iPLA<sub>2</sub>s mit Apoptose in Verbindung gebracht werden konnten, gibt es bis jetzt keine Studien zur Aktivität oder Expression in verschiedenen Tumorarten [53].

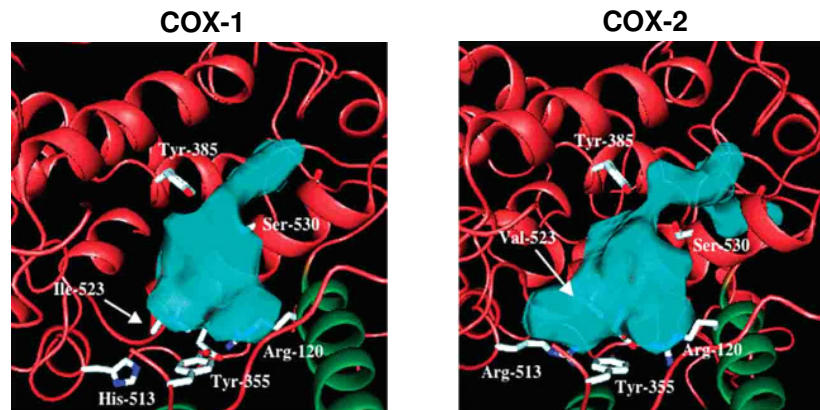
### 1.2.2 Cyclooxygenasen

Die Cyclooxygenasen (COX), auch bekannt als Prostaglandin H-Synthasen, katalysieren als Häm-enhaltende Enzyme den zweiten Reaktionsschritt der Prostaglandin-Biosynthese, die Bildung des PGH<sub>2</sub> (Abb. 1-1). Seit 1991 sind zwei COX-Isoformen bekannt, die COX-1 und -2 [78, 79], die in ihrer Aminosäuresequenz eine Homologie von 61 % aufweisen und ein ähnliches Molekulargewicht von ca. 71 kDa besitzen [80]. Obwohl man ihre biologischen Funktionen nicht absolut trennen kann, bezeichnet man die COX-1 vereinfacht als „*housekeeping*“-Enzym, da sie konstitutiv exprimiert wird und an physiologischen Funktionen, wie Hämostase und Cytoprotektion des Magens beteiligt ist. Die COX-2 gilt in erster Linie als induzierbares Enzym. Die Promotorregion des COX-2-Gens enthält dazu eine Reihe von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, wie den nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und CREB (*cAMP response element-binding protein*). Die Expression steigt in Reaktion auf proinflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF), Mitogene und Endotoxine (LPS) innerhalb weniger Stunden an („*immediate early gene*“) [81]. Die COX-2 galt daher als Isoenzym, welches für die Synthese von Prostaglandinen während pathophysiologischer Prozesse, wie Entzündung, Schmerz, Fieber und Krebsentstehung, verantwortlich ist [18, 22, 82]. Es existieren aber auch eindeutige Daten, dass die COX-2 in verschiedenen Geweben, wie Niere, ZNS und Uterus, konstitutiv exprimiert wird und ebenfalls physiologische Funktionen ausübt [83-85]. Darüber hinaus sind auch von der COX-1 gebildete Prostaglandine an Entzündungsprozessen beteiligt [86].

Die Cyclooxygenasen-1 und -2 sind integrale Membranproteine im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran. Als Homodimer besitzen sie eine kurze N-terminale epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-ähnliche Domäne, die eine Rolle bei der Einlagerung in den Lipid-Bilayer spielt, eine Membran-Bindedomäne sowie eine große C-terminale katalytische Domäne. Diese enthält eine Häm-Bindestelle und die katalytischen Zentren der Cyclooxygenase (COX)- sowie Peroxidase (POX)-Reaktion an sich gegenüberliegender Stelle [82, 87]. Bisher wurde vermutet, dass jede Untereinheit des Homodimers simultan arbeitet. Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass bei Substrat- oder Inhibitorenbindung in der Cyclooxygenase-aktiven Seite der einen Untereinheit das Binden eines weiteren Moleküls an die andere Untereinheit verhindert [88]. Beide Isoformen enthalten einen hydrophoben Kanal, der in der Membran-Bindedomäne beginnt und bis tief in die katalytische Domäne hineinreicht. Dieser ermöglicht den Eintritt des Substrates bzw. Inhibitors in das COX-aktive



Zentrum [89]. Im COX-aktiven Zentrum selbst führt ein Austausch der Aminosäure Isoleucin<sup>523</sup> (COX-1) gegen Valin<sup>523</sup> (COX-2) zur entscheidenden Öffnung einer Seitentasche. Dies nutzte man bei der Entwicklung von selektiven COX-2-Inhibitoren, den Coxiben, aus. Die hydrophobe Seitentasche ermöglicht das Anlagern von Sulfonamidgruppen bzw. -analoge und erhöht somit die Substratspezifität der COX-2 (Abb. 1-3, siehe auch Kapitel 1.3) [82, 90].



**Abb. 1-3: Lösemittelzugängliche Oberfläche des COX-aktiven Zentrums von COX-1 und -2 (hellblau):** Katalytische Domäne (rot), Membran-Bindedomäne (grün), Aminosäurereste im aktiven Zentrum (weiß); Austausch von Ile<sup>523</sup> gegen Val<sup>523</sup> ermöglicht die Öffnung der Seitentasche (weiße Pfeile) und damit ein Anlagern von Sulfonamidgruppen und -analoge selektiver COX-2-Inhibitoren (Coxibe, siehe Kapitel 1.2.3) [82].

Es existiert eine beachtliche Anzahl an Publikationen, die belegen, dass die Cyclooxygenase-2 eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung einnimmt. Eine gesteigerte COX-2-Expression konnte für eine Vielzahl von Tumorarten gezeigt werden [91-93]. Epidemiologische Studien bestätigen, dass die Einnahme von NSAIDs als Hemmstoffe der Cyclooxygenasen das Risiko reduziert, am kolorektalen Karzinom zu erkranken [94-96]. Eine erhöhte COX-2-Expression in kolorektalen Karzinomzellen führt zu einer gesteigerten PGE<sub>2</sub>-Produktion und fördert so Wachstum und Motilität der Zellen [97]. PGE<sub>2</sub> reguliert ebenfalls COX-2-abhängig und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelt Invasivität und Metastasierung im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom [98]. Neben dem Einfluss von cPLA<sub>2α</sub> auf die Polypenanzahl in APC-knockout-Mäusen konnte in diesen Mäusen sowohl durch den Knockout des COX-2-Genes [99] als auch des EP<sub>2</sub>-Rezeptors [100] eine deutliche Verringerung der Anzahl und der Größe der Polypen erzielt werden. Die gleichen Ergebnisse erreichte man durch die Gabe von Rofecoxib, einem selektiven COX-2-Inhibitor [101]. Eine Beteiligung der COX-2 an der Tumorentstehung kann überwiegend durch vier Mechanismen beschrieben werden: 1) Förderung der Zellproliferation [102], 2) Hemmung der Apoptose [103, 104], 3) Veränderung der Zelladhäsion und Förderung der Metastasierung [105, 106] sowie 4) gesteigerte Angiogenese durch Induktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) [107] (siehe auch Kapitel 1.3.2). Auch für die COX-1 konnte eine Beteiligung an kolorektaler Tumorentwicklung sowohl im APC-Mausmodell als auch in FAP-Patienten gezeigt werden, so dass eine koordinierte Regulation von COX-1 und COX-2 in Tumorgewebe postuliert wird [108, 109].

### 1.2.3 Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthasen

1999 berichtete Jakobsson das erste Mal, dass die rekombinante humane „*microsomal glutathione-S-transferase-1-like 1*“ (MGST1-L1) die Fähigkeit hat, PGH<sub>2</sub> in PGE<sub>2</sub> umzuwandeln. Die MGST1-L1, heute als mikrosomale Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthase-1 (mPGES-1) bezeichnet, ist in die MAPEG - Superfamilie einzuordnen [110]. MAPEG steht für Membran-assoziierte Proteine, die am Eicosanoid- und Glutathionmetabolismus beteiligt sind. Hierzu zählen ebenfalls die MGST-1 bis-3, die Leukotrien C<sub>4</sub>-Synthase (LTCS) sowie das 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein (FLAP). Fast zur gleichen Zeit wurde eine cytosolische Form der PGE<sub>2</sub>-Synthase gefunden, die in Gegenwart von Glutathion die Umsetzung zu PGE<sub>2</sub> katalysiert und als cPGES bezeichnet wird [111]. Daneben wurde eine weitere Glutathion-unabhängige Membran-assoziierte Synthase im Rinderherz nachgewiesen, die mPGES-2 [112, 113].

#### 1.2.3.1 mPGES-1

Die Primärstruktur des humanen mPGES-1-Proteins zeigt eine ca. 80 %ige Sequenzhomologie zu anderen Spezies und bis zu 40 % zu anderen Proteinen der MAPEG-Familie [110, 114]. Sie besitzt ein Molekulargewicht von ca. 15 kDa und benötigt Glutathion (GSH) für enzymatische Aktivität. Daneben ist die Aminosäure Arginin<sup>110</sup> ebenfalls essentiell für eine katalytische Umsetzung [114]. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen eine Expression der mPGES-1 im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran, zum Teil kolokalisiert mit der COX-2 [114]. Die mPGES-1 ist in den meisten Geweben unter basalen Bedingungen nur schwach oder gar nicht exprimiert. Ausnahmen bildeten Reproduktionsorgane wie Hoden und Gebärmutter sowie Prostata, Milchdrüsen und Harnblase [110]. Eine hohe Expression konnte dagegen in den humanen Krebszellen HeLa und A-549 gezeigt werden [110]. Neben der Stimulation der COX-2-Expression kann auch die mPGES-1-Proteinsynthese durch proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder LPS, in verschiedenen Zellen und Geweben im Menschen [110, 114, 115], in der Ratte [114, 116] und in der Maus [117] ansteigen. Meist ist die Induktion der mPGES-1 ebenfalls von einer gesteigerten COX-2-Expression begleitet und führt so zu einem deutlichen Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Produktion. Darüber hinaus kann durch das antiinflammatorische Glucocorticoid Dexamethason die Enzymexpression und die damit verbundene PGE<sub>2</sub>-Menge unterdrückt bzw. auf die Ausgangswerte zurückgebracht werden [116, 118, 119].

Die Promotorregion des humanen mPGES-1 Gens enthält unter anderem neben Bindestellen für AP-1 und CREB zwei für die induzierbare Promotoraktivität kritische GC-Boxen. Nach Stimulus-Aktivierung wird der Transkriptionsfaktor Egr-1 (*early growth response gene-1*) über den MAP-Kinase-Mechanismus neu synthetisiert und phosphoryliert. Durch anschließende Bindung an die proximale GC-Box löst er die mPGES-1-Transkription aus [120, 121]. PPAR $\gamma$ -Liganden unterdrücken diesen Egr-1 vermittelten Effekt auf die mPGES-1 Expression [122]. Transfektionsstudien sowie

knockdown-Experimente mit mPGES-1, COX-1 und COX-2 konnten zeigen, dass die PGE<sub>2</sub>-Bildung durch mPGES-1 überwiegend über den COX-2-vermittelten Reaktionsweg erfolgt und hauptsächlich eine verzögerte (einige Stunden) durch proinflammatorische Zytokine ausgelöste PGE<sub>2</sub>-Freisetzung hervorruft (Abb. 1-4) [114, 123]. COX-2 und mPGES-1 befinden sich beide in perinuklearen Membranen, so dass ein effizienter Transfer des instabilen PGH<sub>2</sub> stattfinden kann [114, 124]. Bei einer sehr hohen Arachidonsäure-Konzentration ist ebenfalls eine COX-1/mPGES-1-vermittelte PGE<sub>2</sub>-Produktion möglich (Abb. 1-4) [114].

2000 zeigte Murakami, dass die mPGES-1 eine Rolle in der Tumorentstehung einnimmt. Die Kotransfektion der mPGES-1 und COX-2 in menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-239) führte zu Zellveränderungen verbunden mit aggressivem Wachstum und untypischer Morphologie [114]. Westernblot-Analysen von Gewebeproben des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms wiesen eine Überexpression der mPGES-1 in ca. 80 % aller Tumore, verglichen mit angrenzendem normalem Gewebe, auf. Proben des kolorektalen Karzinoms besaßen eine ca. 83 %ige Überexpression. Die COX-2 zeigte ebenfalls eine Hochregulation, jedoch mit ausgeprägten Unterschieden in der Intensität, was darauf schließen lässt, dass die Regulation der Enzyme über verschiedene Mechanismen erfolgt [42, 125, 126]. Auch für andere Tumorarten konnte eine Überexpression der mPGES-1 gezeigt werden [127-130].

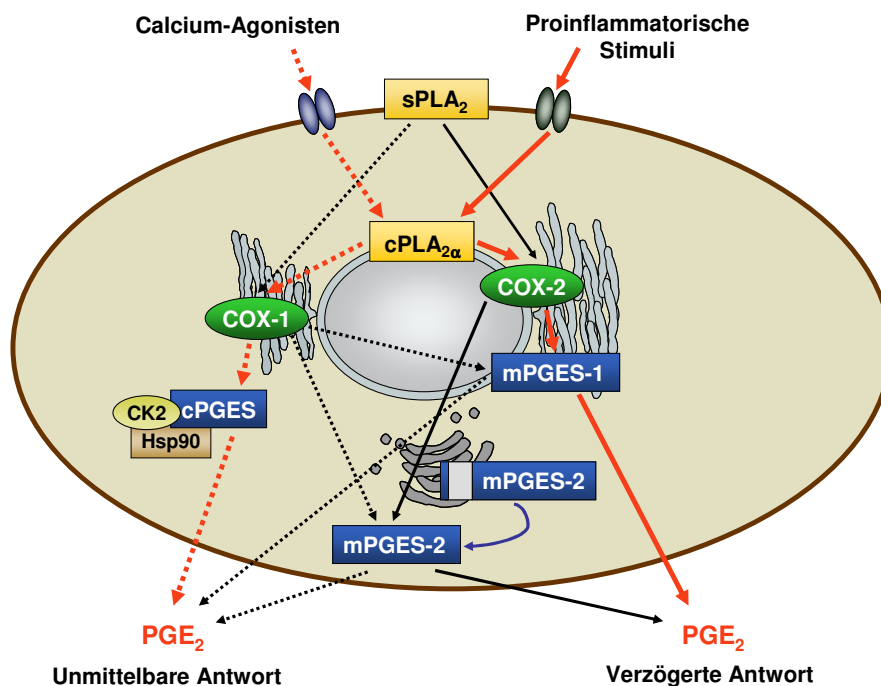
### 1.2.3.2 cPGES

Die cytosolische PGE<sub>2</sub>-Synthase wurde ursprünglich als Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) assoziiertes Protein p23 identifiziert [111]. Auch das 23 kDa große Protein benötigt GSH als Kofaktor. Die cPGES ist konstitutiv im Cytosol in einer Vielzahl von Geweben und Zellen exprimiert und zeigt keine Beeinflussung durch proinflammatorische Zytokine. Eine Ausnahme stellt die cPGES im Rattenhirn dar. Hier steigt die cPGES-Proteinexpression nach LPS-Behandlung stark an [111]. In Kotransfektions- und Antisense-Experimenten wurde deutlich, dass die cPGES nur COX-1 gebildetes PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> umsetzen kann. Dies geschieht meist in einer unmittelbaren Antwort auf Calcium-Agonisten innerhalb von wenigen Minuten, so dass das hier gebildete PGE<sub>2</sub> physiologisch überwiegend zur Aufrechterhaltung der Homöostase beiträgt [48]. Die Lokalisation der cPGES im Cytosol erleichtert vermutlich eher eine Kopplung mit der COX-1 im Endoplasmatischen Retikulum als mit der COX-2 in der perinuklearen Membran (Abb. 1-4). Die optimale Aktivität wird durch eine Komplexbildung mit Hsp90 und Casein-Kinase-2 (CK2) erreicht. In aktivierten Zellen führt eine Phosphorylierung der cPGES durch CK2 zu einer gesteigerten Enzymaktivität, verbunden mit erhöhter PGE<sub>2</sub>-Produktion. Dies wird durch die Bindung an Hsp90 erreicht [131, 132].

Eine Rolle der cPGES in der Tumorentstehung ist bisher nicht bekannt.

### 1.2.3.3 mPGES-2

mPGES-2 als zweite membrangebundene PGE<sub>2</sub>-Synthase benötigt kein Glutathion zur katalytischen Aktivität. Diese steigt aber in Gegenwart von SH-reduzierenden Substanzen wie β-Mercaptoethanol an. Die mPGES-2 ist zunächst ein 41 kDa großes Protein, das mit dem Golgi-Apparat assoziiert ist. Während der Proteinreifung erfährt die mPGES-2 eine proteolytische Abspaltung der N-terminalen hydrophoben Domäne und wird zum cytosolischen Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa [133]. Sie wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert mit hohen Konzentrationen in Hirn, Herz, Muskel, Niere und Leber [113]. Die Enzymmenge bleibt während Entzündungsprozessen und Gewebeschäden unverändert. Transfektionsexperimente in verschiedenen Zelllinien konnten zeigen, dass die mPGES-2 sowohl COX-1- als auch COX-2-gekoppelt PGE<sub>2</sub> produzieren kann (Abb. 1-4)[133]. Überraschenderweise wurde eine beachtliche mPGES-2-Expression im kolorektalen Karzinom gefunden [133]. Da hier ebenfalls die mPGES-1 hochreguliert ist, konnte aber noch kein Zusammenhang zwischen der mPGES-2 und Tumorentstehung nachgewiesen werden.



**Abb. 1-4: Funktionelle Kopplung der PLA<sub>2</sub>, COX und PGE<sub>2</sub>-Synthasen:** Unmittelbare Antwort hervorgerufen durch Calcium-Agonisten (gestrichelte Pfeile): Arachidonsäure (AA) wird schnell durch cPLA<sub>2α</sub> freigesetzt und zu PGE<sub>2</sub> über die konstitutiv exprimierten Enzyme COX-1 und cPGES metabolisiert. Verzögerte Antwort stimuliert durch proinflammatorische Zytokine (ganze Pfeile): Langsam und kontinuierlich durch cPLA<sub>2α</sub> freigesetzte AA wird zu PGE<sub>2</sub> über die induzierbaren Enzyme COX-2 und mPGES-1 metabolisiert. AA-Freisetzung in extrem großen Mengen ermöglicht eine Kopplung zwischen COX-1 und mPGES-1. mPGES-2 zeigt keine bevorzugte Kopplung. Daneben sind auch sPLA<sub>2</sub>s in der Lage, AA freizusetzen (siehe Kapitel 1.2.1.2) [48].

### 1.3 Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs)

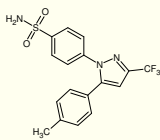
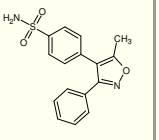
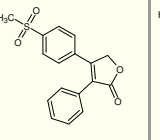
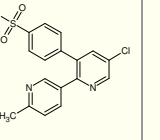
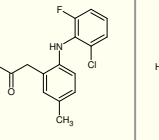
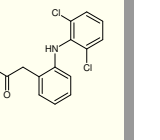
Die Verwendung von pflanzlichen Materialien wie der Rindenextrakt des Weidenbaumes zur Behandlung von Schmerzen und Fieber geht bis auf das antike Ägypten zurück. Die aktive Komponente der Weidenrinde wurde im 18. Jahrhundert als Salicin beschrieben. 1897 gelang Felix Hoffman die Herstellung des stabilen Derivates Acetylsalicylsäure (ASS), welches seit 1899 von der Bayer AG unter dem Handelsnamen „Aspirin“ vermarktet wird [82]. Als antipyretisch, analgetisch und antiphlogistisch wirkende Substanz zählt ASS noch heute zu einem der meist verkauften Analgetika.

Obwohl in den darauf folgenden Jahren einige Substanzen mit gleichem Wirkprinzip hinzukamen, konnte der Wirkungsmechanismus erst 1971 von Sir John Vane aufgeklärt werden, indem er zeigte, dass ASS, Indomethacin und Natriumsalicylat dosisabhängig die Prostaglandinsynthese *in vitro* hemmen [12]. Diese Substanzen wurden als „Aspirin-ähnliche“ Stoffe bzw. später als Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) bezeichnet, welche heute als Hemmstoffe der Cyclooxygenase (COX) anerkannt sind. 1991 wurde die Existenz einer weiteren Isoform der COX beschrieben [78, 79]. Studien in den 90iger Jahren belegen, dass klassische NSAIDs beide Isoformen der COX hemmen [134, 135]. Die antipyretische, antiphlogistische und analgetische Wirkung der NSAIDs wird durch die Hemmung der COX-2 ausgelöst [134, 136]. COX-1 bedingte Hemmung der Prostaglandinsynthese führt meist zu Nebenwirkungen in der Schmerztherapie mit NSAIDs wie Ibuprofen und Diclofenac. Hierzu zählen z.B. gastrointestinale Blutungen, Ulzerationen, Bronchokonstriktion und Nierenfunktionsstörungen. ASS ist die einzige therapeutisch eingesetzte Substanz, die beide Cyclooxygenasen irreversibel durch Acetylierung des Serin-Restes in Position 530 des COX-aktiven Zentrums hemmt. Dabei konnte eine 10 - 100fach stärkere Wirkung von ASS auf die COX-1 verglichen mit der COX-2 nachgewiesen werden [82, 137]. Eine damit verbundene Hemmung der Thrombozytenaggregation durch niedrig dosierte ASS wird zur Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen, wie Thrombose und Herzinfarkt, ausgenutzt. Aufgrund des fehlenden Zellkernes sind Thrombozyten nicht in der Lage, COX-1 neu zu synthetisieren. Die resultierende Hemmung der Thromboxansynthese hält somit über die Lebenszeit des Thrombozyten (8 – 10 Tage) an [82].

#### 1.3.1 Selektive Cyclooxygenase-Inhibitoren

Durch die Entwicklung selektiver COX-2-Inhibitoren sollten die gastrointestinalen Nebenwirkungen, wie schwerwiegende Blutungen bis hin zu Ulzerationen, reduziert werden. Als erste Vertreter der so genannten Coxibe kamen Rofecoxib (1999, Vioxx™) und Celecoxib (2000, Celebrex™) auf den Markt, für die eine reduzierte gastrointestinale Toxizität gezeigt werden konnte [138, 139]. Es folgten Valdecoxib, Etoricoxib und der bisher selektivste COX-2 Inhibitor Lumiracoxib [140-142]. Lumiracoxib besitzt als einziges Essigsäurederivat strukturelle Ähnlichkeiten mit dem klassischen NSAID Diclofenac und weist, verglichen mit den anderen Coxiben, ebenfalls Unterschiede in den

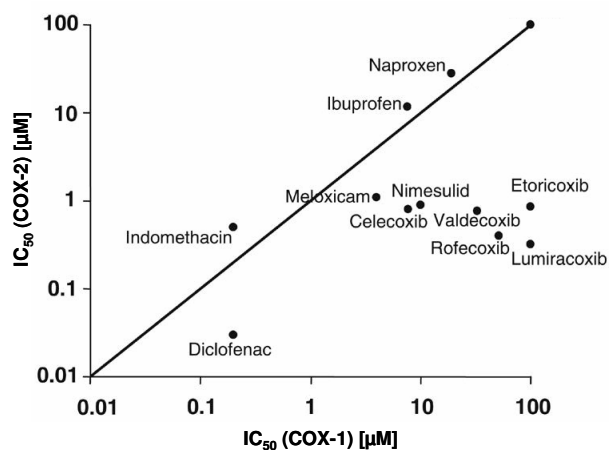
pharmakokinetischen Eigenschaften auf. Aufgrund einer lebertoxischen Wirkung wurde Lumiracoxib bereits nach einem Jahr wieder vom Markt genommen. Tab. 1-3 gibt einen Überblick über die pharmakokinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der Coxibe.

Name	Celecoxib	Valdecoxib <sup>3</sup>	Rofecoxib <sup>3</sup>	Etoricoxib	Lumiracoxib <sup>3</sup>	Diclofenac
<b>Handelsname</b>	Celebrex <sup>®</sup> Onsenal <sup>®</sup>	Bextra <sup>®</sup>	Vioxx <sup>®</sup>	Arcoxia <sup>®</sup>	Prexige <sup>®</sup>	Voltaren <sup>®</sup> u. a.
<b>Strukturformel</b>						
<b>Indikationen</b>	Osteoarthritis, Rheumatoide Arthritis, Akutschmerz, FAP-Leiden	Osteoarthritis, Rheumatoide Arthritis, Akutschmerz	Osteoarthritis, Rheumatoide Arthritis, Akutschmerz	Osteoarthritis, Rheumatoide Arthritis, Gichtarthritis, Akutschmerz	Osteoarthritis, Rheumatoide Arthritis, Akutschmerz	Arthritis, Arthrose, akuter und chronischer Schmerz
<b>Pharmakokinetisches Profil (Auszug)<sup>1</sup></b>						
<b>Orale Bioverfügbarkeit</b>	ca. 70 %	83 %	92 - 93 %	ca. 100 %	74 %	30 - 80 %
<b>Eliminationshalbwertszeit (t<sub>1/2</sub>)</b>	8 - 12 h	8 - 11 h	17 h	20 - 26 h	2 - 6 h	1 - 2 h
<b>Verteilungsvolumen</b>	339 - 571 l	55 l	86 - 91 l	120 l	9 l	0,17 l
<b>Plasmaproteinbindung</b>	97 %	98 %	85 %	92 %	> 98 %	99,5 %
<b>Pharmakologische Beeinflussung der COX-Isoenzyme<sup>2</sup></b>						
<b>IC<sub>50</sub>(COX-1)</b>	6,7 μM	26,1 μM	18,8 μM	116 μM	67 μM	0,15 μM
<b>IC<sub>50</sub>(COX-2)</b>	0,87 μM	0,87 μM	0,53 μM	1,1 μM	0,13 μM	0,05 μM
<b>COX-2-Selektivität</b>	7,6	30	35	106	515	3,0

**Tab. 1-3:** Auszüge aus dem pharmakokinetischen und dem pharmakologischen Wirkprofilen der Coxibe und von Diclofenac. Die COX-2-Selektivität errechnet sich als Ratio der IC<sub>50</sub> (COX-2) / IC<sub>50</sub> (COX-1).<sup>1</sup> Pharmakokinetische Daten nach [143, 144]; <sup>2</sup> Pharmakologische Daten nach [141, 145]; <sup>3</sup> Rofecoxib wurde im September 2004 wegen erhöhtem kardiovaskulären Risiko vom Markt genommen, gefolgt von Valdecoxib im April 2005 ebenfalls wegen kardiovaskulärer Nebenwirkungen sowie Hautreaktionen. Lumiracoxib wurde im März 2008 wegen Lebertoxizität vom Markt genommen.

Jedoch zeichnete sich durch die Einnahme von selektiven COX-2-Hemmern bei Langzeitstudien ein Anstieg von kardiovaskulären Nebenwirkungen, wie Myokardinfarkt und Schlaganfall, ab [146, 147]. Die APPROVe-Studie, in der Rofecoxib als chemopräventive Substanz in FAP-Patienten getestet wurde, führte 2004 aufgrund erhöhter kardiovaskulärer Ereignisse verglichen mit Placebo zur Marktrücknahme von Vioxx<sup>™</sup> [148]. Gleiches galt für Valdecoxib. Es folgten zahlreiche Studien und Analysen zur Klärung dieser Nebenwirkungen und des eventuellen Klasseneffekts der Coxibe. Dabei

ist zu beachten, dass die COX-Isoenzymselektivität der Inhibitoren von der Konzentration abhängig ist. Abb. 1-5 zeigt, dass die COX-2-Selektivität eine kontinuierliche Größe darstellt, so dass es keine eindeutige Trennung zwischen selektiven und nicht selektiven COX-2-Hemmern gibt und es zu einer Überlappung zwischen einigen Coxiben (Celecoxib) und einigen klassischen NSAIDs (Diclofenac, Nimesulid) kommt. Für diese Substanzen kann somit eine Erhöhung der Tagesdosen zu gastrointestinalen Komplikationen führen, die auf die COX-1-Hemmung zurückzuführen sind [149].



**Abb. 1-5:** COX-2-Selektivität als eine kontinuierliche Größe. IC<sub>50</sub>-Konzentrationen verschiedener klassischer NSAIDs und COX-2-Inhibitoren für die Hemmung der COX-1-Aktivität in Thrombozyten und der COX-2-Aktivität in Monozyten (humaner Vollblutassay). Unterhalb der Linie befinden sich Inhibitoren mit COX-2-Selektivität, die mit zunehmendem Abstand von der Linie ansteigt. Modifiziert nach [149].

Metaanalysen randomisierter Studien sollten das kardiovaskuläre Risiko der Coxibe und der klassischen NSAIDs aufzeigen [150, 151]. Die Analysen ergaben für Coxibe verglichen mit Placebo einen moderaten Anstieg kardiovaskulärer Ereignisse, die überwiegend Myokardinfarkten zugeschrieben werden können. Die Behandlung von Patienten mit klassischen NSAIDs wie Ibuprofen oder Diclofenac in hohen Dosen führte, verglichen mit Placebo, zu einem ähnlichen Anstieg kardiovaskulärer Ereignisse. Überraschenderweise blieben diese Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Naproxen in hohen Dosen (2 x 500 mg) aus. Dieser Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Naproxen neben ASS das einzige klassische NSAID ist, welches *in vivo* in hohen Dosen die COX-1-Aktivität und damit die TXA<sub>2</sub>-Synthese in Thrombozyten mehr als 90 % hemmt [152].

Andererseits lieferte ein systematischer Review randomisierter Studien zu gastrointestinalen Nebenwirkungen den Nachweis, dass selektive COX-2-Hemmer gegenüber klassischen NSAIDs eindeutig weniger gastrointestinale Nebenwirkungen besitzen und besser toleriert werden [153].

Nach wie vor sind Analgetika aus der Therapie von verschiedenen Erkrankungen, wie akuter und chronischer Schmerz, rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis aber auch Tumorschmerz, nicht wegzudenken. Daneben kommen erweiterte Indikationsmöglichkeiten wie der Einsatz in der Tumorthherapie hinzu (siehe 1.3.2 und 1.3.3). Aus den heutigen Erkenntnissen zu Nebenwirkungen klassischer NSAIDs und selektiver COX-2-Inhibitoren leitet sich ein neues, individuelles Therapieregime in Abhängigkeit von den Vorerkrankungen und der Behandlungsdauer ab. Deshalb sollte eine strenge Nutzen-Risiko-Abwägung vor dem Einsatz von NSAIDs erfolgen [153-156].

### 1.3.2 Die antikarzinogene Wirkung von NSAIDs

Verschiedene klinische Befunde, epidemiologische und experimentelle Studien konnten zeigen, dass ASS sowie andere NSAIDs viel versprechende Krebstherapeutika darstellen könnten. Die Langzeiteinnahme zeigte ein reduziertes Risiko, an Darm-, Magen-, Brust-, Prostata-, Lungen- und Hautkrebs zu erkranken, wobei die meisten Daten zum kolorektalen Karzinom vorliegen [157-160]. Bereits 1983 lieferten Waddell und Loughry einen der ersten Hinweise, dass NSAIDs bei der Behandlung des Darmkrebses erfolgreich sein könnten. Sie beobachteten die Rückbildung von rektalen Polypen durch die Einnahme von Indomethacin und Sulindac [161]. Es folgten eine Reihe retrospektiver und prospektiver Studien, die verdeutlichten, dass die chronische Einnahme von NSAIDs über 10-15 Jahre das relative Risiko der Darmkrebserkrankung um 40-50 % senken kann [160]. Am meisten überzeugten jedoch Studien an Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass die Einnahme von Sulindac die Größe und Anzahl der Polypen reduziert. Eine Einnahme von Celecoxib (2 x 400 mg täglich) über 6 Monate führte ebenfalls zu einer Abnahme in Größe und Anzahl der Polypen von 31 % gegenüber Placebo [162-165]. Celecoxib wurde als einziges NSAID von der FDA zur Behandlung von FAP-Patienten zugelassen.

Als ein möglicher Wirkungsmechanismus der NSAIDs wird die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Hemmung der Cyclooxygenasen postuliert. Mehrfach nachgewiesen ist die erhöhte Expression der COX-2 in verschiedenen Tumorarten. 1994 zeigte Eberhart, dass die COX-2 in 85 % der kolorektalen Karzinome und schon in ca. 50 % der frühen kolorektalen Adenome überexprimiert wird. Die COX-1-Expression scheint unverändert [166]. Damit verbunden gelang auch der Nachweis einer vermehrten Prostaglandinsynthese, besonders des PGE<sub>2</sub>, die sowohl im frühen Adenom als auch im Karzinom stattfindet [167-169].

Auf der Suche nach dem Zusammenhang zwischen COX-2-Überexpression, Prostaglandinsynthese und Tumorentstehung konnte zunächst gezeigt werden, dass die externe Zugabe von PGE<sub>2</sub> zu Magenepithelzellen ein erhöhtes Zellwachstum hervorrief [170]. Pai et al. wies sowohl in diesen Zellen als auch in Kolonkarzinomzellen eine verstärkte Expression von EGF- (*epidermal growth factor*) Rezeptoren nach Zugabe von PGE<sub>2</sub> nach, was ein verstärktes Ansprechen der Tumorzellen auf die proliferationsfördernde Wirkung von Wachstumsfaktoren zur Folge hatte [171]. Die Überexpression von COX-2 in Darmepithelzellen der Ratte zeigte eine verstärkte Adhäsion an extrazellulären Matrixproteinen, eine Resistenz gegenüber Apoptose-auslösender Stoffe, eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 sowie eine verminderte Expression des TGF-β<sub>2</sub>-Rezeptors (*transforming growth factor β<sub>2</sub>*), welcher in der Einleitung der Apoptose eine wichtige Rolle spielt [172]. Verstärkte Bcl-2-Konzentrationen verbunden mit einer verringerten Apoptose durch PGE<sub>2</sub> lagen auch in kolorektalen Krebszellen vor [103]. Eine Überexpression von COX-2 in Caco-2-Krebszellen führten zu einer gesteigerten Zellmigration und Invasivität verbunden mit erhöhter



Expression verschiedener Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die am Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind aber auch mit der Metastasierung von Tumoren in Verbindung gebracht werden [106]. Tsujii entdeckte für die gleiche Zelllinie kokultiviert mit Endothelzellen, dass durch die COX-2-Überexpression eine gesteigerte Angiogenese durch vermehrte Bildung von Angiogenesefaktoren, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) und Endothelin-1 auftritt [173]. Eine erhöhte PGE<sub>2</sub>-Produktion in Endothelzellen führte ebenfalls zu einer gesteigerten Ausschüttung von VEGF [174].

Zusammenfassend führen eine COX-2-Überexpression und eine damit verbundene gesteigerte Prostaglandinsynthese (besonders PGE<sub>2</sub>) im Verlauf der Tumorentstehung 1) zur Hemmung der Apoptose, 2) zu gesteigerter Angiogenese, 3) zu vermehrter Zellproliferation und 4) zur Metastasierung. Die antiproliferative Wirkung von NSAIDs kann somit zum Teil durch die Hemmung der Cyclooxygenasen und damit verbundener Hemmung der Prostaglandinsynthese erklärt werden (Abb. 1-6).

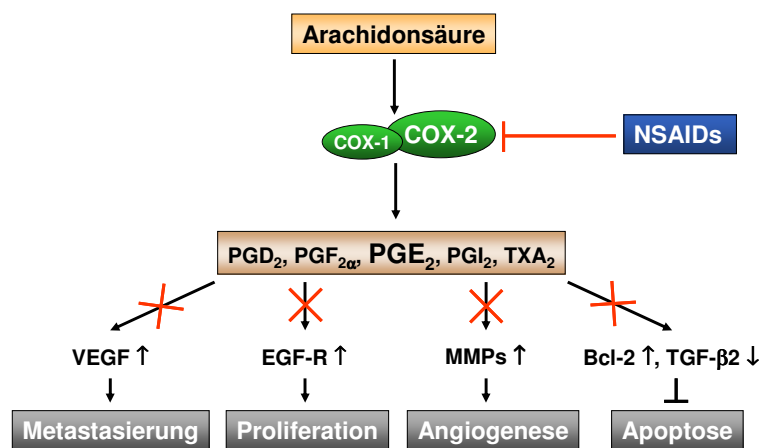


Abb. 1-6: Antikarzinogene Effekte von Nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) durch Hemmung der Cyclooxygenasen (COX) [175]

### 1.3.3 COX-unabhängige Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung von NSAIDs

Die antikarzinogenen Effekte von NSAIDs werden nicht ausschließlich durch die Hemmung der Cyclooxygenase hervorgerufen. Kolonkarzinomzellen, die keine Expression der COX-Isoenzyme aufweisen und somit auch keine Prostaglandine nach exogener Stimulation produzieren, zeigten eine verminderte Zellproliferation und eine gesteigerte Apoptose nach Behandlung mit Sulindac [176]. Gleiches konnte für embryonale Fibroblasten von Mäusen, die keine COX-1- bzw. COX-2-Genexpression aufweisen, nach Behandlung mit Indomethacin, NS-398 (COX-2 Inhibitor) oder Sulindac gezeigt werden [177]. Sulindac Sulfon, ein Derivat ohne Einfluss auf die Prostaglandinsynthese, hemmte Azoxymethan-induzierten Darmkrebs in Ratten [178]. Daneben sind die Konzentrationen der NSAIDs zur Induktion der Apoptose und Hemmung der Proliferation häufig

wesentlich höher als die Konzentrationen, die zur Hemmung der Prostaglandinsynthese notwendig sind. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass auch COX-unabhängige Effekte für die antikarzinogenen Wirkungen der NSAIDs verantwortlich sind.

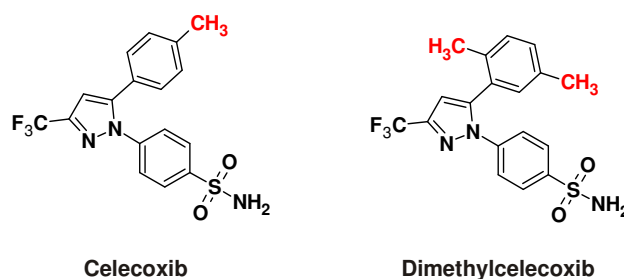
Verschiedene Mechanismen für die COX-unabhängige Induktion der Apoptose durch NSAIDs wurden vorgeschlagen, wie 1) die Hemmung der Aktivität des nukleären Faktors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), 2) die Beeinflussung der Bildung von pro- und antiapoptotischen Proteinen, 3) die Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Reaktionsweges der Apoptose, 4) die Hemmung der Proteasomenfunktion, 5) den Zellzyklusblock sowie 6) die Erzeugung einer Stressantwort und Aktivierung von Stress-Kinasen [179].

Deutliche COX-unabhängige Effekte zeigte auch der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib in humanen Kolonkarzinomzellen in Form einer verringerten Überlebensrate und eines G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Zellzyklusblocks [180, 181]. Vergleichende Untersuchungen zu antiproliferativen Effekten der Coxibe konnten für Celecoxib sowohl in der Zellkultur als auch im Nacktmausmodell die stärksten Wirkungen aufzeigen, die somit unabhängig von der COX-2-Selektivität waren [182-184]. Auch die R-Enantiomere der 2-Arylpropionsäuren, wie R-Ibuprofen und R-Flurbiprofen, die in therapeutischen Dosen keine COX-hemmenden Eigenschaften besitzen, weisen antikarzinogene Effekte auf. Sowohl *in vitro* in Kolonkarzinomzellen als auch *in vivo* im Tumormausmodell induzierte R-Flurbiprofen sowohl einen G<sub>1</sub>-Zellzyklusblock als auch Apoptose. Als Mechanismus für den Zellzyklusarrest wird die Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) und des Transkriptionsfaktors AP-1 beschrieben [185]. Die gesteigerte Apoptose wird teilweise auf die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 zurückgeführt [186].

Für Celecoxib konnten bisher verschiedene molekulare Angriffspunkte nachgewiesen werden, die zu den COX-2-unabhängigen antikarzinogenen Wirkungen beitragen können (u.a. Tab. 1-4). Celecoxib zeigte beispielsweise eine Hemmung der Phosphatidylinositol-Triphosphat-abhängigen Kinase-1 (PKC-1) in HT-29-Kolonkarzinomzellen. Dadurch wurde die durch PKC-1 hervorgerufene Phosphorylierung der Akt-Kinase unterbunden, was zu einer Induktion von Apoptose und Zellzyklusblock führte [187]. Prostatakarzinomzellen zeigten nach Celecoxib-Behandlung einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, hervorgerufen durch eine Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums. Als Folge des Calciumanstieges kam es zu einer Induktion der Apoptose in den Zellen über die Aktivierung von Caspasen und Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien [188]. Eine Behandlung von Caco-2-Kolonkarzinomzellen mit Celecoxib zeigte eine Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$ - (GSK-3 $\beta$ ) vermittelte Freisetzung von Beta-Catenin aus der Zellmembran in das Zytoplasma mit anschließender Degradierung durch Proteasomen und Caspasen. Daneben konnte auch eine deutliche Abnahme der Beta-Catenin DNA-Bindeaktivität gezeigt werden [189]. Bindet Beta-Catenin an Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie (*T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor*), so wird die Transkription spezifischer Zielgene (COX-2, MMPs, Cyclin D1) aktiviert, die eine fördernde Wirkung auf das Tumorstadium zeigen [190, 191].

### 1.3.4 Das Strukturanalogon von Celecoxib: Dimethylcelecoxib (DMC)

Durch Austausch der Methylgruppe in Position 4 am Phenylring mit 2 Methylgruppen in Position 2 und 5 entstand aus Celecoxib das Strukturanalogon Dimethylcelecoxib (DMC) (Abb. 1-7). Der IUPAC-Name der Substanz ist 4-[5-(2,5-Dimethylphenyl)-3-(trifluormethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzensulfonamid. Die Sulfonamidstruktur im Celecoxib ist essentiell für dessen COX-2-Selektivität, da sie sich in die erweiterte Seitentasche der COX-2 einlagert (Abb. 1-3). Es wird vermutet, dass die minimalen Veränderungen im Phenylring des DMC dazu führen, dass das Molekül zu sperrig ist, um in den Substratbindekanal der COX-2 eingelagert zu werden [192].



**Abb. 1-7: Strukturformeln für Celecoxib und Dimethylcelecoxib (DMC):** Durch Austausch der Methylgruppe in Position 4 am Phenylring des Celecoxib und Einführung von 2 Methylgruppen in Position 2 und 5 entsteht Dimethylcelecoxib (DMC). Diese Strukturmodifizierung vergrößert die Seitenkette in dem Maße, dass DMC nicht mehr in den Substratbindekanal der Cyclooxygenase-2 passt.

Auf der Grundlage der antikarzinogenen Eigenschaften von COX-2-Inhibitoren und hier speziell von Celecoxib war man auf der Suche nach neuen Apoptose-induzierenden Substanzen. Die Synthese von DMC wurde das erste Mal 2002 von Song et al. beschrieben. Er untersuchte Celecoxib und dessen Derivate auf ihre antikarzinogenen Eigenschaften und versuchte, diese von der COX-hemmenden Komponente zu trennen [193]. Er beschrieb Substanz 7 (DMC) als hoch aktiv Apoptose-induzierend und nicht COX-hemmend. Deshalb wird DMC meist als Kontroll-Substanz eingesetzt, um zwischen COX-abhängigen und COX-unabhängigen antikarzinogenen Eigenschaften zu unterscheiden. Der angegebene  $IC_{50}$ -Wert für die COX-2-Hemmung wurde fälschlicherweise aus der Publikation von Penning et al. entnommen, in der DMC jedoch nicht getestet wurde [194]. Erst 2006 erbrachte Schönthal et al. durch einen zellfreien COX-Inhibitor-Screening-Assay den Nachweis, dass DMC bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M nur einen unbedeutenden Effekt auf die COX-2-Aktivität *in vitro* ausübt [192].

Durch experimentelle Daten mit Celecoxib wurde belegt, dass zumindest ein Teil der erhaltenen antikarzinogenen Effekte von Celecoxib unabhängig von der COX-2-Hemmung sind. DMC erwies sich in der Hemmung von Tumorwachstum in verschiedenen Maus-Xenograft-Tumormodellen als genauso potent wie Celecoxib [195-197].

Daneben zeigte auch DMC eine Hemmung der Angiogenese [198]. Für Celecoxib wurden eine Reihe von zellulären Zielstrukturen identifiziert, die für die COX-unabhängigen antikarzinogenen Effekte verantwortlich gemacht werden (Abb. 1-8).

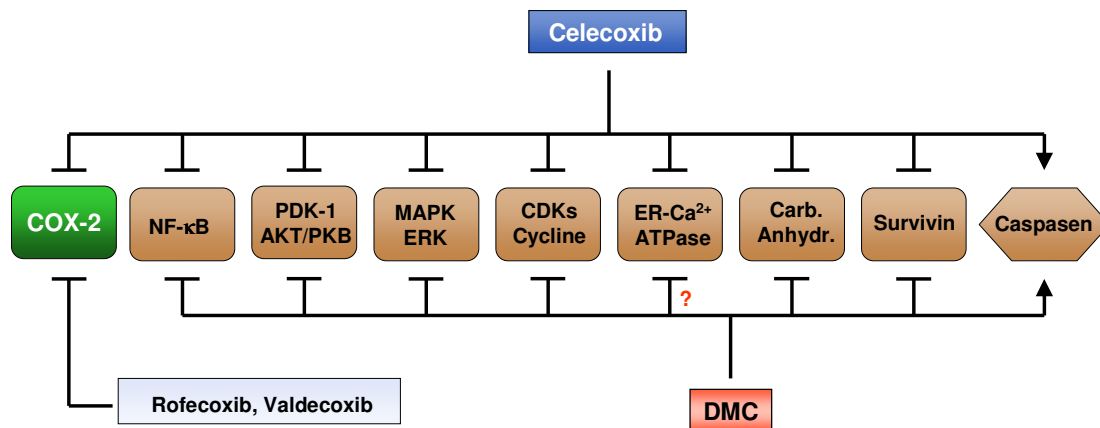


Abb. 1-8: Zelluläre Angriffspunkte von Coxiben und DMC [192].

Die Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums sowie der PDK-1 wurden bereits in Kapitel 1.3.3 beschrieben, wobei die Inhibierung der PDK-1 auch für DMC gezeigt werden konnte [197]. Des Weiteren gelang auch der Nachweis, dass DMC ebenso wie Celecoxib den APC/Beta-Catenin-Signaltransduktionsweg in Kolonkarzinomzellen beeinflusst. Andere Coxibe zeigten diesen Effekt nicht [182, 189]. Ebenfalls von Bedeutung scheint sowohl der Einfluss von Celecoxib als auch von DMC auf die Cycline A und B, welche essentielle Untereinheiten der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) darstellen. Beide Substanzen hemmen in Zellkulturexperimenten die Transkription der Cycline und somit die Aktivität der CDKs, was zum Zellzyklusblock und somit zu einer Hemmung der Proliferation führt [181, 196, 199]. Wie Abb. 1-8 zusammenfasst, konnte für DMC gezeigt werden, dass es *in vitro* die gleichen zellulären Zielproteine beeinflusst wie Celecoxib. Somit scheinen die molekularen Mechanismen für die antiproliferativen Wirkungen vergleichbar zu sein. [195, 200, 201]. Die dafür notwendigen minimalen effektiven Konzentrationen wurden in Tab. 1-4 zusammengefasst. Ein Vergleich der Konzentrationen mit den IC<sub>50</sub>-Werten zur Hemmung der COX-2 macht deutlich, dass diese Wirkungsmechanismen unabhängig von der COX-2-Hemmung sind.

	COX-2 <sup>1</sup>	NF-κB	PDK-1 <sup>2</sup>	MAPK	Cycline	ER Ca <sup>2+</sup> ATPase <sup>2</sup>	Beta-Catenin	Survivin
<b>Celecoxib</b>	0,87 μM	≥ 50 μM	48 μM	> 30 μM	> 30 μM	35 μM	≥ 60 μM	≥ 30 μM
<b>DMC</b>	> 100 μM	≥ 40 μM	38 μM	> 20 μM	> 20 μM	?	≥ 60 μM	≥ 20 μM

Tab. 1-4: Minimale effektive Konzentrationen von DMC und Celecoxib für die Hemmung der zellulären Zielmoleküle *in vitro* (intakte Zellen). Ausnahmen: <sup>1</sup> IC<sub>50</sub> im Vollblutassay, <sup>2</sup> IC<sub>50</sub> *in vitro*-Aktivitätsassay. [145, 182, 188, 195, 197, 202-204]

## 1.4 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

DMC wird aufgrund der Strukturähnlichkeit und der fehlenden COX-Hemmung in zahlreichen Publikationen als Kontrollsubstanz zu Coxiben, speziell zu Celecoxib verwendet, um die COX-abhängigen Effekte von den COX-unabhängigen zu trennen. Dabei konnte gezeigt werden, dass DMC selbst sehr gute antikarzinogene Eigenschaften aufweist, was diese Substanz als Therapeutikum in der Onkologie interessant erscheinen lässt, da die NSAID-spezifischen Nebenwirkungen, wie gastrointestinale und kardiovaskuläre Störungen vermutlich nicht vorhanden sind. Um es jedoch eindeutig als COX-inaktive Kontrollsubstanz oder auch als chemopräventive Substanz einsetzen zu können, muss nachgewiesen werden, dass DMC neben der COX-Inaktivität auch keinen Einfluss auf die Prostanoidsynthese im Allgemeinen hat. Besonders von Interesse ist hier das PGE<sub>2</sub>, da eine vermehrte Produktion in einer Vielzahl von Krebsarten gefunden werden konnte. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit folgende Fragestellung behandelt:

1. Hat DMC einen Einfluss auf die Prostanoidsynthese in Tumorzellen?

Ein weitere ungeklärte Beobachtung ist die Tatsache, dass die antiproliferativen Wirkungen, die für DMC und Celecoxib in intakten Zellen gezeigt wurden, meist erst bei sehr hohen Konzentrationen erfolgten und dass die darin involvierten COX-unabhängigen molekularen Zielmoleküle ebenfalls erst bei sehr hohen Konzentrationen beeinflusst werden. Die Relevanz dieser Ergebnisse wird daher stark diskutiert, da offensichtlich eine Diskrepanz zwischen den niedrigen Plasmakonzentrationen *in vivo* (ca. 8 µM nach 2 x 400 mg/Tag [205]) und den hohen Konzentrationen in Zellkulturexperimenten (ca. 50 µM) vorliegt. Vorversuche zur Analyse der intrazellulären Coxibkonzentrationen in humanen Kolonkarzinomzellen konnten zeigen, dass eine Aufkonzentrierung von DMC und Celecoxib nicht jedoch der anderen Coxibe in den Zellen vorliegt. Diese Beobachtung führte zur zweiten Fragestellung dieser Arbeit:

2. Wie und wo reichern sich DMC und Celecoxib in der Zelle an?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

##### Substanz

[<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-Arachidonsäure  
 [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Prostaglandin D<sub>2</sub>  
 [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Prostaglandin E<sub>2</sub>  
 [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Prostaglandin F<sub>2α</sub>  
 [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub>  
 [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Thromboxan B<sub>2</sub>  
 1,4-Dithiothreitol  
 2-Mercaptoethanol  
 1-Palmitoyl-2-Arachidonyl-sn-Glycero-3-  
 Phosphatidylcholin (PAPC)  
 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-  
 Phosphatidylcholin (POPC)  
 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycerol (POG)  
 Aceton  
 Acetonitril  
 Acrylamid (rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30)  
 Acetylsalicylsäure  
 Agarose NEE0  
 Ameisensäure, 88-91 %  
 Ammoniumchlorid  
 APS  
 Aprotinin  
 Arachidonsäure, ≥ 98 %  
 Biocoll-Trennlösung, Dichte 1,077 gTml  
 Borsäure  
 Bromphenolblau  
 BSA  
 Butylhydroxytoluol (BHT)  
 Calciumchlorid -Dihydrat  
 Calcium Ionophor A23187  
 Chloroform  
 Complete <sup>™</sup> Mini, EDTA-frei

##### Hersteller

Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA  
 Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA  
 Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA  
 Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA  
 Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA  
 Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Merck, Darmstadt  
 Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA  
 Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA  
 Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA  
 Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze  
 J.T. Baker, Deventer, NL  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Merck, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze  
 Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA  
 Biochrom, Berlin  
 Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze  
 Serva Electrophoresis, Heidelberg  
 PAA Laboratories, Linz, Österreich  
 Merck, Darmstadt  
 Merck, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze  
 Merck, Darmstadt  
 Roche Diagnostics, Mannheim

<b><u>Substanz</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Coomassie brilliant blue G-250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
DNA-Größenmarker (1 kb plus)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Idranal® III)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Eisen-(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut, HPLC	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Fluka, Seelze
FCS	Life Technologies, Paisley, Schottland
L-Glutamat	Gibco, Paisley, Schottland
Glutathion, reduziert (GSH)	Merck, Darmstadt
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hexan	Merck, Darmstadt
Interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$	PeproTech, Hamburg
Isopropanol 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Lipopolysaccharid, bakteriell (LPS)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Magermilchpulver (Nutaflor®)	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Mayer's Hematoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Methanol, 100 %, HPLC	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco, Paisley, Schottland
Penicillin G / Streptomycin	Gibco, Paisley, Schottland
Pepstatin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Phenol	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Phosphorsäure 85 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
PhosphoSafe™ Extraktionspuffer	Novagen, Gibbstown, USA
PMA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
PMSF	Perbio Science GmbH, Bonn

<b><u>Substanz</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
Prostaglandin H <sub>2</sub>	Larodan Fine Chemicals, Malmö, Schweden
Saccharose	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Salzsäure, 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
SDS	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris	AppliChem, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley, Schottland
Tumornekrosisfaktor-alpha, TNF $\alpha$	PeproTech, Hamburg
Tween <sup>®</sup> 20	AppliChem, Darmstadt
Wasser, LC/MS	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Zitronensäure, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Zinn-(II)-chlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

## 2.1.2 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

<b><u>Kit</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Avidin/Biotin Blocking-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
COX-Inhibitor Screening Assay Kit	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
DAB Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
First Strand cDNA Synthese Kit für RT-PCR	Roche Diagnostics, Mannheim
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
PGE <sub>2</sub> Correlate EIA <sup>™</sup> -Kit	Assay Designs Inc., Ann Arbor, Massachussets, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Vectastain Elite ABC Kit (Standard)	Vector Laboratories, Burlingame, USA



### 2.1.3 Zelllinien

Name	Gewebeherkunft	Hersteller
<b>A-549</b>	humanes Lungenadenokarzinom, Epithelzellen	Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)
<b>HeLa</b>	humanes Zervixkarzinom, Epithelzellen	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
<b>HCA-7</b>	humanes kolorektales Adenokarzinom, Epithelzellen	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
<b>HCT-116</b>	humanes kolorektales Adenokarzinom, Epithelzellen	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
<b>MonoMac-6</b>	humane akute Monozytenleukämie, Monozyten	American Type Culture Collection (ATCC)
<b>BL-41-E95-A</b>	humanes Burkitt-Lymphom, B-Lymphozyten	Dr. H.-E. Claesson, Karolinska Institut (Stockholm)
<b>HUVEC</b>	Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene	Lonza (Basel)

### 2.1.4 Test- und Referenzsubstanzen

Wirkstoff	Hersteller	Indikation und Verwendungszweck
<b>Dimethylcelecoxib</b>	Berlin-Adlershof	Testsubstanz, Celecoxib-Analogon ohne COX-Hemmung
<b>Celecoxib</b>	Witega, Berlin	COX-2-Inhibitor, Referenz- und Testsubstanz (mPGES-1)
<b>Rofecoxib</b>	Witega, Berlin	COX-2-Inhibitor, Testsubstanz (mPGES-1)
<b>Valdecoxib</b>	Witega, Berlin	COX-2-Inhibitor, Testsubstanz (mPGES-1)
<b>Etoricoxib</b>	Witega, Berlin	COX-2-Inhibitor, Testsubstanz (mPGES-1)
<b>Lumiracoxib</b>	Novartis, Basel	COX-2-Inhibitor, Testsubstanz (mPGES-1)
<b>Diclofenac</b>	Sigma, Seelze	klassisches NSAID, Testsubstanz (mPGES-1)
<b>SC-560</b>	Witega, Berlin	COX-1-Inhibitor (in vitro), Referenzsubstanz
<b>MK-886</b>	Cayman, Ann Arbor	unspezifischer mPGES-1-Inhibitor, Referenzsubstanz
<b>cPLA<sub>2α</sub>-Inhibitor</b>	Calbiochem, La Jolla	cPLA <sub>2α</sub> -Inhibitor, Referenzsubstanz

Alle in der Tabelle angegebenen Substanzen kamen in DMSO gelöst zum Einsatz. Der Nachweis der Identität aller Coxibe erfolgte durch NMR-Analyse und die Ermittlung der Reinheit mittels HPLC. Diese betrug > 99 % [206].

## 2.1.5 Nährmedien, Puffer und Lösungen

### Nährmedien für eukaryotische Zellen:

Zellen	Medium
A-549	D-MEM (Dulbecco's modified Eagle medium) + Glucose, Glutamin
HeLa, BL-41	RPMI-1640 + Glucose, Glutamin + Hepes (25 mM)
MonoMac-6	RPMI-1640 + Glucose, Glutamin + Pyruvat (1mM) + Oxalacetat, nichtessentielle Aminosäuren
HCA-7	D-MEM (Dulbecco's modified Eagle medium) + Glucose, Glutamin + Pyruvat (1mM)
HCT-116	McCoy's 5 A + Glucose, Glutamin
HUVEC	EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2) + EGM SingleQuot Kit (Wachstumsfaktoren, Zytokine und essentielle Zusätze)

Mit Ausnahme des Mediums für HUVEC-Zellen wurden alle Zellkulturmedien von Gibco (Paisley, Schottland) bezogen und zusätzlich mit 10 % FCS, 100 I.E./ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin versetzt. Die Kultivierung der HUVEC-Zellen als Endothelzellkultur erforderte die Verwendung eines speziellen Mediums mit entsprechenden Zusätzen (incl. FCS, Endkonzentration 2 %; Lonza, Basel). Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### Agarosegel-Elektrophorese:

DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerol
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris/HCl, pH 8 1 M Borsäure 25 mM EDTA

**Isolation von Proteinen:**

PBS-Puffer	1,7 M NaCl 34 mM KCl 111 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2 H <sub>2</sub> O 18,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <i>ad</i> 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 7,4
Protease-Inhibitor-Mischung 1	1 mM PMSF 3 mM DTT 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 1 µg/ml Aprotinin
Protease-Inhibitor-Mischung 2	1 Tablette Complete™ Mini, EDTA-frei in 10 ml Puffer oder H <sub>2</sub> O
Ultraschallpuffer (Gesamtproteinextrakt)	20 mM Tris-HCl (pH 8,5) 1 mM EDTA 1 mM 2-Mercaptoethanol 5 % Glycin frisch dazu: Protease-Inhibitor-Mischung 1
Cytosolextraktionspuffer	0,25 M Saccharose 30 mM Tris-HCl pH 7,9 1 mM EDTA frisch dazu: Protease-Inhibitor-Mischung 1
Kpi-Puffer 0,1 M, pH 7,4 (mikrosomale Fraktion, mPGES-1-Assay)	19 ml 0,2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 81 ml 0,2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <i>ad</i> 200 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Homogenisierungspuffer (mikrosomale Fraktion)	0,1 M Kpi-Puffer, pH 7,4 0,25 M Saccharose 1 mM GSH frisch dazu: Protease-Inhibitor-Mischung 2
Translokationspuffer	10 mM Hepes, pH 7,9 10 mM KCl 1 mM EDTA frisch dazu: 1 mM DTT Protease-Inhibitor-Mischung 2
Phosphopuffer (für Phosphorylierungen)	PhosphoSafe™ Extraktionspuffer frisch dazu: Protease-Inhibitor-Mischung 1
Ery-Lyse-Puffer	1,15 mM NH <sub>4</sub> Cl 0,1 M KHCO <sub>3</sub> 1 mM EDTA

**Bestimmung von Proteinkonzentrationen:**

Bradford Reagenz	0,01 % Coomassie brilliant blue G-250 0,04 % Ethanol (abs.) 10 % Phosphorsäure (85 %) <i>ad</i> 500 ml H <sub>2</sub> O
------------------	--

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:**

Lämmli-puffer (4x)	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8 10 % SDS 0,004 % Bromphenolblau 40 % Glycerol frisch dazu: 20 % 2-Mercaptoethanol
SDS-Sammelgel	3 % Acrylamidlösung 125 mM Tris (pH 6,8) 0,1 % SDS 0,05 % APS 0,05 % TEMED
SDS-Trenngel (10%)	10 % Acrylamidlösung 375 mM Tris (pH 8,8) 0,1 % SDS 0,05 % APS 0,05 % TEMED
SDS-Laufpuffer (10x)	30 g Tris-Base 150 g Glycin 10 g SDS <i>ad</i> 1000 ml H <sub>2</sub> O

**Western Blot**

Ponceau-Lösung	3 % Trichloressigsäure 0,1 % Ponceau S
Transferpuffer	5,81 g Tris-Base 2,93 g Glycin 200 ml Methanol (100 %) 0,37 g SDS <i>ad</i> 1000 ml H <sub>2</sub> O
PBST-Puffer	0,1 % Tween 20 in PBS-Puffer
Blocking-Puffer	5 % Magermilchpulver in PBS-Puffer
Antikörper-Puffer	2 % Magermilchpulver in PBST-Puffer

**Immunhistochemie**

PBS-Saponin-Puffer	0,1 % Saponin in PBS-Puffer
Blocking-Lösung für endogene Peroxidase	1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 % NaN <sub>3</sub> in PBS-Saponin-Puffer

**mPGES-1-Aktivitätsassay:**

mPGES-1-Reaktionspuffer	0,1 M Kpi-Puffer, pH 7,4 2,5 mM GSH frisch dazu: Protease-Inhibitor-Mischung 2
PGH <sub>2</sub> -Lösung	40 mM PGH <sub>2</sub> in Reaktionspuffer, pH 7,4
Stopplösung	40 mM FeCl <sub>2</sub> 80 mM Citronensäure

**cPLA<sub>2g</sub>-Aktivitätsassay:**

Vesikel-Puffer	20 mM Tris pH 7,4 134 mM NaCl
TGN-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0 300 mM NaCl 20 % Glycerol

**2.1.6 Primer**

Primer	Sequenz	T <sub>Annealing</sub> [°C]
mPGES-1 fwd mPGES-1 rev	5'-ACG-CTG-CTG-GTC-ATC-AAG-AT-3' 5'-CCG-TGT-CTC-AGG-GCA-TCC-T-3'	54
sPLA <sub>2</sub> IIA fwd sPLA <sub>2</sub> IIA rev	5'-AAG-GAA-GCC-GCA-CTC-AGT-TA-3' 5'-TTG-CAC-AGG-TGA-TTC-TGC-TC-3'	53
β-Aktin fwd β-Aktin rev	5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3' 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'	55

Das Programm „Primer 3“ diente zur Ermittlung der Oligonukleotidsequenzen der in den PCR-Analysen eingesetzten Primer. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma BioSpring (Frankfurt). Das zertifizierte Lux™ Primer Set FAM-markiert für β-Aktin (Invitrogen, Karlsruhe) wurde Rahmen der Quantitativen TaqMan™ RT-PCR zur Standardisierung verwendet.

### 2.1.7 Antikörper

Antigen	Herkunft	Verdünnung		Hersteller
		WB	IHC	
<b>Primärantikörper:</b>				
COX-1	Maus, monoklonal	1:500		Cayman, Ann Arbor, USA
COX-2	Ziege, polyklonal	1:400		Santa Cruz, Heidelberg
mPGES-1	Hase, polyklonal	1:500	1:5000	Agrisera, Vännäs, Schweden
mPGES-2	Hase, polyklonal	1:500		Cayman, Ann Arbor, USA
cPGES	Hase, polyklonal	1:500		Cayman, Ann Arbor, USA
cPLA <sub>2α</sub>	Ziege, polyklonal	1:200		Santa Cruz, Heidelberg
phospho-cPLA <sub>2α</sub>	Hase, polyklonal	1:500		Cell Signalling, Danvers, USA
β-Actin	Maus, monoklonal	1:5000		Sigma-Aldrich, Seelze
<b>Sekundärantikörper:</b>				
Hase, IgG IRDye	Ziege	1:10000		Molecular probes, Leiden, NL
Maus, IgG IRDye	Ziege	1:10000		Molecular probes, Leiden, NL
Ziege, IgG IRDye	Esel	1:10000		Molecular probes, Leiden, NL
Hase, IgG <i>biotinyliert</i>	Ziege		1:1600	Vector Lab., Burlingame, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die eukaryotischen Zelllinien wurden in einem Hera Cell Inkubator (Heraeus, Hanau) bei 37 °C, einem CO<sub>2</sub> 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. Die Zellmedien (2.1.5) erhielten einen Zusatz von 10 % FCS, 100 I.E./ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin. Bei Zellkulturarbeiten wurden, wenn nichts anderes angegeben, die verwendeten Lösungen, wie Medium, PBS und Trypsin, bei 37 °C vorgewärmt und für alle Versuche wurde Medium mit 10 % FCS verwendet.

### 2.2.1.1 Passagieren von eukaryotischen Zellen

Die verwendeten humanen Krebszelllinien (2.1.3) sind adhärent wachsende Zellen, die in Zellkulturflaschen bis zu 90 % Konfluenz gezogen wurden. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit sterilem PBS gewaschen und durch die Einwirkung von Trypsin-EDTA vom Boden der Flasche gelöst. Die Suspension wurde mit 5 ml Medium aufgefüllt bei 500x g für 3 min zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg). Nach dem Resuspendieren des Pellets im frischen Medium erfolgte die Zellzahlbestimmung. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in geringerer Dichte in neuen Flaschen überführt. Für Versuche erfolgte ein Aussäen in Zellkulturschalen oder in 12-well Platten in den gewünschten Konzentrationen.

### 2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Das nach Abtrypsinisieren erhaltene Pellet wurde in frischen Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte eine Mischung von 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (0,18%). Es wird dabei die Eigenschaft ausgenutzt, dass Trypanblau nur in permeable Membranen eindringen kann und im Anschluss sich an Proteinstrukturen des Zytoplasmas anlagert. Dies kann jedoch nur bei toten Zellen geschehen, die sich somit blau färben. Das Zählen der lebenden Zellen erfolgte in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop durch Auszählen von vier großen aneinander liegenden Quadraten.

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

Mittelwert (Zellen): Mittelwert der gezählten Zellen in den vier großen Quadraten

Verdünnungsfaktor: ergibt sich aus der Verdünnung mit Trypanblau = 2

### 2.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Die Zellen befinden sich zur dauerhaften Lagerung in Kryoröhrchen im flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff entnommen, schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort in 5 ml Medium überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500x g für 3 min) vom Einfriermedium und somit vom DMSO befreit, in frisches Kulturmedium aufgenommen und in kleine Zellkulturflaschen ausgesät.

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst trypsinisiert, in Medium gewaschen und durch Zentrifugation (500x g, 3 min) sedimentiert. Durch Aufnahme im kaltem (4°C) Einfriermedium (FCS, 20 % DMSO) wurden die Zellen resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt (je 1 ml;  $1 \times 10^6$  Zellen). Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10-15 min und anschließendes langsames Einfrieren in Kryoboxen bei -80 °C. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

## 2.2.2 RNA-Analytik

### 2.2.2.1 RNA-Extraktion aus humanen Krebszellen

Die Arbeiten wurden RNase-frei, durch Reinigung der Laborbank und Geräte mit RNaseZAP® (Sigma, Seelze) durchgeführt. Die Isolation von Gesamt-RNA aus Tumorzellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden), welches überwiegend nach dem Prinzip einer modifizierten Salzfällung abläuft. Eine hohe Salzkonzentration bedeutet eine optimale Bindung der RNA an Silikagele. Die Zellen wurden nach entsprechender Inkubationszeit vom Zellmedium befreit, mit einem Zellkulturschaber in PBS geerntet und zentrifugiert (10000x g, 2 min). Das entstandene Pellet wurde nach dem Protokoll des Herstellers weiter verarbeitet. Im letzten Schritt erfolgte eine Eluation der RNA von den Säulchen mittels RNase-freien Wasser und die Lagerung bei – 80 °C.

### 2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren (DNA, RNA) erfolgte spektrophotometrisch an einem Nano-Drop™ ND-1000 UV-VIS-Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Dazu wird der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA und RNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Bei einem A260/A280-Verhältnis von 1,8 bis 2,0 konnte von einer reinen Nukleinsäure-Lösung ausgegangen werden. Die Konzentration der Nukleinsäure ergibt sich aus folgender Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

OD<sub>260</sub>: optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge

V: Verdünnungsfaktor

F: Multiplikationsfaktor (= 50 für dsDNA, = 37 für ssDNA, = 40 für RNA)

### 2.2.2.3 RT-PCR-Analytik

Bei der RT-PCR wird zunächst cDNA (*complementary DNA*) durch reverse Transkription aus einer beliebigen RNA synthetisiert. Die cDNA dient im Anschluss als Template für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR). Diese Methode wurde hier zum einem zum Nachweis der Gentranskription für die sPLA<sub>2</sub>IIA in HeLa-Zellen und zum anderen auch zur semiquantitativen Analyse des Einflusses von DMC auf die mPGES-1-Gentranskription in HeLa-Zellen verwendet.

Der Qiagen OneStep RT-PCR Kit vereinigt beide Reaktionsabläufe in einem Arbeitsgang. Es wurden die unter (2.1.6) angegebenen Primer verwendet und die PCR-Produkte im Anschluss auf einem 1 %igen (w/v) Agarosegel unter Verwendung eines DNA-Größenmarkers elektrophoretisch aufgetrennt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolles mit folgenden Bedingungen:



<u>Reaktionsansatz:</u>	0,4 µM	Primer fwd (mPGES-1, sPLA <sub>2</sub> IIA, β-Aktin)		
	0,4 µM	Primer rev (mPGES-1, sPLA <sub>2</sub> IIA, β-Aktin)		
	400 µM	dNTP-Mix		
	0,6 µg	RNA		
	5 µl	Qiagen OneStep RT-PCR Puffer (5x)		
	1 µl	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix		
	ad 25 µl	H <sub>2</sub> O (RNase-frei)		
<u>Reaktionsbedingungen:</u>	Reverse Transkription:	30 min	50 °C	
	Aktivierung DNA-Polymerase:	15 min	95 °C	
	Amplifizierung für mPGES-1:	1 min	94 °C	} 26 Zyklen
		1 min	54 °C	
		1 min	72 °C	
	Amplifizierung für sPLA <sub>2</sub> IIA:	1 min	94 °C	} 28 Zyklen
		1 min	53 °C	
1 min		72 °C		
Finale Extension:	10 min	72 °C		

#### 2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das Auftrennen der DNA-Fragmente aus der RT-PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarose (1 %) wurde unter Erhitzen in 50 ml 1x TBE-Puffer (2.1.5) gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 0,3 µg/ml), die Lösung in die Gelkammer eines Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarose Gelelektrophorese-Systems (Bio-Rad, München) gegossen und der Geltaschenkamm eingesetzt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer (2.1.5) vermischt und in die Geltaschen des mit 1x TBE-Puffer überdeckten Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Anschließend wurde die DNA mittels UV-Meter (Gel Doc<sup>®</sup> Geldokumentationssystem und QuantityOne<sup>®</sup>-Software, Bio-Rad, München) detektiert.

#### 2.2.2.5 Quantitative TaqMan™ RT-PCR-Analytik

Die Quantifizierung des Einflusses von DMC auf die mPGES-1-mRNA in HeLa-Zellen erfolgte mittels reverser Transkription und anschließender quantitativer TaqMan™ Real-Time (RT)-PCR am ABI Prism<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems, Darmstadt). Diese Methode erlaubt die direkte Detektion amplifizierter DNA durch Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden, welche in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA binden. Das emittierte Fluoreszenzsignal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (*real-time*) dargestellt werden.

Die Messungen wurden mit speziellen kommerziell erhältlichen Absolute™ QPCR Mix-Lösungen (Abgene, Hamburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Detektion der mPGES-1-mRNA diente der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I (Absolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix), der in doppelsträngige DNA interkaliert oder sich an diese anlagert. Zur Normierung wurde das *Housekeeping-Gen*  $\beta$ -Aktin verwendet. Im speziellen LUX™-Primer-Set (Invitrogen, Karlsruhe) ist dafür ein Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM gekoppelt.

Zunächst erfolgte die Synthese der cDNA aus 500-1000 ng isolierter RNA (2.2.2.1) mit dem First Strand cDNA Synthese Kit für RT-PCR (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Die gewonnene cDNA wurde unmittelbar im Anschluss der quantitativen TaqMan™ RT-PCR zugeführt, welche unter folgenden Bedingungen ablief:

<u>Reaktionsansatz für mPGES-1:</u>	0,27 $\mu$ M	mPGES-1 fwd-Primer	
	0,27 $\mu$ M	mPGES-1 rev-Primer	
	0,5 ng	cDNA	
	12,5 $\mu$ l	Absolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix	
	ad 25 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	
<u>Reaktionsansatz für <math>\beta</math>-Aktin:</u>	0,1 $\mu$ M	LUX™ $\beta$ -Aktin-Primer, FAM-markiert	
	0,1 $\mu$ M	LUX™ $\beta$ -Aktin-Primer, unmarkiert	
	0,5 ng	cDNA	
	12,5 $\mu$ l	Absolute™ QPCR ROX Mix	
	ad 25 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	
<u>Reaktionsbedingungen:</u>	Aktivierung der Enzyme:	2 min 50 °C	
		15 min 95 °C	
	Amplifizierung:	15 s 95 °C	} 40 Zyklen
		1 min 60 °C	

Der PCR-Zyklus wird in die Startphase, die exponentiellen Phase und die Plateauphase unterteilt. Der Anfang der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung benutzt, indem der Zyklus angegeben wird, wo die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt ( $C_t$  = „Schwellenwert-Zyklus“) (Abb. 2-1). Dieser Wert ist abhängig von der Anzahl der Anfangskopien und dient als Berechnungsgrundlage für die Ermittlung der relativen mRNA-Menge. Negativkontrollen (z.B. Wasser) zeigen keine Amplifikation und damit  $C_t$ -Werte > 40.

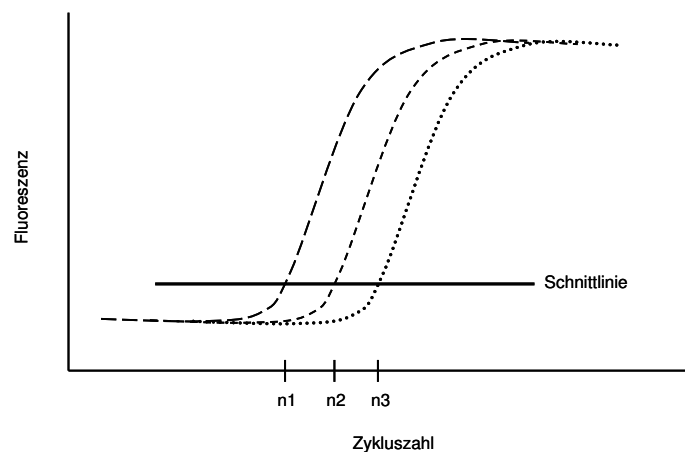
Der  $C_t$ -Wert für die mPGES-1-Signale wurde mit den  $C_t$ -Werten für  $\beta$ -Aktin korreliert, um Schwankungen in der Ausgangskonzentration der eingesetzten cDNA auszugleichen (Differenz  $\Delta C_t$  aus  $C_t$ -Werten für mPGES-1 und  $\beta$ -Aktin). Der Gehalt an mPGES-1-mRNA in den mit DMC behandelten und stimulierten HeLa-Zellen wurde anschließend auf den Gehalt in unbehandelten und stimulierten HeLa-Zellen (als 1 festgelegt) bezogen (Differenz  $\Delta \Delta C_t$  aus  $\Delta C_t$ -Werten für behandelte und unbehandelte HeLa). Dies wurde für drei verschiedene Zeitpunkte durchgeführt (2, 4 und 6 h).

Die relative mPGES-1-mRNA-Menge ließ sich näherungsweise über den folgenden mathematischen Zusammenhang berechnen:

$$mPGES-1-mRNA_{relativ} = 2^{(-\Delta\Delta C_t)}$$

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{mPGES-1}} - C_{t_{\beta-Aktin}})_{behandelt} - (C_{t_{mPGES-1}} - C_{t_{\beta-Aktin}})_{unbehandelt}$$

Zur Herleitung der Gleichung und zur ausführlichen Erklärung der verwendeten  $\Delta\Delta C_t$ -Methode sei auf das Handbuch von ABI Prism<sup>®</sup> 7700 SDS verwiesen.



**Abb. 2-1:** PCR-Quantifizierung mittels komparativer  $C_t$ -Methode. An der Schnittlinie der drei Proben steigt die Fluoreszenzintensität erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz an (entspricht 10 Standardabweichungen der Basislinie). Dies bedeutet, dass hier die gleiche Fluoreszenzintensität und somit die gleiche aktuelle DNA-Menge jedoch zu unterschiedlichen Zykluszahlen vorliegt. Der „Schwellenwert-Zyklus“ wird als  $C_t$ -Wert bezeichnet.

## 2.2.3 Proteinanalytik

### 2.2.3.1 Gesamtproteinextraktion

Die behandelten Zellen wurden in der Kulturschale mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit einem Zellkulturschaber geerntet und dann für 2 min bei 2600x g und 4 °C abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Nach dem Suspendieren des erhaltenen Pellets in 100 µl Ultraschallpuffer (2.1.5) folgte eine Lyse der Zellen mittels Ultraschall (2 x 10 s, mittlere Stärke, mittlere Intervallzahl) (Branson Sonifier 250, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) und eine erneute Zentrifugation der Suspension für 10 min bei 21.000x g und 4 °C. Der erhaltene Überstand dient zur Analyse der Proteine im Gesamtzellextrakt und wurde bei - 80 °C aufbewahrt. Um Phosphorylierungen eines Enzymes nachzuweisen, wurde anstelle des Ultraschallpuffers ein spezieller Phosphopuffer (2.1.5) verwendet.

### **2.2.3.2 Extraktion cytosolischer Proteine**

Die Zellen wurden analog der Gesamtproteinextraktion geerntet, nach erfolgter Zentrifugation (2 min, 2600x g, 4 °C) in 120 µl Cytosolextraktionspuffer (2.1.5) aufgenommen und mit einem dounce-Homogenisator auf Eis aufgeschlossen. Durch diese Behandlung kommt es zu einem Aufbrechen der Zellmembranen, während die Zellkerne sowie die übrigen Organellen weitgehend unversehrt bleiben. Nach erneuter Zentrifugation der Suspension für 10 min bei 21.000x g und 4 °C wurde der Überstand mit den enthaltenen cytosolischen Proteinen abgenommen und bei - 80 °C aufbewahrt.

### **2.2.3.3 Extraktion mikrosomaler Proteine**

Wie bei der Gesamtproteingewinnung beschrieben wurden die Zellen zunächst geerntet und zentrifugiert. Danach erfolgte eine restlose Befreiung des Pellets vom PBS und ein schnelles Einfrieren im flüssigen Stickstoff. Das Auftauen erfolgte langsam auf Eis. Nach Zusatz von 300 µl Homogenisierungspuffer (2.1.5) wurden die Zellen zusätzlich mit Ultraschall (3 x 10 s, niedrigste Stärke, kein Intervall) lysiert. Durch erneute Zentrifugation für 15 min bei 10.000x g und 4 °C konnte die subzelluläre Fraktion (Überstand) von der nuklearen und mitochondrialen Fraktion (Pellet) abgetrennt werden. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugen-Röhrchen (1,5 ml) überführt. Die mikrosomale Fraktion erhielt man durch nochmalige Zentrifugation für 1 Stunde bei 130.000x g und 4 °C in einer Ultrazentrifuge (Optima™ TLX Ultrazentrifuge; Rotor: TLA-55, Beckmann Coulter, Krefeld). Das entstandene Pellet wurde in 40 µl Homogenisierungspuffer durch kurzzeitige Ultraschallbehandlung (3 s, niedrige Stärke, kein Intervall) resuspendiert und bei - 80 °C gelagert.

### **2.2.3.4 Trennen von Proteinen in Cytosol- und Membranfraktion**

Das Ernten der Zellen erfolgte wie bei der Gesamtproteinextraktion beschrieben. Das nach dem Zentrifugieren (2 min, 2600x g, 4 °C) erhaltene Pellet wurde restlos vom PBS befreit, in 120 µl Translokationspuffer (2.1.5) resuspendiert und mit einem dounce-Homogenisator auf Eis aufgeschlossen. Es folgte die Abtrennung der Kernfraktion durch Zentrifugation bei 1000x g und 4 °C für 10 min und Ultrazentrifugation des erhaltenen Überstandes für 1 h bei 100.000x g und 4 °C. Durch diesen Schritt konnte die Membranfraktion (Pellet) von der cytosolischen Fraktion (Überstand) getrennt werden. Das entstandene Pellet wurde in 60 µl Translokationspuffer durch kurzzeitige Ultraschallbehandlung (3 s, niedrige Stärke, kein Intervall) resuspendiert und wie die cytosolische Fraktion bei - 80 °C gelagert.

### **2.2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt [207]. Das farbgebende Prinzip ist die Komplexbindung des Coomassie Brilliant Blau G-250-Farbstoffes des Bradford Reagenzes (2.1.5) mit Proteinen, wodurch die unprotonierte anionische blaue Form entsteht und diese

UV-spektrophotometrisch bei 595 nm gemessen werden kann. Als Proteinstandard zur Erstellung der Eichgeraden diente die Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 µg/µl). Die Proteinproben wurden mit Aqua purificata 1:10 verdünnt. Auf einer 96-well Microtiter<sup>®</sup>-Platte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) wurden jeweils 200 µl des Bradford-Reagenzes mit 10 µl der Proteinlösungen bzw. der Standards vermischt. Nach 2 min erfolgte die photometrische Auswertung bei 595 nm mittels SpectraFluor Plus<sup>®</sup>-Instrument und X-Fluor<sup>®</sup>-Software (Tecan, Crailsheim). Mit Hilfe des BSA-Standards wurde eine Kalibriergerade erstellt, die die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Proben ermöglichte.

#### **2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse erfolgte mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach einer Methode von Laemmli [208] unter Verwendung des vertikalen Elektrophoresesystems Mini-Protean<sup>®</sup> 3 (Bio-Rad, München). Die Protein-Proben wurden 1:4 mit Lämmli-Puffer (2.1.5) verdünnt. Das darin enthaltene anionische Detergenz SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) bindet an die kationischen Proteinreste, wodurch eine negative Überschussladung entsteht. Die Proteinproben wurden danach bei 95 °C für 5 min denaturiert (Thermomixer compact<sup>®</sup>, Eppendorf, Hamburg) und in die Protein-Ladetaschen des 1 mm dicken Geles überführt. Als Protein-Größenmarker diente Precision Plus (Bio-Rad, München). Die Elektrophorese wurde innerhalb der ersten 10 min bei 80 V, danach mit einer konstanten Spannung von 150 V unter Verwendung des 1x SDS-Laufpuffers (2.1.5) durchgeführt. Dabei 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) (2.1.5). Die Porengröße wird hier durch die Acrylamid-Konzentration bestimmt. Für die Detektion der meisten Proteine wurden 12 %ige Trenngele verwendet. Bei Proteinen mit einer Molekülgröße über 75 kDa erfolgte eine bessere Trennung durch die Verwendung von 10 %igen Trenngelen sowie bei kleinen Proteinen unter 40 kDa durch 15 %ige Trenngele.

#### **2.2.3.7 Western Blot**

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach der Burnette-Methode [209] auf eine Nitrozellulosemembran (BioTrace<sup>®</sup> NT, Pall, Dreieich) überführt. Hierbei wird die negative Ladung des gebundenen SDS ausgenutzt, wobei das SDS im Laufe des Transfers von den Proteinen abgetrennt wird. Die so erhaltene Proteinkopie des SDS-Geles auf der Nitrozellulosemembran ermöglicht nun die Detektion der Proteine durch spezifische Antikörper.

Der Proteintransfer erfolgte nach einer kurzen Äquilibrierung von Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel), Membran und Gel in Transferpuffer (2.1.5) mit einer Mini Trans-Blot<sup>®</sup>-Transferzelle (Bio-Rad, München) bei einer konstanten Spannung von 100 V über 1 Stunde. Unmittelbar danach wurde der Proteintransfer durch Färbung mit Ponceau-Lösung (2.1.5) kontrolliert und mittels

Fotokopie dokumentiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation der Membran für 1h bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (2.1.5).

#### **2.2.3.8 Antikörper-Inkubation und -Detektion**

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. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper befindet sich unter 2.1.7.

Der Primärantikörper wurde mit 4 ml Antikörper-Puffer (2.1.5) verdünnt, mit der Membran in Kunststoffolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Um eine gleichmäßige Bindung des Antikörpers zu erhalten, fanden die Antikörperinkubationen auf einem Überkopfmischer (Reax<sup>®</sup> 2, Heidolph, Schwabach) statt. Die Membran wurde dreimal für je 10 min in Waschpuffer (2.1.5) gewaschen und danach im gleichen Verfahren mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift von dreimal 10 min und die Detektion des Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexes mit einem Odyssey<sup>®</sup> Infrared Scanner (LI-COR, Lincoln, USA).

#### **2.2.4 Immunzytochemie der mPGES-1 in HeLa-Zellen**

Zum immunzytochemischen Nachweis des Einflusses von DMC auf die mPGES-1-Expression in stimulierten HeLa-Zellen wurden diese auf so genannten *8-well-Culture Slides* (BD Falcon<sup>™</sup> CultureSlide, BD Biosciences, Heidelberg) kultiviert. Dazu wurden 2000 Zellen pro Kammer ausgesät und nach 24 h mit Il- $\beta$  (1 ng/ml) und TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) stimuliert sowie zeitgleich mit verschiedenen DMC-Konzentrationen für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung des Mediums und der Kammern erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern für 10 min in 2 %iger Paraformaldehydlösung (in PBS, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen mit PBS (5 min) und PBS-Saponin (2.1.5) (10 min) wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Einwirken der entsprechenden Lösung (2.1.5) geblockt (60 min in Dunkelheit). Nach erneutem Waschen (immer 3 x 3 min mit PBS-Saponin) erfolgte das Blocken mit Avidin für 15 min, Waschen und Blocken mit Biotin für 15 min unter Verwendung des Avidin-Biotin-Kits (2.1.2). Der primäre mPGES-1-Antikörper (2.1.7) wurde nach einem weiteren Waschschrift über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Inkubation der Zellen mit Immunglobulin G (Hase) zur Detektion der unspezifischen Färbung des Antikörpers. Nach dem Waschen folgte das Blocken mit 1 %igen Ziegen Serum (in PBS-Saponin) für 15 min und die Inkubation des biotinylierten Zweitantikörpers (2.1.7) für 30 min. Eine Verstärkung des Antikörpersignals wurde durch die Verwendung des Vectastain Elite ABC Kits (2.1.2) nach Herstellerangaben erreicht (Inkubation 45 min in Dunkelheit).

Nach erneutem Waschen konnte der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex durch eine Diaminobenzidin-Peroxidase-Färbung (DAB Substrate Kit, 2.1.2) sichtbar gemacht werden. Im Anschluss an das Waschen mit PBS (3 x 3 min) wurden die Zellkerne durch Verwendung von Mayer's Hematoxylin (5-10 s) eingefärbt und die Objektträger in Wasser gewaschen (20 min). Eine Fixierung der Deckgläser erreichte man durch Verwendung von PBS-Glycerol (1:10).

## 2.2.5 Aktivitätsassays

### 2.2.5.1 In vitro COX-Inhibitor-Screening-Assay

Mit dem COX-Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemicals, 2.1.2) wurde der Einfluss von DMC auf die COX-1- und COX-2-Aktivität *in vitro* untersucht. Dabei stammte das COX-1-Enzym vom Schaf und die COX-2 war ein humanes rekombinates Enzym. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. SC-560 diente als selektiver COX-1-Hemmer (*in vitro*) als Kontrollsubstanz für die COX-1-Hemmung und Celecoxib entsprechend als Kontrollsubstanz für die COX-2-Hemmung. Die bei dem Versuch eingesetzte Arachidonsäure als Substrat für die COX-Enzyme wird dabei zu PGH<sub>2</sub> umgesetzt, welches aufgrund der Instabilität quantitativ nicht erfasst werden kann. Sowohl nicht-enzymatisch als auch durch den Zusatz von SnCl<sub>2</sub> und Salzsäure wird es zu verschiedenen Prostaglandinen reduziert. Hierbei entsteht überwiegend PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>, welche quantitativ mittels LC-MS/MS-Messung (API 4000, Applied Biosystems, Darmstadt) erfasst wurden.

Die Proben wurden nach Versuchsbeendigung für 5 min zentrifugiert (10.000x g, RT) und, mit Methanol verdünnt (1:5), bei - 80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Zur Probenaufarbeitung für die LC-MS/MS-Messung wurden jeweils 70 µl der verdünnten Probe mit den unten aufgeführten Reagenzien versetzt und zweimal mit je 600 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Im Anschluss erfolgte ein Abdampfen der organischen Phase bei 45 °C und einem leichten Stickstoffstrom. Nach Aufnahme des Rückstandes in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v) konnten die Proben nach einer Methode von Schmidt vermessen werden [210, 211]. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Analyst Software V1.4.2 (Applied Biosystems, Darmstadt).

#### Probenaufarbeitung für LC-MS/MS:

Extraktion:	70 µl	Probe (1:5 in MeOH)	} 2x 600 µl Ethylacetat
	100 µl	ETDA (0,15 M)	
	20 µl	Methanol	
	20 µl	Interner Standard	
Interner Standard:	25 ng/ml	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-PGE <sub>2</sub> , [ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-PGD <sub>2</sub> , [ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-TXB <sub>2</sub>	
	10 ng/ml	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-PGF <sub>2α</sub> , [ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-6-keto-PGF <sub>1α</sub>	

### 2.2.5.2 COX-2-Vollblutassay

Die Untersuchung des Einflusses von DMC und Celecoxib auf die COX-2-Aktivität im humanen Vollblut erfolgte unter Anwendung der Methode nach Patrignani et al. [212]. Dazu wurden jeweils 500 µl frisches heparinisiertes humanes Vollblut in eine 24-well Platte aliquotiert und mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen versetzt (je 2 µl, gelöst in DMSO). Durch Zugabe von 1 µl einer bakteriellen Lipopolysaccharid-Lösung (5 mg/ml in PBS, Endkonzentration 10 µg/ml) wurde die Reaktion gestartet. Die Stimulation mit LPS induziert in den Monozyten die COX-2-Expression, was zu einer gesteigerten Prostaglandinsynthese führt [212]. Den mengenmäßig größten Anteil im Vollblut bildet dabei das PGE<sub>2</sub>, welches zur Quantifizierung herangezogen wurde. Die enzymatische Reaktion wurde nach 20 h bei 37 °C durch schnelles Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Proben wurden im Anschluss bei 450x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, der Plasmaüberstand abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei - 80 °C gelagert. Als Positivkontrolle wurde das Vollblut mit 2 µl DMSO ohne Inhibitor, aber mit Stimulanz und in der Negativkontrolle mit 2 µl DMSO ohne Inhibitor und ohne Stimulanz wie oben inkubiert. Die Positivkontrolle repräsentiert die maximal mögliche PGE<sub>2</sub>-Synthese und die Negativkontrolle das im Blut ohne Stimulation vorhandene PGE<sub>2</sub>. Die Plasmaproben wurden im Anschluss einer Festphasenextraktion unterzogen und nach einer Methode von Schmidt der LC-MS/MS-Analytik zugeführt [211].

Die Vorbereitung von jeweils 250 µl Plasma für die SPE erfolgte zunächst nach den unten stehenden Angaben. Die Kartuschen (ABSELUT Nexus; 30 mg/ml; 1 ml, Varian, Darmstadt) wurden mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert und mit 1 ml Probe beladen. Es folgten zwei Waschstritte mit 1 ml Wasser und 1 ml Methanol/Wasser (30:70, v/v) sowie das Trocknen unter vollem Vakuum für 7 min. Die gebildeten Prostanoiden wurden anschließend mit 1 ml Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (35:60:5, v/v) eluiert und das Lösungsmittel unter Stickstoff bei 45 °C abgedampft. Nach dem Aufnehmen des Rückstandes 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v) konnten die Proben der LC-MS/MS zugeführt werden.

#### Probenaufarbeitung für LC-MS/MS:

Extraktion:	250 µl	Plasma	} 1 min bei 10.000x g → SPE
	10 µl	BHT (2 mg/ml in MeOH)	
	100 µl	ETDA (0,15 M)	
	20 µl	Methanol	
	20 µl	Interner Standard (2.2.5.1)	
	600 µl	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (45 mM)	



### 2.2.5.3 In vitro mPGES-1-Assay

In dem von Jakobsson et al. entwickelten Aktivitätsassay wird die katalytische Umsetzung von  $\text{PGH}_2$  zu  $\text{PGE}_2$  durch die mPGES-1 in Gegenwart von Glutathion gemessen [110, 118]. Als Quelle für das mPGES-1-Enzym diente die mikrosomale Präparation (2.2.3.3) von stimulierten ( $\text{IL-1}\beta = 1 \text{ ng/ml}$ ,  $\text{TNF}\alpha = 5 \text{ ng/ml}$ , 16 h) HeLa-Zellen, da diese durch Stimulation eine Überexpression von mPGES-1-Protein zeigte. Die verschiedenen Testsubstanzen als mögliche Inhibitoren (2.1.4) wurden in unterschiedlichen Konzentration in DMSO gelöst und je  $1 \mu\text{l}$  in eine 96-well Microtiterplatte vorgelegt. Es folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis mit  $0,2 \text{ mg/ml}$  Protein der mikrosomalen Fraktion, gelöst in  $50 \mu\text{l}$  mPGES-1-Reaktionspuffer (pH 7,4; 2.1.5), welcher für die Reaktion essentielles Glutathion enthielt. Die Reaktion wurde unter Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  einer  $40 \mu\text{M}$   $\text{PGH}_2$ -Lösung (2.1.5) gestartet und nach einer Minute mit  $100 \mu\text{l}$  Stopplösung (2.1.5) abgebrochen. Das in der Lösung enthaltene  $\text{FeCl}_2$  und die Zitronensäure setzte überschüssiges  $\text{PGH}_2$  zu 12-HHT um [23].  $100 \mu\text{l}$  der erhaltenen Reaktionslösung wurden mit  $100 \mu\text{l}$  EDTA ( $0,15 \text{ M}$ ) versetzt und über Nacht bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Im Anschluss an die unten angegebene Festphasenextraktion (SPE) erfolgte die Analyse des während der Reaktion gebildeten  $\text{PGE}_2$  nach einer von Schmidt validierten LC-MS/MS-Methode [211]. Als Positivkontrolle wurde  $1 \mu\text{l}$  DMSO ohne Inhibitor, aber mit Mikrosomenfraktion und als Negativkontrolle  $1 \mu\text{l}$  DMSO ohne Inhibitor und ohne Mikrosomen wie oben inkubiert. Die Positivkontrolle repräsentiert die maximal mögliche  $\text{PGE}_2$ -Konzentration und die Negativkontrolle die nichtenzymatische Zersetzung von  $\text{PGH}_2$  zu  $\text{PGE}_2$ . Um auszuschließen, dass die Mikrosomenpräparation bereits hohe Mengen an  $\text{PGE}_2$  enthält, wurde diese in einem zusätzlichen Kontrollversuch ohne  $\text{PGH}_2$  inkubiert. Die Mengen an  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  lagen unter dem Detektionslimit. MK-886, ein unspezifischer mPGES-1-Inhibitor, diente nach Bestätigung des in der Literatur angegebenen  $\text{IC}_{50}$ -Wertes für die Hemmung der mPGES-1-Aktivität als Kontrollsubstanz.

#### Probenaufarbeitung für LC-MS/MS:

Extraktion:	200 $\mu\text{l}$	Probe ( $100 \mu\text{l}$ Probe + $100 \mu\text{l}$ EDTA)	} SPE
	20 $\mu\text{l}$	Methanol	
	20 $\mu\text{l}$	Interner Standard	
	700 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}$	
Interner Standard:	500 ng/ml	$[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGE}_2$	
	250 ng/ml	$[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGD}_2$	

Zur Probenaufarbeitung wurde die Probenmischung mit EDTA langsam aufgetaut und mit den aufgeführten Reagenzien versetzt. Zur Festphasenextraktion über Oasis-HLB-SPE-Kartuschen (1 ml; Waters, Eschborn) wurden diese zunächst mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert,  $940 \mu\text{l}$  Probe aufgegeben und mit 1 ml Methanol/Wasser (30:70, v/v) gewaschen und anschließend für 5 min unter vollem Vakuum getrocknet. Die Eluierung der Prostaglandine erfolgte mit 1 ml

Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (35:60:5, v/v). Nach dem Abdampfen unter Stickstoff bei 45 °C und Aufnehmen des Rückstandes in 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v) konnten die Proben der LC-MS/MS zugeführt werden.

#### 2.2.5.4 In vitro cPLA<sub>2α</sub>-Assay

Zur in vitro Aktivitätsmessung der cPLA<sub>2α</sub> benötigt man zunächst künstlich hergestellte Vesikel aus Glycerophospholipiden, die Arachidonsäure in sn-2-Position enthalten. Werden diese einer cPLA<sub>2α</sub>-Präparation in Gegenwart von Calcium-Ionen ausgesetzt, kommt es zur Freisetzung der Arachidonsäure, die quantitativ durch LC-MS/MS-Messung erfasst werden kann.

Zur Vesikelpräparation wurde 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (PAPC) als Arachidonsäurequelle und 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycerol (POG) im Verhältnis 2:1 verwendet, wobei 50 nmol Lipide pro Inkubation zum Einsatz kamen. Die in Chloroform gelösten Lipide wurden entsprechend gemischt und nach dem Eindampfen unter Stickstoffstrom in 1/3 des Endvolumens in Vesikel-Puffer (2.1.5) gelöst. Es folgten 4 Einfrier- und Auftauzyklen im flüssigen Stickstoff und im Wasserbad (30 °C). Nach Auffüllen auf das Endvolumen (190 µl pro Inkubation) mit Vesikel-Puffer wurden unter Verwendung eines Ultraschallbades (Merck, Darmstadt) für 15 min kleine unilamellare Vesikel (*SUV-small unilaminar vesicles*, 10-50 nm) hergestellt.

Die humane rekombinante cPLA<sub>2α</sub> wurde von Marika Hoffmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Steinhilber (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt) in Sf9-Insektenzellen überexprimiert, aufgereinigt und uns zur Verfügung gestellt. Pro Inkubation kam 200 ng Enzym zum Einsatz, welches in 10 µl TGN-/Vesikel-Puffer (1:10) (2.1.5) gelöst wurde. Je 190 µl der Vesikellösung wurden in Glaszentrifugenröhren vorgelegt und mit jeweils 1 µl DMC-Lösung in verschiedenen Konzentrationen sowie mit 5 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung (0,04 M) gemischt. Nach dem Zusatz von 10 µl Enzymlösung erfolgte die Inkubation für 60 min bei 37 °C im Wasserbad. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 1,6 ml eiskaltem Methanol abgestoppt. Ein spezifischer cPLA<sub>2</sub>-Inhibitor (Calbiochem) diente als Kontrollsubstanz. Als Positivkontrolle wurde die Vesikellösung mit 1 µl DMSO ohne Inhibitor, mit CaCl<sub>2</sub> und Enzym und in der Negativkontrolle mit 1 µl DMSO ohne Inhibitor, mit CaCl<sub>2</sub> aber ohne Enzym wie oben inkubiert. Die Positivkontrolle repräsentiert die maximal mögliche Arachidonsäure-Freisetzung und die Negativkontrolle die nichtenzymatisch freigesetzte oder in der Lösung bereits vorhandene Arachidonsäure.

Zur Probenaufarbeitung wurden 200 µl Reaktionslösung mit 20 µl Internem Standard (300 ng/ml [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-Arachidonsäure) versetzt und zweimal mit je 600 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Im Anschluss erfolgte ein Abdampfen der organischen Phase unter Stickstoff bei 45 °C. Nach Aufnahme des Rückstandes in 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v) konnte die Menge an gebildeter Arachidonsäure durch LC-MS/MS-Analytik quantifiziert werden.

## 2.2.6 Analytik der Prostanoiden

### 2.2.6.1 Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Medium mittels PGE<sub>2</sub>-EIA

Zur Ermittlung des Einflusses von DMC auf die PGE<sub>2</sub>-Produktion wurden drei verschiedene humane Krebszelllinien (2.1.3) verwendet. Zunächst wurden gleich viele Zellen in 12-well Platten ausgesät. Nach 24 h bei 37 °C wurde das Medium gewechselt und die Zellen zur Steigerung der Prostaglandinsynthese, speziell PGE<sub>2</sub>, stimuliert. Zeitgleich erfolgte eine Inkubation mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen. Für A-549-Zellen genügte IL-1β (2 ng/ml) zur Stimulation, HeLa-Zellen benötigten dagegen IL-1β (1 ng/ml) und TNF-α (5 ng/ml). Da HCA-7-Zellen basal schon eine starke PGE<sub>2</sub>-Syntheserate aufwiesen, wurden sie nur mit der entsprechenden Testsubstanz inkubiert. Hier erfolgten ein Mediumwechsel nach 1 Stunde und eine erneute Inkubation mit den gleichen Zusätzen. Dieser Schritt garantierte eine komplette Entfernung des PGE<sub>2</sub>, das eventuell vor der vollen Aktivität der Testsubstanzen gebildet wurde. Für alle Zellen wurde das Medium nach entsprechender Inkubationszeit abgenommen und 5 min bei 21.000x g zentrifugiert. Aus dem gewonnenen Überstand konnte der Gehalt an PGE<sub>2</sub> unter Verwendung eines PGE<sub>2</sub> Correlate EIA™-Kits (2.1.2) nach Herstellerangaben quantifiziert werden. Der EIA-Test stellt dabei eine etablierte, einfache und schnelle Methode zur Quantifizierung des PGE<sub>2</sub> in Zellmedium dar.

### 2.2.6.2 Bestimmung der Prostanoiden im Medium mittels LC-MS/MS

Mit Hilfe der LC-MS/MS-Analytik gelingt eine gleichzeitige Quantifizierung verschiedenener Prostanoiden, wie PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub>, im Zellmedium. Daneben können durch Festphasenextraktion (SPE) die Prostanoiden auch aus anderen Matrices, wie Plasma oder Assaypuffer bestimmt werden, was bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurde. Da PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> nur kurzlebige Prostanoiden darstellen und sehr schnell hydrolysieren, werden diese in Form ihrer Metaboliten 6-keto-PGF<sub>1α</sub> und TXB<sub>2</sub> erfasst. Der Versuchsansatz war hier identisch zu 2.2.6.1. Sowohl die Aufarbeitung des Mediums, die eine SPE darstellt, als auch die sich anschließende LC-MS/MS-Analytik erfolgte nach einer Methode von Schmidt [211]. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden bereits unter 2.2.5.2 beschrieben.

#### Probenaufarbeitung für LC-MS/MS:

Extraktion:	500 µl	Medium	} 1 min bei 10.000x g → SPE
	100 µl	ETDA (0,15 M)	
	20 µl	Methanol	
	20 µl	Interner Standard (2.2.5.1)	
	400 µl	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (45 mM)	

## 2.2.7 WST-Proliferationsassay

Der WST-Proliferationstest beruht auf der Umwandlung einer extern zugeführten Tetrazolium-1-Verbindung (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Mannheim) zu einer Formazan-Verbindung durch mitochondriale Enzyme stoffwechselaktiver Zellen. Im Gegensatz zum Tetrazolium-Salz absorbiert die Formazan-Verbindung kurzwelliges Licht im Bereich von 350 nm bis 500 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 450 nm liegt. Die Bildung der Formazan-Verbindung ist daher proportional zur Anzahl lebender und stoffwechselaktiver Zellen.

HeLa- und HCA-7-Zellen wurden in sterilen 96-well Platten (3000 bzw. 6000 Zellen/Well in 100 µl Medium) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Es folgten ein Mediumwechsel und eine Inkubation der Zellen mit verschiedenen DMC-Konzentrationen. HeLa-Zellen wurden dabei parallel mit IL-1β (1 ng/ml) und TNF-α (5ng/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. HCA-7-Zellen wurden zusätzlich verschiedenen PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen ausgesetzt oder nur mit den entsprechenden Testsubstanzen inkubiert. Der Zusatz von 10 µl WST-1-Reagenz pro Well erfolgte nach erneuter Inkubationszeit von 20 h bei 37 °C. Nach weiteren 90 min wurde die Mikrotiterplatte für 1 min auf einem Schüttler (Titramax 100 T, Heidolph, Schwabach) geschwenkt und anschließend die Absorption bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm mittels SpectraFluor Plus<sup>®</sup>-Instrument und X-Fluor<sup>®</sup>-Software (Tecan, Crailsheim) bestimmt. Die Absorption der unbehandelten Zellen wurde als Index für 100%ige Lebensfähigkeit definiert und die Absorption der Wells mit behandelten Zellen prozentual auf diesen Wert bezogen.

## 2.2.8 Analytik der zellulären Coxib-Konzentration

### 2.2.8.1 Bestimmung der intrazellulären Coxib-Konzentration

Zur Bestimmung der intrazellulären Coxib-Konzentrationen wurden 6 Zelllinien miteinander verglichen, wobei es sich bei MonoMac-6 und BL-41 um Suspensionszellen und bei HCA-7, HeLa, HCT-116 und HUVEC um adhärenente Zellen handelte. Die Zellen wurden entsprechend ihres Wachstumsverhaltens in sterilen 10 cm-Schalen ausgesät und 24 h im Brutschrank kultiviert. Bei den adhärenenten Zellen folgte nach dem Mediumwechsel eine Behandlung mit den verschiedenen Coxiben in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden die Zellen viermal gründlich und zügig mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen (1,5 ml) überführt, das zuvor gewogen wurde. Nach einer kurzen Zentrifugation für 1 min bei 4 °C und 2000x g wurde der Überstand restlos abgesaugt und die Masse der Zellen mit einer Feinwaage (Mettler H54AR, Giesen) bestimmt. Suspensionszellen wurden zunächst durch Zentrifugation (1 min bei 500x g) vom Medium befreit und im frischen Medium mit entsprechendem Coxib-Zusatz ebenfalls für 2 h inkubiert. Durch dreimaliges Zentrifugieren (1 min,

500x g, 4 °C) in jeweils 10 ml eiskaltem PBS wurden die Zellen gewaschen, in 1 ml PBS resuspendiert, in ein ausgewogenes Ultrazentrifugen-Röhrchen (1,5 ml) überführt und erneut zentrifugiert (1 min, 2000x g, 4 °C). Das Auswiegen des Pellets erfolgte auch hier nach dem restlosen Absaugen des PBS. Anschließend wurden die Zellpellets mit 200 µl PBS überschichtet und 16 h bei 120.000x g und 20 °C in einer Ultrazentrifuge (Optima™ TLX Ultrazentrifuge; Rotor: TLA-55, Beckmann Coulter, Krefeld) zentrifugiert. Die hohen Zentrifugalkräfte führen zu einem Platzen der Zellkörper, so dass die löslichen Bestandteile aus den Zellen in das PBS herausgepresst werden, während die Proteine und übrigen Zellbestandteile als Pellet am Boden verbleiben. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand schnell und vollständig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um weitere Diffusionseffekte aus dem Pellet zu vermeiden. 10 µl des Überstandes wurden mit einer Acetonitril/Wasser-Mischung (50/50) im Verhältnis 1:100 verdünnt und die Coxibkonzentration mittels LC-MS/MS-Analytik nach einer Methode von Bräutigam et al. [213, 214] quantifiziert. Das verbleibende Pellet aus unlöslichen Zellbestandteilen einschließlich der Membranen wurde erneut genau gewogen.

Aus der Differenz der Zellmasse vor ( $m_{\text{vor\_UZ}}$ ) und nach der Zentrifugation ( $m_{\text{nach\_UZ}}$ ) ließ sich das Volumen des Zellfiltrates berechnen, da die spezifische Masse des Filtrates durch seinen wässrigen Charakter annähernd mit 1 µg/µl angenommen werden kann:

$$m_{\text{Filtrat}} [\text{mg}] \equiv m_{\text{vor\_UZ}} - m_{\text{nach\_UZ}} \quad \text{wobei: } m_{\text{Filtrat}} [\text{mg}] \cong V_{\text{Filtrat}} [\mu\text{l}]$$

Der aus dem Zusatz von 200 µl PBS vor Zentrifugation resultierende Verdünnungsfaktor ( $d_{\text{Filtrat}}$ ) errechnet sich wie folgt:

$$d_{\text{Filtrat}} = \frac{V_{\text{Filtrat}} + 200 \mu\text{l}}{V_{\text{Filtrat}}}$$

Aus dem Volumen des Filtrates, dem Verdünnungsfaktor, dem Molekulargewicht des Coxibs ( $M_{\text{Coxib}}$  [g/mol]) und der ermittelten Coxib-Konzentration im Überstand ( $\beta_{\text{Coxib\_Übst}}$  [ng/ml]) ließ sich anschließend die intrazelluläre (Stoffmengen)-Konzentration des Coxibs ( $c_{\text{Coxib\_IZ}}$ ) berechnen:

$$c_{\text{Coxib\_IZ}} [\mu\text{M}] = \frac{\beta_{\text{Coxib\_Übst}} * d_{\text{Filtrat}}}{M_{\text{Coxib}}}$$

Voruntersuchungen zeigten, dass im Filtrat eine Restproteinmenge von ca. 0,6 mg/ml vorhanden ist [215]. Des Weiteren ist bekannt, dass Coxibe eine hohe Proteinbindung aufweisen (vgl. Tab. 1-3). Deshalb kann die durch die vereinfachte Präparationstechnik ermittelte intrazelluläre Coxib-Konzentration nicht exakt als die freie intrazelluläre Konzentration bezeichnet werden, da sie sich dieser nur annähert. Es war daher weniger die Bestimmung von absoluten Konzentrationen von Bedeutung, sondern es sollte vielmehr durch identische Protokollführung ein Vergleich der intrazellulären Konzentration innerhalb der Gruppe der Coxibe erfolgen.

### 2.2.8.2 Bestimmung der Coxib-Konzentration in löslicher Fraktion und Membranfraktion

Zur getrennten Analyse der Coxib-Konzentrationen in der löslichen Fraktion und in der Membranfraktion wurden HCT-116-Zellen verwendet. Zur Membranfraktion zählen nach der hier beschriebenen Methode neben der Plasmamembran auch die Zellkerne, Mitochondrien sowie Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparates. 24 h nach dem Aussäen der Zellen wurde diese mit steigenden Coxib-Konzentrationen (5 - 60  $\mu\text{M}$ ) für 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen durch Einwirkung von Trypsin-EDTA und die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. Nach dem Waschen mit PBS und Zentrifugieren (500x g, 2 min) wurden die Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert, durch Ultraschalleinwirkung (3 x 12 Pulse, 30 %, Stufe 3) homogenisiert und der Ultrazentrifugation zugeführt (40000x g, 2 h, 20 °C). Anschließend erfolgte zur Extraktion der Coxibe eine Verdünnung des Überstandes mit Acetonitril (1:1). Dieser entsprach der löslichen Fraktion der Zelle. Das Pellet, welches der Membranfraktion der Zelle entspricht, wurde wiederum in 100  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert und zur Coxib-Extraktion analog mit Acetonitril (1:1) verdünnt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 10000x g erfolgte die Quantifizierung der Coxibe aus dem Überstand mittels LC-MS/MS [213, 214].

### 2.2.8.3 Bestimmung von Coxib-Membran-Interaktionen mittels $^1\text{H}$ MAS-NOESY NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der  $^1\text{H}$  MAS-NOESY NMR-Spektroskopie sollte untersucht werden, ob zwischen Coxiben und Membranen Interaktionen auftreten. Die  $^1\text{H}$  NOESY NMR ist eine zweidimensionale NMR-Methode, die auf Wechselwirkungen von Protonen durch den Raum, sogenannte dipolare Kopplungen, beruht. Dieser Effekt wird als „Nuclear Overhauser Effekt“ (NOE) bezeichnet. Die Intensität des NOE-Effekts nimmt mit  $1/r^6$  sehr schnell ab, wobei r den Abstand der Protonen kennzeichnet. Daher können nur Protonen detektiert werden, die weniger als 5 Å voneinander entfernt sind. Treten Wechselwirkungen zwischen einer Substanz mit der Zellmembran auf, so müssen diese im engen Kontakt zueinander stehen, so dass NOE-Signale detektiert werden können.

1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (POPC) diente im Versuchsaufbau als Baustein der Modelmembran. POPC und das entsprechend untersuchte Coxib (jeweils 10 mg) wurden getrennt in 2 ml einer Chloroform/Methanol-Mischung (1:1) gelöst und die Ansätze im molaren Verhältnis 10:2 von Coxib zu Lipid gemischt. Das Entfernen des Lösungsmittels erfolgte über Nacht durch Lyophilisation. Die Proben wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und durch 5 - 10 Einfrier- und Auftauzyklen im flüssigen Stickstoff und im Wasserbad (25 °C) multilamellare Vesikel präpariert. Die so entstandene gelartige Probe wurde der NMR-Analytik zugeführt. Alle NMR-Experimente einschließlich der Probenvorbereitung wurden von Dr. Jakob J. Lopez in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Glaubitz (Institut für Biophysikalische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt.

#### 2.2.8.4 Bestimmung der Membranintegrität und Membranfluidität

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien (TMA-DPH) können dynamische Vorgänge in Lipidmembranen untersucht werden. TMA-DPH zeigt eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute in Phospholipidmembranen und nur eine sehr geringe in wässriger Umgebung [216]. Der Fluorophor ist lipophil mit einer kationischen Gruppe und lagert sich deshalb überwiegend in der Nähe von der Phospholipid-Kopfgruppen der Membran ein. TMA-DPH lässt somit Aussagen über die Beweglichkeit der ihn umgebenden Regionen der Zellmembran zu und hat sich zur Untersuchung der Membranfluidität in lebenden Zellen durch Messung der Fluoreszenzanisotropie etabliert. Des Weiteren können mit Hilfe einfacher Fluoreszenzmessungen Aussagen über die Membranintegrität getroffen werden, da Beeinträchtigungen der Aufnahme des TMA-DPH in die Membran veränderte Fluoreszenzintensitäten hervorrufen.

##### **Fluorimetrische Bestimmung der Einlagerung von TMA-DPH in die Membran nach Coxib-Behandlung:**

HCT-116-Zellen wurden in schwarzen 96-well Microtiterplatten ausgesät (5000 Zellen/Well) und 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, anschließend vom Medium befreit und einmal mit 100 µl PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl PBS folgte eine Vorinkubation mit den Coxiben in verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 20 µM) für 10 min. In einer zweiten Platte (ohne Zellen) wurden die jeweiligen Coxiblösungen nochmals vorgelegt und 0,5 µM TMA-DPH versetzt. Nach der Vorinkubation der Zellen wurde das PBS abgesaugt und die Reaktionsansätze der 2. Platte zügig und gleichmäßig mittels Mehrkanal-Transferpipette überführt. Die Fluoreszenz des TMA-DPH wurde zum Zeitpunkt Null und nach 15 min mittels SpectraFluor Plus<sup>®</sup>-Instrument und X-Fluor<sup>®</sup>-Software (Tecan, Crailsheim) bestimmt, wobei die Anregungswellenlänge 360 nm und die Emissionswellenlänge 450 nm betrug. Die Berechnung der Fluoreszenzintensität erfolgte als Endpunktmessung, indem die Differenz zwischen Zeitpunkt Null und nach 15 min ermittelt wurde. Die Fluoreszenzintensität der mit DMSO- oder Coxib-behandelten Zellen wurde mit der Fluoreszenzintensität von unbehandelten Zellen (PBS mit TMA-DPH) verglichen.

##### **Fluoreszenzanisotropie-Messung zur Bestimmung der Membranfluidität nach Coxib-Behandlung:**

HCT-116-Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen mit den jeweiligen Coxib in einer Konzentration von 80 µM bzw. 100 µM (Blindwert mit DMSO) für 30 min im Brutschrank inkubiert, anschließend in PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA abgelöst. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit 5 ml HBSS-Puffer (Gibco, Paisley, Schottland) und Zentrifugation (1300x g, 3 min, RT). Die Zellzahl wurde nach dem ersten Waschschrift bestimmt, wobei  $7,5 \times 10^5$  Zellen in 500 µl HBSS für die Anisotropiemessung verwendet wurden. Die Zellsuspension (500 µl) wurde mit 500 µl einer TMA-DPH-Lösung (4 µM in HBSS) durch vortexen gemischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Messung

---

der Stady-State Anisotropie erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm (Spaltbreite 4 mm) mittels SLM Aminco Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Gunter Eckert, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe-Universität Frankfurt), wobei die Anisotropie der DMSO-behandelten Zellen mit der Anisotropie der Coxib-behandelten Zellen verglichen wurde.

### **2.2.9 Statistik**

Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel<sup>®</sup> XP, GraphPad Prism 4 und SPSS<sup>®</sup> 12.01 für Windows. Die Versuchsergebnisse wurden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mit dem Softwareprogramm ImageJ 1.4.1 mit der Angabe der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Mittelwerte (SD). Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit Hilfe eines sigmoidalen Emax-Modells berechnet. Die Ermittlung der Signifikanz p erfolgte mittels univariater Analyse der Varianz (ANOVA) und T-Test unter Verwendung einer Bonferroni a-Korrektur für multiple Vergleiche ( $\alpha = 0,05$ ). Sie wurde in den graphischen Darstellungen wie folgt gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ .



## 3 Ergebnisse

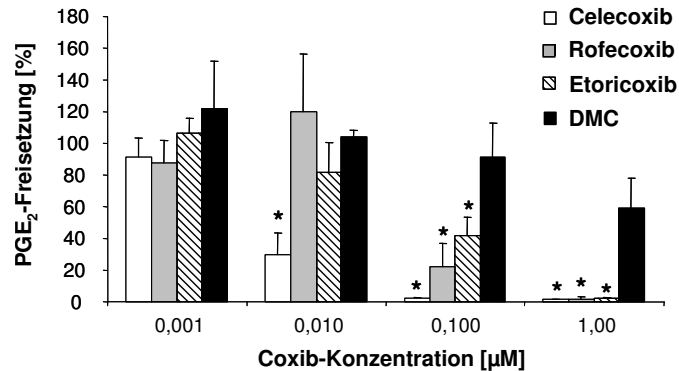
### 3.1 Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch DMC in humanen Krebszellen

Zahlreiche Studien belegen antikarzinogene Effekte sowohl von klassischen NSAIDs als auch von selektiven COX-2-Inhibitoren, wobei Celecoxib eine herausragende Stellung einnimmt und als einziges NSAID zur Behandlung der familiären adenomatösen Polyposis den Zulassungsstatus erreicht hat [165]. Neuere Studien konnten zeigen, dass sowohl COX-abhängige als auch COX-unabhängige Effekte für die antikarzinogenen Eigenschaften verantwortlich sind [160, 175]. Das Celecoxib-Strukturanalogen Dimethylcelecoxib (DMC) besitzt laut bisherigen Untersuchungen neben einer Reihe von antikarzinogenen Effekten keinen Einfluss auf die Cyclooxygenasen und wird deshalb meist als Kontrollsubstanz eingesetzt, um zwischen COX-abhängigen und COX-unabhängigen tumorhemmenden Eigenschaften zu unterscheiden [192]. Um DMC als eine solche Vergleichsubstanz verwenden zu können, ist es von großer Bedeutung zu zeigen, dass diese Substanz nicht nur keinen Einfluss auf die COX-Aktivität sondern auch keinen Einfluss auf die Prostanoidsynthese im Allgemeinen besitzt. Dies gilt besonders für das PGE<sub>2</sub>, welches vermehrt in verschiedenen Tumorgeweben gebildet wird und eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung besitzt [42, 103, 168, 174].

#### 3.1.1 DMC hemmt die PGE<sub>2</sub>-Synthese in humanen Krebszellen

In einem ersten Experiment wurde zunächst der Einfluss von DMC auf die PGE<sub>2</sub>-Freisetzung in humanen HCA-7-Zellen (kolorektales Adenokarzinom) im Vergleich zu den COX-2-Inhibitoren Celecoxib, Rofecoxib und Etoricoxib untersucht. Aufgrund der Eigenschaft von HCA-7-Zellen, basal viel PGE<sub>2</sub> zu bilden (Abb. 3-2 A), dienten diese zunächst als Zellmodell. Die Zellen wurden dazu für 30 min mit den Substanzen in steigenden Konzentrationen vorinkubiert (0,001 - 1 µM) und im Anschluss das Medium gewechselt. Dieser Schritt war notwendig, um das bereits gebildete PGE<sub>2</sub> zu entfernen, welches möglicherweise vor der vollen Wirkungsentfaltung der potentiellen Inhibitoren entstehen kann. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit frischem Medium und den entsprechenden Inhibitoren für 2 h inkubiert. Die Quantifizierung des gebildeten PGE<sub>2</sub> erfolgte aus dem zentrifugierten Medium mittels PGE<sub>2</sub>-EIA. Wie in Abb. 3-1 dargestellt, bestätigte der Versuch deutlich die PGE<sub>2</sub>-Hemmung der untersuchten selektiven COX-2-Inhibitoren im nanomolaren Bereich, wobei Celecoxib bereits ab einer Konzentration von 10 nm eine signifikante Hemmung zeigte. Obwohl alle drei Substanzen ähnliche Eigenschaften im humanen COX-2-Vollblutassay aufzeigten bzw. hier Rofecoxib die stärkste Hemmwirkung besaß (IC<sub>50</sub> = 0,57 µM verglichen mit 0,87 µM und 1,1 µM für Celecoxib und Etoricoxib [145]), erwiesen sich Rofecoxib und Etoricoxib in

HCA-7-Zellen als deutlich weniger potent auf die PGE<sub>2</sub>-Hemmung. Überraschenderweise konnte DMC, wenn auch vergleichsweise weniger stark als die COX-2-Inhibitoren, die PGE<sub>2</sub>-Synthese deutlich hemmen. 1 µM DMC reduzierte die PGE<sub>2</sub>-Produktion in HCA-7-Zellen bereits um ca. 40 %.

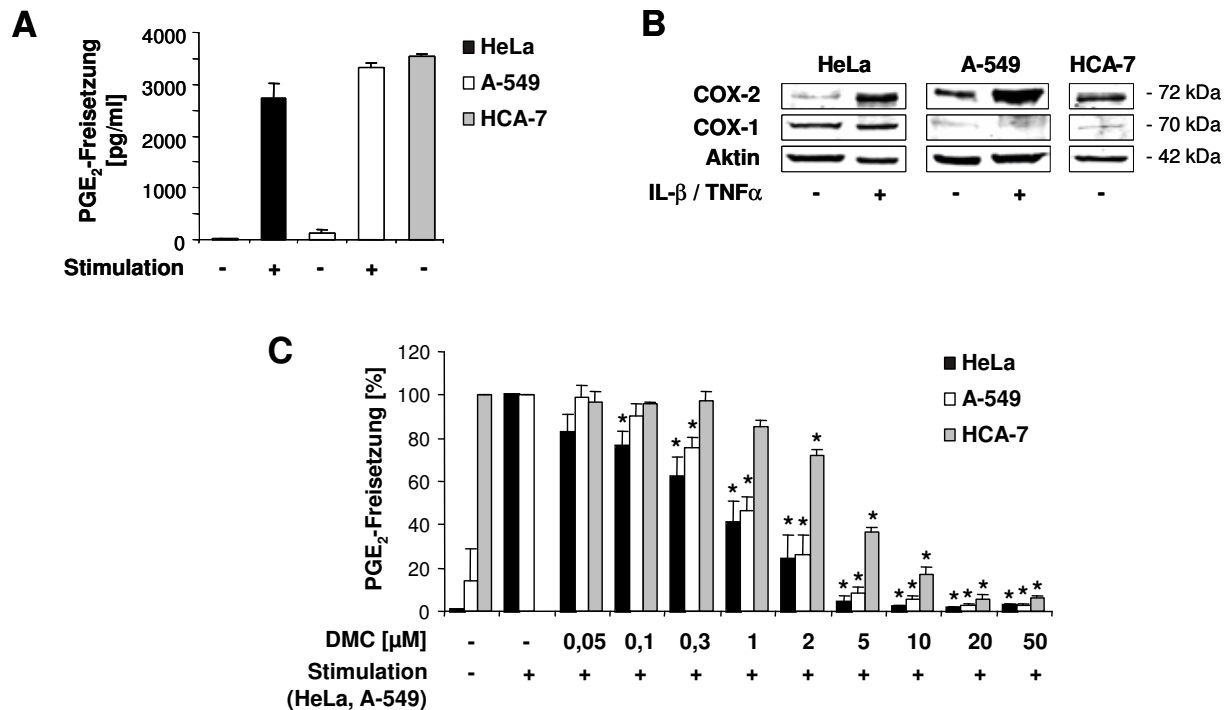


**Abb. 3-1:** Prozentuale PGE<sub>2</sub>-Freisetzung in das Zellmedium von HCA-7-Zellen in Gegenwart ansteigender Coxib-Konzentrationen (0,001 - 1 µM). Die Zellen wurden zunächst 30 min vorinkubiert und die Coxibe nach einem Mediumwechsel erneut zugesetzt. Die gebildete PGE<sub>2</sub>-Menge wurde nach 2 h Inkubation im Zellmedium mittels PGE<sub>2</sub>-EIA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede in der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle wurden mit einem Stern gekennzeichnet (\*p < 0,05).

Die von DMC gezeigte unerwartete Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in HCA-7-Zellen im niedrigen mikromolaren Bereich darf in Zellkulturversuchen nicht vernachlässigt werden und sollte im folgenden Experiment genauer untersucht werden. Es war der Nachweis zu erbringen, ob die PGE<sub>2</sub>-Hemmung eine Ausnahme in HCA-7-Zellen darstellt oder generell in Krebszelllinien vorhanden ist. Dazu wurden mit den HeLa- (Zervixkarzinom) und A-549-Zellen (Lungenadenokarzinom) zwei weitere humane Krebszellen in das Experiment aufgenommen. Zunächst erfolgte in den drei Zelllinien in Abhängigkeit von einer Zytokininkubation die Detektion der PGE<sub>2</sub>-Produktion mittels PGE<sub>2</sub>-EIA (Abb. 3-2 A) und die Ermittlung der Expression der COX-Isoenzyme durch Western Blot-Analyse im Gesamtproteinextrakt (Abb. 3-2 B). Die verwendeten Zelllinien wiesen ein unterschiedliches COX-2-Expressionsmuster auf und besaßen somit auch verschiedene Mengen an basal gebildeten PGE<sub>2</sub>. Zur Stimulation mussten HeLa-Zellen mit IL-1β (1 ng/ml) und TNFα (5 ng/ml) und A-549-Zellen nur mit IL-1β (2 ng/ml) für 16 h behandelt werden. Die Zytokininkubation führte in beiden Zellarten zu einer gesteigerten PGE<sub>2</sub>-Synthese, was auf die Induktion der COX-2-Expression und die damit verbundene vermehrte COX-2-Aktivität zurückzuführen ist. Für HCA-7-Zellen konnte basal schon eine große Menge an COX-2-Protein nachgewiesen werden, so dass diese schon unstimuliert viel PGE<sub>2</sub> bildeten (Abb. 3-2 A und B). Das COX-1-Enzym zeigte nur in HeLa-Zellen eine ersichtliche Expression und blieb durch proinflammatorische Zytokine unbeeinflusst (Abb. 3-2 B).

Anschließend sollten alle drei Zelllinien im Hinblick auf die mögliche Beeinflussung der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch DMC untersucht werden. Dazu wurden HeLa- und A-549-Zellen zeitgleich zur

Stimulation mit steigenden DMC-Konzentrationen für 16 h inkubiert und danach die Menge an gebildeten PGE<sub>2</sub> im Medium mittels PGE<sub>2</sub>-EIA bestimmt. In beiden Fällen zeigte DMC eine konzentrationsabhängige Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese, so dass IC<sub>50</sub>-Werte von  $0,64 \pm 0,15 \mu\text{M}$  (HeLa) und  $0,83 \pm 0,11 \mu\text{M}$  (A-549) ermittelt werden konnten (Abb. 3-2 C). Die Vorinkubation der HCA-7- Zellen mit DMC erfolgte wie schon im ersten Versuch unstimuliert für 30 min zum vollständigen Entfernen des PGE<sub>2</sub>. Nach einem Mediumwechsel wurde DMC erneut hinzugefügt und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in HCA-7-Zellen konnte erneut bestätigt werden und ergab einen kalkulierten IC<sub>50</sub>-Wert von  $3,08 \pm 0,05 \mu\text{M}$  (Abb. 3-2 C).



**Abb. 3-2:** (A) Absolute PGE<sub>2</sub>-Freisetzung in das Zellmedium von HeLa-, HCA-7 und A-549-Zellen nach Inkubation ohne (HCA-7) bzw. mit Zytokinen (HeLa: 1 ng/ml IL-1 $\beta$  + 5 ng/ml TNF $\alpha$ ; A-549: 2 ng/ml IL-1 $\beta$ ). Die gebildete PGE<sub>2</sub>-Menge wurde nach 16 h Inkubation im Zellmedium mittels PGE<sub>2</sub>-EIA gemessen. (B) Western Blot-Analyse der COX-1- und COX-2-Expression in humanen Krebszellen. Der Gesamtproteinextrakt wurde für HeLa- und A-549 unstimuliert und stimuliert untersucht, HCA-7-Zellen dagegen nur unstimuliert. Die  $\beta$ -Aktin-Expression diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente. (C) Prozentuale PGE<sub>2</sub>-Freisetzung in das Zellmedium von stimulierten HeLa- und A-549-Zellen sowie unstimulierten HCA-7-Zellen in Gegenwart von entweder 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder ansteigenden DMC-Konzentrationen (0,05 - 50  $\mu\text{M}$ ). Die gebildete PGE<sub>2</sub>-Menge wurde nach 16 h Inkubation im Zellmedium mittels PGE<sub>2</sub>-EIA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 - 6 unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede in der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle wurden mit einem Stern gekennzeichnet (\* $p < 0,05$ ).

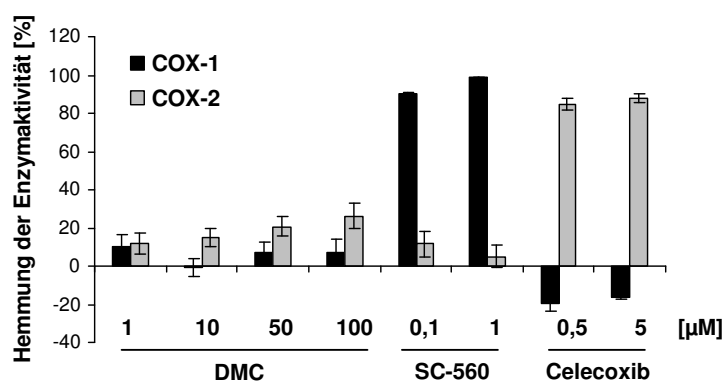
Zusammenfassend konnte somit nachgewiesen werden, dass der hemmende Effekt von DMC auf die PGE<sub>2</sub>-Produktion keinen Einzeleffekt für HCA-7-Zellen darstellt, sondern für alle drei untersuchten Zelllinien bestätigt wurde. Diese Auswirkung ist somit vermutlich auch auf andere PGE<sub>2</sub>-produzierende Zelllinien übertragbar.

### 3.1.2 DMC zeigt keine Beeinflussung der COX-Isoenzyme im niedrigen mikromolaren Bereich

Aufgrund der unerwarteten Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch DMC mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 0,6 µM und 3,1 µM in drei verschiedenen humanen Krebszelllinien sollte an dieser Stelle der Beleg erbracht werden, dass DMC sowohl auf die Aktivität als auch auf die Expression der COX-Isoenzyme keinen Einfluss besitzt.

#### 3.1.2.1 In vitro COX-Inhibitor-Screening-Assay

Mit Hilfe eines COX-Inhibitor-Screening-Assays erfolgte die Untersuchung der Wirkung von DMC auf die COX-Aktivität, wobei gereinigtes COX-1-Enzym vom Schaf und humanes rekombinantes COX-2-Enzym verwendet wurde. Dabei verstoffwechseln die Cyclooxygenasen die während des Assays zugesetzte Arachidonsäure zum instabilen PGH<sub>2</sub>. Dieses wurde durch den Zusatz von Zinnchlorid (SnCl<sub>2</sub>) und Salzsäure zu verschiedenen Prostaglandinen umgesetzt, welche durch LC-MS/MS-Analyse quantifiziert wurden. Wie Abb. 3-3 zeigt, hemmte DMC sowohl die COX-1- als auch die COX-2-Aktivität nur im geringen Ausmaß. Erst Konzentrationen ab 50 µM konnten eine Hemmung der COX-2 von ca. 20 % hervorrufen. Als Referenzsubstanzen dienten der selektive COX-1-Hemmer SC-560 (*in vitro*) und Celecoxib als selektiver COX-2-Hemmer. So zeigten 0,1 µM SC-560 bereits eine Hemmung der COX-1-Aktivität von mehr als 90 %. Gleiches wurde für Celecoxib im Falle der COX-2 in einer Konzentration von 0,5 µM erreicht.



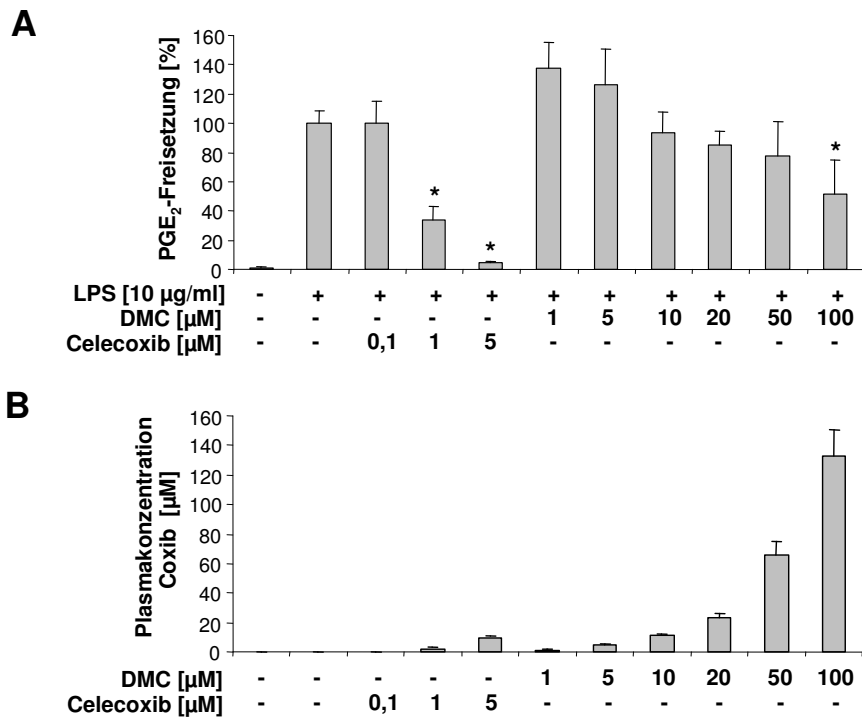
**Abb. 3-3:** COX-Inhibitor-Screening-Assay: Dargestellt ist die Hemmung der COX-1- und COX-2-Enzymaktivität. Die Referenzsubstanzen SC-560 (COX-1-Inhibitor) und Celecoxib (COX-2-Inhibitor) zeigten eine Hemmung der jeweiligen Enzymaktivität von mehr als 90 % in Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,5 µM. Der Einfluss von DMC auf beide Isoenzyme wurde in Konzentrationen von 1 - 100 µM getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten.

### 3.1.2.2 COX-2-Vollblutassay für DMC und Celecoxib

Da der verwendete Screening-Assay nur ein artifizielles System darstellt und deshalb auch nur zu einer Voruntersuchung geeignet ist, sollte mit dem humanen COX-2-Vollblutassay ein System verwendet werden, das den pharmakologischen Abläufen *in vivo* sehr nahe kommt. Die in den Krebszelllinien basal vorhandene (HCA-7) oder durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen hervorgerufene PGE<sub>2</sub>-Produktion (HeLa, A-549) ist aufgrund des Expressionsmusters der COX-Isoenzyme überwiegend der COX-2-Expression zuzuschreiben. Aus diesem Grund wurde an dieser Stelle explizit der COX-2-Vollblutassay durchgeführt.

Durch die Inkubation von heparinisierten Vollblut mit bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS) erreicht man eine Stimulation der COX-2-Expression und somit einen Anstieg in der Prostaglandinsynthese, wobei die COX-2 im Vollblut überwiegend in Monozyten exprimiert wird [212]. Jeweils 500 µl des heparinisierten Blutes wurden dazu mit DMC in steigenden Konzentrationen (1 - 100 µM) versetzt und mit LPS (10 µg/ml) für 20 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Lagerung auf Eis und Zentrifugation bei 4 °C konnte das gebildete PGE<sub>2</sub> nach einer Festphasenextraktion des erhaltenen Plasmaüberstandes durch LC-MS/MS-Analytik quantifiziert werden (2.2.5.2). Als Positivkontrolle wurde stimuliertes Blut ohne Inhibitorenzusatz verwendet, was die maximal mögliche Menge an PGE<sub>2</sub> darstellte. Unstimuliertes Blut ohne Inhibitor diente als Negativkontrolle. Als Vergleichssubstanz wurde Celecoxib in den Konzentrationen von 0,1µM, 1 µM und 5 µM untersucht. Wie Abb. 3-4 A zeigt, konnte für Celecoxib eine deutliche Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Freisetzung und damit eine Hemmung der COX-2-Aktivität im humanen Vollblutassay bestätigt werden. IC<sub>50</sub>-Angaben aus der Literatur von 0,19 µM [141] und 0,87 µM [140] stimmen mit den erhaltenen Werten überein, wobei sich eine 50 %ige Enzymhemmung bei einer Konzentration kleiner 1 µM abzeichnete. Des Weiteren konnte der Beleg erbracht werden, dass DMC erst ab Konzentrationen von 100 µM die COX-2-Aktivität im verwendeten Assay signifikant hemmte. Eine 50 %ige Inhibierung der COX-2-Aktivität wurde in den untersuchten Konzentrationen nicht erreicht, so dass hierzu Konzentrationen größer 100 µM nötig waren (Abb. 3-4 A). Zeitgleich wurden zur Kontrolle aus den Plasmaüberständen die entsprechenden Konzentrationen der Coxibe mittels LC-MS/MS quantifiziert [213]. Wie Abb. 3-4 B verdeutlicht, waren die eingesetzten Konzentrationen an DMC und Celecoxib mit den tatsächlich im Plasma gemessenen Konzentrationen vergleichbar.

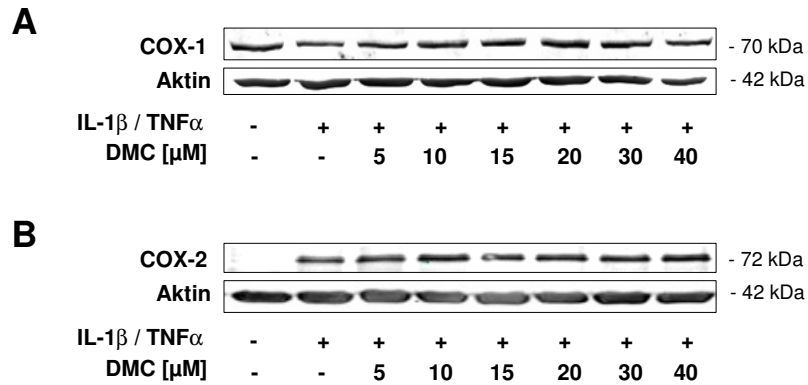
Sowohl die Ergebnisse aus dem COX-Screening-Assay als auch die Ergebnisse aus dem COX-2-Vollblutassay lassen darauf schließen, dass DMC erst in Konzentrationen größer 100 µM einen relevanten Einfluss auf die COX-2-Aktivität ausübt. Die bisherigen Literaturangaben konnten somit bestätigt werden: DMC ist kein COX-2-Inhibitor im niedrigen mikromolaren Bereich [192].



**Abb. 3-4:** (A) Humaner COX-2-Vollblutassay für DMC und Celecoxib. Frisches heparinisiertes Vollblut wurde mit LPS (10 µg/ml) stimuliert und mit steigenden Konzentrationen von Celecoxib (0,1 - 5 µM) oder DMC (1 - 100 µM) inkubiert. Nach dem Zentrifugieren erfolgte die Quantifizierung des gebildeten PGE<sub>2</sub> aus dem Überstand (Plasma) mittels LC-MS/MS. Die Daten stellen die Mittelwerte ± SD von 2 unabhängigen Experimenten dar (n=6). (B) Parallel dazu wurden aus den Plasmaüberständen die entsprechenden absoluten Coxib-Konzentrationen ebenfalls mittels LC-MS/MS quantifiziert. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen den Mittelwerten ± SD von 2 unabhängigen Experimenten (n=6).

### 3.1.2.3 COX-1- und COX-2-Proteinexpression nach Behandlung mit DMC

Zusätzlich sollte für DMC auch eine Beeinflussung der Proteinexpression der COX-Isoenzyme ausgeschlossen werden. Dazu wurden HeLa-Zellen in Zellkulturschalen ausgesät, nach 24 h mit IL-1β und TNFα stimuliert und zeitgleich mit verschiedenen DMC-Konzentrationen für 16 h inkubiert. Nach Gewinnung des Gesamtproteinextraktes konnte die COX-1- und COX-2-Proteinexpression mittels Western Blot analysiert werden. Die COX-1 zeigte eine Expression in HeLa-Zellen, welche von DMC in ihrer Intensität nicht beeinflusst wurde (Abb. 3-5 A). Die COX-2 hingegen zeigte durch Stimulation einen starken Expressionsanstieg. Auch im Hinblick auf die COX-2-Proteinexpression nach Zytokineninkubation zeigte DMC keine Wirkung. Das induzierte COX-2-Protein blieb auch in Gegenwart von steigenden DMC-Konzentrationen unverändert stark erhalten (Abb. 3-5 B). Zusammengefasst kann somit ausgeschlossen werden, dass DMC im niedrigen mikromolaren Bereich die COX-Isoenzyme in ihrer Aktivität oder Expression beeinflusst.

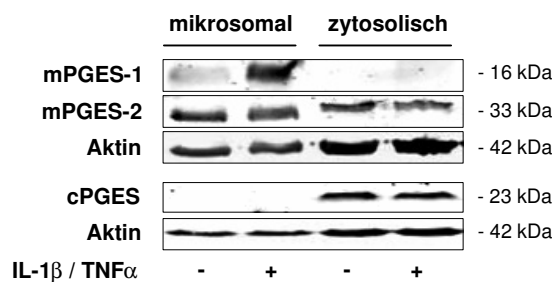


**Abb. 3-5:** Western Blot-Analyse der COX-1- (A) und COX-2-Expression (B) in stimulierten (IL-1 $\beta$  = 1 ng/ml, TNF $\alpha$  = 5 ng/ml) HeLa-Zellen. Die Zellen wurden zeitgleich entweder mit 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder ansteigenden DMC-Konzentrationen (5 - 40  $\mu$ M) für 16 h inkubiert, 50  $\mu$ g des Gesamtproteinextraktes elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge an COX-1 und COX-2 detektiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

### 3.1.3 Einfluss von DMC auf die Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthasen

Nachdem gezeigt wurde, dass DMC erst in Konzentrationen größer 100  $\mu$ M die COX-2-Aktivität sichtlich hemmt (3.1.2), jedoch *in vitro* eine deutliche PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung in Krebszellen bewirkte (3.1.1), wurden die Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthasen (PGES) als mögliche molekulare Zielproteine für DMC in Betracht gezogen. Die PGES verstoffwechseln das durch die COX-Isoenzyme freigesetzte PGH<sub>2</sub> spezifisch zu PGE<sub>2</sub>.

In allen nachfolgenden Versuchen wurde, soweit nicht anders angegeben, das HeLa-Zellsystem als Testmodell verwendet. Zunächst sollte der Status der Proteinexpression der PGE<sub>2</sub>-Synthasen untersucht werden. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der PGE<sub>2</sub>-Synthasen in der Zelle (1.2.3) erfolgte dies durch Isolation der cytosolischen und mikrosomalen Fraktion aus unstimulierten und mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  für 16 h stimulierten HeLa-Zellen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde der Expressionsstatus der mPGES-1, mPGES-2 und cPGES mit den entsprechenden polyklonalen Antikörpern (2.1.7) analysiert. Alle drei PGE<sub>2</sub>-Synthasen konnten in HeLa-Zellen detektiert werden, wobei die cPGES nur im Cytosol zu finden war und durch proinflammatorische Zytokine nicht reguliert wurde. Die mPGES-2 konnte sowohl im Cytosol als auch in der mikrosomalen Fraktion gefunden werden und zeigte ebenfalls keine Regulation nach Zytokininkubation. Die mPGES-1 hingegen, welche basal nur schwach in der mikrosomalen Fraktion exprimiert war, zeigte nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  einen starken Anstieg der Proteinexpression in dieser Fraktion (Abb. 3-6).



**Abb. 3-6:** Western Blot-Analyse von mPGES-1, mPGES-2 und cPGES in der mikrosomalen und zytosolischen Fraktion von HeLa-Zellen nach einer Inkubationszeit von 16 h. Die Zellen wurden dabei unstimuliert oder stimuliert analysiert (IL-1 $\beta$  = 1 ng/ml, TNF $\alpha$  = 5 ng/ml).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

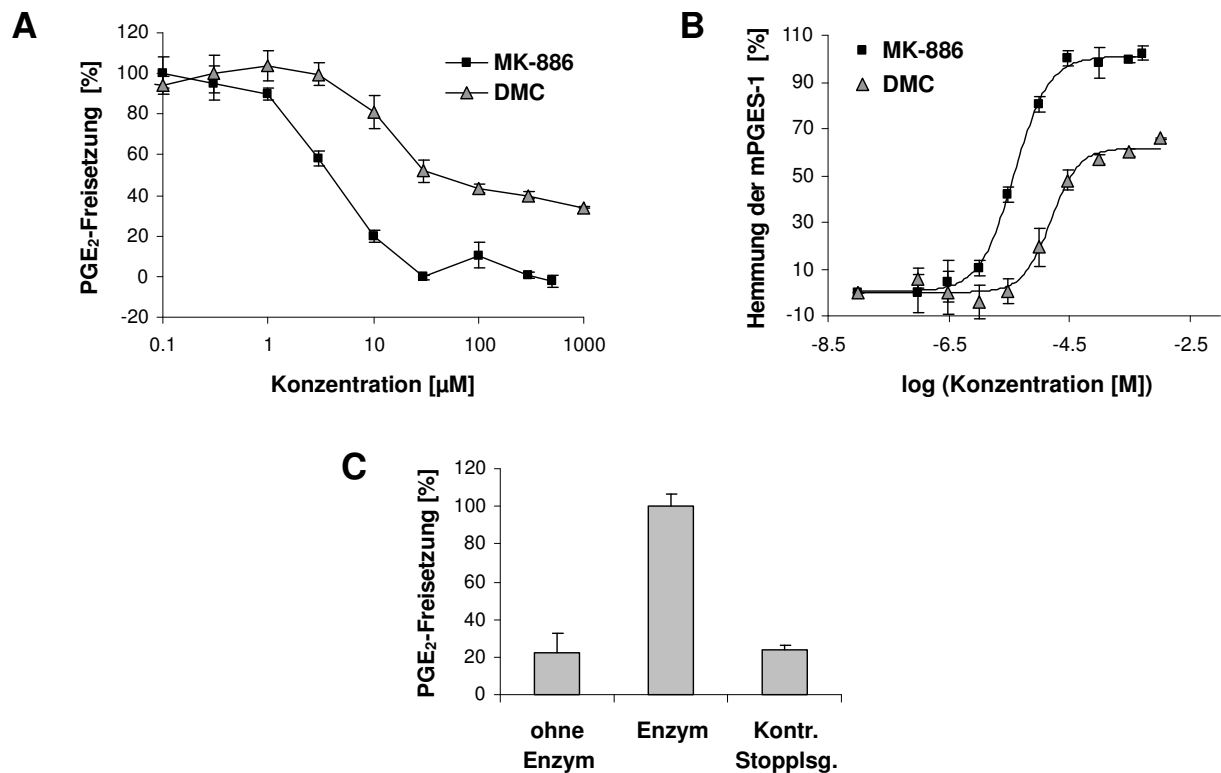
Somit konnte sowohl für die COX-2 als auch für die mPGES-1 in HeLa-Zellen eine gesteigerte Proteinexpression nach Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine funktionelle Kopplung zwischen beiden Enzymen vorliegt und dies nach Zytokinbehandlung zu einer gesteigerten Prostaglandinsynthese führt [114]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die in HeLa-Zellen durch Stimulation hervorgerufene gesteigerte PGE<sub>2</sub>-Synthese überwiegend über die Enzyme COX-2 und mPGES-1 vermittelt wird.

### 3.1.3.1 In vitro mPGES-1-Aktivitätsassay für DMC und MK-886

Eine von DMC hervorgerufene Hemmung der mPGES-1-Aktivität in HeLa-Zellen hätte eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese zur Folge. Die mPGES-1 ist als membrangebundenes Enzym überwiegend in der Kernmembran und im Endoplasmatischen Retikulum exprimiert, so dass zur Untersuchung des Einflusses von DMC auf die mPGES-1-Aktivität zunächst die mikrosomale Fraktion aus HeLa-Zellen isoliert wurde, welche diese Bestandteile enthält. Durch eine zuvor erfolgte Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  für 16 h wurde die mPGES-1 in dieser Fraktion angereichert und als Ausgangsmaterial für den *in vitro* mPGES-1-Aktivitätsassay verwendet. Es folgte eine Inkubation der Proteinfraction in einem Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (2.1.5) mit verschiedenen DMC- bzw. MK-886-Konzentrationen in Gegenwart von Glutathion [110]. Nach Zugabe des Substrates PGH<sub>2</sub> wurde dieses durch die Aktivität der mPGES-1 in PGE<sub>2</sub> umgewandelt. Aufgrund verschiedener Eigenschaften des Substrates und des Enzymes musste der Assay auf Eis (ca. 0 °C) durchgeführt und die Reaktion nach 1 min mit FeCl<sub>2</sub>-Zitronensäure-Lösung abgestoppt werden. PGH<sub>2</sub> ist eine labile Substanz, welche bei physiologischem pH-Wert und 37 °C eine Halbwertszeit von ca. 5 min aufweist und in eine Mischung von PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub> im Verhältnis 3:1 zersetzt wird (ebenfalls geringe Menge an PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) [217, 218]. Daneben ist die Enzymkatalyse sehr schnell und bei 37 °C nicht quantifizierbar [118]. Die Stopplösung aus FeCl<sub>2</sub> und Zitronensäure wird verwendet, um nicht umgesetztes PGH<sub>2</sub> sofort nach Reaktionsbeendigung überwiegend in 12-Hydroxyheptadecatriensäure (12-HHT) umzusetzen [23]. Das gebildete PGE<sub>2</sub> konnte im Anschluss an eine Festphasenextraktion durch LC-MS/MS-Analytik quantifiziert werden (2.2.5.3). Der unspezifische mPGES-1-Inhibitor



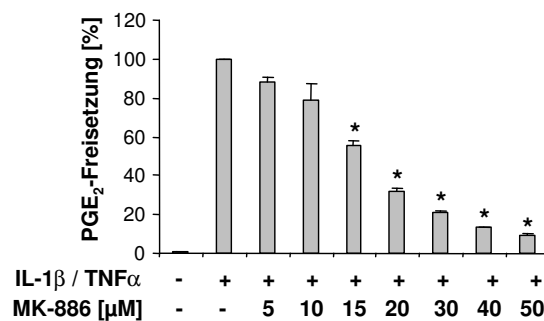
MK-886 diente als Kontrollsubstanz [116]. Für MK-886 konnte ebenfalls eine Hemmung des FLAP-Enzyms (5-Lipoxygenase aktivierendes Protein) und damit der Leukotrienbiosynthese nachgewiesen werden [219, 220]. Ein spezifischer Inhibitor der mPGES-1 war noch nicht verfügbar. Wie in Abb. 3-7 A und B dargestellt, zeigte DMC eine Hemmung der mPGES-1-Aktivität, jedoch nur bis maximal 65 % der Enzymaktivität. Im Vergleich dazu hemmte MK-886 wie erwartet die Enzymaktivität bis zu 100 %. Der kalkulierte  $IC_{50}$ -Wert von  $4,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$  für MK-886 zeigte sich mit den  $IC_{50}$ -Werten der Literatur vergleichbar, wobei Werte von  $3,2 \mu\text{M}$  für das rekombinante Enzym der Ratte und  $1,6 \mu\text{M}$  für das humane rekombinante Enzym, exprimiert in CHO-Zellen, ermittelt wurden [116, 221]. Für die mPGES-1-Hemmung von DMC bis zu einem Maximum von 65 % konnte ein  $IC_{50}$ -Wert von  $15,6 \pm 2,3 \mu\text{M}$  ermittelt werden. Damit liegt die zur Hemmung der mPGES-1-Aktivität ermittelte Konzentration von DMC im verwendeten System ca. 10-fach höher als jene Konzentration, die zur Hemmung der  $\text{PGE}_2$ -Synthese notwendig ist.



**Abb. 3-7:** *In vitro* mPGES-1-Aktivitätsassay aus der stimulierten mikrosomalen Fraktion von HeLa-Zellen. (A) 0,1 mg/ml mikrosomales Protein wurde mit verschiedenen Konzentrationen von DMC (0,1 - 1000  $\mu\text{M}$ ) oder MK-886 (0,1 - 500  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Vorhandenes mPGES-1-Enzym reduzierte zugesetztes  $\text{PGH}_2$  zu  $\text{PGE}_2$ . Eine Hemmung der Freisetzung von  $\text{PGE}_2$  kennzeichnete eine Hemmung der mPGES-1-Aktivität. (B) Durch Transformation der Hemmkurve aus (A) konnten die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt und die maximale Hemmung dargestellt werden. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM errechneten sich aus 3 - 4 unabhängigen Experimenten. (C) Kontrollversuche: ohne Enzym = Inkubation Assaypuffer mit  $\text{PGH}_2$  (Negativkontrolle); Enzym = Inkubation mikrosomale Fraktion mit  $\text{PGH}_2$  ohne Testsubstanz (Positivkontrolle); Kontrolle Stopplösung = Inkubation  $\text{PGH}_2$  mit Stopplösung und anschließend mit mikrosomaler Fraktion.

Abb. 3-7 C zeigt zusammengefasst die verwendeten Kontrollversuche, wobei zunächst die PGH<sub>2</sub>-Lösung nur mit Assaypuffer inkubiert wurde. Die hier entstandene PGE<sub>2</sub>-Menge entspricht der nichtenzymatischen Umsetzung des PGH<sub>2</sub> und wurde von der Gesamt-PGE<sub>2</sub>-Menge der Proben abgezogen. Die Inkubation der mikrosomalen Fraktion mit PGH<sub>2</sub> ohne Testsubstanz lieferte die maximale Menge an umgesetzten PGE<sub>2</sub> und entspricht somit der Positivkontrolle. In einer weiteren Kontrolle wurde PGH<sub>2</sub> vor Zugabe zur mikrosomalen Fraktion mit der Stopplösung im gleichen Verhältnis wie unter Assaybedingungen inkubiert. Dabei wurde überprüft, ob die Stopplösung in der Lage ist, die gesamte eingesetzte PGH<sub>2</sub>-Menge zu den entsprechenden Abbauprodukten (12-HHT etc.) umzusetzen.

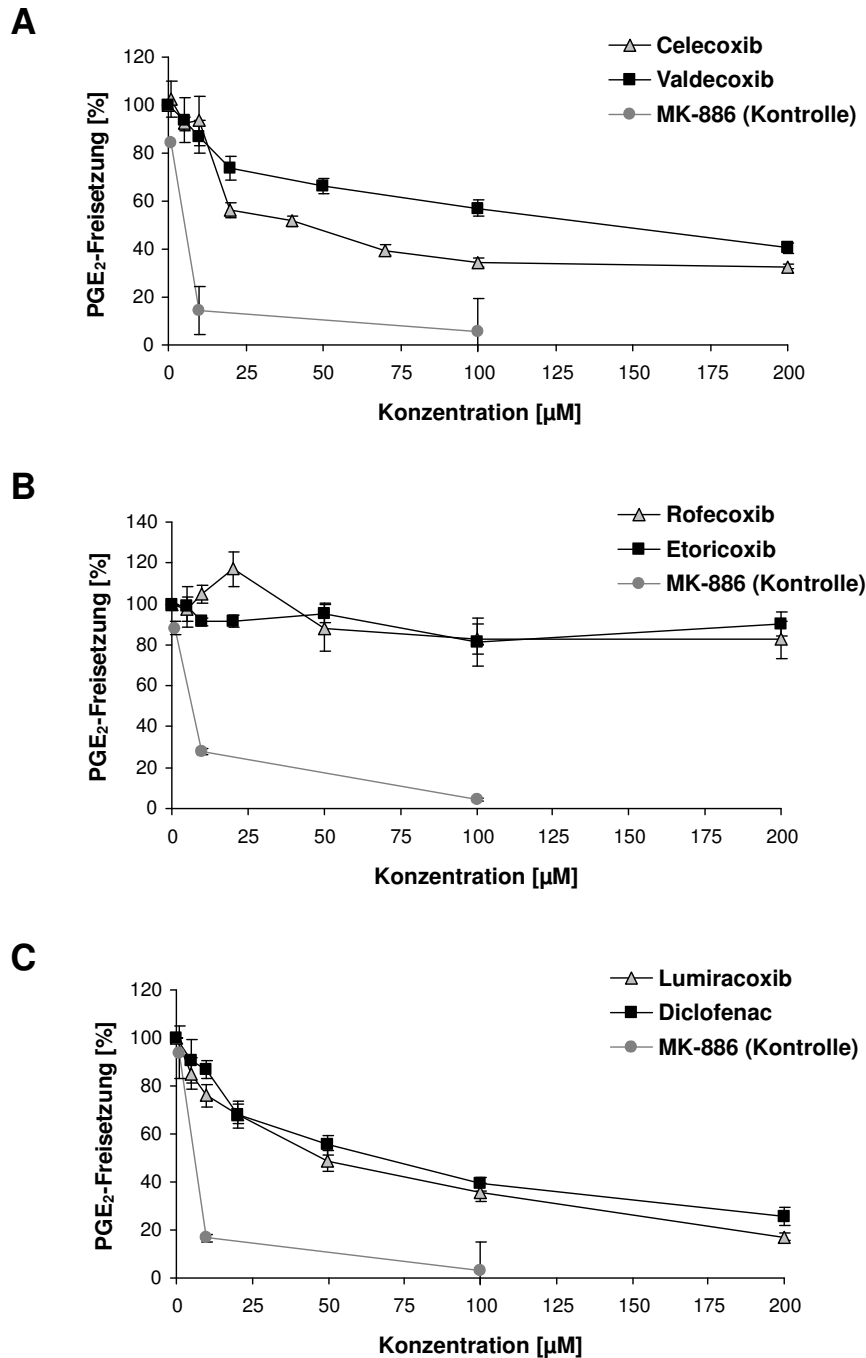
Da MK-886 ein unspezifischer mPGES-1-Inhibitor ist, sollte im folgenden Schritt überprüft werden, ob eine Inkubation von HeLa-Zellen mit steigender Konzentration dieser Substanz (5-50 µM) ebenfalls eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese hervorruft. Dazu wurden HeLa-Zellen stimuliert und zeitgleich mit MK-886 inkubiert. Die Analyse des gebildeten PGE<sub>2</sub> erfolgte nach 16 h Inkubation aus dem Zellmedium mittels PGE<sub>2</sub>-EIA. Wie Abb. 3-8 zeigt, konnte für die Referenzsubstanz MK-886 eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese bestätigt werden. Allerdings sind hierzu unter gleichen Versuchsbedingungen für MK-886 höhere Konzentrationen als für DMC notwendig. Dies bestätigte auch ein Vergleich der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte für die PGE<sub>2</sub>-Hemmung in HeLa-Zellen von 15,3 ± 0,4 µM für MK-886 und 0,64 ± 0,15 µM für DMC. Zusammengefasst kann davon ausgegangen werden, dass neben dem Einfluss von DMC auf die mPGES-1-Aktivität weitere Mechanismen zur Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese beitragen.



**Abb. 3-8:** Prozentuale PGE<sub>2</sub>-Freisetzung im Zellmedium von stimulierten (IL-1β = 1 ng/ml, TNFα = 5 ng/ml) HeLa-Zellen in Gegenwart von entweder 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder ansteigenden MK-886-Konzentrationen (5 - 50 µM). Die gebildete PGE<sub>2</sub>-Menge wurde nach 16 h Inkubation im Zellmedium mittels PGE<sub>2</sub>-EIA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von 3 unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede in der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle wurden mit einem Stern gekennzeichnet (\*p < 0,05).

### 3.1.3.2 In vitro mPGES-1-Aktivitätsassay für Coxibe und Diclofenac

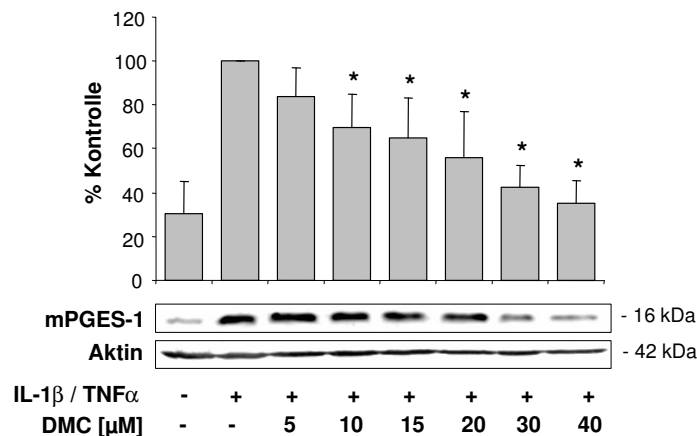
Aufgrund der Tatsache, dass DMC als Struktur analogon von Celecoxib die mPGES-1-Aktivität im verwendeten *in vitro* Assay hemmte, sollten auch die zur Verfügung stehenden selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib, Valdecoxib und Lumiracoxib am verwendeten Modell getestet werden. Da das klassische NSAID Diclofenac eine Strukturähnlichkeit mit Lumiracoxib aufweist, wurde dieses ebenfalls in den Test einbezogen. Die Durchführung des mPGES-1-Aktivitätsassays erfolgte wie unter 2.2.5.3 und 3.1.3.1 beschrieben und die verwendeten Substanzen wurden in Konzentrationen von 5 - 200  $\mu\text{M}$  untersucht. Eine Ausnahme bildete Celecoxib, da hier 1 - 200  $\mu\text{M}$  verwendet wurden. Zur Funktionskontrolle des Assays wurde in jedem Lauf MK-886 in den Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Wie Abb. 3-9 A zeigt, hemmten die beiden Coxibe mit Sulfonamid-Struktur Celecoxib und Valdecoxib die  $\text{PGE}_2$ -Freisetzung und damit die mPGES-1-Aktivität bis zu einem Maximum von ca. 70 % bzw. 60 %. Für diese maximale Hemmung konnte für Celecoxib ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $21,9 \pm 3,3 \mu\text{M}$  und für Valdecoxib ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $75,1 \pm 18,8 \mu\text{M}$  berechnet werden. Die Coxibe mit einem Methylsulfonyl-Rest Rofecoxib und Etoricoxib zeigten dagegen in den verwendeten Konzentrationen bis 200  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die mPGES-1-Aktivität (Abb. 3-9 B). Anders verhielt es sich für die Essigsäurederivate Lumiracoxib und Diclofenac. Beide hemmten fast gleichwertig die mPGES-1-Aktivität bis zu einem Maximum von ca. 80 % für die jeweils getesteten Konzentrationen. Für beide Substanzen kann es nicht ausgeschlossen werden, dass sie in Konzentrationen größer 200  $\mu\text{M}$  die Aktivität bis zu 100 % hemmen (Abb. 3-9 C). Die Ermittlung der  $\text{IC}_{50}$ -Konzentrationen zeigten ähnliche Werte von  $42,6 \pm 6,5 \mu\text{M}$  für Lumiracoxib und  $43,4 \pm 8,1 \mu\text{M}$  für Diclofenac. Anhand der gewonnenen Daten kann man ausschließen, dass die Hemmung der mPGES-1-Aktivität einen Gruppeneffekt der Coxibe darstellt. DMC und Celecoxib wiesen die vergleichsweise niedrigsten  $\text{IC}_{50}$ -Werte mit  $15,6 \mu\text{M}$  und  $21,9 \mu\text{M}$  auf, wobei bei beiden Substanzen nur eine maximale Hemmung bis ca. 65 % bzw. 70 % erreicht wurde.



**Abb. 3-9:** *In vitro* mPGES-1-Aktivitätsassay aus der stimulierten mikrosomalen Fraktion von HeLa-Zellen (**A**) für Coxibe mit Sulfonamid-Struktur Celecoxib und Valdecoxib, (**B**) für Coxibe mit Methylsulfonyl-Rest Rofecoxib und Etoricoxib und (**C**) für die Essigsäure-Derivate Lumiracoxib und Diclofenac als klassisches NSAID. 0,1 mg/ml mikrosomales Protein wurde mit verschiedenen Konzentrationen der angegebenen Testsubstanzen (5 - 200  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Vorhandenes mPGES-1-Enzym reduzierte zugesetztes  $\text{PGH}_2$  zu  $\text{PGE}_2$ . Eine Hemmung der Freisetzung von  $\text{PGE}_2$  kennzeichnete eine Hemmung der mPGES-1-Aktivität. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM errechneten sich aus 3 - 4 unabhängigen Experimenten. MK-886 diente in jedem Versuch in den Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  als Kontrollsubstanz.

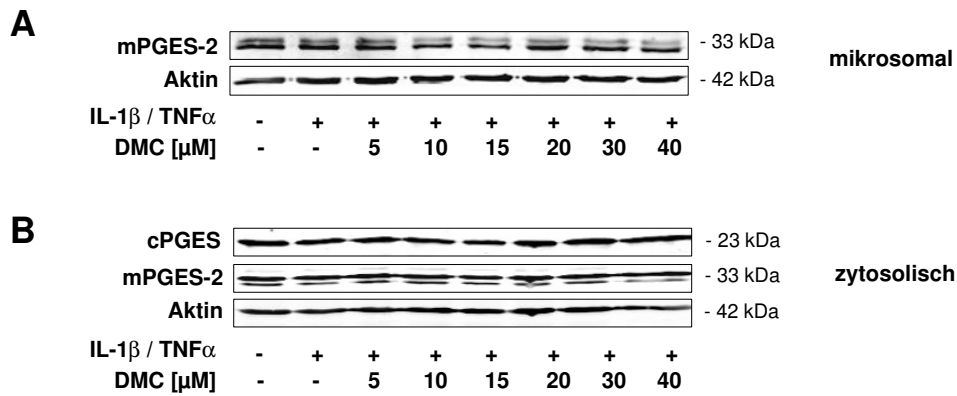
### 3.1.3.3 mPGES-1-, mPGES-2- und cPGES-Proteinexpression nach Behandlung mit DMC

Da die hemmende Wirkung von DMC auf die mPGES-1-Aktivität *in vitro* allein nicht die gezeigte PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung erklären kann, wurde auf der Suche nach weiteren Mechanismen der Einfluss von DMC auf die Proteinexpression der PGE<sub>2</sub>-Synthasen analysiert. Eine Hemmung der Proteinexpression sollte ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese bewirken. Wie schon im Kapitel 3.1.3 beschrieben, erfolgte dazu aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der PGE<sub>2</sub>-Synthasen in der Zelle eine cytosolische und mikrosomale Zellpräparation. HeLa-Zellen wurden mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimuliert und zeitgleich mit steigenden DMC-Konzentrationen für 16 h inkubiert. Durch sich anschließende Western Blot-Analyse konnte der Status der Proteinexpression detektiert werden. Abb. 3-10 zeigt die Detektion der mPGES-1-Proteinexpression in der mikrosomalen Fraktion. Steigende DMC-Konzentrationen führten zu einer deutlichen Abnahme des mPGES-1-Proteins, so dass DMC hier die durch Stimulation hervorgerufene gesteigerte Proteinexpression verhindert. Eine statistisch signifikante Abnahme der mPGES-1-Expression konnte bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M DMC nachgewiesen werden.



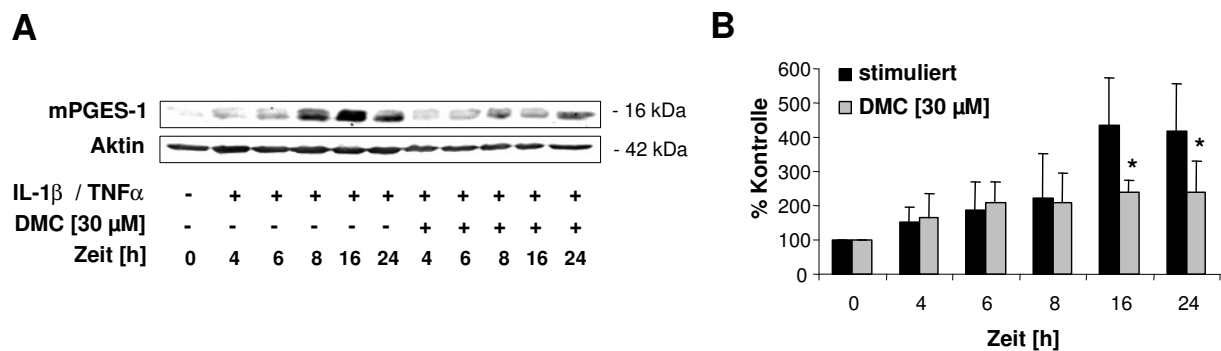
**Abb. 3-10:** Western Blot-Analyse des mPGES-1-Proteins in der stimulierten mikrosomalen Fraktion von HeLa-Zellen nach DMC-Behandlung. Die Zellen wurden zeitgleich zur Stimulation (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) entweder mit 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder ansteigenden DMC-Konzentrationen (5 - 40  $\mu$ M) für 16 h inkubiert, 50  $\mu$ g der Proteinfraktion elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge an mPGES-1 detektiert. Das Säulendiagramm zeigt die mittlere Stärke  $\pm$  SD des mPGES-1-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin. Die Bande der stimulierten HeLa-Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede durch DMC-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (\* $p < 0,05$ ). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Die Analyse der mPGES-2-Proteinexpression in der mikrosomalen und in der cytosolischen Fraktion der stimulierten HeLa-Zellen zeigte auch nach einer Behandlung mit DMC in Konzentrationen von 5 - 40  $\mu$ M keine Änderung in der Bandenintensität (Abb. 3-11 A und B). Die Proteinmenge der cPGES blieb ebenfalls unverändert (Abb. 3-11 B).



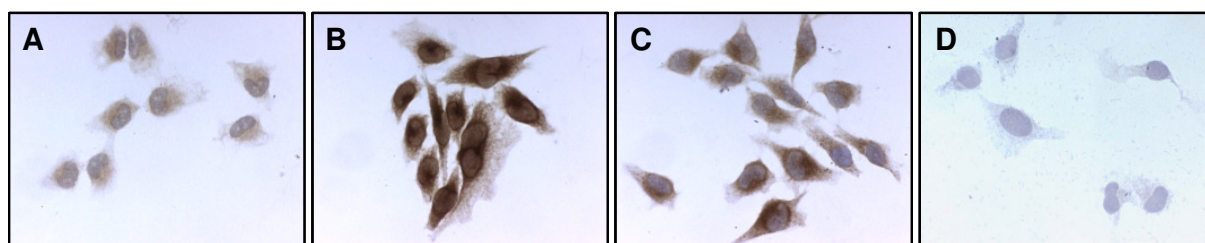
**Abb. 3-11:** Western Blot-Analyse der (A) mikrosomalen und (B) cytosolischen Proteinfraktion zur Untersuchung der Wirkung von DMC auf die cPGES und mPGES-2 in stimulierten (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) HeLa-Zellen. Die Zellen wurden zeitgleich entweder mit 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder ansteigenden DMC-Konzentrationen (5 - 40  $\mu$ M) für 16 h inkubiert, 50  $\mu$ g der jeweiligen Proteinfraktion elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge an mPGES-2 und cPGES detektiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, wie der zeitabhängige Effekt von DMC auf die mPGES-1-Proteinexpression verläuft. Dazu wurden HeLa-Zellen 4, 6, 8, 16 oder 24 Stunden ohne oder in Gegenwart von DMC mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimuliert. Um einen deutlichen Effekt durch Western Blot-Analyse detektieren zu können, wurde die hohe Konzentration von 30  $\mu$ M DMC gewählt. Auch in Abhängigkeit von der Zeit konnte DMC die durch Stimulation hervorgerufene mPGES-1-Proteininduktion unterbinden (Abb. 3-12 A), wobei erst ab Inkubationszeiten von 16 h bzw. 24 h eine signifikante Hemmung eintrat (Abb. 3-12 B).



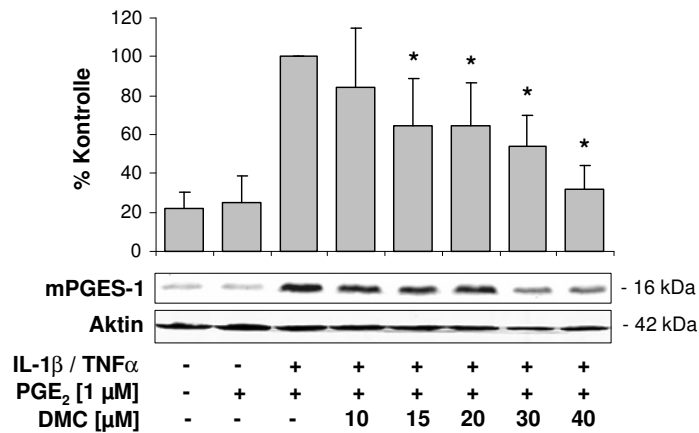
**Abb. 3-12:** Western Blot-Analyse der mikrosomalen Fraktion zur Untersuchung der zeitlichen Wirkung von DMC auf die mPGES-1 in stimulierten (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) HeLa-Zellen. (A) Die Zellen wurden für 4, 6, 8, 16 oder 24 h entweder mit 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder mit 30  $\mu$ M DMC inkubiert, 30  $\mu$ g der Proteinfraktion elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge von mPGES-1 detektiert. (B) In der densitometrischen Auswertung von (A) wurde zunächst die mittlere Stärke  $\pm$  SD des mPGES-1-Signals im Verhältnis zur Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin analysiert und die Intensität zum Zeitpunkt Null auf 100 % gesetzt. Anschließend wurden zeitabhängig stimulierte, DMC-behandelte Zellen mit stimulierten Zellen ohne DMC verglichen. Die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede durch DMC-Behandlung (\* $p$  < 0,05). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Parallel zum Nachweis des Einflusses von DMC auf die mPGES-1-Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse wurde eine immunzytochemische Analyse durchgeführt (2.2.4). Auch hier erfolgte eine Stimulation der HeLa-Zellen mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  und eine zeitgleiche Inkubation mit verschiedenen DMC-Konzentrationen (20, 30, 40  $\mu$ M) für 16 Stunden. Abb. 3-13 zeigt repräsentativ die immunzytochemische Färbung der mPGES-1-Expression in HeLa-Zellen nach Stimulation und Inkubation mit 20  $\mu$ M DMC. Der Anstieg der mPGES-1-Proteinexpression nach Zytokinbehandlung konnte ebenfalls durch die immunzytochemische Analyse nachgewiesen werden (Abb. 3-13 A und B). Der Zusatz von 20  $\mu$ M DMC zeigte auch hier eine deutliche Hemmung der mPGES-1-Induktion (Abb. 3-13 C). Jedoch lies sich dieser Effekt durch höhere Konzentrationen von DMC (30, 40  $\mu$ M) nicht weiter verstärken, so dass sich die Methode nicht zur Quantifizierung eignete. Daneben konnte anhand der Färbung deutlich eine Anreicherung der mPGES-1 in der Nähe des Zellkernes detektiert werden.



**Abb. 3-13:** Immunzytochemische Analyse der mPGES-1-Expression in HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Stimulation und Inkubation mit DMC. (A) Unstimulierte, (B) stimulierte (IL-1 $\beta$  = 1 ng/ml, TNF $\alpha$  = 5 ng/ml) und (C) stimulierte und mit 20  $\mu$ M DMC für 16 h inkubierte HeLa-Zellen. Braunfärbung kennzeichnet mPGES-1-Expression. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. (D) Kontrolle der unspezifischen Färbung mit Immunglobulin G (Hase). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss von extern zugefügtem PGE<sub>2</sub> auf die mPGES-1-Proteinexpression allein und auf die Wirkung von DMC auf die mPGES-1-Expression untersucht. Damit sollte u.a. überprüft werden, ob eventuell ein Rückkopplungseffekt durch vorhandenes PGE<sub>2</sub> vorliegt und so die Expression der an der PGE<sub>2</sub>-Synthese beteiligten Enzyme hemmt. Wie in den vorausgegangenen Experimenten wurden HeLa-Zellen stimuliert und mit steigenden DMC-Konzentrationen für 16 h inkubiert. Zeitgleich erfolgte ein Zusatz von 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>. Die Menge an mPGES-1-Protein wurde in der mikrosomalen Fraktion mittels Western Blot detektiert. Wie Abb. 3-14 verdeutlicht, hatte das extern zugesetzte PGE<sub>2</sub> keinen Effekt auf die Stimulation der mPGES-1-Proteinexpression. Auch in diesem Versuch konnte eine signifikante Hemmung der durch Zytokininkubation hervorgerufenen mPGES-1-Proteininduktion durch DMC ab Konzentrationen von 15  $\mu$ M nachgewiesen werden, so dass extern zugeführtes PGE<sub>2</sub> diesen Effekt nicht beeinflusst. Da eine Inkubationszeit von 16 h vorlag, wurde in einem Kontrollversuch die Stabilität des PGE<sub>2</sub> im HeLa-Medium durch Quantifizierung des PGE<sub>2</sub> im Medium nach Inkubationsende mittels PGE<sub>2</sub>-EIA analysiert. Dabei konnte die eingesetzte Menge an PGE<sub>2</sub> fast vollständig in allen Proben wiedergefunden werden.



**Abb. 3-14:** Western Blot-Analyse der mikrosomalen Fraktion zur Untersuchung der Wirkung von extern zugesetzten PGE<sub>2</sub> auf den hemmenden Effekt von DMC auf die mPGES-1-Induktion in stimulierten (IL-1β = 1 ng/ml, TNFα = 5 ng/ml) HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 16 h neben 1 µM PGE<sub>2</sub> entweder mit 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder mit steigenden DMC-Konzentrationen (10 - 40 µM) inkubiert, 30 µg der Proteinfraction elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge an mPGES-1 detektiert. Das Säulendiagramm zeigt die mittlere Stärke ± SD des mPGES-1-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β-Aktin. Die Bande der stimulierten HeLa-Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede durch DMC-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (\*p < 0,05). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

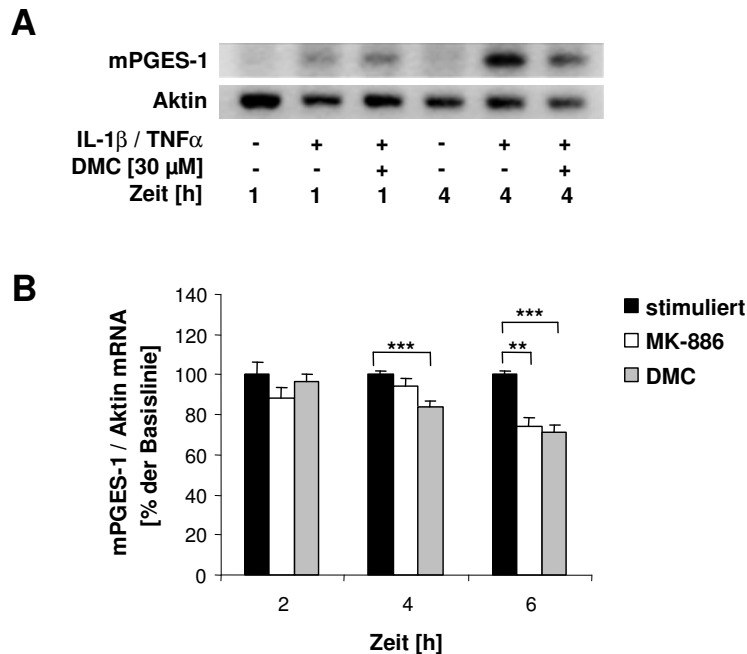
### 3.1.3.4 mPGES-1-mRNA-Expression nach Behandlung mit DMC

Durch Untersuchung des Einflusses von DMC auf die mRNA-Expression sollte überprüft werden, ob transkriptionelle oder translationelle Mechanismen für die Proteinhemmung verantwortlich sind. Dazu wurde in Vorversuchen zunächst die OneStep RT-PCR-Analytik verwendet. Im ersten Schritt erfolgte die Gewinnung der Gesamt-RNA aus stimulierten HeLa-Zellen nach 1 bzw. 4 h. In einem weiteren Versuch wurden die HeLa-Zellen zeitgleich zur Stimulation mit 30 µM DMC versetzt. Die erhaltenen RT-PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel detektiert. Durch Stimulation mit IL-1β und TNFα konnte besonders nach 4 h ein deutlicher Anstieg der mPGES-1-mRNA erreicht werden. Die zusätzliche Inkubation mit 30 µM DMC zeigte eine Hemmung dieser induzierten Expressionszunahme (Abb. 3-15 A). Zur besseren Quantifizierung dieses Ergebnisses wurde auf die quantitative TaqMan™ RT-PCR-Analytik übergegangen. Die Gesamt-RNA wurde aus HeLa-Zellen gewonnen, die 2, 4 und 6 h stimuliert wurden bzw. 2, 4 und 6 h stimuliert und zeitgleich mit 30 µM DMC oder 20 µM MK-886 inkubiert wurden. Die mRNA der mPGES-1 wurde gegen β-Aktin normalisiert. Der Vergleich der relativen mRNA-Menge der mPGES-1 in stimulierten Zellen ohne DMC und in stimulierten Zellen mit DMC zeigte nach 4 bzw. 6 h Inkubation eine signifikante Abnahme der mPGES-1-mRNA in Gegenwart von 30 µM DMC (Abb. 3-15 B). Der größte Effekt wurde nach 6 h erzielt. Hier konnte eine Hemmung der induzierten mRNA-Expression von ca. 30 %



erreicht werden. Auch der MAPEG-Inhibitor MK-886 zeigte in der verwendeten Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  eine Hemmung der mPGES-1-mRNA-Expression.

DMC verhinderte somit sowohl eine Induktion der mPGES-1-Proteinexpression als auch eine Induktion der mPGES-1-mRNA-Expression in stimulierten HeLa-Zellen.



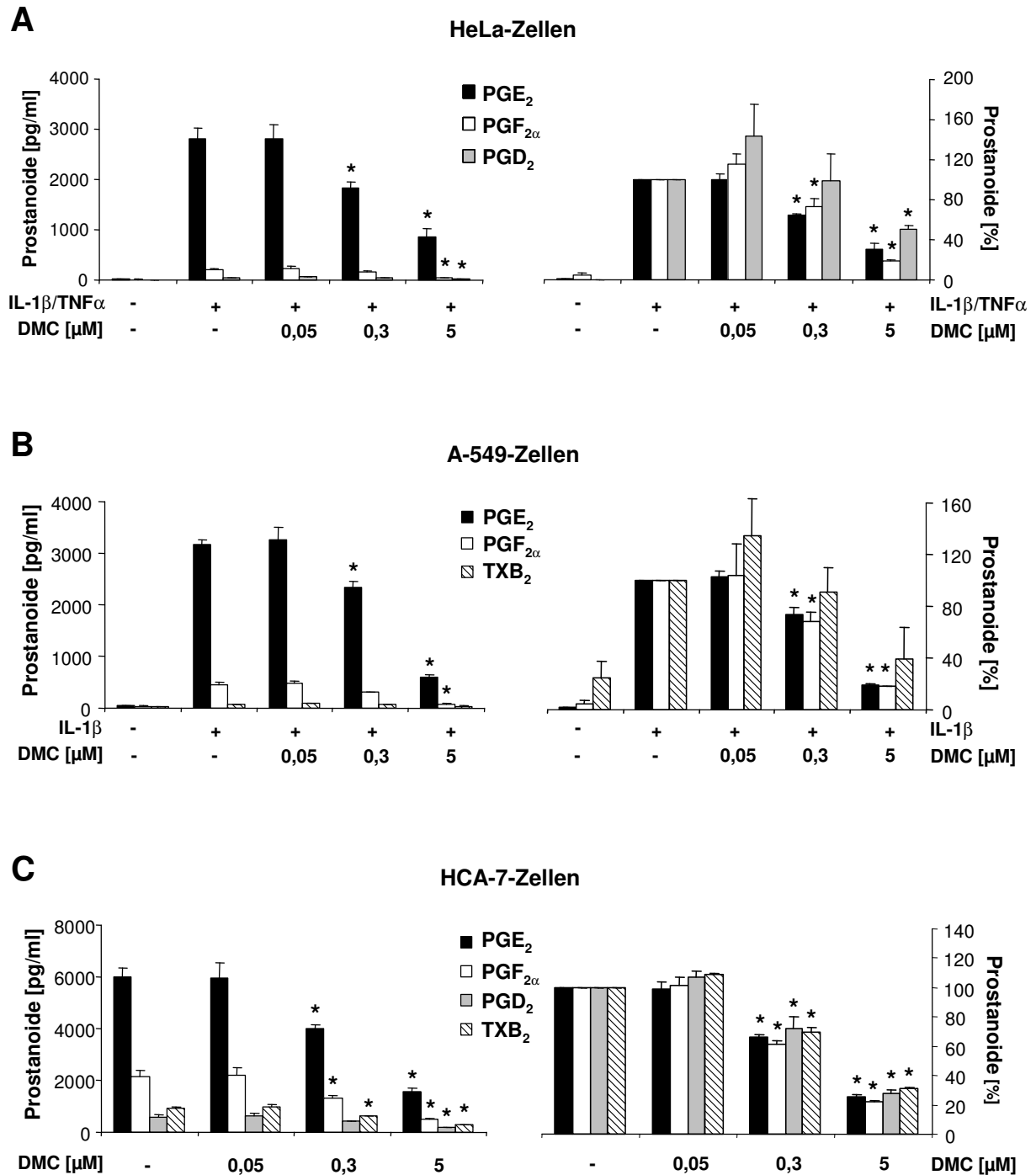
**Abb. 3-15:** (A) Agarosegel zur Analyse von mPGES-1- und  $\beta$ -Aktin-mRNA Expression nach erfolgter OneStep RT-PCR als Vorversuch zu B. (B) Quantitative TaqMan<sup>TM</sup> RT-PCR-Analyse der relativen mPGES-1-mRNA-Menge in HeLa-Zellen nach 2, 4 und 6 h Stimulation (IL-1 $\beta$  = 1 ng/ml, TNF $\alpha$  = 5 ng/ml). Die relative mRNA-Menge von stimulierten unbehandelten HeLa-Zellen wurde auf 100 % gesetzt und mit stimulierten und behandelten Zellen (30  $\mu\text{M}$  DMC, 20  $\mu\text{M}$  MK-886) nach 2, 4 und 6 h verglichen. Die Normalisierung erfolgte gegen das gleichzeitig amplifizierte  $\beta$ -Aktin. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten. Die Sterne kennzeichnen im Vergleich zur stimulierten Kontrolle statistisch signifikante Unterschiede mit \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.1.4 DMC hemmt die Prostanoid-Synthese in humanen Krebszellen

Die gezeigten Wirkungen von DMC auf die mPGES-1-Aktivität und -Expression fanden entweder in höheren Konzentrationen statt als zur PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung notwendig waren oder führten nicht zu einer vollständigen Hemmung des Enzymes, so dass diese Effekte allein nicht die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion in humanen Krebszellen erklären können.

Auf der Suche nach weiteren molekularen Angriffspunkten für DMC wurde eine Beeinflussung der cytosolischen Phospholipase A<sub>2α</sub> (cPLA<sub>2α</sub>) in Betracht gezogen. Die cPLA<sub>2α</sub> ist das einzige Enzym aus der großen Gruppe der Phospholipasen, welches spezifisch Arachidonäure aus Glycerophospholipiden freisetzt (Kap. 1.2.1.1). Eine Hemmung dieses Enzymes würde eine Hemmung der gesamten Arachidonsäurekaskade bedeuten. Im Falle des Cyclooxygenase-Stoffwechselweges käme es nicht nur zu einer Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese sondern auch zur Hemmung der gesamten Prostanoidsynthese (Kap. 1.1). Aus diesem Grund wurde im folgenden Experiment der Einfluss von DMC auf die Bildung der einzelnen Prostanoiden in den humanen Krebszellen HeLa, A-549 und HCA-7 untersucht, was durch die Anwendung der LC-MS/MS-Analytik gelang. Mit dieser Methode ist die zeitgleiche Detektion von PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> möglich, wobei PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> aufgrund der schnellen Verstoffwechslung in Form ihrer Metaboliten 6-keto PGF<sub>1α</sub> und TXB<sub>2</sub> analysiert wurden.

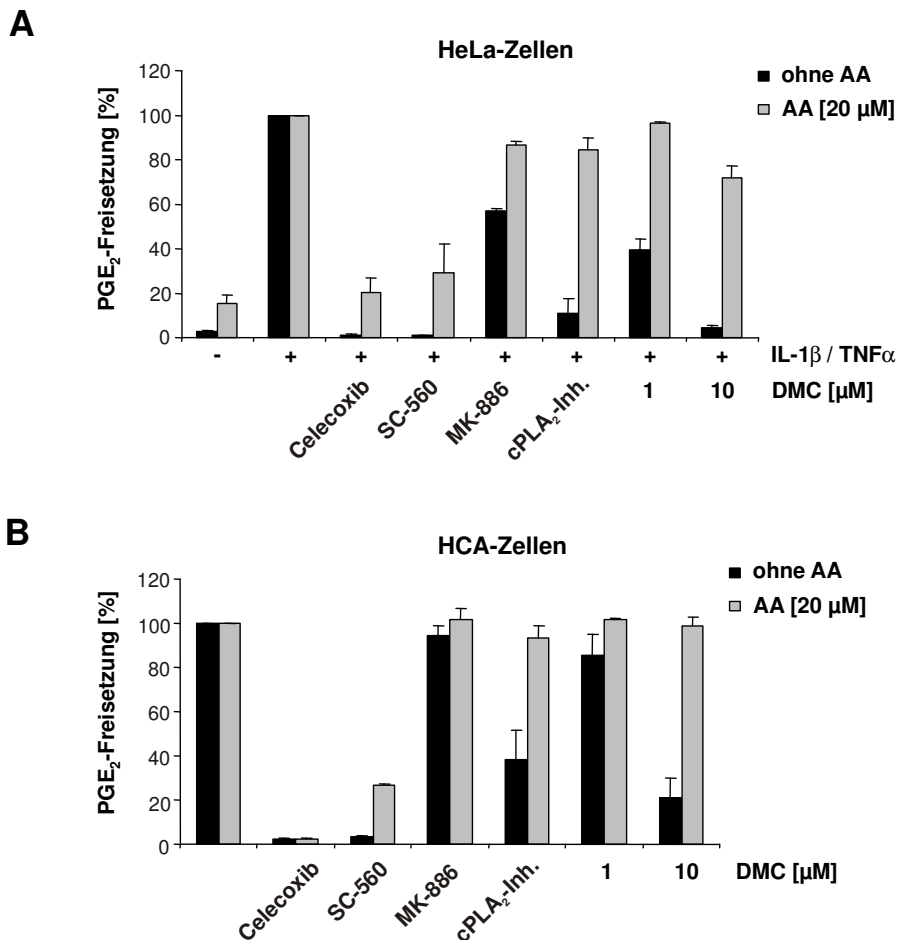
Wie schon im Kapitel 3.1.1 beschrieben, erfolgte eine Stimulation und zeitgleiche Inkubation mit verschiedenen DMC-Konzentrationen von HeLa- und A-549-Zellen für 16 h und die Quantifizierung der gebildeten Prostanoiden nach einer Festphasenextraktion durch LC-MS/MS-Messung. HCA-7 Zellen wurden unstimuliert 30 min mit DMC vorbehandelt und nach einem Mediumwechsel weitere 16 h inkubiert. Die Auswahl der verwendeten DMC-Konzentrationen von 0,05 μM, 0,3 μM und 5 μM erfolgte dabei repräsentativ anhand der erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte für die PGE<sub>2</sub>-Hemmung in den angegebenen Zellen. Wie Abb. 3-16 A zeigt, konnten in HeLa-Zellen PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> nach Stimulation quantifiziert werden. Für stimulierte A-549 waren es neben PGE<sub>2</sub> auch PGF<sub>2α</sub> und TXB<sub>2</sub> (Abb. 3-16 B). In beiden Zelllinien dominierte sehr stark die Bildung von PGE<sub>2</sub>. Dies galt auch für unstimulierte HCA-7-Zellen, die neben einer sehr hohen PGE<sub>2</sub>-Produktion auch PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und TXB<sub>2</sub> bildeten (Abb. 3-16 C). Überraschenderweise zeigte DMC in allen drei Zelllinien eine signifikante Hemmung von allen gebildeten Prostanoiden (Abb. 3-16 A-C). Der Effekt war von der DMC-Konzentration abhängig und erfolgte für alle Prostanoiden im gleichen Ausmaß, so dass die Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme im Allgemeinen und hier die cPLA<sub>2α</sub> im Speziellen ein mögliches molekulares Zielprotein für DMC darstellen könnten.



**Abb. 3-16:** LC-MS/MS-Analytik der Prostanoiden im Medium humaner Krebszellen. Absolute (pg/ml) und prozentuale Prostanoid-Freisetzung in das Zellmedium von stimulierten (A) HeLa- und (B) A-549-Zellen (IL-1β = 1 ng/ml + TNFα = 5 ng/ml für HeLa, IL-1β = 1 ng/ml für A-549) sowie (C) unstimulierten HCA-7-Zellen in Gegenwart von entweder 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder verschiedenen DMC-Konzentrationen (0,05; 0,3; 5 μM). Die gebildete Menge der Prostanoiden wurde nach 16 h Inkubation im Zellmedium im Anschluss an eine Festphasenextraktion quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede in der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle wurden mit einem Stern gekennzeichnet (\* p < 0,05).

### 3.1.5 Externe Arachidonsäure verhindert die PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung durch DMC

Liegt eine Hemmung der cPLA<sub>2α</sub> vor, so kann dieser Effekt durch die Zugabe von Arachidonsäure umgangen werden. Die Freisetzung der Arachidonsäure aus der Zellmembran durch Phospholipasen A<sub>2</sub> wäre nicht mehr erforderlich und eine Neusynthese von Prostanoiden könnte erfolgen. Im folgenden Versuch wurde der Einfluss von externer Arachidonsäure auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese neben DMC auch für verschiedene weitere Testsubstanzen sowohl in stimulierten HeLa-Zellen als auch in unstimulierten HCA-7-Zellen untersucht. Dabei wurde sich hier auf die PGE<sub>2</sub>-Analytik beschränkt, da der Ausgangspunkt in der Ursachenfindung für die durch DMC hervorgerufene PGE<sub>2</sub>-Hemmung bestand und die Detektion des PGE<sub>2</sub> mittels EIA im Zellmedium eine einfache und schnelle Analytik darstellte. Die selektiven Inhibitoren der COX-1 (SC-560) und COX-2 (Celecoxib) sollten als Kontrollsubstanzen zeigen, dass für diese auch nach Zusatz von externer Arachidonsäure weiterhin eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese vorliegt, wobei dieser Effekt bei Celecoxib stärker ausgeprägt sein sollte, da das gebildete PGE<sub>2</sub> überwiegend COX-2 vermittelt vorliegt. Neben MK-886 wurde auch ein kommerziell erhältlicher cPLA<sub>2α</sub>-Inhibitor (1,2,4-Trisubstituiertes Pyrrolidinderivat, Calbiochem) als Vergleichssubstanz verwendet. Die Inkubation der Zellen wurde zur Vergleichbarkeit analog zu den vorangegangenen Versuchen durchgeführt und erfolgte auch hier für 16 h. Zusätzlich wurden 20 μM Arachidonsäure extern zugesetzt. HCA-7-Zellen wurden wiederum für 30 min mit den Inhibitoren vorinkubiert und anschließend das Medium gewechselt, um das PGE<sub>2</sub> zu entfernen, welches basal in HCA-7-Zellen entsteht, bis die Hemmstoffe ihre volle Wirksamkeit erreicht haben. Die Messung des gebildeten PGE<sub>2</sub> erfolgte mittels Enzymimmunoassay. Wie die Abb. 3-17 sowohl in HeLa-Zellen (A) als auch in HCA-7-Zellen (B) verdeutlicht, konnte die zugesetzte Arachidonsäure die hemmende Wirkung von 1 bzw. 10 μM DMC auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese aufheben. Die Konzentrationen von DMC wurden dabei so gewählt, dass sie im Bereich 50 - 100 %iger Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in diesen Zellen lagen. Der verwendete cPLA<sub>2α</sub>-Inhibitor (5 μM) zeigte, wie angenommen, das gleiche Ergebnis. Ebenfalls erwartungsgemäß hemmte der verwendete COX-2-Inhibitor Celecoxib (10 μM) weiterhin die PGE<sub>2</sub>-Synthese. Auch SC-560 (10 μM) hemmte nach Zusatz von Arachidonsäure fast vollständig die PGE<sub>2</sub>-Synthese. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass SC-560 in bestimmter zellulärer Umgebung seine *in vitro* gezeigte COX-1-Selektivität verliert [222]. Auch im humanen Vollblutassay hemmte SC-560 bei einer Konzentration von 10 μM vollständig die COX-2-Aktivität (IC<sub>50</sub> = 128 nM) [222]. Für den mPGES-1-Inhibitor MK-886 würde man in der eingesetzten Konzentration von 20 μM weiterhin eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese vermuten, was sich aber nicht bestätigte. Da MK-886 auch in der Lage ist, das FLAP-Enzym aus der Gruppe der MAPEG-Enzyme und somit die Leukotriensynthese zu hemmen (IC<sub>50</sub> = 1,1 μM im humanen Vollblut [223]), liegt die Vermutung nahe, dass die eingesetzte Konzentration zu niedrig war, um das FLAP-Enzym und die mPGES-1 ausreichend zu hemmen.



**Abb. 3-17:** Einfluss von externer Arachidonsäure auf die PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung von DMC und verschiedenen Referenzsubstanzen. Prozentuale PGE<sub>2</sub>-Freisetzung in das Zellmedium von (A) stimulierten HeLa-Zellen (IL-1β = 1 ng/ml, TNFα = 5 ng/ml) sowie (B) unstimulierten HCA-7-Zellen in Gegenwart von entweder 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder 1 bzw. 10 μM DMC, 10 μM Celecoxib, 10 μM SC-560, 20 μM MK-886 oder 5 μM cPLA<sub>2α</sub>-Inhibitor. Zum Vergleich erfolgte in einem weiteren Experiment ein Zusatz von 20 μM Arachidonsäure. Die gebildete Menge an PGE<sub>2</sub> wurde nach 16 h Inkubation im Zellmedium mittels Enzymimmunoassay quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten.

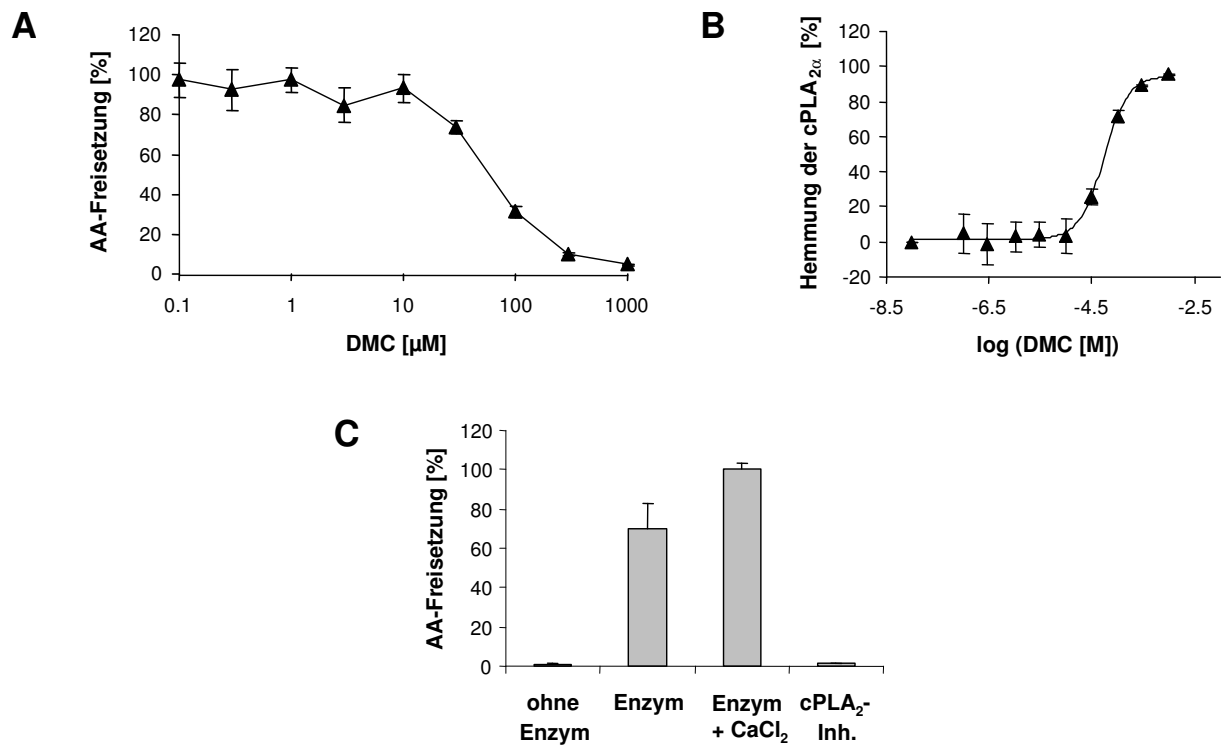
### 3.1.6 Einfluss von DMC auf die cPLA<sub>2α</sub>

Da anhand der durchgeführten Experimente gezeigt werden konnte, dass DMC die Gesamtprostanoidsynthese hemmt und die PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung durch die Zugabe von Arachidonsäure aufgehoben wurde, sollte in den folgenden Experimenten der Einfluss von DMC auf die cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität und -Expression untersucht werden.

#### 3.1.6.1 In vitro cPLA<sub>2α</sub>-Aktivitätsassay für DMC

Die Untersuchung des Einflusses von DMC auf die cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität erfolgte an einem *in vitro*-Modell. Dazu wurde das humane rekombinante Enzym in Sf9-Insektenzellen überexprimiert, daraus isoliert und mit künstlich hergestellten Vesikeln aus Glycerophospholipiden versetzt (Kap. 2.2.5.4). Es

erfolgte eine Inkubation der Vesikel in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) mit verschiedenen DMC-Konzentrationen und dem rekombinanten Enzym für 1 h. Die freigesetzte Arachidonsäure wurde durch eine LC-MS/MS-Messung quantifiziert. Der  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ -Inhibitor (Calbiochem) diente als Kontrollsubstanz in jedem durchgeführten Assay und zeigte in der verwendeten Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine vollständige Hemmung der Arachidonsäurefreisetzung (Abb. 3-18 C). Auch DMC konnte in Abhängigkeit von der Konzentration die Freisetzung der Arachidonsäure und somit die  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ -Aktivität im verwendeten Testsystem hemmen (Abb. 3-18 A). Dabei erreichte DMC eine nahezu vollständige Hemmung der  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ . Dieser Effekt tritt erst in höheren Konzentrationen auf, so dass die ermittelte  $\text{IC}_{50}$  einen Wert von  $57.6 \mu\text{M} \pm 9.6 \mu\text{M}$  ergab (Abb. 3-18 B). Zur Kontrolle der Funktionalität des Assays wurden neben dem spezifischen  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ -Inhibitor auch die Vesikellösung ohne Enzyminkubation (Negativkontrolle) sowie als Positivkontrollen die Vesikellösung mit dem Enzym mit und ohne  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) analysiert. Erwartungsgemäß führte der Zusatz von Calciumionen zu einer Steigerung der  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ -Enzymaktivität, da diese Calcium-abhängig ist [49, 51](Abb. 3-18 C).



**Abb. 3-18:** *In vitro*  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ -Aktivitätsassay für DMC. (A) Künstlich hergestellte Vesikel aus einer Mischung von 1-Palmitoyl-2-Arachidonyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (PAPC) und 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycerol (POG) im Verhältnis 2:1 wurden in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  (1nM) mit steigenden DMC-Konzentrationen (0,1 - 1000  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und mit humanen rekombinanten  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ -Enzym (200 ng/Inkubation) versetzt. Dieses setzt Arachidonsäure (AA) aus PAPC der Vesikel frei. Eine Hemmung der Freisetzung von AA kennzeichnete eine Hemmung der  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ -Aktivität. (B) Durch Transformation der Hemmkurve aus (A) konnte der  $\text{IC}_{50}$ -Wert ermittelt und die maximale Hemmung dargestellt werden. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM errechneten sich aus 3 unabhängigen Experimenten. (C) Kontrollen: Die Vesikellösung ohne Enzym entspricht der Negativkontrolle. Als Positivkontrollen wurde die Vesikellösung ohne oder in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  mit dem Enzym inkubiert und des Weiteren ein spezifischer  $\text{cPLA}_{2\alpha}$ -Inhibitor (5  $\mu\text{M}$ ) verwendet.

### 3.1.6.2 cPLA<sub>2α</sub>-Proteinexpression, -Phosphorylierung und -Translokation nach Behandlung mit DMC

Da DMC die cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität erst bei höheren Konzentrationen hemmt als für die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese notwendig sind, wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss von DMC auf das cPLA<sub>2α</sub>-Protein untersucht. Im Gegensatz zur mPGES-1, deren Aktivitätssteigerung meist mit einer vermehrten Expression verbunden ist, wird die cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität überwiegend über ihren Phosphorylierungsstatus und durch die Translokation zu intrazellulären Membranen reguliert (Kap. 1.2.1.1). Es wurde zunächst die Beeinflussung der Phosphorylierung am Serin<sup>505</sup> durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNFα in HeLa-Zellen untersucht. Bisherige Daten belegen, dass diese Phosphorylierung mit einer Steigerung der Enzymaktivität verbunden ist [51]. Da die Phosphorylierung einen sehr schnellen Prozess darstellt, wurden HeLa-Zellen nur für 1 h mit den beiden Zytokinen inkubiert und die cPLA<sub>2α</sub> im isolierten Gesamtproteinextrakt anhand der Western Blot-Analyse im Hinblick auf den Phosphorylierungsstatus am Serin<sup>505</sup> untersucht. Um einen Einfluss der Stimulation auf die Proteinexpression der cPLA<sub>2α</sub> zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen für 16 h mit den Zytokinen inkubiert und anschließend im Gesamtproteinextrakt die Expression des cPLA<sub>2α</sub>-Proteins im Vergleich zu unbehandelten Zellen detektiert. Wie die Abb. 3-19 zeigt, erfolgte durch die Stimulation mit IL-1β und TNFα innerhalb 1 h eine deutlich verstärkte Phosphorylierung des cPLA<sub>2α</sub>-Proteins am Serin<sup>505</sup>. Dieser Effekt stieg zwischen 10 min und 2 h langsam an, um dann im Verlauf der nächsten 24 h wieder abzunehmen. Aus diesem Grund wurde für das folgende Experiment eine Stimulationszeit von 1 h gewählt. Die Gesamtproteinexpression der cPLA<sub>2α</sub> blieb durch Zytokininkubation unbeeinflusst.

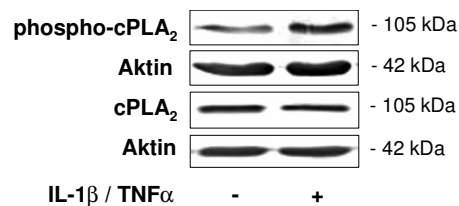
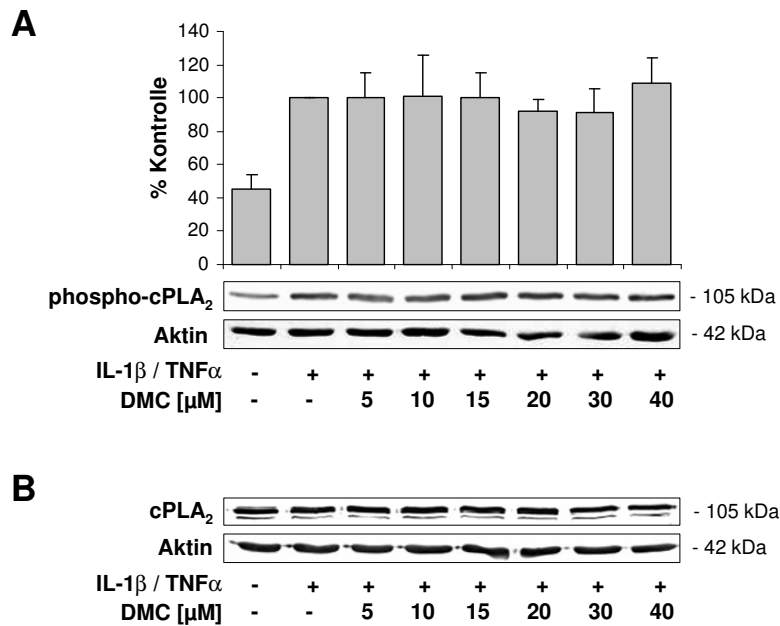


Abb. 3-19: Western Blot-Analyse des phospho-cPLA<sub>2α</sub> (Ser<sup>505</sup>) und cPLA<sub>2α</sub>-Proteins in HeLa-Zellen. Diese wurden für die Phosphorylierung 1 h und für die Proteinexpression 16 h stimuliert (IL-1β = 1 ng/ml, TNFα = 5 ng/ml), 50 µg des Gesamtproteinextraktes elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge an phospho-cPLA<sub>2α</sub> (Ser<sup>505</sup>) und cPLA<sub>2α</sub> detektiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Im folgenden Experiment sollte der Einfluss von DMC auf die cPLA<sub>2α</sub>-Phosphorylierung am Serin<sup>505</sup> sowie auf die cPLA<sub>2α</sub>-Proteinexpression untersucht werden. Der Versuch wurde analog dem vorangegangenen durchgeführt. Es erfolgte neben der Stimulation eine zusätzliche Inkubation mit steigenden DMC-Konzentrationen (5 - 40 μM) für 1 h bzw. 16 h. Anhand der anschließenden Western Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass DMC weder einen Einfluss auf die Serin<sup>505</sup>-Phosphorylierung der cPLA<sub>2α</sub> (Abb. 3-20 A) noch einen Einfluss auf die cPLA<sub>2α</sub>-Proteinexpression (Abb. 3-20 B) besitzt.

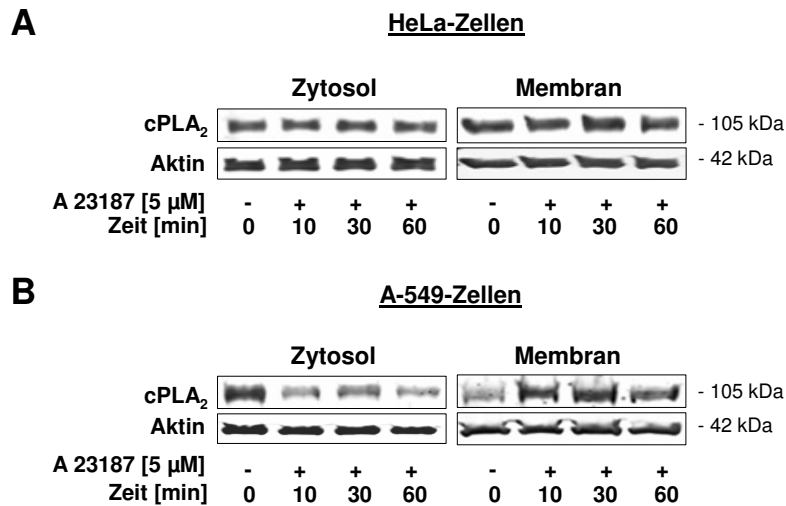


**Abb. 3-20:** Western Blot-Analyse des Gesamtproteinextraktes zur Untersuchung der Wirkung von DMC auf die (A) Ser<sup>505</sup>-Phosphorylierung der cPLA<sub>2α</sub> und (B) die cPLA<sub>2α</sub>-Proteinexpression in HeLa-Zellen. Diese wurden für die Phosphorylierung 1 h und für die Proteinexpression 16 h stimuliert (IL-1β = 1 ng/ml, TNFα = 5 ng/ml), zeitgleich mit 0,1 % DMSO (als Kontrolle) oder mit steigenden DMC-Konzentrationen (5 - 40 μM) inkubiert und anschließend 50 μg des Gesamtproteinextraktes elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge an phospho-cPLA<sub>2α</sub> (Ser<sup>505</sup>) und cPLA<sub>2α</sub> detektiert. Das Säulendiagramm in (A) zeigt die mittlere Stärke ± SD des phospho-cPLA<sub>2α</sub>-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β-Aktin. Die Bande der stimulierten HeLa-Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Die Aktivität der cPLA<sub>2α</sub> ist Calcium-abhängig. Der durch eine Stimulation hervorgerufene intrazelluläre Calciumanstieg führt zu einer Translokation der cPLA<sub>2α</sub> zu intrazellulären Membranen und damit zum Ort der Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden der Membranen [20]. Eine Detektion der Translokation mittels Immunzytochemie war aufgrund der unspezifischen Färbung des cPLA<sub>2α</sub>-Antikörpers nicht möglich, wobei 2 verschiedene Antikörper getestet wurden. Im folgenden Experiment wurde zunächst versucht, die Translokation mittels Western Blot zu detektieren um im Anschluss daran den Einfluss von DMC auf die Translokation zu analysieren. Eine Hemmung der Translokation wäre mit einer Hemmung der cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität verbunden. Das verwendete

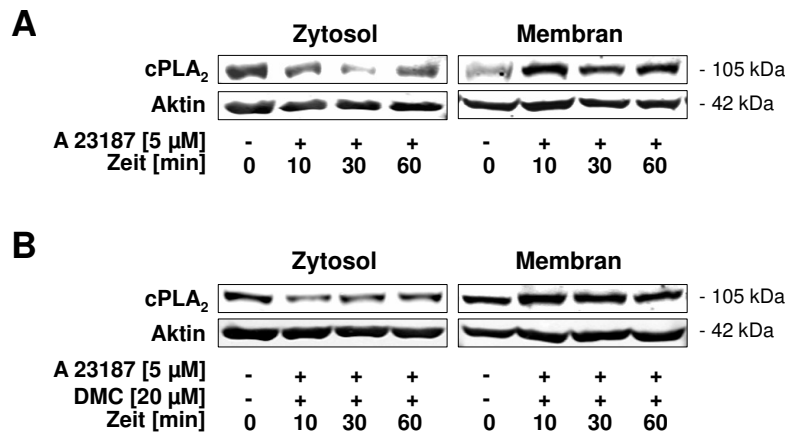


HeLa-Zellsystem zeigte schon im unstimulierten Zustand eine Lokalisation der cPLA<sub>2α</sub> an den intrazellulären Membranen, was in Abb. 3-21 A dargestellt ist. Dieses Modell erwies sich daher als nicht geeignet. Es wurden daraufhin A-549-Zellen ausgewählt, da hier die Detektion der Translokation nach Stimulation im Medium mit nur 5 % FCS-Zusatz gelang. Als stimulierendes Agens diente in diesem Falle das Calcium-Ionophor A23187, welches neben antibiotischen Eigenschaften befähigt ist, die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration zu erhöhen und somit die Translokation der cPLA<sub>2α</sub> zu aktivieren. HeLa- und A-549-Zellen wurden in einem ersten Versuch mit A23187 für 10, 30 und 60 min inkubiert und anschließend die Proteine der Cytosol- und Membranfraktion isoliert. Durch Western Blot-Analyse konnte das cPLA<sub>2α</sub>-Protein in den beiden Fraktionen detektiert werden. Wie Abb. 3-21 B zeigt, wanderte die cPLA<sub>2α</sub> in A-549-Zellen schon nach einer Stimulationszeit von 10 min aus dem Cytosol in Richtung Membranen, was durch eine Abnahme der Proteinbande in der cytosolischen Fraktion und eine Zunahme in der Membranfraktion gekennzeichnet ist.



**Abb. 3-21:** Western Blot-Analyse der cPLA<sub>2α</sub> in (A) HeLa-Zellen und (B) A-549-Zellen im Cytosol und der Membranfraktion nach Stimulation mit Calcium Ionophor. Die Zellen wurden für 10, 30 und 60 min mit 5 μM Calcium Ionophor A23187 stimuliert und in Cytosol- und Membranfraktion aufgetrennt. Jeweils 30 μg Protein der beiden Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge von cPLA<sub>2α</sub> detektiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Experimente.

Im sich anschließenden Experiment wurden A-549-Zellen zum einen nur mit Calcium-Ionophor A23187 behandelt und zum anderen zunächst 30 min mit DMC vorinkubiert. Nach einem Mediumwechsel erfolgte neben einer erneuten Zugabe von DMC die Stimulation mit A23187 im gleichen Zeitintervall. Auch hier kam es wie im Vergleichsexperiment (Abb. 3-22 A) zu einer Abnahme der cPLA<sub>2α</sub>-Proteinmenge im Cytosol mit zeitgleichem Anstieg in der Membran, so dass 20 μM DMC die Translokation der cPLA<sub>2α</sub> nicht beeinflusste (Abb. 3-22 B).

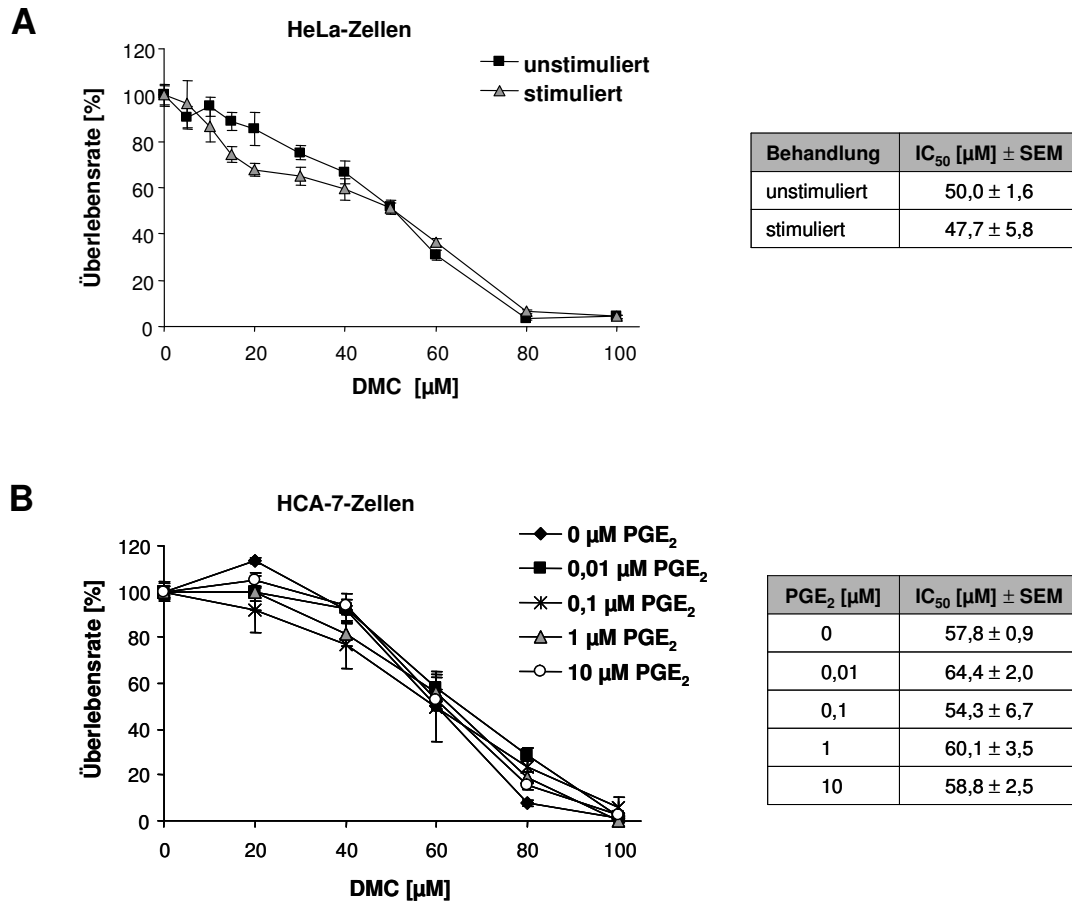


**Abb. 3-22:** Western Blot-Analyse der cPLA<sub>2α</sub> in A-549-Zellen im Cytosol und der Membranfraktion nach Stimulation mit und ohne DMC-Koinkubation. **(A)** A-549-Zellen wurden für 10, 30 und 60 min mit 5 µM Calcium Ionophor A23187 stimuliert und in Cytosol- und Membranfraktion aufgetrennt. **(B)** Versuch wie (A), zusätzlich wurden die Zellen mit 20 µM DMC für 30 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte der zeitgleiche Zusatz von DMC (20 µM) und A23187 (5 µM) für 10, 30 und 60 min. Jeweils 30 µg Protein der beiden Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinmenge von cPLA<sub>2α</sub> mittels Western Blot-Analyse detektiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

### 3.1.7 Die antiproliferative Wirkung von DMC ist unabhängig von der PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung

In der Literatur gibt es zahlreiche Belege dafür, dass DMC eine antiproliferative Wirkung in verschiedenen Krebszellen besitzt [192, 195, 196]. Aufgrund der Eigenschaft von DMC, die Cyclooxygenasen nicht zu hemmen, wurden diese Wirkungen als COX-unabhängig und somit auch als PGE<sub>2</sub>-unabhängig beschrieben. Aufgrund der hier aufgeführten Ergebnisse muss die PGE<sub>2</sub>-Unabhängigkeit neu überprüft werden. Dazu wurde die Überlebensrate von unstimulierten und stimulierten HeLa-Zellen in Gegenwart von steigenden DMC-Konzentrationen anhand des WST-Proliferationstests (2.2.7) miteinander verglichen. Hier konnte gezeigt werden, dass unstimulierte und stimulierte HeLa-Zellen gegenüber DMC die gleiche Empfindlichkeit aufweisen. Der antiproliferative Effekt von DMC fiel somit annähernd gleich stark aus (Abb. 3-23 A), was auch die kalkulierten IC<sub>50</sub>-Werte von  $50,0 \pm 1,6$  für unstimulierte verglichen mit  $47,7 \pm 5,8$  µM für stimulierte HeLa-Zellen bestätigten. In einem weiteren Versuch wurde die Überlebensrate von HCA-7-Zellen, welche basal eine hohe Menge an PGE<sub>2</sub> bildeten, untersucht. Neben DMC erfolgte hier zusätzlich eine Inkubation mit verschiedenen PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen (0,01 - 10 µM). Dabei wiesen HCA-7-Zellen unabhängig von der extern zugesetzten PGE<sub>2</sub>-Menge die gleiche Empfindlichkeit gegenüber DMC auf (Abb. 3-23 B). Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte lagen alle im Bereich von 60 µM und können im Detail der Tabelle in Abb. 3-23 B entnommen werden. Auch auf die humanen Kolonkarzinomzellen HCT-116, welche

schwach die COX-1 und keine COX-2 exprimieren, zeigte DMC antiproliferative Eigenschaften mit einem  $IC_{50}$  von  $63,3 \pm 9,6 \mu\text{M}$  [182].



**Abb. 3-23:** Bestimmung der Überlebensrate mittels WST-1-Proliferationsassay nach Behandlung von (A) unstimulierten oder stimulierten ( $IL-1\beta = 1 \text{ ng/ml}$ ,  $TNF\alpha = 5 \text{ ng/ml}$ ) HeLa-Zellen mit DMC (5 - 100  $\mu\text{M}$ ) oder (B) unstimulierten HCA-7-Zellen mit DMC allein (20 - 100  $\mu\text{M}$ ) oder DMC und steigenden PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen (0,01 - 10  $\mu\text{M}$ ). Die Inkubationszeit betrug 20 h und die Ermittlung der Überlebensrate erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM errechneten sich aus 3-4 unabhängigen Experimenten.

## 3.2 Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme der Coxibe in die Zelle und zur intrazellulären Verteilung

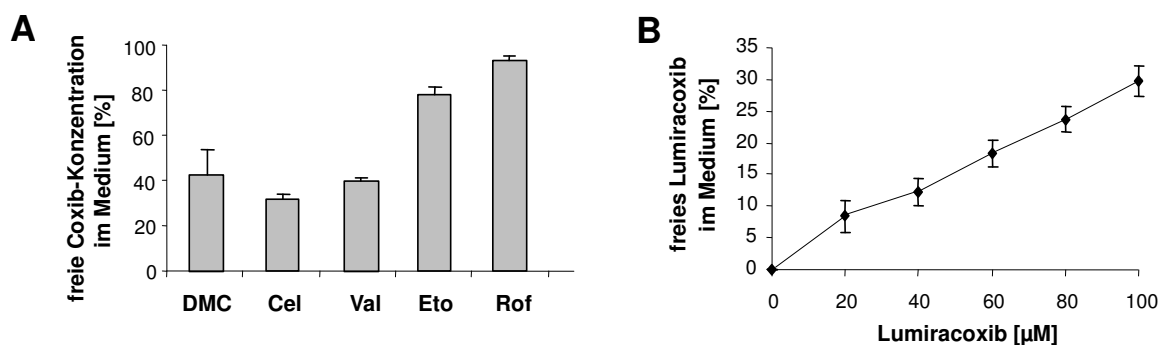
Die für DMC beschriebene antiproliferative Wirkung in der Zellkultur konnte auch im Nacktmausmodell bestätigt werden, wo DMC das Tumorwachstum von s.c. injizierten HCT-116-Zellen, welche keine COX-2 exprimieren, signifikant gegenüber unbehandelten Mäusen hemmte [182]. Überraschenderweise zeigte aus der Reihe der Coxibe nur Celecoxib mit DMC vergleichbare antiproliferative Effekte. Diese chemopräventive Eigenschaft wurde dabei verschiedenen COX-2-unabhängigen Mechanismen, wie beispielsweise der Hemmung der Phosphatidylinositol-Triphosphat-abhängigen Kinase-1 (PDK-1) [197, 202], der Hemmung von Cyclinen [182] oder dem Abbau des Beta-Catenins zugeschrieben [189]. Die Relevanz der Beeinflussung dieser Zielmoleküle wird besonders für Celecoxib mehr und mehr diskutiert, da offensichtlich ein Widerspruch zwischen den niedrigen Plasmakonzentrationen *in vivo* und den hohen Konzentrationen *in vitro* vorliegt [224]. Die orale Gabe von 2 x 400 mg Celecoxib führt zu einer Plasmakonzentration von ca. 8 µM [205], während Celecoxib-Konzentrationen von ca. 50 µM nötig sind, um die COX-2-unabhängigen Zielmoleküle in Zellkulturexperimenten zu beeinflussen (Tab. 1-4). Deshalb sollte in den folgenden Experimenten zunächst untersucht werden, ob unterschiedliche intrazelluläre Konzentrationen der Coxibe vorliegen.

### 3.2.1 DMC und Celecoxib zeigen deutlich höhere intrazelluläre Konzentrationen

Eine stärkere intrazelluläre Anreicherung von Celecoxib in Tumorzellen im Vergleich zu anderen Coxiben würde eine Rationale liefern, um die Zellkulturmechanismen besser mit den pharmakologischen Effekten von Celecoxib *in vivo* in Mensch und Tier korrelieren zu können. Diese Theorie wird ebenfalls von der Tatsache gestützt, dass Celecoxib ein außergewöhnlich hohes Verteilungsvolumen von 339 - 571 l im Vergleich zu den anderen Coxiben (9 - 120 l, Tab. 1-3) aufweist und somit nach der Absorption schnell in tiefere Kompartimente aufgenommen wird [143, 144]. Ähnliche Ergebnisse würden aufgrund der Strukturanalogie auch von DMC erwartet werden.

Coxibe besitzen mit 85 % - 99,5 % eine hohe Protein-Bindungsaffinität (Tab. 1-3), so dass die freien Plasma-Konzentrationen deutlich niedriger liegen als die totalen Konzentrationen. Die Zellkulturexperimente zur Untersuchung der antiproliferativen Eigenschaften der Coxibe [181, 182, 189] sowie die hier aufgeführten Untersuchungen zu DMC fanden in Gegenwart von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) statt. Da überwiegend nur die proteinungebundene Form der Coxibe die Zelle passieren kann, wurden in Vorversuchen von Thorsten Maier zunächst die tatsächlichen freien Konzentrationen der Coxibe im Medium bestimmt [215]. Durch Ultrazentrifugation für 20 h bei 180000x g und 37 °C konnten die Proteine im Zellmedium abgetrennt werden. Im Zellüberstand verblieb eine Restproteinmenge von 0,06 %, so dass durch Quantifizierung der Coxibe im Überstand

mittels LC-MS/MS annähernd die freie Konzentration ermittelt werden konnte. Wie Abb. 3-24 A zeigt, lagen die ermittelten freien Konzentrationen für DMC und Valdecoxib bei ca. 40 % und für Celecoxib bei ca. 30 %. Die Methylsulfone Etoricoxib und Rofecoxib, die eine geringere Plasmaproteinbindung aufweisen (Tab. 1-3), zeigten auch im Zellmedium einen deutlich höheren freien Anteil von 78 % für Etoricoxib und 93 % für Rofecoxib. Dabei war der prozentuale Anteil des freien Coxibs im untersuchten Konzentrationsbereich von 20  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  unabhängig von der eingesetzten Coxib-Konzentration. Im Gegensatz dazu zeigte Lumiracoxib eine von der eingesetzten totalen Menge abhängige freie Mediumkonzentration (Abb. 3-24 B), was vermutlich auf eine von den restlichen Coxiben abweichende strukturbedingte Pharmakokinetik zurückzuführen ist. Die freie Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Lumiracoxib im Medium betrug ca. 7,5 % während bei 100  $\mu\text{M}$  Lumiracoxib ca. 30 % frei vorlagen.

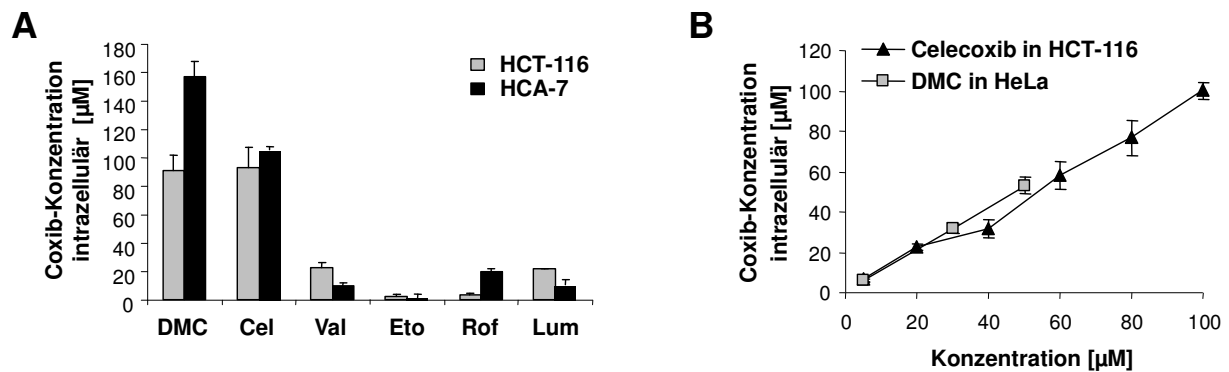


**Abb. 3-24:** (A) Bestimmung des prozentualen Anteils an freiem, ungebundenen Coxib bezogen auf die totale Konzentration im Medium mit 10 % FCS. 10 ml Medium mit steigenden Coxibkonzentrationen (0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{M}$ ) wurden für 20 h bei 37 °C und 180000x g ultrazentrifugiert und anschließend die Coxibe im nahezu Protein-freien Überstand sowie im Medium ohne Ultrazentrifugation mittels LC-MS/MS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM des prozentual freien Anteils im Vergleich zur Gesamtkonzentration von fünf unabhängigen Experimenten. (B) Abhängigkeit des prozentualen Anteils an freien Lumiracoxib in Medium mit 10 % FCS von der totalen eingesetzten Konzentration. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten. Abkürzungen: DMC, Dimethylcelecoxib; Cel, Celecoxib; Val, Valdecoxib; Eto, Etoricoxib; Rof, Rofecoxib. (Mit freundlicher Genehmigung von Thorsten J. Maier [215])

Die effektive Aufnahme der Coxibe stellt die Voraussetzung für die Beeinflussung der intrazellulären Zielmoleküle dar. In einem ersten Versuch wurden von Thorsten Maier zunächst die intrazellulären Konzentrationen der Coxibe in HCT-116 (COX-2 negativ) und HCA-7 (COX-2 positiv) nach einer Behandlung mit jeweils 100  $\mu\text{M}$  Coxib untersucht [215]. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen in Medium mit 10 % FCS und den Coxiben für 2 h, da in Vorversuchen ermittelt werden konnte, dass sich eine Gleichgewichtskonzentration bereits nach 30 min einstellte und in diesem Zeitraum durch die Coxibe noch keine morphologischen Veränderungen der Zelle durch Apoptose stattfanden. Durch Ultrazentrifugation des Zellpellets in PBS gelang ein Auspressen der freien Menge an Coxib in der Zelle in den PBS-Überstand und eine Quantifizierung mittels LC-MS/MS. Diese Methode ist jedoch nicht geeignet, die exakte freie intrazelluläre Konzentration zu ermitteln und wurde somit nur für eine

vergleichende Analyse verwendet (2.2.8.1). Wie Abb. 3-25 A verdeutlicht, erreichten Celecoxib und DMC intrazelluläre Konzentrationen von 90 - 160  $\mu\text{M}$  in beiden Zelllinien. Die Konzentrationen mit  $< 25 \mu\text{M}$  fielen hingegen für die anderen Coxibe ca. 5 - 10-fach niedriger aus. Vergleicht man die intrazelluläre Konzentration mit dem Anteil an freien Coxib im Medium (Abb. 3-24), so können die Unterschiede in der Proteinbindung nicht für die hohen intrazellulären Konzentrationen von Celecoxib und DMC verantwortlich sein, welche ca. 2 - 3-fach höher lagen. Die intrazellulären Konzentrationen von den restlichen Coxiben lagen alle unterhalb der freien Konzentration im Medium.

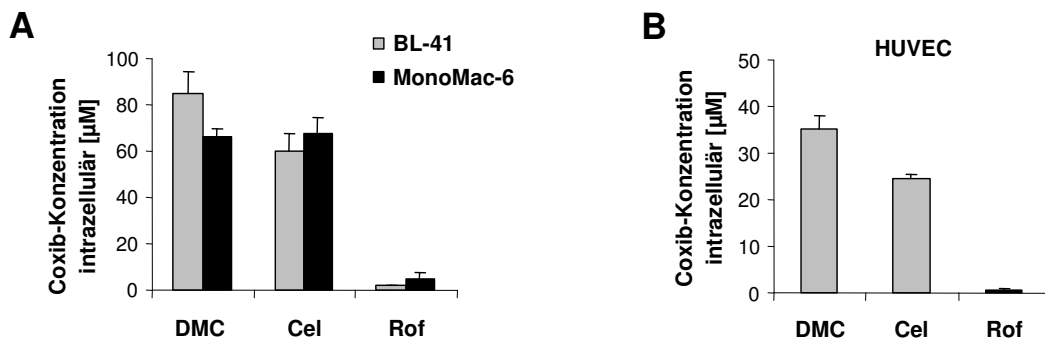
In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob die Aufnahme von Celecoxib und DMC in die Zelle von der eingesetzten Konzentration abhängig ist, wobei für Celecoxib HCT-116-Zellen (COX-2 negativ) und für DMC HeLa-Zellen (COX-2 positiv) verwendet wurden. Ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration und der erreichten intrazellulären Konzentration konnte dabei sowohl für Celecoxib als auch für DMC hergestellt werden (Abb. 3-25 B).



**Abb. 3-25:** (A) Intrazelluläre Coxib-Konzentrationen in HCT-116- und HCA-7-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit jeweils 100  $\mu\text{M}$  Coxib inkubiert, mit kaltem PBS gewaschen, das Pellet mit 200  $\mu\text{l}$  PBS überschichtet und der wässrige Zellbestandteil mittels Ultrazentrifugation ausgepresst. Die Quantifizierung der Coxib-Konzentrationen im erhaltenen Überstand erfolgte mittels LC-MS/MS-Analytik. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf unabhängigen Experimenten. (B) Intrazelluläre Celecoxib- und DMC-Konzentrationen in HCT-116 und HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration. Versuch wie (A) unter Verwendung steigender Konzentrationen von Celecoxib (5 - 100  $\mu\text{M}$ ) und DMC-(5 - 50  $\mu\text{M}$ ). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 (Celecoxib;  $n = 4$ ) und 3 (DMC;  $n = 9$ ) unabhängigen Experimenten. Abkürzungen: DMC, Dimethylcelecoxib; Cel, Celecoxib; Val, Valdecoxib; Eto, Etoricoxib; Rof, Rofecoxib; Lum, Lumiracoxib. (Abb. 3-25 A mit freundlicher Genehmigung von Thorsten J. Maier [215])

Da die bisherigen Ergebnisse durch Verwendung von HCT-116- und HCA-7-Zellen überwiegend auf das kolorektale Karzinom beschränkt sind, sollte im folgenden Versuch überprüft werden, ob die unterschiedliche Aufnahme der Coxibe in die Zelle auch auf andere Zellsysteme übertragbar ist. In die Betrachtung wurden deshalb BL-41 als Modell für das Burkitt-Lymphom, MonoMac-6 als monozytäres System (beides Suspensionszellen) sowie die primären Endothelzellen HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) aufgenommen und die intrazellulären Konzentrationen von Celecoxib, DMC und Rofecoxib miteinander verglichen.

Wie Abb. 3-26 A zeigt, konnte für jeweils 50  $\mu\text{M}$  Celecoxib und DMC die deutliche intrazelluläre Anreicherung in BL-41 und MonoMac-6-Zellen bestätigt werden. Auch hier führte die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Rofecoxib in beiden Zellsystemen zu einer ca. 10-fach niedrigeren intrazellulären Konzentration. Bei der Untersuchung der Endothelzellen (HUVEC) mussten die Konzentration von Celecoxib und DMC auf 25  $\mu\text{M}$  verringert werden, da 50  $\mu\text{M}$  zu deutlichen morphologischen Zellveränderungen führte. Da 25  $\mu\text{M}$  Rofecoxib bereits unter dem Detektionslimit der LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode lagen, wurde für Rofecoxib 50  $\mu\text{M}$  beibehalten. Die gesteigerte Sensitivität der HUVEC-Zellen gegenüber Celecoxib und DMC ist überwiegend auf die reduzierte FCS-Menge im Medium zurückzuführen. Für die primären Endothelzellen wurde ein Spezialmedium mit nur 2 % FCS verwendet. Die intrazelluläre Akkumulation von DMC und Celecoxib bestätigte sich ebenfalls für die Endothelzellen, wobei Rofecoxib kaum in die Zellen aufgenommen wurde (Abb. 3-26 B). Zusammengefasst konnte somit gezeigt werden, dass DMC und Celecoxib verglichen mit den restlichen Coxiben in den untersuchten Zellsystemen 5 - 10-fach höhere intrazelluläre Konzentrationen erreichen, die linear von den eingesetzten Konzentrationen, jedoch nicht von der freien Mediumkonzentration abhängig sind.

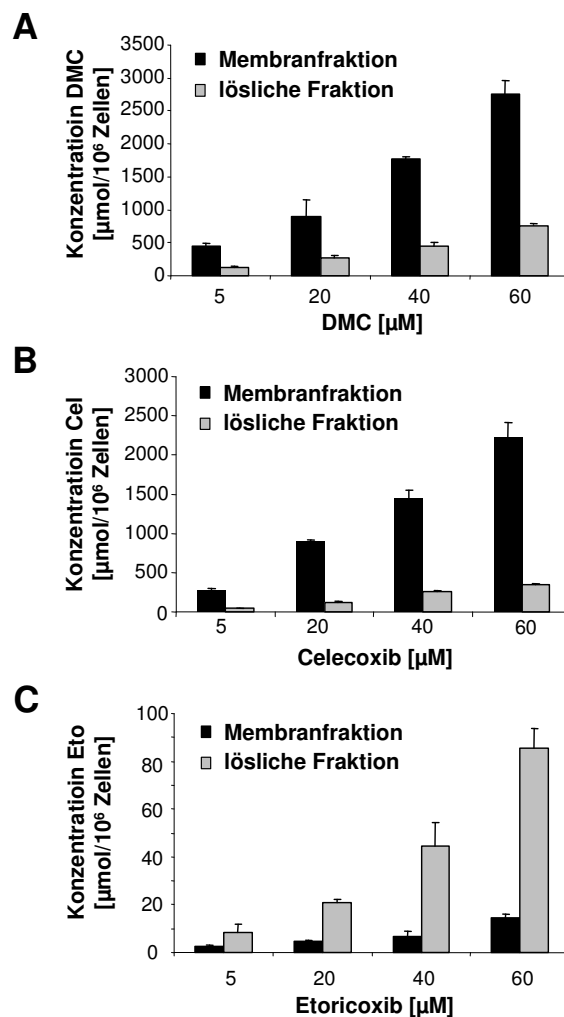


**Abb. 3-26:** Intrazelluläre Coxib-Konzentrationen in BL-41-, MonoMac-6- und HUVEC-Zellen. (A) BL-41 und MonoMac-6 wurden 2 h mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  DMC, Celecoxib und Rofecoxib inkubiert, mit kaltem PBS gewaschen, das Pellet mit 200  $\mu\text{l}$  PBS überschichtet und der wässrige Zellbestandteil mittels Ultrazentrifugation ausgepresst. Die Quantifizierung der Coxib-Konzentrationen im erhaltenen Überstand erfolgte mittels LC-MS/MS-Analytik. (B) Versuch wie (A) in HUVEC-Zellen, wobei jeweils 25  $\mu\text{M}$  DMC und Celecoxib und 50  $\mu\text{M}$  Rofecoxib untersucht wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 unabhängigen Experimenten ( $n = 4$ ). Abkürzungen: DMC, Dimethylcelecoxib; Cel, Celecoxib; Rof, Rofecoxib.

### 3.2.2 DMC und Celecoxib zeigen eine Anreicherung in der Membranfraktion

Um weitere Informationen über die subzelluläre Lokalisation von Celecoxib und DMC zu erhalten, wurden im folgenden Experiment die Konzentration der beiden Substanzen in der löslichen Fraktion und in der Membranfraktion von HCT-116-Zellen analysiert und mit Etoricoxib verglichen. Es erfolgte dazu eine Inkubation der Zellen mit steigenden Coxib-Konzentrationen (5, 20, 40, 60  $\mu\text{M}$ ) für 2 h. Nach dem Ernten und Auszählen der Zellen wurden diese mittels Ultrazentrifugation in die

lösliche Fraktion und die Membranfraktion aufgetrennt, wobei zur Membranfraktion nach der hier verwendeten Methode neben der Plasmamembran auch die Zellkerne, Mitochondrien sowie Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparates zählten. Wie Abb. 3-27 veranschaulicht, enthielt die Membranfraktion von HCT-116-Zellen ca. 80 % der intrazellulären Gesamtkonzentration an DMC und Celecoxib (Abb. 3-27 A und B), jedoch nur ca. 20 % der Gesamtkonzentration an Etoricoxib (Abb. 3-27 C). Des Weiteren konnte durch dieses Experiment das Ergebnis in Abb. 3-25 A erneut bestätigt werden. Die absoluten Mengen an intrazellulären DMC und Celecoxib lagen um ein Vielfaches (ca. 20-fach) höher als die absolute Menge an Etoricoxib (Abb. 3-27 A bis C). Zusammengefasst lies sich damit eine Anreicherung von DMC und Celecoxib nicht aber von Etoricoxib in Membrankompartimenten der HCT-116-Kolonkarzinomzellen nachweisen.

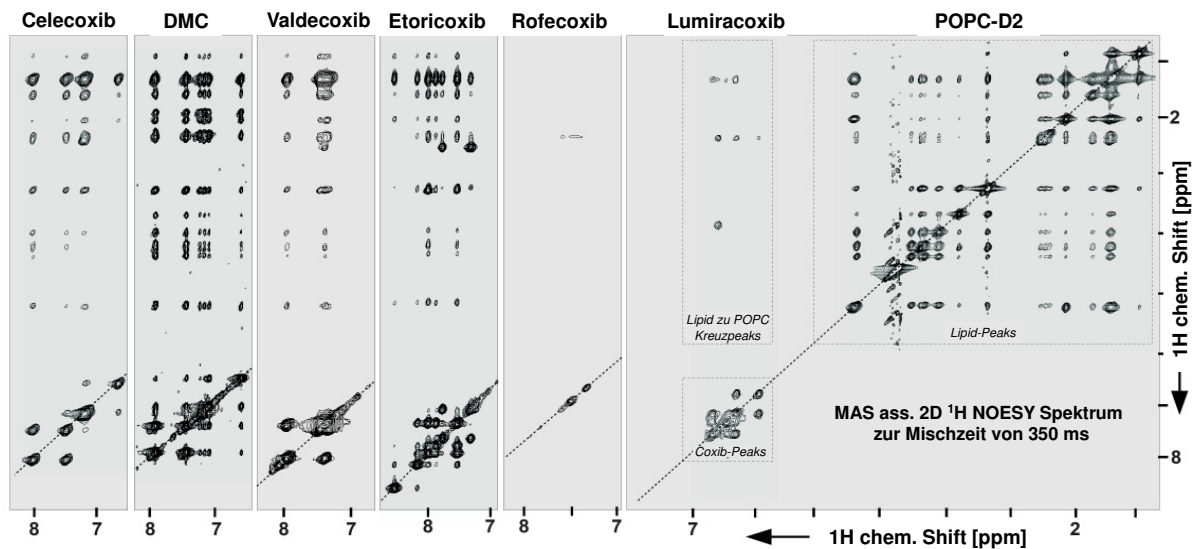


**Abb. 3-27:** Konzentration von (A) DMC, (B) Celecoxib und (C) Etoricoxib in der Membranfraktion (schwarze Balken) und der löslichen Fraktion (graue Balken) von HCT-116-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit steigenden Coxib-Konzentrationen (5, 20, 40, 60  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend in lösliche Fraktion und Membranfraktion getrennt. Die Konzentration der Coxibe in der jeweiligen Fraktion erfolgte mittels LC-MS/MS. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Konzentration des Coxibs bezogen auf die Zellzahl von drei unabhängigen Experimenten. Abkürzungen: DMC, Dimethylcelecoxib; Cel, Celecoxib; Eto, Etoricoxib.



### 3.2.3 DMC und Celecoxib zeigen eine starke Wechselwirkung mit der POPC-Modellmembran

Auf der Basis der gezeigten Anreicherung von DMC und Celecoxib in der Zellmembran erfolgte unter Verwendung der  $^1\text{H}$  MAS NOESY NMR-Spektroskopie die Untersuchung von Coxib-Membran-Interaktionen. Alle NMR-Versuche wurden von Dr. Jakob J. Lopez in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Glaubitz (Institut für Biophysikalische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt. Das Phospholipid 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (POPC) diente hierbei als Baustein der Modellmembran, indem es zunächst mit dem Coxib gemischt wurde und anschließend durch Einfrier- und Auftauzyklen multilamellare Vesikel hergestellt wurden. Treten Wechselwirkungen zwischen dem Coxib und der Modellmembran auf, so können diese durch NOE-Signale detektiert werden (2.2.8.3.) Im Allgemeinen sind aromatische  $^1\text{H}$  NMR-Signale von Substanzen, wie den Coxiben (6 – 8 ppm) gut von den dominierenden Lipidresonanzen, welche als typische amphiphile Shifts unter 5 ppm auftreten, zu trennen.

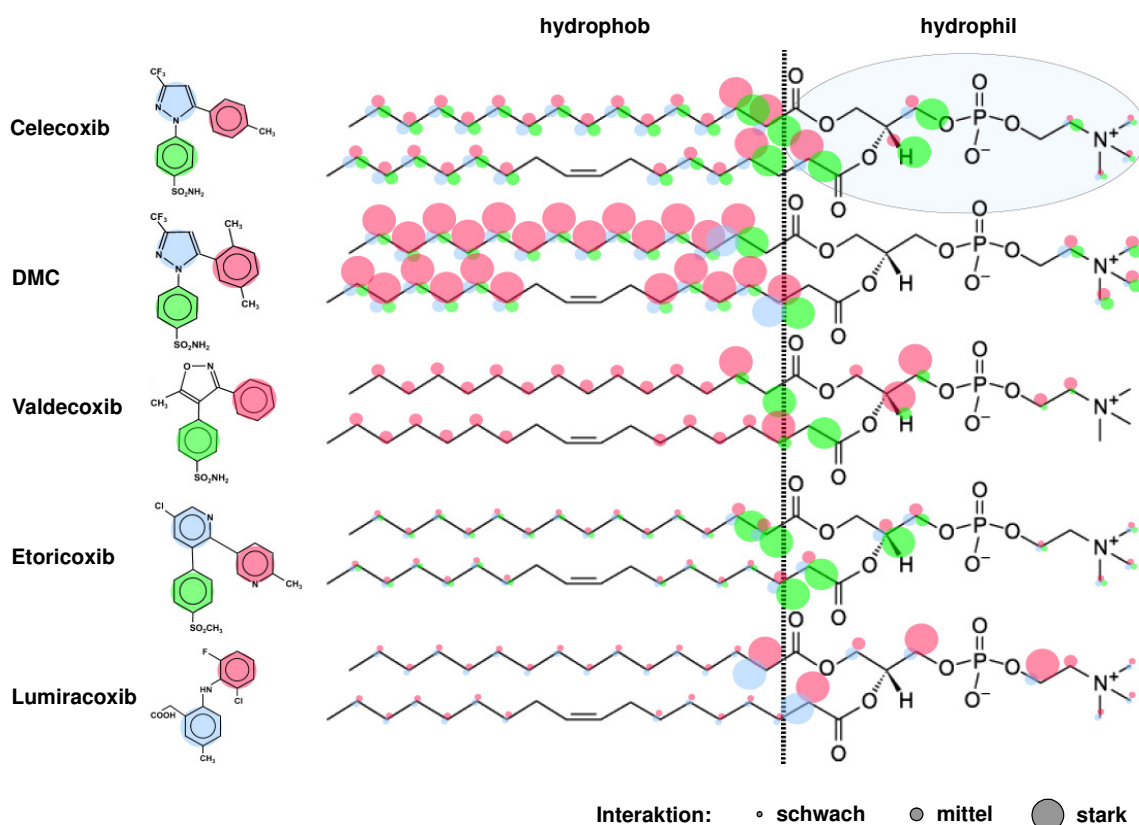


**Abb. 3-28:**  $^1\text{H}$  MAS NOESY Spektrum von POPC und Coxiben zu einer Mischzeit von 350 ms (Mischzeit für die maximalen Kreuzpeakintensitäten). Die aromatischen Signale der Coxibmoleküle liegen zwischen 6 und 8 ppm und waren somit sehr gut von den Lipidsignalen abzutrennen (kleiner 5 ppm). Die Kreuzpeakintensitäten spiegeln dabei die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Coxib-Moleküle innerhalb der Vesikelmembran wieder. Abkürzung: POPC, 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3- Phosphatidylcholin. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jakob J. Lopez und Prof. Dr. Clemens Glaubitz)

Wie Abb. 3-28 darstellt, existieren verschiedene Kreuzpeaks in der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie, die auf Coxib-POPC-Interaktionen zurückzuführen sind. Die Stärke dieser Peaks spiegelt dabei die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Coxibs innerhalb der Vesikelmembran wieder. Wie deutlich zu erkennen ist, zeigte Rofecoxib keine Inkorporation in den POPC-Bilayer. Die Konzentrationen von Rofecoxib waren dabei so gewählt, dass Kreuzpeaks für Wechselwirkungen

zwischen den Kernen des Rofecoxibmoleküls und den Kernen des Lipids sichtbar werden müssten. Für die anderen Coxibe konnten Kreuzpeaks für entsprechende Wechselwirkungen erhalten werden (Abb. 3-28).

Zur graphischen Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit wurde anschließend Abb. 3-29 erstellt. Mit der Ausnahme von Rofecoxib zeigten alle anderen Coxibe mittlere bis starke Interaktionen mit der polaren Phospholipid-Kopfgruppe, was einen Hinweis auf den Kontakt der Coxibe mit der Vesikeloberfläche lieferte. Interessanterweise zeigten nur DMC und Celecoxib mittlere bis starke Interaktionen mit der hydrophoben Kette des POPC. Für beide Stoffe konnten diese Interaktionen für alle drei aromatischen Ringe gezeigt werden (jeweils gekennzeichnet in Abb. 3-29 mit blau, grün und pink). Valdecoxib, Etoricoxib und Rofecoxib wiesen für Wechselwirkungen mit der Acylkette nur schwache Signale auf. Zusammengefasst lies sich somit durch Kreuz-Relaxationsexperimente unter Anwendung der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie deutlich die Integration von DMC und Celecoxib in die hydrophoben Acylketten der POPC-Modellmembran nachweisen.

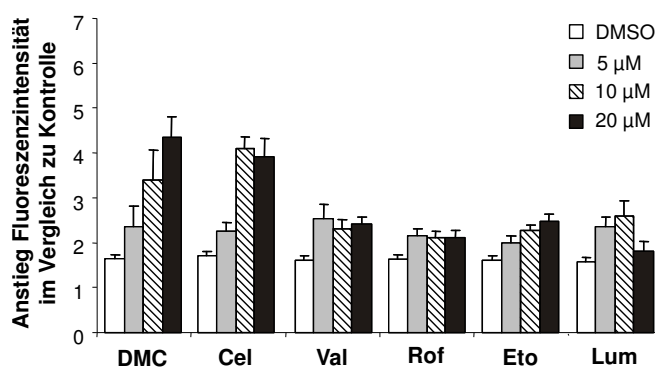


**Abb. 3-29:** Relative Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Coxibe innerhalb des Molekülgerütes des Lipids POPC. Die NOESY Kreuz-Relaxationsraten wurden in schwache, mittlere und starke Werte in Form von verschieden großen Kreisen unterteilt (graue Kreise in Legende), welche die Interaktionen der Coxibe mit entsprechender Stärke entlang des Lipidgerütes charakterisieren. Die Kreise wurden zur Darstellung der aromatischen Reste der Coxibe, welche mit Lipidmolekül wechselwirken, farblich unterteilt. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jakob J. Lopez und Prof. Dr. Clemens Glaubitz)

### 3.2.4 DMC und Celecoxib beeinflussen die Membranintegrität in intakten Zellen

Aus der gewonnenen Erkenntnis, dass sich DMC und Celecoxib in Membranen einlagern, sollten in den folgenden Versuchen mögliche Konsequenzen abgeleitet werden. Dazu wurde sowohl die Membranintegrität als auch die Membranfluidität nach Coxib-Behandlung untersucht. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien (TMA-DPH) können dynamische Vorgänge in Lipidmembranen untersucht werden. In *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass TMA-DPH schnell in Plasmamembranen lebender Zellen eingelagert wird und mindestens 25 min im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen des Phospholipidbilayers verweilt [216, 225]. Ein kontinuierliches Ansteigen der Fluoreszenzintensität ist dabei gleichzusetzen mit dem Übergang des TMA-DPH aus dem wässrigen Medium (Umgebung der Zelle) in die Phospholipidmembran. Dieser Prozess ist durch physikochemische Membraneigenschaften, wie Rigidität und Permeabilität, beeinflussbar.

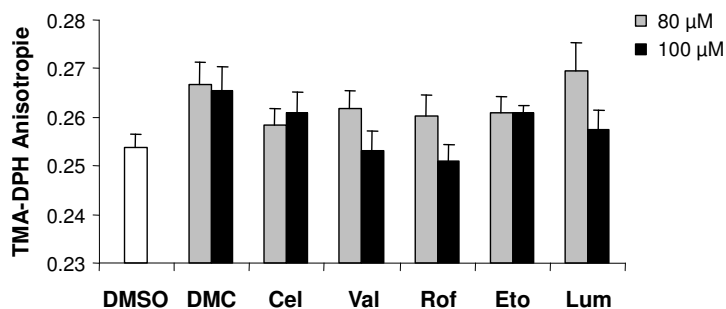
Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob eine Beeinflussung der Aufnahme von TMA-DPH in die Zellmembran von HCT-116-Zellen durch Coxib-Behandlung vorliegt. Veränderte Fluoreszenzintensitäten würden somit eine Wirkung der Coxibe auf die Membranintegrität nachweisen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit steigenden Coxib-Konzentrationen (5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert, wobei die Verwendung von PBS als Lösungsmittel keine höheren Konzentrationen aufgrund des Ausfallens der Coxibe erlaubte. Anschließend erfolgte die gleichzeitige Inkubtion der Zellen mit den Coxiben und 0,5  $\mu\text{M}$  TMA-DPH. Die Fluoreszenzintensität wurde zum Zeitpunkt Null und nach 15 min im Vergleich zu PBS-behandelten Zellen ohne DMSO und ohne Coxib gemessen.



**Abb. 3-30:** Einfluss der Coxibe auf die Membranintegrität in HCT-116-Zellen. Die Zellen wurden zunächst mit verschiedenen Coxib-Konzentrationen für 10 min vorinkubiert und anschließend mit TMA-DPH (0,5  $\mu\text{M}$ ) für weitere 15 min inkubiert. Ein kontinuierliches Ansteigen der Fluoreszenzintensität zeigt dabei die Aufnahme des TMA-DPH aus wässriger Lösung in die Zellmembran an. Die Fluoreszenzintensität wurde zum Zeitpunkt Null und nach 15 min bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm gemessen (Anregungswellenlänge 360 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Coxibbehandlung im Vergleich zur Kontrolle (PBS) von drei unabhängigen Experimenten. Abkürzungen: DMC, Dimethylcelecoxib; Cel, Celecoxib; Val, Valdecoxib; Eto, Etoricoxib; Rof, Rofecoxib; Lum, Lumiracoxib.

Abb. 3-30 zeigt zunächst einen Anstieg der Fluoreszenzintensität gegenüber der PBS-Kontrolle sowohl für DMSO-behandelte Zellen (entspricht dem Vehikel) als auch für alle Coxib-behandelten Zellen. DMC und Celecoxib konnten dabei konzentrationsabhängig die Aufnahme von TMA-DPH in die Zellmembran steigern, was durch ansteigende Fluoreszenzintensitäten verdeutlicht wurde (Abb. 3-30). Bei allen anderen Coxiben war dieser Effekt deutlich geringer ausgeprägt. Aus diesen Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass nur DMC und Celecoxib dazu in der Lage sind, die physikochemischen Eigenschaften der Membran durch Erhöhung der Integrität merklich zu verändern.

In einem sich anschließenden Experiment sollte unter Verwendung des TMA-DPH Anisotropiemessungen durchgeführt werden, die Hinweise auf die Beeinflussung der Membranfluidität liefern. Dabei ist ein Anstieg der TMA-DPH-Anisotropie von einer Abnahme der Membranflexibilität im Bereich der hydrophilen Phospholipid-Kopfgruppen gekennzeichnet [226]. HCT-116-Zellen wurden zunächst für 30 min mit den verschiedenen Coxiben in den Konzentrationen 80  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  vorinkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und nach dem Ernten die Zellzahl bestimmt. Es folgte eine weitere Inkubation von 20 min von jeweils  $7,5 \times 10^5$  Zellen gemischt mit 2  $\mu\text{M}$  TMA-DPH. Anschließend wurde die Fluoreszenz-Anisotropie von DMSO-behandelten Zellen mit Coxib-behandelten Zellen verglichen. Wie Abb. 3-31 zeigt, konnten alle Coxibe einen mäßigen Anstieg der TMA-DPH Anisotropie aufweisen. Diese Änderung ist jedoch nicht signifikant, so dass die Beeinflussung der Membranfluidität im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen vermutlich unbedeutend ist.



**Abb. 3-31:** Einfluss der Coxibe auf die Membranfluidität in HCT-116-Zellen. Die Zellen wurden zunächst für 30 min entweder mit DMSO (Kontrolle) oder mit 80  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Coxibs inkubiert. Nach Ablösen der Zellen und Zellzahlbestimmung wurden jeweils  $7,5 \times 10^5$  Zellen resuspendiert in 500  $\mu\text{l}$  HBSS zur Anisotropiemessung verwendet, mit TMA-DPH (4  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{l}$  HBSS) versetzt und 20 min inkubiert. Die Messung der Stady-State Anisotropie erfolgte mittels Fluoreszenz-Spektrometer mit Polarisator bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm (Anregungswellenlänge 360 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM des TMA-DPH Anisotropie nach Coxibbehandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Abkürzungen: DMC, Dimethylcelecoxib; Cel, Celecoxib; Val, Valdecoxib; Eto, Etoricoxib; Rof, Rofecoxib; Lum, Lumiracoxib.

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch DMC in humanen Krebszellen

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib neben den durch die COX-2-Hemmung hervorgerufenen antiphlogistischen, antipyretischen und analgetischen Wirkungen auch antikarzinogene Eigenschaften besitzt. Die molekularen Mechanismen, welche diesem chemopräventiven Effekt zugrunde liegen, sind nicht vollständig geklärt. Es konnten jedoch sowohl COX-abhängige als auch COX-unabhängige Mechanismen gefunden werden, die zu diesen Wirkungen führen. Das Strukturanalogon Dimethylcelecoxib (DMC) besitzt gleichwertige antikarzinogene Effekte [196-198, 227] und wurde deshalb aufgrund der fehlenden COX-Hemmung häufig als Vergleichssubstanz für Celecoxib verwendet, um die COX-abhängigen von den COX-unabhängigen Eigenschaften zu trennen. DMC selbst rückt aufgrund der chemopräventiven Eigenschaften als Krebstherapeutikum immer mehr in den Vordergrund [228]. Als Mechanismus für die nicht vorhandene COX-2-Hemmung wird die Vergrößerung des Moleküles durch die 2 Methylgruppen am Phenylring postuliert, welche eine Interaktion von DMC mit dem Enzym verhindern soll [192, 229]. Daher wurden für DMC im Vergleich zu Celecoxib weniger gastrointestinale als auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen postuliert, so dass DMC für die Langzeiteinnahme zur Chemoprävention vermutlich besser geeignet wäre [228]. Voraussetzung hierfür ist, dass DMC aufgrund der fehlenden COX-Hemmung auch keine Beeinflussung der Prostanoidsynthese aufweist. Da für PGE<sub>2</sub> eine deutliche Beteiligung in der Tumorentstehung nachgewiesen werden konnte (Abb. 1-6) [103, 168, 169, 171], wurde in dieser Arbeit zunächst vorrangig die Wirkung von DMC auf dieses Prostaglandin untersucht.

Ein Vergleich von DMC mit den Coxiben Celecoxib, Rofecoxib und Etoricoxib auf die PGE<sub>2</sub>-Produktion *in vitro* in HCA-7-Kolonkarzinomzellen zeigte überraschenderweise für alle Substanzen eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese. DMC erwies sich verglichen mit den Coxiben als schwächer wirksam, zeigte aber bei einer Konzentration von 1 µM schon eine ca. 40 %ige Hemmung, die in Zellkulturexperimenten nicht vernachlässigt werden darf. Anschließende Versuche bestätigten die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese ebenfalls in zwei weiteren humanen Krebszellen A-549 und HeLa. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte in allen drei Zelllinien lagen dabei im Bereich von 0,6 bis 3 µM. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von Backhus et al. überein, der in IL-1β stimulierten A-549-Zellen ebenfalls eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch DMC zeigen konnte [229]. Jedoch wurden hier nur 10 und 50 µM DMC getestet, so dass es nicht möglich war, daraus den IC<sub>50</sub>-Wert zu berechnen. Backhus et al. beschrieb hier DMC als nicht PGE<sub>2</sub>-hemmend, was durch eine logarithmische Auftragung des gebildeten PGE<sub>2</sub> gelang. Durch Entlogarithmieren der Daten kann nachgewiesen

werden, dass 50  $\mu\text{M}$  DMC die  $\text{PGE}_2$ -Synthese um mehr als 98 % hemmt. In U87-Glioblastomazellen zeigte DMC hingegen keine  $\text{PGE}_2$ -Hemmung [196]. Diese Zellen produzieren wie die hier verwendeten HCA-7-Zellen basal eine hohe  $\text{PGE}_2$ -Menge und benötigen somit keine Stimulation. Die Unwirksamkeit von DMC könnte auf eine unterschiedliche Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. Für HCA-7-Zellen erfolgte eine Vorinkubation mit den entsprechenden DMC-Konzentrationen von 30 min. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut mit DMC inkubiert. Dieser Arbeitsschritt sicherte ein komplettes Entfernen des  $\text{PGE}_2$ , welches vor der vollen Aktivitätsentfaltung von DMC gebildet wurde. Kardosh et al. beschrieb keine Vorinkubation in den untersuchten U87-Zellen [196].

DMC wurde erstmals 2002 von Song et al. beschrieben, als er Celecoxib und -Analoge im Hinblick auf Apoptose-induzierende Eigenschaften untersuchte [193]. Diese sollten von der COX-hemmenden Komponente differenziert werden. Der von Song verwendete  $\text{IC}_{50}$ -Wert von größer 100  $\mu\text{M}$  für die COX-2-Hemmung von DMC stammte aus einer Publikation von Penning et al., in der DMC jedoch nicht untersucht wurde [194]. Zahlreiche Arbeiten beschrieben DMC als Substanz ohne COX-hemmende Eigenschaften mit dem Verweis auf Penning et al. [197, 229, 230]. Erst Schönthal bestätigte 2006 in einem *in vitro* COX-Inhibitor-Screening-Assay, dass DMC-Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  nur einen unbedeutenden Einfluss auf das rekombinante COX-2-Enzym besitzen [192]. Der Einfluss auf die COX-1 wurde nicht gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die schwache Wirkung von DMC auf die humane rekombinante COX-2 in einem zellfreien *in vitro* Aktivitätsassay bestätigt werden. Die untersuchten DMC-Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  zeigten daneben auch keinen Einfluss auf die Aktivität des gereinigten COX-1-Enzyms vom Schaf. Da der Screening-Assay nur ein artifizielles System darstellt, sollte die Wirkung von DMC im humanen COX-2-Vollblutassay untersucht werden, welches den physiologischen Vorgängen *in vivo* sehr nahe kommt. Auch hier konnte bestätigt werden, dass DMC erst in Konzentrationen größer 100  $\mu\text{M}$  eine 50%ige Hemmung der COX-2-Aktivität bewirkt. Im Vergleich zeigte Celecoxib als COX-2-Hemmer eine Hemmung schon unter 1  $\mu\text{M}$ , was mit den in der Literatur angegebenen Werten von 0,19  $\mu\text{M}$  - 0,87  $\mu\text{M}$  für Versuche mit humanen Vollblut vergleichbar ist [135, 140, 141]. Untersuchungen zur Wirkung von DMC auf die Proteinexpression der COX-Isoenzyme konnten ebenfalls keinen Einfluss erkennen lassen. Aufgrund der gezeigten Inaktivität von DMC auf die COX-Isoenzyme im niedrigen mikromolaren Bereich muss diese Substanz einen Einfluss auf andere Enzyme des  $\text{PGE}_2$ -Syntheseweges besitzen.

#### 4.1.1 Die mPGES-1 als mögliches molekulares Zielprotein von DMC

Durch zahlreiche Studien wurde erkannt, dass die COX-2 eine kritische Rolle in der Entstehung von verschiedenen Krebsarten spielt. Dabei konnte eine gesteigerte Expression in einer Vielzahl von Tumortypen gezeigt werden [91, 173, 231], was mit einer gesteigerten Prostaglandinsynthese, besonders des  $\text{PGE}_2$ , verbunden ist. So zeigten ca. 90 % der Gewebeproben vom kolorektalen Karzinom sowie ca. 50 % der frühen Adenome erhöhte COX-2-Mengen [91]. Ein Ausschalten der

cPLA<sub>2α</sub> [60], der COX-2 [99] oder des EP<sub>2</sub>-Rezeptors [100] führte in APC-knockout-Mäusen zu einer verringerten Polypenbildung, was einen Hinweis auf die Verbindung zwischen PGE<sub>2</sub>-Signalweg und Onkogenese lieferte. Die bisher beschriebenen Wirkungen einer gesteigerten COX-2-vermittelten PGE<sub>2</sub>-Synthese in der Tumorentwicklung führen durch verschiedene molekulare Angriffspunkte zu 1) einer Hemmung der Apoptose [103, 232], 2) gesteigerter Angiogenese [107, 233], 3) vermehrter Zellproliferation [102] und 4) Metastasierung [106, 234] (Abb. 1-6). Des Weiteren wird vermutet, dass auch die mPGES-1 aufgrund ihrer gesteigerten Expression in einer Vielzahl von Tumorgeweben eine Rolle in der Tumorentwicklung spielt [125-129]. So zeigten 83 % kolorektaler Karzinome [126] und 79 % der Tumore vom nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom [125] eine Überexpression der mPGES-1. Meist ist die gesteigerte mPGES-1-Menge mit einer vermehrten COX-2-Expression und daraus resultierenden erhöhten PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen verbunden, wobei Unterschiede in der Expressionsrate unterschiedliche Regulationsmechanismen der beiden Proteine vermuten lassen. Eine mechanistische Kopplung zwischen der mPGES-1 und der COX-2 konnte anhand von Transfektionsstudien [114] und knockdown-Experimenten [123] bestätigt werden (Abb. 1-4). Zahlreiche weitere Studien weisen ebenfalls auf eine Beteiligung der mPGES-1 und COX-2 in der Tumorentstehung hin. So zeigten mit COX-2 und mPGES-1 kotransfizierte HEK-239-Zellen *in vitro* eine erhöhte Proliferation [114]. Die s.c. Injektion dieser Zellen in immundefiziente Nacktmäuse führte zu einem aggressiven Tumorwachstum [235]. Für die COX-1/mPGES-1-Kotransfektion konnte dies nicht bestätigt werden. Für die Kolonkarzinomzellen HCA-7, welche COX-2 und mPGES-1 konstitutiv exprimieren und basal viel PGE<sub>2</sub> bilden, wurde eine COX-2 und PGE<sub>2</sub>-abhängige Proliferation nachgewiesen [236]. Eine Inkubation der HCA-7-Zellen mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 bewirkte neben einer kompletten Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese ebenfalls eine Reduktion des Zellwachstums um ca. 40 %. Der unspezifische mPGES-1-Inhibitor MK-886, der auch das FLAP-Enzym als weiteres MAPEG-Enzym hemmen kann [220], zeigte ebenfalls eine Reduktion des Zellwachstums um 40 % und eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese um ca. 60 % [235]. In zahlreichen klinischen Befunden und epidemiologischen Studien wurde beschrieben, dass das relative Risiko an Darmkrebs zu erkranken durch die Einnahme von NSAIDs über 10 - 15 Jahre gesenkt werden kann [157, 159, 160]. Die durch NSAIDs hervorgerufene COX-Hemmung führt neben einer gewünschten verminderten PGE<sub>2</sub>-Synthese auch zu einer Hemmung der anderen Prostanoiden, was zu gastrointestinalen und kardiovaskulären Nebenwirkungen führt. Da die gastrointestinalen Nebenwirkungen überwiegend auf eine COX-1-Hemmung zurückzuführen sind, konnten diese durch den Einsatz von selektiven COX-2-Hemmern, den Coxiben, reduziert werden [138, 237]. Die kardiovaskulären Nebenwirkungen sind bis heute nicht vollständig geklärt, treten aber sowohl unter den klassischen NSAIDs als auch unter Coxiben in der Langzeittherapie auf [148, 150, 151]. Da während der Krebsentstehung die vermehrte PGE<sub>2</sub>-Synthese eine zentrale Rolle spielt, stellt neben der COX-2 auch die mPGES-1 aufgrund der gezeigten Hochregulation im Tumorgewebe ein interessantes Zielmolekül dar. Durch die spezifische Hemmung der mPGES-1 sollten die durch NSAIDs

hervorgerufenen Nebenwirkungen ausbleiben, da die Synthese der anderen Prostanoiden unbeeinflusst bleibt. Tatsächlich zeigte MF63, ein neuer selektiver Inhibitor der mPGES-1 mit einem  $IC_{50}$ -Wert für das humane rekombinante Enzym von 1,3 nM, eine selektive Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in Nagern verbunden mit gleicher antipyretischer und antiphlogistischer Wirksamkeit wie NSAIDs und sehr guter Verträglichkeit [238]. MF63 oder andere spezifische mPGES-1-Inhibitoren wurden im Hinblick auf Tumorprävention noch nicht getestet. Auch für das in dieser Arbeit untersuchte DMC stellt die mPGES-1 aufgrund der gezeigten PGE<sub>2</sub>-Hemmung einen möglichen molekularen Angriffspunkt dar. Daneben ist aber auch eine Beeinflussung der cPGES oder der mPGES-2 möglich. Die cPGES, welche im Cytosol basal exprimiert wird und keine Beeinflussung durch proinflammatorische Zytokine zeigt, verstoffwechselt überwiegend zur Aufrechterhaltung der Homöostase nur COX-1-gebildetes PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> (Abb. 1-4) [48, 111]. Eine mögliche Beteiligung der cPGES in der Krebsentstehung wurde noch nicht gezeigt, wobei für Bauchspeicheldrüsenkrebs zumindest teilweise eine vermehrte Expression beschrieben wurde [239]. Die mPGES-2 zeigt zunächst eine Expression im Golgi-Apparat und erfährt während der Proteinreifung eine Proteolyse der N-terminalen hydrophoben Domäne, so dass die aktive Form im Cytosol vorliegt [133]. Die mPGES-2-Expression ist ebenfalls nicht stimulierbar und zeigt keine bevorzugte Kopplung zu einem COX-Isoenzym (Abb. 1-4). Sowohl im kolorektalen Karzinom [133] als auch in Pankreaskarzinom [239] konnte eine gesteigerte Expression für die mPGES-2 nachgewiesen werden, wobei ein möglicher Zusammenhang mit der Tumorentstehung noch nicht beschrieben wurde.

Die in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen zeigten eine Expression aller PGE<sub>2</sub>-Synthasen, wobei die mPGES-1 nach einer Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  deutlich in ihrer Expression anstieg, während die mPGES-2 und cPGES unbeeinflusst blieben. Die Menge an PGE<sub>2</sub>, welches über die COX-1/cPGES- bzw. COX/mPGES-2-Reaktionswege gebildet wurde, erwies sich als sehr gering, da unstimulierte Zellen kaum PGE<sub>2</sub> produzierten. Durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  wurde ein massiver Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Produktion erreicht, der somit überwiegend dem COX-2/mPGES-1-Syntheseweg zugeschrieben werden kann. Der Einfluss von DMC auf die mPGES-1-Aktivität wurde in einem zellfreien Assay unter Verwendung der stimulierten mikrosomalen Fraktion von HeLa-Zellen durchgeführt. Interessanterweise zeigte DMC eine Hemmung der mPGES-1 bis zu einem Maximum von 65 % der Enzymaktivität, wofür ein  $IC_{50}$ -Wert von 15,6  $\mu$ M ermittelt werden konnte. Im Vergleich dazu zeigte MK-886 als unspezifischer mPGES-1-Inhibitor erwartungsgemäß eine 100 %ige Hemmung der mPGES-1 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von ca. 4  $\mu$ M, der mit Literaturangaben vergleichbar ist und damit die Funktionalität des Assays beweist [116, 221]. Der Effizienzverlust von DMC im zellfreien Assay könnte zum einen damit erklärt werden, dass DMC kein direkter Inhibitor der mPGES-1 ist und somit die Hemmung durch indirekte Mechanismen, wie Konformationsänderungen im Enzym oder allosterische Hemmung hervorruft. Zum anderen ist die im Assay eingesetzte PGH<sub>2</sub>-Substratkonzentration von 20  $\mu$ M vermutlich wesentlich höher als die tatsächliche Konzentration in den Zellen. Als kompetitiver Inhibitor müsste DMC PGH<sub>2</sub> als Substrat



vom aktiven Zentrum der mPGES-1 verdrängen, was bei zu hoher PGH<sub>2</sub>-Konzentration nur zum Teil gelingt und somit nicht zu einer vollständigen Enzymhemmung führt. Diese beiden Hypothesen bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen.

Thoren et al. testete verschiedene NSAIDs auf mPGES-1-Hemmung in bakterieller Membran mit überexprimierten mPGES-1-Enzym und konnte für den COX-2-Inhibitor NS-398 eine Hemmung mit einer IC<sub>50</sub> von ca. 20 µM ermitteln [118]. Deshalb wurden weitere zur Verfügung stehende Coxibe und Diclofenac als klassisches NSAID mit Strukturähnlichkeit zu Lumiracoxib im mPGES-1-Assay getestet. Interessanterweise zeigten die Sulfonamide Celecoxib und Valdecoxib sowie die Essigsäurederivate Lumiracoxib und Diclofenac ebenfalls eine Hemmung der mPGES-1-Aktivität, während Rofecoxib und Etoricoxib mit Methylsulfonylstruktur unwirksam blieben. Celecoxib erwies sich mit einer IC<sub>50</sub> von 21,9 µM neben DMC als vergleichsweise stärkste Substanz. Jedoch wurde auch von Celecoxib die Enzymaktivität nicht zu 100 % gehemmt. Der Einfluss auf die mPGES-1 stellt somit keinen Gruppeneffekt der Coxibe dar.

Des Weiteren führte DMC in Konzentrationen größer 10 µM ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung der mPGES-1-Proteininduktion in stimulierten HeLa-Zellen, während die Proteinexpression der mPGES-2 und cPGES unverändert blieb. Die nach Stimulation hervorgerufene gesteigerte mPGES-mRNA-Synthese wurde durch Koinkubation mit 30 µM DMC ebenfalls unterbunden. Der maximale Effekt von ca. 30 % wurde nach 6 h erreicht. Ähnliche Wirkungen zeigte auch schon Kojima et al. in IL-1β stimulierten synovialen Fibroblasten. Nach Inkubation mit sowohl klassischen NSAIDs, wie Indometacin und Meloxicam als auch mit den selektiven COX-2-Inhibitoren Rofecoxib und NS-398 in Konzentrationen von 1 µM wurde die mPGES-1-mRNA- und Protein-Expression gehemmt [240]. cPGES und COX-1 blieben auch hier unbeeinflusst. Interessanterweise konnte der Zusatz von 1 µM externem PGE<sub>2</sub> zu stimulierten Fibroblasten die hemmende Wirkung der NSAIDs auf die mPGES-1 unterbinden, wobei externes PGE<sub>2</sub> in unstimulierten Fibroblasten keinen Effekt auf die mPGES-1-Expression aufwies [240]. Im Gegensatz dazu konnte der Zusatz von 1 µM PGE<sub>2</sub> die von DMC hervorgerufene Hemmung der mPGES-1-Proteinexpression in stimulierten HeLa-Zellen nicht verhindern. Auch das Strukturanalogon Celecoxib reduzierte in einer Konzentration von 1 µM deutlich die IL-1β-stimulierte mPGES-1-Proteinexpression in humanen Fibroblasten des Zahnfleisches. Der unspezifische COX-Inhibitor Indomethacin hingegen zeigte diese Wirkung hier nicht [241]. Celecoxib bestätigte eine signifikante Reduktion der mPGES-1-Expression auch *in vivo* nach Langzeiteinnahme bei Patienten mit Osteoarthritis [242]. Im Nacktmaus-Tumormodell wiesen Xenograften von A-549-Zellen eine verminderte mPGES-1-Expression nach Celecoxib-Behandlung im Vergleich zu Xenograften von unbehandelten Mäusen auf [243].

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass DMC die mPGES-1-Aktivität *in vitro* deutlich hemmt und in HeLa-Zellen die durch Stimulation hervorgerufene Induktion der mPGES-1-Protein- und -Genexpression verringert. Ähnliche Effekte wurden auch für Celecoxib beschrieben, so dass die Beeinflussung der mPGES-1 einen möglichen molekularen Mechanismus für die antikarzinogene

Wirkung von sowohl DMC als auch von Celecoxib darstellt. Die für DMC gezeigte Beeinflussung der mPGES-1 in HeLa-Zellen findet in ca. 10-fach höheren Konzentrationen statt als zur Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese notwendig sind, so dass weitere an der PGE<sub>2</sub>-Synthese beteiligten Enzyme als mögliche molekulare Zielstrukturen für DMC untersucht werden müssen.

#### 4.1.2 Die cPLA<sub>2α</sub> als mögliches molekulares Zielprotein von DMC

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Gesamtprostanoide in den verwendeten humanen Krebszellen HeLa, A-549 und HCA-7 nach DMC-Behandlung zeigte unerwarteterweise eine Hemmung der gesamten in der jeweiligen Zellart gebildeten Prostanoide. Diese Hemmung erwies sich als konzentrationsabhängig und hatte für alle Prostanoide das gleiche Ausmaß. Aufgrund der hier dargestellten Experimente wurde eine Hemmung der COX-Isoenzyme für DMC ausgeschlossen, so dass dieser Effekt nur durch die Unterbindung der Arachidonsäurefreisetzung, vermittelt durch die Hemmung der Phospholipasen A<sub>2</sub>, hervorgerufen werden kann.

Eine herausragende Rolle aus der „Superfamilie“ der Phospholipasen übernimmt die cytosolische Phospholipase A<sub>2α</sub> (cPLA<sub>2α</sub>), die als einzige von den mehr als 20 bisher identifizierten PLA<sub>2</sub>-Enzymen spezifisch Arachidonsäure aus der sn-2-Position von Glycerophospholipiden der Zellmembran freisetzt (Abb. 1-1) [46, 49]. Auch für die cPLA<sub>2α</sub> konnte in zahlreichen Studien eine gesteigerte Expression in verschiedenen Krebsarten, wie kolorektales Karzinom, Dünndarm- [54], Lungen- [55], Pankreaskarzinom [239] sowie Krebs im Mund-Kiefer-Bereich [244] nachgewiesen werden. So zeigte Penel et al. eine Überexpression der cPLA<sub>2α</sub> in ca. 50 % der untersuchten Darmkrebsgewebe und Darmkrebszelllinien, wobei dies mit der COX-2-Expression korrelierte und für die PGE<sub>2</sub>-Produktion von Bedeutung war [245]. Im kolorektalem Adenokarzinom korrelierte die Anzahl cPLA<sub>2α</sub>-exprimierender Bindegewebszellen mit der Expression von VEGF, so dass die COX-2-induzierte Angiogenese über die durch cPLA<sub>2α</sub> freigesetzte Arachidonsäure reguliert werden könnte [246]. Jedoch gibt es auch einige Publikationen, die zeigen, dass die cPLA<sub>2α</sub> im Tumorgewebe unverändert bleibt oder sogar weniger stark exprimiert wird. So z.B. im kolorektalem Karzinom, wo ca. 85 % der COX-2-überexprimierenden Krebsgewebe keine cPLA<sub>2α</sub>-Expression aufwiesen [247]. Auch im Tiermodell wurden teilweise widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Eine Deletion der cPLA<sub>2α</sub> in der APC<sup>Δ716</sup>-knockout-Maus, ein Modell für die humane FAP, reduzierte die Größe aber nicht die Anzahl der Polypen im Dünndarm. Die Polypen im Dickdarm blieben jedoch unbeeinflusst [60]. Hong et al. verwendete APC<sup>Min</sup>-knockout-Mäuse zur Deletion der cPLA<sub>2α</sub> und fand sowohl eine Reduktion in Größe als auch in Anzahl der Polypen im Dünndarm [248]. Da die Deletion der COX-2 in APC<sup>Δ716</sup>-Mäusen das gleiche Ergebnis brachte [99], schien die cPLA<sub>2α</sub> der Hauptlieferant der Arachidonsäure für die COX-2 im Dünndarmepithel zu sein. Die Behandlung von cPLA<sub>2α</sub>-knockout-Mäusen mit Urethan, einem Lungenkarzinogen, führte zu 43% weniger Lungentumoren und zu einer reduzierten Prostaglandinmenge im Tumorgewebe verglichen mit dem Wildtyp [249]. Weiser-Evans et.al

injizierte Lungenkrebszellen in die Lunge von Mäusen, was die Ausbildung von primären Tumoren mit anschließender Metastasierung in anderen Lungengebieten und Lymphknoten zur Folge hatte. Wurden die gleichen Zellen in cPLA<sub>2α</sub>-knockout-Mäuse injiziert, so konnte die Anzahl der sekundären metastatischen Tumore dramatisch reduziert werden [250]. In einem anderen Tumormodell zeigten cPLA<sub>2α</sub>-knockout-Mäuse dagegen nach der Behandlung mit Azoxymethan, einem Darmkarzinogen, einen Anstieg in der Tumervielfalt und -größe im Darm [251]. Ilsley et al. konnte eine Beziehung zwischen reduzierten Ceramidkonzentrationen und einer damit verbundenen reduzierten Apoptoserate in cPLA<sub>2α</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen herstellen [251]. Die proapoptotischen Eigenschaften der cPLA<sub>2α</sub> belegen auch andere Arbeiten. Hier wird die Arachidonsäure selbst als zytotoxische Substanz eingestuft, da sie Sphingomyelinasen (SMasen) aktivieren konnte, die Sphingomyelin zu Ceramiden umsetzen. Ceramide wiederum können zu einem Zellzyklusblock und Apoptose führen. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der TNFα-induzierten Akkumulation von Arachidonsäure und steigenden Ceramidkonzentrationen in humanen Leukämiezellen nachgewiesen werden [61, 62].

Aufgrund der hier zusammengefassten Datenlage ist die Rolle der cPLA<sub>2α</sub> in der Tumorentstehung nicht eindeutig. Es ist unklar, unter welchen Bedingungen ihre Aktivität mit tumorauslösenden oder tumorhemmenden Effekten verbunden ist. Da jedoch in verschiedenen Tumorarten eine Überexpression der cPLA<sub>2α</sub> mehrfach gezeigt wurde, stellt sie in diesen Geweben aufgrund ihrer nachgewiesenen kritischen Rolle in der Prostaglandinbildung nach wie vor ein potentielles Zielmolekül zur Chemoprävention und somit einen möglichen Angriffspunkt von DMC dar.

Durch Western Blot-Analyse wurde zunächst die Expression der cPLA<sub>2α</sub> in HeLa-Zellen bestätigt. Auch die verwendeten A-549 und HCA-7 exprimieren die cPLA<sub>2α</sub>. Eine Applikation von 20 μM externer Arachidonsäure konnte die durch 1 bzw. 10 μM DMC-vermittelte Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese sowohl in stimulierten HeLa-Zellen als auch in unstimulierten HCA-Zellen aufheben, was auf eine mögliche Hemmung der cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität durch DMC schließen lässt. Auch Chuang et al. konnte die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch DMC in Konzentrationen von 0,1 - 10 μM in Pankreaskarzinomzellen BxPC-3 nach Zusatz von 10 μM Arachidonsäure aufheben [227]. Um den Einfluss von DMC auf die cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Assay unter Verwendung des humanen rekombinaten Enzyms, überexprimiert in Sf9-Insektenzellen, sowie künstlich hergestellter Vesikel aus Glycerophospholipiden mit Arachidonsäure in sn-2-Position durchgeführt. DMC zeigte eine Hemmung der cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität bis zu 100 % der Gesamtaktivität mit einer IC<sub>50</sub> von 58 μM.

Die Proteinexpression der cPLA<sub>2α</sub> kann in verschiedenen Zelltypen durch proinflammatorische Zytokine (IL-1β, TNFα) oder Wachstumsfaktoren (EGF, CSF) induziert werden [49]. Hauptsächlich erfolgt die Aktivierung jedoch durch eine Stimulus-vermittelte Translokation der cPLA<sub>2α</sub> vom Cytosol zu intrazellulären Membranen und durch Phosphorylierungen von Serinresten (Abb. 1-2) [20, 49, 51]. Die Bindung von Calcium-Aktivatoren an spezifische Rezeptoren führt zur Aktivierung der

Phospholipase C über G-Protein-abhängige oder -unabhängige Mechanismen, was die Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAC) zur Folge hat. IP<sub>3</sub> mobilisiert intrazelluläres Calcium, welches ab Konzentrationen von ca. 200 nM zu einer Translokation der cPLA<sub>2α</sub> vom Cytosol bevorzugt zu perinuklearen Membranen, wie Golgi, Endoplasmatisches Retikulum und Kernmembran führt und somit den Zugang zu Arachidonsäure-enthaltenden Phospholipiden ermöglicht. Gleichzeitig führt dies zu einer effizienten Kopplung der cPLA<sub>2α</sub> mit weiteren Enzymen der Eicosanoid-Biosynthese [20, 49]. Alternativ kann die intrazelluläre Calciumkonzentration auch durch eine Aktivierung Rezeptor-gekoppelter Calcium-Kanäle erhöht werden [49]. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und MAPK-aktivierte Proteinkinase steigern dagegen durch Phosphorylierungen am Serin<sup>505</sup> und Serin<sup>727</sup> die Aktivität der cPLA<sub>2α</sub> [51].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von DMC auf die cPLA<sub>2α</sub>-Proteinexpression, auf den Phosphorylierungsstatus der cPLA<sub>2α</sub> und auf die cPLA<sub>2α</sub>-Translokation untersucht. Nach Stimulation der HeLa-Zellen mit IL-1β und TNFα war zunächst ein Anstieg der Phosphorylierung am Serin<sup>505</sup> zu erkennen, während die Gesamtproteinmenge unbeeinflusst blieb. Die Inkubation der Zellen mit DMC hatte weder einen Einfluss auf die durch Stimulation hervorgerufene Phosphorylierung noch auf die cPLA<sub>2α</sub>-Gesamtproteinexpression. Die Untersuchung der Translokation der cPLA<sub>2α</sub> erfolgte in A-549-Zellen. Durch Stimulation mit Calcium-Ionophor A23187 wurde nach 10 min eine Anreicherung der cPLA<sub>2α</sub> in der Membranfraktion erreicht, was mit einer zeitgleichen Abnahme im Cytosol verbunden war. Ähnliche Ergebnisse mit Calcium-Ionophor lieferten auch Makrophagen [252] und CHO-Zellen, welche cPLA<sub>2α</sub> überexprimierten [253]. Calcium-Ionophor fungiert als Ionentransporter, der durch den Austausch von Ca<sup>2+</sup> gegen H<sup>+</sup> die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht und damit die cPLA<sub>2α</sub> aktiviert. Der Zusatz von DMC konnte die durch Stimulation hervorgerufene Translokation der cPLA<sub>2α</sub> nicht unterbinden.

Zusammengefasst zeigte DMC weder einen Einfluss auf die Proteinexpression der cPLA<sub>2α</sub> noch auf die Phosphorylierung bzw. Translokation. Die Hemmung der cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität *in vitro* mit einer IC<sub>50</sub> von 58 μM allein erklärt nicht die Hemmung der Prostanoidsynthese mit einer ca. 10-fach niedrigeren IC<sub>50</sub>. Die im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Aufnahme der Coxibe in die Zelle und zur intrazellulären Verteilung konnten sowohl für Celecoxib als auch für DMC eine starke Interaktion mit den Acylketten des verwendeten Phospholipid-Bilayer-Models aufweisen, was auf eine Anreicherung in der Zellmembran hinweist (ausführliche Diskussion siehe Kap. 4.2). Die Akkumulation von DMC in Zellmembranen könnte neben der Störung der Membranstruktur auch zu einer höheren Konzentration an membrangebundene oder transmembranäre Enzyme führen. Ein Beispiel hierfür ist die gezeigte Hemmung der membrangebundenen mPGES-1 [254], aber auch die Hemmung der PDK-1 [197]. So könnte man spekulieren, dass zum einen durch die von DMC hervorgerufene Membranveränderung und abgeschwächte Fluidität in intakten Zellen den Angriff der cPLA<sub>2α</sub> an Membranphospholipide erschwert und es somit zu einer zusätzlichen indirekten Hemmung

des Enzymes kommt. Zum anderen führt die Anreicherung in der Membran zu einer hohen DMC-Konzentration, welche das Enzym umgibt, so dass die gefundenen Ergebnisse des zellfreien Assays nicht den tatsächlichen Zustand in intakten Zellen widerspiegeln. Ein Beispiel hierfür liefert die erst kürzlich gezeigte Hemmung der 5-Lipoxygenase (5-LOX) durch Celecoxib [255]. Unter zellfreien Bedingungen zeigte Celecoxib eine Hemmung der 5-LOX mit einer  $IC_{50}$  von ca. 25  $\mu$ M verglichen mit einer  $IC_{50}$  von ca. 7  $\mu$ M für intakte Leukozyten. Diese Theorien erfordern jedoch weitere Untersuchungen. Hierfür müsste die  $cPLA_{2\alpha}$ -Aktivität in intakten Zellen untersucht werden, wobei zu bedenken ist, dass die gebildete Arachidonsäure im intakten System sofort über die COX- und LOX-Isoenzyme verstoffwechselt wird. Des Weiteren sind neben der  $cPLA_{2\alpha}$  auch andere  $PLA_2$ -Enzyme zur Synthese von Arachidonsäure befähigt, welche ausgeschaltet werden müssen. Zu nennen sind hier hauptsächlich die sekretorischen Phospholipasen ( $sPLA_2$ ).

Da im Rahmen dieser Arbeit durch die von DMC hervorgerufene Hemmung der  $PGE_2$ -Synthese der Fokus auf den Cyclooxygenase-Stoffwechselweg gelegt wurde, ist hinsichtlich der gezeigten Hemmung der  $cPLA_{2\alpha}$ -Aktivität ebenfalls die Auswirkung auf den Leukotrienstoffwechsel zu klären. Eine Hemmung der  $cPLA_{2\alpha}$  würde ebenfalls eine Hemmung der Leukotriensynthese bedeuten. In diesem Zusammenhang müsste weiter beachtet werden, dass DMC möglicherweise auch die Aktivität der 5-LOX und damit die Synthese der 5-LOX-Produkte, wie 5-HETE und  $LTB_4$  hemmt, wie es für Celecoxib gezeigt werden konnte [255, 256]. DMC bestätigte aufgrund der Strukturähnlichkeit bereits mehrfach ähnliche Wirkungen auf molekulare Zielproteine, wie es auch anhand der hier aufgeführten Daten für die  $mPGES-1$  gezeigt werden konnte.

Da neuere Untersuchungen auch den  $sPLA_2$ -Enzymen eine wichtige Rolle in der Arachidonsäurefreisetzung zukommen lassen, stellen diese ebenfalls ein mögliches molekulares Zielmolekül von DMC dar. Bisher konnten von 10 verschiedenen  $sPLA_2$ -Varianten in Säugern 9 im Menschen identifiziert werden (Tab. 1-2; Kap.1.2.1.2). Aufgrund der Gruppendiversität ist die Datenlage zur möglichen Beteiligung an der Tumorentwicklung relativ gering. Eine Überexpression der  $sPLA_2-II$  konnte in verschiedenen Tumorgeweben gefunden werden, wobei die genauere Differenzierung fehlte [45]. Speziell der  $sPLA_2-IIA$  wird eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung und -progression zugeschrieben. So konnte eine ansteigende Gen- und Proteinexpression in humanen kolorektalen Adenomen von FAP-Patienten gefunden werden [70]. Eine Überexpression der  $sPLA_2-IIA$  wurde auch in Prostata Tumoren [257] und Brustkrebs [258] gefunden, wobei besonders im Brustkrebs eine positive Korrelation zwischen der  $sPLA_2-IIA$ -Expression und dem Tumorstadium bestand. Im Prostatakarzinom zeigte die  $sPLA_2-IIA$  nur eine gesteigerte Zellproliferation durch die gleichzeitige Aktivität der  $cPLA_{2\alpha}$  [59]. Neuere Untersuchungen zeigten für Prostatakrebs eine verstärkte  $sPLA_2-IIA$ -Expression in Karzinomen verglichen mit gutartigem Gewebe. Dagegen war die Expression in metastasierenden Karzinomen gegenüber Primärtumoren verringert [259]. Andere Studien bestätigen für die  $sPLA_2-IIA$  starke antibakterielle Eigenschaften [71], die im Bezug auf deren Expression im Magenadenokarzinom mit einer längeren Überlebenszeit und weniger

---

Metastasierungen verbunden sein könnten [72]. Trotzdem werden der sPLA<sub>2</sub>-IIA eher protumorigene Eigenschaften zugeschrieben, da eine Aktivitätshemmung meist mit einer Hemmung von Proliferation, Angiogenese und induzierter Apoptose verbunden ist [53]. Daneben konnte im kolorektalem Adenokarzinom für die sPLA<sub>2</sub>-X eine verstärkte Expression gefunden werden, welche mit der COX-2-Expression korreliert [73]. Die sPLA<sub>2</sub>-X induzierte in HT-29-Zellen deutlich die Arachidonsäurefreisetzung, was zu einer COX-2-abhängigen PGE<sub>2</sub>-Synthese führte [73]. Mounier et al. zeigte hingegen sowohl im normalen Gewebe als auch im kolorektalen Adenokarzinomgewebe eine hohe sPLA<sub>2</sub>-X-mRNA-Expression und eine hohe sPLA<sub>2</sub>-III-Expression im Tumorgewebe, so dass dieses Enzym einen möglichen Biomarker für das kolorektale Karzinom darstellen könnte [260]. In humanen kolorektalen Darmkrebszellen brachte Murakami et al. die sPLA<sub>2</sub>-III mit einem gesteigerten Tumorwachstum und Angiogenese in Verbindung [261]. Aus der Gruppe der sPLA<sub>2</sub> zeigen vor allem die sPLA<sub>2</sub>-IIA und -V eine Induktion nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen. Die sPLA<sub>2</sub>-III und -X sind dagegen überwiegend konstitutiv exprimiert [18].

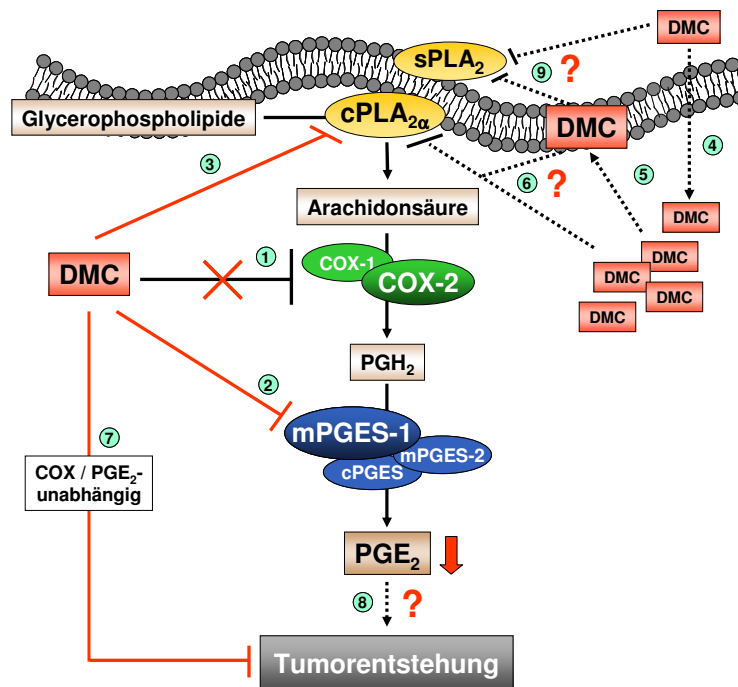
In den hier verwendeten HeLa-Zellen konnte eine Expression der sPLA<sub>2</sub>-IIA-mRNA durch eigene Experimente detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für HCA-7-Zellen wurde eine sPLA<sub>2</sub>-III-Proteinexpression beschrieben [261]. Die Expression der anderen sPLA<sub>2</sub>-Enzyme wurde bisher noch nicht untersucht. Da DMC die Gesamtprostanoidsynthese sowohl in HCA-7- als auch in HeLa-Zellen hemmt und dies durch die Zugabe von externer Arachidonsäure unterbunden werden kann, stellen vor allem die sPLA<sub>2</sub>-IIA und die sPLA<sub>2</sub>-III mögliche molekulare Zielproteine für DMC dar. Diese Theorie bedarf jedoch weiteren Untersuchungen.

#### 4.1.3 Einfluss der PGE<sub>2</sub>-Hemmung auf die antiproliferativen Eigenschaften von DMC

In zahlreichen Publikationen konnte die antiproliferative Wirkung von DMC auf verschiedene humane Krebszellen *in vitro* und im Nacktmausmodell gezeigt werden. Einige molekulare Mechanismen, die dieser Wirkung zugrunde liegen können, wurden bereits im Kapitel 1.3.4 dargestellt. Kardosh et al. beschrieb in humanen Lymphomzellen (Raji und Ramos), die COX-1 basal aber keine COX-2 exprimierten, eine Hemmung der Zellproliferation durch einen MTT-Assay nach 48 h DMC-Inkubation mit IC<sub>50</sub>-Werten kleiner 50 µM [196]. Myelomzellen [195] und Glioblastomzellen [227] zeigten ähnliche Sensitivität. Backhus et al. konnte dies für A-549-Zellen bestätigen. Eine Analyse der Überlebensrate mit einem MTS-Assay ergab für DMC eine IC<sub>50</sub> von 53 µM [229]. Auch für die humanen Pankreaskarzinomzellen ohne COX-2-Expression (MIA-PaCa) sowie mit COX-2-Expression (BxPC-3) konnte eine gleiche Sensitivität gegenüber DMC nachgewiesen werden [227]. Daneben bestätigte Schiffmann et al. im Nacktmausmodell, dass DMC das Tumorwachstum von s.c. injizierten HCT-116-Zellen, welche keine COX-2 exprimieren, signifikant gegenüber unbehandelten Mäusen hemmt [182]. DMC wurde in einer täglichen oralen Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Auch Kulp et al. zeigte eine Hemmung des Tumorwachstums im Nacktmausmodell mit PC-3-Zellen, die basal keine COX-2 exprimierten. Allerdings wurde hier der Effekt erst bei einer oralen DMC-Dosis von 200 mg/kg Körpergewicht erreicht [197].

Die aufgezeigte Hemmung der Proliferation durch DMC in zahlreichen Zelllinien mit unterschiedlichen COX-2-Expressionsstatus verdeutlicht besonders, dass diese Wirkung COX-unabhängig erfolgt. Durch einen WST-Proliferationstest sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob dieser Effekt auch unabhängig von der PGE<sub>2</sub>-Hemmung ist. Die vergleichende Analyse der Wirkung von DMC auf die Überlebensrate von unstimulierten und stimulierten HeLa-Zellen lieferte ähnliche Ergebnisse. Es konnte auch hier kein Unterschied in der Sensitivität der Zellen mit ähnlichen IC<sub>50</sub>-Werten von 50 µM bzw. 48 µM festgestellt werden. HCA-7-Zellen, welche unstimuliert bereits große Mengen PGE<sub>2</sub> bilden, verhielten sich auch nach Zugabe von ansteigenden Konzentrationen an PGE<sub>2</sub> (0,01 - 10 µM, extern zugegeben) ähnlich sensitiv gegenüber der antiproliferativen Wirkung von DMC. So scheint die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion *in vitro* keinen Einfluss auf den antiproliferativen Effekt von DMC zu besitzen. Jedoch kann besonders für das Nacktmausmodell nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese im tumorumgebenden Mausegewebe zur antitumorigenen Wirkung von DMC beiträgt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Effekte von DMC auf Enzyme des Prostanoid-Syntheseweges mit speziellem Fokus auf das PGE<sub>2</sub> demonstrieren eindeutig, dass DMC trotz fehlender COX-Hemmung im niedrigen mikromolaren Bereich nicht als Kontrollsubstanz verwendet werden kann, um zwischen Prostaglandin-abhängigen und Prostaglandin-unabhängigen Mechanismen von z.B. Coxiben zu unterscheiden. Die gezeigten Wirkungen von DMC sowie mögliche Mechanismen sind in Abb. 4-1 nochmals schematisch zusammengefasst.



**Abb. 4-1: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen der antikanzerogenen und prostanoïdhemmenden Wirkungen von DMC:** DMC zeigt *in vitro* keine Beeinflussung der COX-Isoenzyme (1). DMC hemmt die Aktivität sowie die Protein- und mRNA-Expression der mPGES-1 (2). DMC hemmt die cPLA<sub>2α</sub>-Aktivität direkt (3), jedoch kann auch die intrazelluläre Anreicherung von DMC (4) sowie die Akkumulation in Zellmembranen (5) zur Hemmung der cPLA<sub>2α</sub> beitragen (6). DMC vermittelt seine antiproliferativen Effekte *in vitro* vorwiegend unabhängig von der COX- und PGE<sub>2</sub>-Hemmung (7); *in vivo* können jedoch Einflüsse durch die PGE<sub>2</sub>-Hemmung nicht ausgeschlossen werden (8). Daneben stellen die sPLA<sub>2</sub>-Enzyme sowohl intra- als auch extrazellulär mögliche Zielmoleküle von DMC dar (9).

## 4.2 Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme der Coxibe in die Zelle und zur intrazellulären Verteilung

Verschiedene klinische Studien deuten zunächst darauf hin, dass die COX-2-Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib vergleichbare chemopräventive Wirkungen auf kolorektale Adenome besitzen [262, 263]. Dabei wird angenommen, dass die Hemmung der COX-2 eine bedeutende Rolle für die antikanzerogenen Wirkungen dieser Substanzen spielt (Kap. 1.3.2.). Daneben gibt es aber auch zahlreiche Hinweise darauf, dass substanzspezifische COX-2-unabhängige Mechanismen ebenfalls zu den antikanzerogenen Eigenschaften der Coxibe beitragen und hier Celecoxib eine herausragende Rolle einnimmt [175] (Kap. 1.3.3). Derzeit ist Celecoxib das einzige NSAID, was zur begleitenden Therapie der familiären adenomatösen Polyposis zugelassen ist [165]. Eigene Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass innerhalb der Coxibe Celecoxib die vergleichsweise stärksten antiproliferativen



Wirkungen sowohl in Zellkulturexperimenten als auch im Nacktmausmodell besitzt. Nur das Struktur analogon DMC wies ähnliche bzw. sogar stärkere antiproliferative Effekte auf und zeigte dabei erst ab Konzentrationen größer 100  $\mu\text{M}$  eine ersichtliche Hemmung der COX-2-Aktivität, was auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte [182] (Kap. 3.1.2; 3.1.7). Eine Reihe von molekularen Zielstrukturen wurden identifiziert, die zur COX-2-unabhängigen antikarzinogenen Wirkung von Celecoxib und DMC beitragen. Zu nennen sind hier beispielsweise die Hemmung der Phosphatidylinositol-Triphosphat-abhängigen Kinase-1 (PKC-1;  $\text{IC}_{50} = 48 \mu\text{M}$  (Celecoxib) bzw.  $38 \mu\text{M}$  (DMC); intakte Zellen), die Hemmung von Cyclinen ( $> 30$  bzw.  $20 \mu\text{M}$ ; verschiedene Tumorzelllinien) oder die Degradierung des Beta-Catenins ( $\geq 60 \mu\text{M}$ , Kolonkarzinomzellen; Kap. 1.3.4; Tab. 1-4.).

Die therapeutische Relevanz dieser Ergebnisse für Celecoxib geraten jedoch immer mehr in Diskussion, da offensichtlich eine Diskrepanz zwischen den niedrigen Plasmakonzentrationen der *in vivo* Studien und den hohen Celecoxib-Konzentrationen für Zellkulturexperimente vorliegt [224]. Tatsächlich werden bei einer Dosis von 400 mg Celecoxib zweimal täglich Plasmakonzentrationen von maximal ca.  $8 \mu\text{M}$  erreicht [205], was im Gegensatz zu den Konzentrationen von ca.  $30 - 70 \mu\text{M}$  steht, welche in der Regel für die COX-2-unabhängigen Zielmoleküle *in vitro* benötigt werden. Auf der Suche nach einer Rationalen zur Korrelation der Zellkulturergebnisse mit pharmakologischen Effekten *in vivo* wurde zunächst vermutet, dass Celecoxib und DMC, nicht aber die anderen Coxibe eine Anreicherung in Tumorzellen sowie in anderen Zelltypen zeigen. Diese Hypothese wird ebenfalls von der Tatsache gestützt, dass Celecoxib im Menschen ein sehr großes Verteilungsvolumen von  $339 - 517 \text{ l}$  aufweist. Verglichen mit Rofecoxib (ca.  $90 \text{ l}$ ), Etoricoxib (ca.  $120 \text{ l}$ ) und Valdecoxib (ca.  $55 \text{ l}$ ) ist das Verteilungsvolumen von Celecoxib ca.  $5 - 10$ fach höher, wobei Lumiracoxib sogar ein noch geringeres Verteilungsvolumen von  $9 \text{ l}$  besitzt [143, 144]. Celecoxib wird somit nach Absorption rasch aus dem Blut in umliegende Kompartimente verteilt und könnte eine Anreicherung in tiefe, derzeit unbekannte Kompartimente zeigen.

Deshalb wurden die intrazellulären Konzentrationen aller zur Verfügung stehenden Coxibe (Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib) und vom Struktur analogon DMC in verschiedenen humanen Zellen untersucht. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass DMC und Celecoxib eine intrazelluläre Anreicherung in humanen Kolonkarzinomzellen unabhängig vom COX-Expressionstatus der Zellen aufweisen (HCT-116: COX-2 negativ; HCA-7: COX-2 positiv) [215]. Da nur die freie, proteinungebundene Form des Coxibs die Zelle passieren kann, wurden in vorangegangenen Experimenten die freien Konzentrationen im Medium mit  $10 \%$  FCS ermittelt. Hier zeigten Etoricoxib und Rofecoxib die höchsten freien Konzentrationen ( $78 \%$  und  $93 \%$ ) [215]. Da DMC und Celecoxib nur zu ca.  $40$  bzw.  $30 \%$  proteinungebunden vorlagen, ist die intrazelluläre Anreicherung unabhängig von der freien Konzentration. Untersuchungen zum möglichen Mechanismus für die zelluläre Aufnahme von Celecoxib und DMC belegten, dass beide Substanzen weder durch einen Serumalbumin-vermittelten Carrier-Transport noch durch einen ATP-vermittelten

aktiven Transport in die Zelle aufgenommen werden [215]. Deshalb wird eine Aufnahme beider Substanzen durch passive Diffusion diskutiert. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass Celecoxib bei niedrigeren Temperaturen (4, 12, 20 °C) besser in die Zelle aufgenommen wurde als bei 37 °C [215].

Es bestand die Annahme, dass diese Anreicherung vom Zelltyp unabhängig ist. Deshalb wurden weitere humane Krebszelllinien und humane Endothelzellen untersucht. Die intrazelluläre Anreicherung von DMC und Celecoxib bestätigte sich ebenfalls für Cervixkarzinomzellen (HeLa), B-Lymphozyten (BL-41), Monozyten (Leukämie; MonoMac-6) und Endothelzellen (HUVEC). Beide Substanzen zeigten eine lineare konzentrationsabhängige Anreicherung. Im Gegensatz dazu war die Anreicherung von Celecoxib und DMC in murinen Fibroblasten (NIH-3T3) wesentlich schwächer ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Zum einen könnte dieser Unterschied an der Verwendung von Zelllinien verschiedener Spezies liegen, zum anderen könnte dies aber auch bedeuten, dass sich Celecoxib und DMC nicht generell in allen Zellarten gleich stark anreichern. Um diese Unterschiede zu klären, sind jedoch weitere Experimente nötig.

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation zeigten für DMC und Celecoxib interessanterweise eine Anreicherung in der Membranfraktion von ca. 80 % der intrazellulären Gesamtkonzentration, während Etoricoxib zu ca. 80 % in der löslichen Fraktion vorlag. Auch in diesem Versuch konnte anhand der erhaltenen Gesamtkonzentrationen nochmals die intrazelluläre Anreicherung für DMC und Celecoxib bestätigt werden. Eine Akkumulation in Membranen setzt Interaktionen zwischen einer Substanz und Membranstrukturen voraus. Mittels zweidimensionaler <sup>1</sup>H MAS NOESY NMR-Spektroskopie werden diese Interaktionen in Form von Kreuzpeaks detektiert sowie den hydrophoben bzw. hydrophilen Bereichen der Modellmembran (POPC) zugeordnet. Mit der Ausnahme von Rofecoxib zeigten alle Coxibe mittlere bis starke Interaktionen mit der polaren Phospholipid-Kopfgruppe, was einen Hinweis auf den Kontakt der Coxibe mit der Vesikel- bzw. Membranoberfläche lieferte. Die stärksten Interaktionen mit den Acylketten des Phospholipid-Bilayer-Modells wiesen dagegen wiederum nur DMC und Celecoxib auf. Die unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen der Coxibe könnten somit von den substanzspezifischen Interaktionen mit der Zellmembran bedingt sein. Trotz der niedrigen intrazellulären Konzentrationen wiesen jedoch auch Etoricoxib, Valdecoxib und Lumiracoxib schwache Kreuz-Relaxationssignale auf, die einen Hinweis auf Interaktionen mit den hydrophoben Breichen der Membran lieferten. Dies ist vermutlich auf die verwendete multilamellare POPC-Modellmembran zurückzuführen, die nur ein stark vereinfachtes Modell darstellt und die Situation *in vivo* nicht komplett nachbildet. Membrankomponenten wie Sphingolipide, Cholesterol oder Proteine fehlen in diesem Modell.

Die ermittelten NMR-Daten stimmen dabei mit den kürzlich gezeigten Untersuchungen mittels Röntgenbeugung überein, in denen für Celecoxib ebenfalls eine Interaktion mit den Acylketten beschrieben wurde. Im Gegensatz dazu wurde für Rofecoxib eine Anlagerung an die hydrophilen Kopfgruppen nachgewiesen [264].

Um mögliche Konsequenzen aus der Anreicherung von DMC und Celecoxib in die Zellmembran ableiten zu können, wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien (TMA-DPH) Untersuchungen zum Einfluss der Coxibe auf die Membranintegrität sowie Membranfluidität durchgeführt. TMA-DPH besitzt die Eigenschaft, sich in Phospholipidmembranen einzulagern und steigert dabei die Fluoreszenzintensität beim Übergang vom wässrigen Milieu in Zellmembranen [216]. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals konnte zunächst für alle Coxibe bestätigt werden, wobei nur Celecoxib und DMC dazu in der Lage waren, konzentrationsabhängig eine deutliche Steigerung des Signals hervorzurufen. Somit wurde die Membranintegrität nur von Celecoxib und DMC merklich verändert. Auf der anderen Seite konnten Untersuchungen zur Fluoreszenz-Anisotropie mit TMA-DPH, welche zum Nachweis einer veränderten Membranfluidität genutzt werden, keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Coxiben erkennen lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Coxibe ebenfalls im Hinblick auf die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in HCA-7-Zellen untersucht (Kap. 3.1.1). Celecoxib hemmte im Vergleich zu den anderen Coxiben die COX-2-bedingte PGE<sub>2</sub>-Synthese mit einer IC<sub>50</sub> kleiner 0,01 µM am stärksten. Rofecoxib und Etoricoxib erwiesen sich mit IC<sub>50</sub>-Werten deutlich über 0,01 µM als weniger potent. Vergleicht man die erhaltenen Werte mit anderen COX-2-Assays in intakten Zellen, so wiesen diese ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte von 0,12 µM für Celecoxib, 0,21 µM für Rofecoxib (LPS-stimulierte humane Monozyten) [265] und 0,079 µM für Etoricoxib (COX-2 transfizierte CHO-Zellen) auf [140]. Der gezeigte Einfluss von Celecoxib auf die Membranintegrität und die Membrananreicherung von Celecoxib führt somit offensichtlich zu einer effizienteren COX-2-Hemmung in den HCA-7 Zellen. Besitzen Membran-gebundene oder Membran-assoziierte Enzyme eine Affinität gegenüber Celecoxib oder auch DMC, so könnten die Membraneffekte hier ebenfalls einen Wirksamkeitssteigerung der beiden Substanzen auf diese Enzyme hervorrufen.

In der Literatur findet man zahlreiche Hinweise, die eine Akkumulation von Celecoxib in Zellmembranen vermuten lassen. So konnte Gamerding et al. für Celecoxib in isolierten Neuroblastoma-Zellen Cholesterol-ähnliche Effekte, wie verstärkte Membran-Anisotropie und abgeschwächte Membran-Fluidität, aufzeigen [266]. In einem Permeabilitätsassay bestätigte Celecoxib die Membranaktivität durch Vergrößerung der Porenvolumen in liposomalen Modelmembranen analog zu dem bereits bekannten membranaktiven Antibiotikum Gramicidin S, wobei eine gesteigerte Kaliumionen-Freisetzung sowie eine gesteigerte Freisetzung des Fluoreszenzindikators Calcein gemessen wurde [267]. Verschiedene Zellkulturstudien deuten ebenfalls eine intrazelluläre Anreicherung sowohl von Celecoxib als auch von DMC an. Zunächst sind hier die überlegenen antiproliferativen Effekte der beiden Substanzen gegenüber den anderen Coxiben zu nennen [182], die durch die intrazelluläre Akkumulation von Celecoxib und DMC erklärbar wären. Die Korrelation zwischen dem antikarzinogenen Effekt und der intrazellulären Konzentration scheint auch deshalb denkbar, weil hohe intrazelluläre Konzentrationen von Celecoxib (30 – 70 µM) die

Hemmung von Enzymen hervorrufen, die als molekulare Zielstrukturen für die antikarzinogenen Wirkungen identifiziert wurden. Dabei scheint die PDK-1 eines der bedeutenden proapoptischen Zielproteine sowohl für Celecoxib als auch für DMC darzustellen [187, 197, 202]. Daneben konnte für Celecoxib sowie andere zytotoxische NSAIDs eine Erhöhung der Membranpermeabilität nachgewiesen werden, was mit einer gesteigerten Apoptoserate verbunden war. Dabei wurde ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, begleitet von einem verstärkten Kaliumaustrom, beschrieben [268]. Des Weiteren sind fast alle zellulären Zielmoleküle von Celecoxib, wie die COX-2, Ca<sup>2+</sup>-ATPase [188], PDK-1 [197], Dihydroceramid-Desaturase [269] oder die 5-Lipoxygenase [255], Membran-assoziierte Enzyme. Auch für DMC konnten Membran-assoziierte Enzyme, wie die PDK-1 [197] oder die mPGES-1 [254], als molekulare Targets identifiziert werden. Im intakten Zellsystem würde die Membrananreicherung von DMC und Celecoxib zu einer erhöhten Konzentration der Substanzen an den membranständigen Enzymen führen und somit deren Hemmung ermöglichen. Celecoxib zeigte beispielsweise im zellfreien Assay eine Hemmung der 5-LOX-Aktivität mit einer IC<sub>50</sub> von 25 µM (rekombinantes Enzym). Wurden dagegen intakte Leukozyten verwendet, so zeigten bereits 6 – 8 µM Celecoxib eine 50 %ige Hemmung der 5-LOX-Aktivität [255]. Dieser Effizienzanstieg könnte also unter anderem mit der Membrananreicherung von Celecoxib und die damit verbundene erhöhte Konzentration in der Umgebung der 5-LOX erklärt werden.

Die Tatsache, dass Celecoxib und auch DMC verschiedene Membran-assoziierte Enzyme hemmen, lässt die Vermutung aufkommen, dass es sich um eine unspezifische Interaktion der Substanzen mit den Enzymen handelt, welche zu einer Reihe von Nebenwirkungen führen würde. Dafür konnte jedoch kein Beleg erbracht werden. Vielmehr wird angenommen, dass die gezeigte intrazelluläre bzw. membranäre Akkumulation die Interaktion von Celecoxib und DMC mit Enzymen, die eine gewisse Substanzaffinität für diese Substanzen aufweisen, erleichtert. Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, die den Einfluss der Membrananreicherung von Celecoxib und DMC auf die Aktivität der Membran-assoziierten Enzyme genauer überprüfen.

Daneben konnte für Celecoxib auch *in vivo* die Wirksamkeit auf die COX-2-unabhängigen Zielstrukturen bestätigt werden, was die Hypothese der intrazellulären Akkumulation stützt. So zeigte Yang et al., dass Celecoxib in Ratten eine neointimale Hyperplasie reduzierte, was auf eine Hemmung des PDK-1/Akt-Signalweges, insbesondere auf die Hemmung der Akt-Aktivierung zurückgeführt wurde [270]. Des Weiteren verhinderte Celecoxib in Ratten die Akkumulation von Beta-Catenin in intestinalen Krypten, was mit den gezeigten *in vitro* Daten von Maier et al. übereinstimmt [189, 271]. Pyrko et al. konnte für Celecoxib ab einer Konzentration von 50 µM in verschiedenen Zellkulturen eine verminderte Expression des Apoptose-hemmenden Proteins Survivin aufzeigen. Dies wurde ebenfalls nach einer oralen Celecoxib-Behandlung in Tumoren von Xenograft-Nacktmäusen bestätigt [272]. Diese Studien demonstrieren eindeutig, dass Celecoxib *in vivo* bei niedrigen Plasmakonzentrationen ebenfalls mit bestimmten Zielproteinen interagiert, für deren Beeinflussung in *in vitro* Experimenten Konzentrationen von ca. 30 - 70 µM benötigt wurden. Das um ein Vielfaches

---

höhere Verteilungsvolumen von Celecoxib verglichen mit den anderen Coxiben (Tab. 1-3) gibt ebenfalls einen Hinweis darauf, dass Celecoxib in tieferen Kompartimenten des Körper akkumuliert. Zusammen mit der gezeigten Anreicherung in Zellmembranen könnte dies einen ersten Erklärungsansatz für die *in vitro* / *in vivo* Konzentrationsdiskrepanz liefern. Werner et al. konnte eine Akkumulation von Celecoxib im Fettgewebe aufzeigen, was mit der Affinität von Celecoxib zu lipophilen Strukturen übereinstimmt [273]. Dieses Verhalten würde auch die verstärkte Anreicherung von Celecoxib im Gastrointestinaltrakt von Ratten erklären, wenn die Substanz während der Aufnahme in die Darmzellen beispielsweise von lipophilen Membranstrukturen umgeben ist [274]. Eine größere intrazelluläre Akkumulation in Zellen des Gastrointestinaltraktes verglichen mit anderen Geweben könnte auch die Wirksamkeit bei FAP-Patienten erklären, wo Celecoxib zu einer Reduktion der Anzahl von adenomatösen Darmpolypen führt [165].

Zusammengefasst konnte somit im zweiten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass Celecoxib und DMC eine intrazelluläre Anreicherung in verschiedenen Zellarten aufweisen, was auf eine Einlagerung in den Bereich der lipophilen Acylketten von Phospholipidmembranen zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse können zumindest teilweise zur Beantwortung der Frage beitragen, warum besonders Celecoxib dazu in der Lage ist, trotz niedriger Plasmakonzentrationen *in vivo* starke antiproliferative Wirkungen zu erzielen, die in Zellkulturexperimenten erst bei ca. 5 - 10fach höherer Konzentration erreicht wurden. Zur vollständigen Klärung der therapeutischen Relevanz dieser Ergebnisse sind weitere *in vivo* Untersuchungen an Patienten notwendig, die über einen längeren Zeitraum klinische Standarddosen von Celecoxib erhalten. Dazu sollte Tumorgewebe und gesundes Gewebe hinsichtlich der Anreicherung von Celecoxib miteinander verglichen werden.

## 5 Zusammenfassung

Antikarzinogene Effekte konnten mehrfach für sowohl klassische NSAIDs als auch für selektive COX-2-Inhibitoren belegt werden, wobei Celecoxib eine herausragende Stellung einnimmt und als einziges NSAID zur Behandlung der familiären adenomatösen Polyposis den Zulassungsstatus erreicht hat. Dimethylcelecoxib (DMC), ein Strukturanalogon des Celecoxibs, zeigte aufgrund einer strukturellen Molekülaufweitung *in vitro* in Konzentrationen kleiner 100  $\mu\text{M}$  keine Hemmung der COX-2. Dennoch weist dieses Molekül ähnliche antikarzinogene Eigenschaften auf und wird daher häufig als Vergleichssubstanz zu Celecoxib verwendet, um COX-abhängige Mechanismen von COX-unabhängigen zu trennen. Daneben rückt DMC selbst als chemopräventive Substanz immer mehr in den Vordergrund, weil aufgrund der COX-Inaktivität weniger gastrointestinale als auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen zu erwarten sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte für DMC eindeutig gezeigt werden, dass es *in vitro* die PGE<sub>2</sub>-Synthese in den drei humanen Krebszellen HeLa, A-549 und HCA-7 im niedrigen mikromolaren Bereich hemmt. Da DMC weder die COX-Aktivität noch die Proteinexpression der COX-Isoenzyme in HeLa-Zellen beeinflusst, muss diese Substanz mit anderen Enzymen des PGE<sub>2</sub>-Syntheseweges interagieren. Die mPGES-1 zeigte wie die COX-2 eine gesteigerte Expression in einer Vielzahl von Tumorgeweben. Eine daraus resultierende gesteigerte PGE<sub>2</sub>-Produktion erwies sich durch die Wirkung auf spezifische Rezeptoren als prokarzinogen. DMC zeigte in einem zellfreien Assay eine Hemmung der mPGES-1-Aktivität bis zu einem maximalen Effekt von 65 % und einer daraus resultierenden IC<sub>50</sub> von ca. 16  $\mu\text{M}$ . Daneben konnte DMC in HeLa-Zellen auch die Protein- und mRNA-Expression der mPGES-1 in Konzentrationen größer 15  $\mu\text{M}$  hemmen.

Die Analyse der Gesamtprostanoide in Krebszellen nach DMC-Behandlung zeigte eine Hemmung der Synthese aller vorhandenen Prostanoide. Da extern zugesetzte Arachidonsäure diesen Effekt von DMC sowohl in HeLa- als auch in HCA-7-Zellen unterbinden konnte, war eine Hemmung der Arachidonsäurefreisetzung durch Beeinflussung der Phospholipasen A<sub>2</sub> nahe liegend. Es konnte für DMC eine Hemmung der cPLA<sub>2 $\alpha$</sub> -Aktivität in einem *in vitro* Assay mit einer IC<sub>50</sub> von 58  $\mu\text{M}$  gezeigt werden. Die zur Steigerung der Aktivität notwendige Translokation der cPLA<sub>2 $\alpha$</sub>  vom Cytosol zu intrazellulären Membranen sowie die Phosphorylierung am Serin<sup>505</sup> blieben wie auch die Gesamtproteinexpression der cPLA<sub>2 $\alpha$</sub>  von DMC unbeeinflusst.

Somit konnte für DMC *in vitro* eine Hemmung von mPGES-1 und cPLA<sub>2 $\alpha$</sub>  nachgewiesen werden. Jedoch wurden *in vitro* weitaus höhere Konzentrationen an DMC eingesetzt, um diese Enzyme zu hemmen, als für die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion in intakten Zellen benötigt wurde. Für die bereits wiederholt gezeigte antiproliferative Wirkung von DMC *in vitro* konnte die PGE<sub>2</sub>-Unabhängigkeit bestätigt werden. Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse kann DMC jedoch nicht mehr als COX- und Prostaglandin-unabhängige Kontrollsubstanz im Vergleich zu anderen Coxiben eingesetzt werden.

Für die mehrfach beschriebenen antiproliferativen Wirkungen von Celecoxib und DMC sowie die Hemmung der identifizierten Zielmoleküle wurden *in vitro* meist sehr hohe Konzentrationen benötigt. Die Relevanz dieser Ergebnisse wird daher stark diskutiert, da die *in vivo* erreichten Plasmakonzentrationen von Celecoxib (ca. 8  $\mu\text{M}$ ) nicht mit den hohen Konzentrationen *in vitro* (ca. 50  $\mu\text{M}$ ) korrelieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass DMC und Celecoxib eine intrazelluläre Anreicherung in humanen Kolonkarzinomzellen, Cervixkarzinomzellen, B-Lymphozyten, Monozyten und vaskulären Endothelzellen aufweisen. In den untersuchten Zellsystemen wurden im Vergleich zu den restlichen Coxiben für Celecoxib und DMC ca. 5 - 10-fach höhere intrazelluläre Konzentrationen erreicht, die linear von den eingesetzten Konzentrationen abhängig waren. Die Aufnahme der beiden Substanzen in die Zelle erfolgt möglicherweise durch passive Diffusion. DMC und Celecoxib zeigten dabei eine Akkumulation in zelluläre Membranstrukturen und hier insbesondere eine Interaktion mit den lipophilen Bestandteilen des Phospholipidbilayers, was mittels subzellulärer Fraktionierung und zweidimensionaler  $^1\text{H}$  MAS NOESY NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte. Die intrazelluläre Anreicherung für DMC und Celecoxib ist vermutlich vom Zelltyp und der Lipidzusammensetzung der vorliegenden Membran abhängig, da dieser Effekt in Fibroblasten nicht bestätigt werden konnte.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung der Membranintegrität neben der Anreicherung in Phospholipidmembranen zu einer effizienteren COX-2-Hemmung durch Celecoxib im Vergleich zu Rofecoxib und Etoricoxib in HCA-7 Zellen führte. Im humanen COX-2-Vollblutassay wurden hingegen ähnliche Effektivitäten der Coxibe auf die COX-2 nachgewiesen. Eine Steigerung der Wirksamkeit von Celecoxib oder DMC auf Membran-gebundene oder Membran-assoziierte Enzyme, die eine Affinität gegenüber diesen Substanzen aufweisen, wäre somit denkbar und würde speziell in solchen Krebszellen eine Rolle spielen, wo durch eine erhöhte Aktivität dieser Enzyme eine verstärkte Proliferation und Überlebensrate nachgewiesen werden konnte.

Pharmakokinetische Studien zeigten für Celecoxib im Vergleich zu anderen Coxiben ein vielfach höheres Verteilungsvolumen. Somit besteht die Möglichkeit, dass sich Celecoxib in solche tieferen Kompartimente einlagert, die vermehrt durch hydrophobe Membranstrukturen gekennzeichnet sind.

Zusammengefasst konnte somit für Celecoxib und DMC gezeigt werden, dass diese in verschiedenen Zelllinien eine intrazelluläre Anreicherung aufweisen, welche durch Interaktionen mit den hydrophoben Bereichen der Phospholipidmembranen hervorgerufen wird. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass in intakten Zellen die Wirkung von Celecoxib und DMC auf Zielmoleküle mit einer gewissen Affinität zu diesen Substanzen stärker ist als *in vitro* und so die Diskrepanz zwischen den Wirkkonzentrationen *in vitro* und *in vivo* erklärt werden kann.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

12-HHT	12-Hydroxyheptadecatriensäure
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>Analysis of Variance</i> )
APPROVe	<i>Adenomatous Poly Prevention on VIOXX Trial</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Rinderserum-Album ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
°C	Grad Celsius
Caspase	Cysteinyl-Aspartase
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COX	Cyclooxygenase
cPGES	cytosolische Prostaglandin E <sub>2</sub> -Synthase
C <sub>t</sub>	„Schwellenwert-Zyklus“ ( <i>Cycle threshold</i> )
DMC	Dimethylcelecoxib
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EIA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FAP	familiäre adematöse Polyposis ( <i>familial adenomatous polyposis</i> )
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GSH	Glutathion
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
IHC	Immunhistochemie
IL-1β	Interleukin-1β
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase



---

kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeOH	Methanol
min	Minute
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E <sub>2</sub> -Synthase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug-Resistenz-Protein
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	physiologischer Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK	Phosphatidylinositol-Triphosphat-abhängige Kinase
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PGT	Prostaglandin-Transporter
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierender Rezeptor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-Time</i> PCR
s.c.	subkutan
Ser	Serin
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of the mean</i> )
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMA-DPH	1-(4-Trimethyl-ammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien
TNFα	Tumornekrosisfaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Thromboxan
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
z.B.	zum Beispiel

## 7 Literaturverzeichnis

1. Krause, W. and R.N. DuBois, *Eicosanoids and the large intestine*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **61**(3-4): p. 145-61.
2. Das, U.N., *COX-2 inhibitors and metabolism of essential fatty acids*. Med Sci Monit, 2005. **11**(7): p. RA233-7.
3. Kurzrok, R. and C.C. Lieb, *Biochemical studies of human semen. The action of semen on the human uterus*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1930. **28**: p. 268-72.
4. Goldblatt, M.W., *A depressor substance in seminal fluid*. Journal of the Society of Chemistry and Industry, 1933. **52**: p. 1056-1059.
5. Goldblatt, M.W., *Properties of human seminal plasma*. J Physiol, 1935. **84**(2): p. 208-18.
6. von Euler, U.S., *Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1934. **175**: p. 78-84.
7. von Euler, U.S., *Über die Spezifische Blutdrucksenkende Substanz des Menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes*. Klinische Wochenschrift, 1935. **14**(33): p. 1182-1183.
8. von Euler, U.S., *On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin)*. J Physiol, 1936. **88**(2): p. 213-34.
9. Bergstroem, S., et al., *The Structure of Prostaglandin E, F1 and F2*. Acta Chemica Scandinavica, 1962. **16**: p. 501-502.
10. Bergstroem, S., et al., *Prostaglandins and Related Factors. 15. The Structures of Prostaglandin E1, F1-Alpha, and F1-Beta*. J Biol Chem, 1963. **238**: p. 3555-64.
11. Bergstroem, S., et al., *The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into Prostaglandins*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. PC4006-8.
12. Vane, J.R., *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs*. Nat New Biol, 1971. **231**(25): p. 232-5.
13. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
14. Bergstroem, S., H. Danielsson, and B. Samuelsson, *The Enzymatic Formation of Prostaglandin E2 from Arachidonic Acid Prostaglandins and Related Factors 32*. Biochim Biophys Acta, 1964. **90**: p. 207-10.
15. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 1007-24.
16. Chilton, F.H. and R.C. Murphy, *Remodeling of arachidonate-containing phosphoglycerides within the human neutrophil*. J Biol Chem, 1986. **261**(17): p. 7771-7.
17. Zhou, L. and A. Nilsson, *Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues*. J Lipid Res, 2001. **42**(10): p. 1521-42.
18. Murakami, M. and I. Kudo, *Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway*. Prog Lipid Res, 2004. **43**(1): p. 3-35.
19. Leslie, C.C., *Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004. **70**(4): p. 373-6.
20. Kudo, I. and M. Murakami, *Phospholipase A2 enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 3-58.
21. Gupta, R.A. and R.N. Dubois, *Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 11-21.
22. FitzGerald, G.A., *COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(11): p. 879-90.
23. Hamberg, M. and B. Samuelsson, *Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(9): p. 3400-4.
24. Warner, T.D. and J.A. Mitchell, *Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic*. Faseb J, 2004. **18**(7): p. 790-804.
25. Chan, B.S., et al., *Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and Xenopus oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT"*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6689-97.
26. Schuster, V.L., *Prostaglandin transport*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 633-47.
27. Reid, G., et al., *The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9244-9.
28. Helmreich, E.J. and K.P. Hofmann, *Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1286**(3): p. 285-322.

29. Breyer, R.M., et al., *Prostanoid receptors: subtypes and signaling*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 661-90.
30. Xue, L., et al., *Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6531-6.
31. Houseknecht, K.L., B.M. Cole, and P.J. Steele, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review*. *Domest Anim Endocrinol*, 2002. **22**(1): p. 1-23.
32. Gupta, R.A., et al., *Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(24): p. 13275-80.
33. Scher, J.U. and M.H. Pillinger, *15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin?* *Clin Immunol*, 2005. **114**(2): p. 100-9.
34. DuBois, R.N., et al., *The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancer*. *Carcinogenesis*, 1998. **19**: p. 49-53.
35. Murakami, M., et al., *Prostaglandin E synthase*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 383-99.
36. Ma, W. and R. Quirion, *Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain?* *Neurosci Lett*, 2008. **437**(3): p. 165-9.
37. Blatteis, C.M., et al., *Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2005. **76**(1-4): p. 1-18.
38. Akaogi, J., et al., *Role of PGE2 and EP receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and as a novel therapeutic strategy*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2006. **6**(4): p. 383-94.
39. Machwate, M., et al., *Prostaglandin receptor EP(4) mediates the bone anabolic effects of PGE(2)*. *Mol Pharmacol*, 2001. **60**(1): p. 36-41.
40. Dey, I., M. Lejeune, and K. Chadee, *Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract*. *Br J Pharmacol*, 2006. **149**(6): p. 611-23.
41. Hoshino, T., et al., *Involvement of prostaglandin E2 in production of amyloid-beta peptides both in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(45): p. 32676-88.
42. Samuelsson, B., R. Morgenstern, and P.J. Jakobsson, *Membrane prostaglandin e synthase-1: a novel therapeutic target*. *Pharmacol Rev*, 2007. **59**(3): p. 207-24.
43. Schaloske, R.H. and E.A. Dennis, *The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(11): p. 1246-59.
44. Ghosh, M., et al., *Properties of the Group IV phospholipase A2 family*. *Prog Lipid Res*, 2006. **45**(6): p. 487-510.
45. Cummings, B.S., *Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs*. *Biochem Pharmacol*, 2007. **74**(7): p. 949-59.
46. Diez, E., et al., *Substrate specificities and properties of human phospholipases A2 in a mixed vesicle model*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(26): p. 18342-8.
47. Capper, E.A. and L.A. Marshall, *Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis*. *Prog Lipid Res*, 2001. **40**(3): p. 167-97.
48. Murakami, M. and I. Kudo, *Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(8): p. 943-54.
49. Clark, J.D., et al., *Cytosolic phospholipase A2*. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1995. **12**(2-3): p. 83-117.
50. Hirabayashi, T., T. Murayama, and T. Shimizu, *Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2*. *Biol Pharm Bull*, 2004. **27**(8): p. 1168-73.
51. Lin, L.L., et al., *cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase*. *Cell*, 1993. **72**(2): p. 269-78.
52. Lin, L.L., A.Y. Lin, and D.L. DeWitt, *Interleukin-1 alpha induces the accumulation of cytosolic phospholipase A2 and the release of prostaglandin E2 in human fibroblasts*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(33): p. 23451-4.
53. Laye, J.P. and J.H. Gill, *Phospholipase A2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention?* *Drug Discov Today*, 2003. **8**(15): p. 710-6.
54. Wendum, D., et al., *COX-2, inflammatory secreted PLA2, and cytoplasmic PLA2 protein expression in small bowel adenocarcinomas compared with colorectal adenocarcinomas*. *Mod Pathol*, 2003. **16**(2): p. 130-6.
55. Kawamoto, S., et al., *Molecular cloning of the 31 kDa cytosolic phospholipase A2, as an antigen recognized by the lung cancer-specific human monoclonal antibody, AE6F4*. *Cytotechnology*, 1995. **17**(2): p. 103-8.
56. Marks, F., K. Muller-Decker, and G. Furstemberger, *A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism*. *Toxicology*, 2000. **153**(1-3): p. 11-26.
57. Heasley, L.E., et al., *Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(23): p. 14501-4.

58. Sved, P., et al., *Oncogenic action of secreted phospholipase A2 in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6934-40.
59. Dong, Q., et al., *Oncogenic action of phospholipase A2 in prostate cancer*. *Cancer Lett*, 2006. **240**(1): p. 9-16.
60. Takaku, K., et al., *Suppression of intestinal polyposis in Apc(delta 716) knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A(2) gene*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(44): p. 34013-6.
61. Jayadev, S., C.M. Linardic, and Y.A. Hannun, *Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(8): p. 5757-63.
62. Nakanishi, M. and D.W. Rosenberg, *Roles of cPLA2alpha and arachidonic acid in cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(11): p. 1335-43.
63. Murakami, M., et al., *Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2*.
64. Murakami, M., et al., *Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A2s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(13): p. 10083-96.
65. Kuwata, H., et al., *Studies on a mechanism by which cytosolic phospholipase A2 regulates the expression and function of type IIA secretory phospholipase A2*. *J Immunol*, 2000. **165**(7): p. 4024-31.
66. Balsinde, J., M.A. Balboa, and E.A. Dennis, *Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(14): p. 7951-6.
67. Yamashita, S., J. Yamashita, and M. Ogawa, *Overexpression of group II phospholipase A2 in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency*. *Br J Cancer*, 1994. **69**(6): p. 1166-70.
68. Kiyohara, H., et al., *Immunohistochemical localization of group II phospholipase A2 in human pancreatic carcinomas*. *Int J Pancreatol*, 1993. **13**(1): p. 49-57.
69. Ying, Z., et al., *Enhanced expression of group II phospholipase A2 in human hepatocellular carcinoma*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1226**(2): p. 201-5.
70. Kennedy, B.P., et al., *Overexpression of the nonpancreatic secretory group II PLA2 messenger RNA and protein in colorectal adenomas from familial adenomatous polyposis patients*. *Cancer Res*, 1998. **58**(3): p. 500-3.
71. Koduri, R.S., et al., *Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2)*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): p. 5849-57.
72. Leung, S.Y., et al., *Phospholipase A2 group IIA expression in gastric adenocarcinoma is associated with prolonged survival and less frequent metastasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(25): p. 16203-8.
73. Morioka, Y., et al., *Potential role of group X secretory phospholipase A(2) in cyclooxygenase-2-dependent PGE(2) formation during colon tumorigenesis*. *FEBS Lett*, 2000. **487**(2): p. 262-6.
74. Balsinde, J., et al., *Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(18): p. 8527-31.
75. Akiba, S., et al., *Involvement of group VI Ca2+-independent phospholipase A2 in protein kinase C-dependent arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D1 cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(28): p. 19906-12.
76. Murakami, M., et al., *Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(5): p. 3103-15.
77. Atsumi, G., et al., *Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca2+-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(24): p. 18248-58.
78. Xie, W.L., et al., *Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(7): p. 2692-6.
79. Kujubu, D.A., et al., *TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(20): p. 12866-72.
80. Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*. *Annu Rev Biochem*, 2000. **69**: p. 145-82.
81. Appleby, S.B., et al., *Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene*. *Biochem J*, 1994. **302** ( Pt 3): p. 723-7.
82. Blobaum, A.L. and L.J. Marnett, *Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition*. *J Med Chem*, 2007. **50**(7): p. 1425-41.

83. Komers, R. and M. Epstein, *Cyclooxygenase-2 expression and function in renal pathophysiology*. J Hypertens Suppl, 2002. **20**(6): p. S11-5.
84. Yamagata, K., et al., *Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids*. Neuron, 1993. **11**(2): p. 371-86.
85. Harris, R.C., et al., *Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2504-10.
86. McAdam, B.F., et al., *Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and iso-eicosanoid production in inflammation*. J Clin Invest, 2000. **105**(10): p. 1473-82.
87. Picot, D. and R.M. Garavito, *Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure*. FEBS Lett, 1994. **346**(1): p. 21-5.
88. Yuan, C., et al., *Partnering between monomers of cyclooxygenase-2 homodimers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6142-7.
89. Picot, D., P.J. Loll, and R.M. Garavito, *The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1*. Nature, 1994. **367**(6460): p. 243-9.
90. Flower, R.J., *The development of COX2 inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(3): p. 179-91.
91. Williams, C.S., M. Mann, and R.N. DuBois, *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*. Oncogene, 1999. **18**(55): p. 7908-16.
92. Dannenberg, A.J., et al., *Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer*. Lancet Oncol, 2001. **2**(9): p. 544-51.
93. Fitzpatrick, F.A. and R. Soberman, *Regulated formation of eicosanoids*. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1347-51.
94. Rao, C.V., et al., *Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent*. Cancer Res, 1995. **55**(7): p. 1464-72.
95. Leaper, D.J., B. French, and A. Bennett, *Reduction by flurbiprofen of primary tumor growth and local metastasis formation in mice*. Adv Prostaglandin Thromboxane Res, 1980. **6**: p. 591-3.
96. Marnett, L.J., *Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer*. Cancer Res, 1992. **52**(20): p. 5575-89.
97. Sheng, H., et al., *Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18075-81.
98. Dohadwala, M., et al., *Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50828-33.
99. Oshima, M., et al., *Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)*. Cell, 1996. **87**(5): p. 803-9.
100. Sonoshita, M., et al., *Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1048-51.
101. Oshima, M., et al., *Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1733-40.
102. Fosslien, E., *Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia*. Ann Clin Lab Sci, 2000. **30**(1): p. 3-21.
103. Sheng, H., et al., *Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells*. Cancer Res, 1998. **58**(2): p. 362-6.
104. Tang, X., et al., *Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4903-8.
105. Li, G., T. Yang, and J. Yan, *Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **299**(5): p. 886-90.
106. Tsujii, M., S. Kawano, and R.N. DuBois, *Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3336-40.
107. Liu, X.H., et al., *Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line*. Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(8): p. 687-94.
108. Takeda, H., et al., *Cooperation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in intestinal polyposis*. Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 4872-7.
109. Chulada, P.C., et al., *Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4705-8.
110. Jakobsson, P.J., et al., *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, 1999. **96**(13): p. 7220-5.

111. Tanioka, T., et al., *Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32775-82.
112. Tanikawa, N., et al., *Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(4): p. 884-9.
113. Watanabe, K., K. Kurihara, and T. Suzuki, *Purification and characterization of membrane-bound prostaglandin E synthase from bovine heart*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1439**(3): p. 406-14.
114. Murakami, M., et al., *Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32783-92.
115. Dieter, P., et al., *Functional coupling of cyclooxygenase 1 and 2 to discrete prostanoid synthases in liver macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 488-92.
116. Mancini, J.A., et al., *Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4469-75.
117. Boulet, L., et al., *Deletion of microsomal prostaglandin E2 (PGE2) synthase-1 reduces inducible and basal PGE2 production and alters the gastric prostanoid profile*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23229-37.
118. Thoren, S. and P.J. Jakobsson, *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, 2000. **267**(21): p. 6428-34.
119. Stichtenoth, D.O., et al., *Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 469-74.
120. Forsberg, L., et al., *Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation*. FEBS Lett, 2000. **471**(1): p. 78-82.
121. Naraba, H., et al., *Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E2 synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28601-8.
122. Cheng, S., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22057-65.
123. Sweeney, F.J., et al., *Inhibition of IL-1beta-dependent prostaglandin E2 release by antisense microsomal prostaglandin E synthase 1 oligonucleotides in A549 cells*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **205**(1-2): p. 151-7.
124. Yamagata, K., et al., *Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever*. J Neurosci, 2001. **21**(8): p. 2669-77.
125. Yoshimatsu, K., et al., *Inducible prostaglandin E synthase is overexpressed in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(9): p. 2669-74.
126. Yoshimatsu, K., et al., *Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(12): p. 3971-6.
127. van Rees, B.P., et al., *Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in intestinal type gastric adenocarcinoma and in gastric cancer cell lines*. Int J Cancer, 2003. **107**(4): p. 551-6.
128. Mehrotra, S., et al., *Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in breast cancer: a potential target for therapy*. J Pathol, 2006. **208**(3): p. 356-63.
129. Cohen, E.G., et al., *Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(9): p. 3425-30.
130. Jabbour, H.N., et al., *Expression of COX-2 and PGE synthase and synthesis of PGE(2) in endometrial adenocarcinoma: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors*. Br J Cancer, 2001. **85**(7): p. 1023-31.
131. Tanioka, T., et al., *Regulation of cytosolic prostaglandin E2 synthase by 90-kDa heat shock protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(4): p. 1018-23.
132. Kobayashi, T., et al., *Regulation of cytosolic prostaglandin E synthase by phosphorylation*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 1): p. 59-69.
133. Murakami, M., et al., *Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37937-47.
134. Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting, *Cyclooxygenases 1 and 2*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: p. 97-120.
135. Warner, T.D., et al., *Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7563-8.

136. Warner, T.D. and J.A. Mitchell, *COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Lancet*, 2008. **371**(9608): p. 270-3.
137. Vane, J.R. and R.M. Botting, *Mechanism of action of anti-inflammatory drugs*. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1996. **102**: p. 9-21.
138. Lefkowitz, J.B., G.S. Geis, and F. Silverstein, *Safety of celecoxib vs other nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. *Jama*, 2000. **284**(24): p. 3123-4.
139. Morrison, B.W., et al., *Rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, in primary dysmenorrhea: a randomized controlled trial*. *Obstet Gynecol*, 1999. **94**(4): p. 504-8.
140. Riendeau, D., et al., *Etoricoxib (MK-0663): Preclinical Profile and Comparison with Other Agents That Selectively Inhibit Cyclooxygenase-2*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **296**(2): p. 558-566.
141. Esser, R., et al., *Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2*. *Br J Pharmacol*, 2005. **144**(4): p. 538-50.
142. Alsalameh, S., et al., *Review article: The pharmacological properties and clinical use of valdecoxib, a new cyclo-oxygenase-2-selective inhibitor*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. **17**(4): p. 489-501.
143. Burian, M. and G. Geisslinger, *Clinical pharmacology of selective COX-2 inhibitors*. *Orthopade*, 2003. **32**(12): p. 1078-1087.
144. Beubler, E., *Pharmacology of cyclooxygenase 2 inhibition*. *Wien Med Wochenschr*, 2003. **153**(5-6): p. 95-9.
145. Riendeau, D., et al., *Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **296**(2): p. 558-66.
146. Bombardier, C., et al., *Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(21): p. 1520-8, 2 p following 1528.
147. Solomon, S.D., et al., *Cardiovascular Risk Associated with Celecoxib in a Clinical Trial for Colorectal Adenoma Prevention*. *N Engl J Med*, 2005.
148. Bresalier, R.S., et al., *Cardiovascular Events Associated with Rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention Trial*. *N Engl J Med*, 2005.
149. Patrono, C., *The PGH-synthase system and isozyme-selective inhibition*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47 Suppl 1**: p. S1-6.
150. Kearney, P.M., et al., *Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials*. *Bmj*, 2006. **332**(7553): p. 1302-8.
151. McGettigan, P. and D. Henry, *Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2*. *Jama*, 2006. **296**(13): p. 1633-44.
152. Capone, M.L., et al., *Clinical pharmacology of platelet, monocyte, and vascular cyclooxygenase inhibition by naproxen and low-dose aspirin in healthy subjects*. *Circulation*, 2004. **109**(12): p. 1468-71.
153. Rostom, A., et al., *Gastrointestinal safety of cyclooxygenase-2 inhibitors: a Cochrane Collaboration systematic review*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007. **5**(7): p. 818-28, 828 e1-5; quiz 768.
154. Jones, R., et al., *Gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. *Am J Med*, 2008. **121**(6): p. 464-74.
155. White, W.B., *Cardiovascular risk, hypertension, and NSAIDs*. *Curr Pain Headache Rep*, 2007. **11**(6): p. 428-35.
156. Graham, D.J., *COX-2 inhibitors, other NSAIDs, and cardiovascular risk: the seduction of common sense*. *Jama*, 2006. **296**(13): p. 1653-6.
157. Gupta, R.A. and R.N. DuBois, *Aspirin, NSAIDs, and colon cancer prevention: mechanisms?* *Gastroenterology*, 1998. **114**(5): p. 1095-8.
158. Farrow, D.C., et al., *Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998. **7**(2): p. 97-102.
159. Schreinemachers, D.M. and R.B. Everson, *Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study*. *Epidemiology*, 1994. **5**(2): p. 138-46.
160. Thun, M.J., S.J. Henley, and C. Patrono, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(4): p. 252-66.
161. Waddell, W.R. and R.W. Loughry, *Sulindac for polyposis of the colon*. *J Surg Oncol*, 1983. **24**(1): p. 83-7.
162. Labayle, D., et al., *Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis*. *Gastroenterology*, 1991. **101**: p. 635-639.
163. Nugent, K.P., et al., *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*, 1993. **80**(12): p. 1618-9.

164. Giardiello, F.M., et al., *Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis*. N Engl J Med, 1993. **328**(18): p. 1313-6.
165. Steinbach, G., et al., *The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis*. N Engl J Med, 2000. **342**(26): p. 1946-52.
166. Eberhart, C.E., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adeno carcinomas*. Gastroenterology, 1994. **107**: p. 1183-1188.
167. Bennett, A., et al., *Prostaglandins from tumours of human large bowel*. Br J Cancer, 1977. **35**(6): p. 881-4.
168. Rigas, B., I.S. Goldman, and L. Levine, *Altered eicosanoid levels in human colon cancer*. J Lab Clin Med, 1993. **122**(5): p. 518-23.
169. Pugh, S. and G.A. Thomas, *Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2*. Gut, 1994. **35**(5): p. 675-8.
170. Nakano, O., et al., *[Effect of prostaglandin E2 on the proliferation of cultured guinea pig gastric mucous cells]*. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1993. **90**(1): p. 9-15.
171. Pai, R., et al., *Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 289-93.
172. Tsujii, M. and R.N. DuBois, *Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2*. Cell, 1995. **83**(3): p. 493-501.
173. Tsujii, M., et al., *Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells*. Cell, 1998. **93**: p. 705-716.
174. Pai, R., et al., *PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(5): p. 923-8.
175. Grosch, S., et al., *Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(11): p. 736-47.
176. Hanif, R., et al., *Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin independent pathway*. Biochem. Pharmacol., 1996. **52**: p. 237-245.
177. Zhang, X., et al., *Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 451-59.
178. Piazza, G.A., et al., *Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels*. Cancer Res, 1997. **57**(14): p. 2909-15.
179. Jana, N.R., *NSAIDs and apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(9): p. 1295-301.
180. Grosch, S., et al., *COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib*. Faseb J, 2001. **15**(14): p. 2742-4.
181. Maier, T.J., et al., *Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(8): p. 1469-78.
182. Schiffmann, S., et al., *The anti-proliferative potency of celecoxib is not a class effect of coxibs*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(2): p. 179-87.
183. Patti, R., et al., *Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human primitive neuroectodermal tumors: effect of celecoxib and rofecoxib*. Cancer Lett, 2002. **180**(1): p. 13-21.
184. Waskewich, C., et al., *Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines*. Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 2029-33.
185. Grosch, S., et al., *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, 2003. **17**(10): p. 1316-8.
186. Grosch, S., et al., *Induction of apoptosis by R-flurbiprofen in human colon carcinoma cells: involvement of p53*. Biochem Pharmacol, 2005. **69**(5): p. 831-9.
187. Arico, S., et al., *Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 27613-21.
188. Johnson, A.J., et al., *The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca2+-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 3): p. 831-7.
189. Maier, T.J., et al., *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. **19**(10): p. 1353-1355.
190. Wong, N.A. and M. Pignatelli, *Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis?* Am J Pathol, 2002. **160**(2): p. 389-401. 3: Yamada Y, et al. Suppression of occurrence and...[PMID:11429049]Related Articles, Links.
191. Kolligs, F.T., G. Bommer, and B. Goke, *Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis*. Digestion, 2002. **66**(3): p. 131-44.



192. Schonthal, A.H., *Antitumor properties of dimethyl-celecoxib, a derivative of celecoxib that does not inhibit cyclooxygenase-2: implications for glioma therapy*. Neurosurg Focus, 2006. **20**(4): p. E21.
193. Song, X., et al., *Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(8): p. 585-91.
194. Penning, T.D., et al., *Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib)*. J Med Chem, 1997. **40**(9): p. 1347-65.
195. Kardosh, A., et al., *Multitarget inhibition of drug-resistant multiple myeloma cell lines by dimethyl-celecoxib (DMC), a non-COX-2 inhibitory analog of celecoxib*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4330-8.
196. Kardosh, A., et al., *Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(5): p. 571-82.
197. Kulp, S.K., et al., *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1444-51.
198. Lin, H.P., et al., *Growth inhibitory effects of celecoxib in human umbilical vein endothelial cells are mediated through G1 arrest via multiple signaling mechanisms*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(12): p. 1671-80.
199. Kardosh, A., et al., *Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(1): p. 55-62.
200. Kim, S.H., et al., *Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target*. J Cancer Res Clin Oncol, 2004. **130**(9): p. 551-60.
201. Ding, H., et al., *Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9*. Int J Cancer, 2005. **113**(5): p. 803-10.
202. Zhu, J., et al., *From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors*. Cancer Res, 2004. **64**(12): p. 4309-18.
203. Shishodia, S., D. Koul, and B.B. Aggarwal, *Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF-kappa B activation through inhibition of activation of I kappa B alpha kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 2011-22.
204. Schiffmann, S., et al., *Celecoxib induces cell death in human colon cancer cells by activation of the sphingolipid de novo synthesis and inhibition of the dihydroceramide desaturase*. submitted.
205. Davies, N.M., et al., *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclooxygenase-2 inhibitor*. Clin Pharmacokinet, 2000. **38**(3): p. 225-42.
206. Bräutigam, L., et al., *Determination of Celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. Biomed. Appl., 2001. **261**(2): p. 203-212.
207. 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, 1976. **72**: p. 248-54.
208. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
209. 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, 1981. **112**(2): p. 195-203.
210. Schmidt, R., O. Coste, and G. Geisslinger, *LC-MS/MS-analysis of prostaglandin E2 and D2 in microdialysis samples of rats*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **826**(1-2): p. 188-97.
211. Schmidt, R., *Dissertation: LC-MS/MS-Analyse von Eicosanoiden*, in *Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie*. 2006, Goethe-Universität: Frankfurt am Main.
212. Patrignani, P., et al., *Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **271**(3): p. 1705-12.
213. Brautigam, L., et al., *Determination of celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **761**(2): p. 203-12.
214. Brautigam, L., J.U. Nefflen, and G. Geisslinger, *Determination of etoricoxib in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionisation*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **788**(2): p. 309-15.
215. Maier, T.J., *Dissertation: Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der antikarzinogenen Wirkung nicht-steroidaler Antiphlogistika in humanen Kolonkarzinomzellen*, in *Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie*. 2005, Goethe-Universität: Frankfurt am Main.

216. Prendergast, F.G., R.P. Haugland, and P.J. Callahan, *1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers*. *Biochemistry*, 1981. **20**(26): p. 7333-8.
217. Hamberg, M., et al., *Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(2): p. 345-9.
218. Nugteren, D.H. and E. Christ-Hazelhof, *Chemical and enzymic conversions of the prostaglandin endoperoxide PGH<sub>2</sub>*. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*, 1980. **6**: p. 129-37.
219. Jakobsson, P.J., et al., *Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(2 Pt 2): p. S20-4.
220. Ford-Hutchinson, A.W., *Leukotriene C<sub>4</sub> synthase and 5-lipoxygenase activating protein. Regulators of the biosynthesis of sulfido-leukotrienes*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **744**: p. 78-83.
221. Riendeau, D., et al., *Inhibitors of the inducible microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase (mPGES-1) derived from MK-886*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. **15**(14): p. 3352-5.
222. Brenneis, C., et al., *Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by SC-560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition*. *Faseb J*, 2006. **20**(9): p. 1352-60.
223. Gillard, J., et al., *L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1989. **67**(5): p. 456-64.
224. Williams, C.S., et al., *Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models*. *Cancer Res*, 2000. **60**(21): p. 6045-51.
225. Kuhry, J.G., et al., *TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells*. *Cell Biophys*, 1983. **5**(2): p. 129-40.
226. Kaiser, R.D. and E. London, *Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth*. *Biochemistry*, 1998. **37**(22): p. 8180-90.
227. Chuang, H.C., et al., *COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation in vitro*. *Mol Cancer*, 2008. **7**: p. 38.
228. Schonthal, A.H., et al., *Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anticancer drugs*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008. **17**(2): p. 197-208.
229. Backhus, L.M., et al., *Dimethyl celecoxib as a novel non-cyclooxygenase 2 therapy in the treatment of non-small cell lung cancer*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005. **130**(5): p. 1406-12.
230. Zhu, J., et al., *Using cyclooxygenase-2 inhibitors as molecular platforms to develop a new class of apoptosis-inducing agents*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(23): p. 1745-57.
231. Dannenberg, A.J. and R.N. DuBois, *COX-2: a new target for cancer prevention and treatment*. 2003.
232. Lin, M.T., et al., *Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(52): p. 48997-9002.
233. Leahy, K.M., A.T. Koki, and J.L. Masferrer, *Role of cyclooxygenases in angiogenesis*. *Curr Med Chem*, 2000. **7**(11): p. 1163-70.
234. Chen, W.S., et al., *Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac*. *Int J Cancer*, 2001. **91**(6): p. 894-9.
235. Kamei, D., et al., *Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(21): p. 19396-405 Epub 2003 Mar 7.
236. Sheng, H., et al., *Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(9): p. 2254-9.
237. Laine, L., et al., *A randomized trial comparing the effect of rofecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, with that of ibuprofen on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis*. *Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Study Group*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(4): p. 776-83.
238. Xu, D., et al., *MF63 [2-(6-chloro-1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-2-yl)-isophthalonitrile], a selective microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitor, relieves pyresis and pain in preclinical models of inflammation*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **326**(3): p. 754-63.
239. Hasan, S., et al., *Expression analysis of the prostaglandin E<sub>2</sub> production pathway in human pancreatic cancers*. *Pancreas*, 2008. **37**(2): p. 121-7.
240. Kojima, F., et al., *Prostaglandin E<sub>2</sub> is an enhancer of interleukin-1beta-induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(10): p. 2819-28.
241. Yucel-Lindberg, T., et al., *Induction of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human gingival fibroblasts*. *Inflammation*, 2004. **28**(2): p. 89-95
- Write to the Help Desk NCBI | NLM | NIH  
Department of Health & Human Services Privacy Statement | Freedom of Information Act | Disclaimer.

- 
242. Alvarez-Soria, M.A., et al., *Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. **16**: p. 1484-1493.
243. Shaik, M.S., et al., *Enhancement of antitumor activity of docetaxel by celecoxib in lung tumors*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(2): p. 396-404.
244. Zhang, S., et al., *Expression of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 and their significance in human oral mucosae, dysplasias and squamous cell carcinomas*. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2008. **70**(4): p. 242-8.
245. Panel, V., et al., *Cytoplasmic phospholipase A2 expression in human colon adenocarcinoma is correlated with cyclooxygenase-2 expression and contributes to prostaglandin E2 production*. *Cancer Lett*, 2006. **243**(2): p. 255-63.
246. Wendum, D., et al., *Cytoplasmic phospholipase A2 alpha overexpression in stromal cells is correlated with angiogenesis in human colorectal cancer*. *Mod Pathol*, 2005. **18**(2): p. 212-20.
247. Dong, M., et al., *Cytoplasmic phospholipase A2 levels correlate with apoptosis in human colon tumorigenesis*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(6): p. 2265-71.
248. Hong, K.H., et al., *Deletion of cytosolic phospholipase A(2) suppresses Apc(Min)-induced tumorigenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(7): p. 3935-9.
249. Meyer, A.M., et al., *Decreased lung tumorigenesis in mice genetically deficient in cytosolic phospholipase A2*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(8): p. 1517-24.
250. Weiser-Evans, M.C., et al., *Depletion of cytosolic phospholipase A2 in bone marrow-derived macrophages protects against lung cancer progression and metastasis*. *Cancer Res*, 2009. **69**(5): p. 1733-8.
251. Ilsley, J.N., et al., *Cytoplasmic phospholipase A2 deletion enhances colon tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2005. **65**(7): p. 2636-43.
252. Peters-Golden, M. and R.W. McNish, *Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **196**(1): p. 147-53.
253. Schievella, A.R., et al., *Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(51): p. 30749-54.
254. Wobst, I., et al., *Dimethylcelecoxib inhibits prostaglandin E2 production*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(1): p. 62-9.
255. Maier, T.J., et al., *Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(7): p. 862-72.
256. Sud'ina, G.F., et al., *Cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) selectivity of COX inhibitors*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2008. **78**(2): p. 99-108.
257. Jiang, J., et al., *Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(2): p. 667-71.
258. Mannello, F., et al., *Nipple aspirate fluids from women with breast cancer contain increased levels of group IIA secretory phospholipase A2*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **111**(2): p. 209-18.
259. Mirtti, T., et al., *Group IIA phospholipase A as a prognostic marker in prostate cancer: relevance to clinicopathological variables and disease-specific mortality*. *Apmis*, 2009. **117**(3): p. 151-61.
260. Mounier, C.M., et al., *Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: sPLA2-III as a biomarker candidate*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(3): p. 587-95.
261. Murakami, M., et al., *Cellular distribution, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A(2)*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(26): p. 24987-98.
262. Baron, J.A., et al., *A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(6): p. 1674-82.
263. Arber, N., et al., *Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(9): p. 885-95.
264. Walter, M.F., et al., *Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs*. *Atherosclerosis*, 2004. **177**(2): p. 235-43.
265. Palomer, A., et al., *Identification of novel cyclooxygenase-2 selective inhibitors using pharmacophore models*. *J Med Chem*, 2002. **45**(7): p. 1402-11.
266. Gamerdinger, M., A.B. Clement, and C. Behl, *Cholesterol-Like Effects of Selective Cyclooxygenase Inhibitors and Fibrates on Cellular Membranes and Amyloid-beta Production*. *Mol Pharmacol*, 2007. **72**(1): p. 141-51.
267. Katsu, T., et al., *Simultaneous measurements of K+ and calcein release from liposomes and the determination of pore size formed in a membrane*. *Anal Sci*, 2007. **23**(5): p. 517-22.
268. Tanaka, K., et al., *Involvement of intracellular Ca2+ levels in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(35): p. 31059-67.

- 
269. Schiffmann, S., et al., *The selective COX-2 inhibitor celecoxib modulates sphingolipid synthesis*. J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 32-40.
270. Yang, H.M., et al., *Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces neointimal hyperplasia through inhibition of Akt signaling*. Circulation, 2004. **110**(3): p. 301-8.
271. Yamada, Y., et al., *Suppression of Occurrence and Advancement of beta-Catenin-accumulated Crypts, Possible Premalignant Lesions of Colon Cancer, by Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Celecoxib*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(6): p. 617-23.
272. Pyrko, P., et al., *Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 19.
273. Werner, U., et al., *Celecoxib inhibits metabolism of cytochrome P450 2D6 substrate metoprolol in humans*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **74**(2): p. 130-7.
274. Paulson, S.K., et al., *Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(5): p. 514-21.

## 8 Anhang

### 8.1 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Wobst I, Schiffmann S, Birod K, Maier TJ, Schmidt R, Angioni C, et al. Dimethylcelecoxib inhibits prostaglandin E2 production. *Biochem Pharmacol* 2008; 76:62-9.

Maier TJ, Schiffmann S, Wobst I, Birod K, Angioni C, Hoffmann M, et al. Cellular membranes function as a storage compartment for celecoxib. (submitted)

### 8.2 Sonstige Veröffentlichungen

Schiffmann S, Sandner J, Birod K, Wobst I, Angioni C, Ruckhaberle E, et al. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis* 2009; 30:745-52.

Schiffmann S, Sandner J, Schmidt R, Birod K, Wobst I, Schmidt H, et al. The selective COX-2 inhibitor celecoxib modulates sphingolipid synthesis. *J Lipid Res* 2009; 50:32-40.

Janssen A, Schiffmann S, Birod K, Maier TJ, Wobst I, Geisslinger G, et al. p53 is important for the anti-proliferative effect of ibuprofen in colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365:698-703.

Frohberg P, Drutkowski G, Wobst I. Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41:1317-24.

Gorlitzer K, Gabriel B, Frohberg P, Wobst I, Drutkowski G, Wiesner J, et al. [Thieno[2,3-c]quinolines - synthesis and biological investigation]. *Pharmazie* 2004; 59:439-42.

### 8.3 Förderung und Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2005 bis Dezember 2008 am Institut für Klinische Pharmakologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main im Rahmen des Europäischen Graduiertenkollegs „Roles of Eicosanoids in Biology and Medicine“ (DFG GRK 757/1) angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. G. Geißlinger möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr. Sabine Grösch für die Unterstützung und Betreuung während meiner Promotionszeit. Außerdem danke ich meiner ganzen Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen. Besonders danken möchte ich Dr. Thorsten Jürgen Maier für die Vorarbeiten zu den Untersuchungen der intrazellulären Coxib-Konzentrationen, Dr. Susanne Schiffmann, die immer wieder ein offenes Ohr für meine Probleme hatte sowie Kerstin Birod für die Anfertigung der cPLA<sub>2α</sub>-Translokationsversuche und für die zahlreichen weiteren „Kleinigkeiten“, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Carlo Angioni und dem ehemaligen Mitarbeiter Dr. Ronald Schmidt danke ich für die Einarbeitung in die LC-MS/MS-Analytik und die zahlreichen Messzeiten, die mir zur Verfügung gestellt wurden. Marika Hoffmann (Arbeitsgruppe Prof. Steinhilber) danke ich für die Bereitstellung des cPLA<sub>2α</sub>-Proteins. Bei Dr. Jakob J. Lopez aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Glaubitz bedanke ich mich für die Durchführung der Untersuchungen mittels <sup>1</sup>H MAS NOESEY NMR-Spektroskopie.

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

## 8.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Ivonne Wobst  
Virchowstraße 15  
89075 Ulm

geboren am 27.03.1977 in Zeulenroda

### Schulbildung

---

1983 - 1991 Georg Ewald Realschule, Langenwolschendorf

1991 - 1995 Friedrich Schiller Gymnasium, Zeulenroda

### Ausbildung

---

1995 - 1998 Berufsausbildung zur Chemielaborantin, Fachrichtung Chemie;  
Zentrallabor der Hutschenreuther AG, Selb

1998 - 2002 Studium der Pharmazie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

11.2002 - 04.2003 Diplomarbeit  
am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
unter Anleitung von Prof. Dr. P. Nuhn

05.2003 - 11.2003 Pharmaziepraktikum in der Süd-Apotheke, Halle / Saale

12.2003 Approbation als Apothekerin

2005 - 2008 Naturwissenschaftliche Promotion  
im Rahmen des internationalen DFG-Graduiertenkollegs „Roles of  
Eicosanoids in Biology and Medicine“ (GRK 757)  
am Institut für Klinische Pharmakologie der Goethe-Universität Frankfurt  
unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. G. Geißlinger

### Berufliche Erfahrungen

---

2004-2005 Krankenhausapothekerin im SRH-Zentralklinikum, Suhl

seit 01.2009 GFB Pharma Production, Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH, Biberach