

Aus der Klinik für Gynäkologie,  
Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie  
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. Uwe Wagner  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Synergistische Effekte des spezifischen  
COX-2-Inhibitors Celecoxib und des SERM Ly 117018  
auf Mammakarzinomzellen in vitro**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von:

Elmar Martin Klusmeier

aus Ostercappeln

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin am  
der Philipps-Universität Marburg am: 19.06.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Wagner

1. Korreferent: Prof. Dr. med. U. Kroh

2. Korreferent: Prof. Dr. med. T. Gudermann

**meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
1.1	Mammakarzinom.....	3
1.1.1	Epidemiologie.....	3
1.1.2	Risikofaktoren.....	4
1.1.3	Therapie.....	5
1.2	Rezeptoren, Hormone.....	7
1.2.1	Östrogen und Östrogenrezeptor.....	7
1.2.2	Cyclooxygenase-2: Eigenschaften, Wirkungsmechanismus.....	11
1.3	Medikamente.....	15
1.3.1	Ly117018 (Raloxifene, Evista® - Analogon, Lilly).....	15
1.3.2	Celecoxib (Celebrex®, Pfizer).....	18
1.4	Synergismus von Ly117018 und Celecoxib: Fragestellung.....	21
1.4.1	Synergismus.....	21
1.4.2	Fragestellung.....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
2.1	Chemikalien.....	25
2.2	Pharmazeutika.....	26
2.3	Zubehör und Plastikartikel.....	26
2.4	Software.....	27
2.5	Geräte.....	27
2.6	Zelllinien.....	28
2.7	Zellkultur.....	28
2.7.1	Lösungen.....	28
2.7.2	Methode.....	29
2.8	Proliferationsassay (Kristallviolett- Methode).....	30
2.8.1	Lösungen.....	30
2.8.2	Methode.....	31
2.8.3	Zelldichte vs. Extinktion.....	31
2.8.4	Zeitabhängigkeiten.....	32
2.8.5	Konzentrationsabhängigkeiten.....	33
2.8.6	Kombinationsversuche.....	34
2.9	Flowcytometry, Zellzyklusanalyse.....	36
2.9.1	Lösungen.....	36
2.9.2	Methode.....	36
2.9.3	Einzelsubstanzversuche.....	37
2.9.4	Kombinationsversuche.....	37
2.10	Western-Blot.....	38
2.10.1	Lösungen.....	38
2.10.2	Antikörper.....	38
2.10.3	Methode.....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
3.1	Proliferationsassay.....	42

3.1.1	Zeitabhängigkeit von Ly117018 .....	42
3.1.2	Zeitabhängigkeit von Celecoxib .....	44
3.1.3	Konzentrationsabhängigkeit von Ly117018 .....	46
3.1.4	Konzentrationsabhängigkeit von Celecoxib .....	48
3.1.5	Zusammenfassung der IC- Werte .....	51
3.1.6	Kombinationen aus Ly117018 und Celecoxib .....	51
3.2	Flowcytometry, Zellzyklusanalyse .....	61
3.2.1	Ly117018- Konzentrationsabhängigkeit .....	61
3.2.2	Celecoxib- Konzentrationsabhängigkeit .....	63
3.2.3	Kombinationen aus Celecoxib und Ly117018 .....	68
3.3	Western- Blot .....	74
3.3.1	Silberfärbung, Ponceau- Färbung, Aktin .....	74
3.3.2	Akt .....	76
3.3.3	P- Akt .....	78
3.3.4	Vergleich Akt und p- Akt .....	80
3.3.5	COX2 .....	82
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
4.1	Diskussion der Ergebnisse .....	83
4.1.1	Ly117018 .....	84
4.1.2	Celecoxib .....	86
4.1.3	Kombination, Synergismus .....	88
4.2	Diskussion zu Celecoxib .....	90
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	92
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>108</b>
7.1	Danksagungen .....	108
7.2	Akademische Lehrer .....	109

# 1 Einleitung

## 1.1 Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist bei Frauen in den Ländern der westlichen Hemisphäre die häufigste bösartige Neubildung, so dass in Deutschland mit 48.000 Neuerkrankungen und 18.000 Todesfällen pro Jahr gerechnet werden muss. Seit Ende des Zweiten Weltkrieges ist es zu einer kontinuierlichen und deutlichen Zunahme der Mortalität nach dem Auftreten des Mammakarzinoms gekommen. Nach einer kurzen Phase der Stagnation in den 90er Jahren ist die Mortalität wieder rückläufig, die Inzidenz hingegen steigt weiter deutlich an (Becker et al., 2001; RKI, 2003).

Die Screening- Untersuchungen und damit die frühe Erkennung machen dabei einen deutlichen Anteil (vermutlich ca. 10%) der steigenden Inzidenz, bzw. der sinkenden Mortalität aus (es wird mehr und vor allem früher diagnostiziert). Den größten Beitrag für die fallende Mortalität leisten aber die bessere, an Leitlinien orientierte, Therapiemöglichkeiten (Schulz et al, 2003).

Ein weiterer Grund für die Inzidenzsteigerung ist die geringe Reduktion von primären Ursachen und die durch Lebenswandel und Demographie gestiegenen Risikofaktoren (siehe Abb. 1- 1) (Becker et al., 2001).

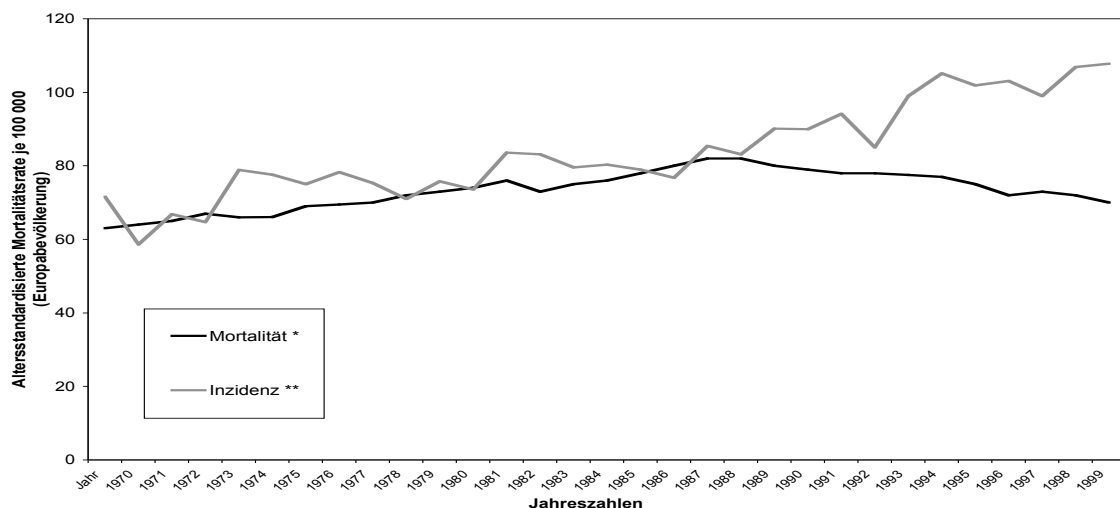


Abbildung 1-1: Entwicklung der Mortalität und Inzidenz an Brustkrebs. Dargestellt sind

die Mortalitätsraten/100.000 Frauen und die Inzidenzraten/100.000 Frauen in Deutschland (Becker et al., 2001; RKI, 2003). (\*der 60- 64 Jährigen; \*\*Saarland)

### 1.1.2 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren der Entwicklung eines Mammakarzinomes unterscheidet man vier große Risikogruppen, 1. soziodemografische Risikofaktoren, 2. familiäre Risikofaktoren, 3. gewebespezifische Risikofaktoren und 4. hormonelle Risikofaktoren

Zu den Soziodemographischen Risikofaktoren zählen z.B. Geschlechtszugehörigkeit, Frauen erkranken hundert mal öfter als Männer, Sozioökonomischer Status, hier gilt, je besser der Status je höher ist das Brustkrebsrisiko (Kelsey et al. 1981), Alter, die Inzidenz nimmt einem dem Alter von 45-50 Jahren stark zu und sinkt langsam ab einem Alter von 75-80 Jahren (Peto et al., 2000; Pike et al. 1993). Grundsätzlich gilt hier, dass Brustkrebs eine Zivilisationskrankheit ist und durch unsere westlichen Lebensumstände, wie hohes Gewicht, Fettreiche Ernährung, wenig Bewegung, regelmäßiger Alkoholkonsum, gefördert wird (Chen et al. 1994).

Als Familiäre Risikofaktoren gelten eine positive Familienanamnese, die das persönliche Risiko ansteigen lässt. Auch eine allgemeine genetische Disposition ist in 5- 10% der Fälle die primäre Ursache von Brustkrebs. Darüber hinaus gibt es auch spezifische genetische Mutationen, bei denen wurde in über 90% eine Mutation im BRCA- 1- Gen, auf Chromosom 17q21, oder im BRCA- 2- Gen, auf Chromosom 13q12-138 (zwei Tumorsuppressor- Gene), nachgewiesen (Alpert et al., 2004; Schwab et al., 2002; Nicoletto et al., 2001; Bremer et al., 2001), als weitere Brustkrebs fördernde Mutationen gelten p53, ATM, PTEN, MLH1 oder MSH2 Mutationen (Peto et al., 2000).

Gewebespezifische Faktoren beziehen sich auf Veränderungen der binnengeweblichen Struktur der Brust bis hin zu ersten Atypien. Proliferative Veränderungen ohne Atypien, die das Erkrankungsrisiko zum Teil verdoppeln, sind z.B. Fibroadenome, Hyperplasien, intraductale Papillome und Adenoide. Veränderung mit Atypien sind in erster Linie lobuläre und ductale Carcinoma in situ, atypische ductale und lobuläre Hyperplasie und eine Mammakarzinom der anderen Brust (Dupont et al., 1985; Hartmann et al 2005).

Der wichtigste Hormonelle Faktor, der Einfluss auf das Erkrankungsrisiko hat, ist die Länge der Östrogeneinwirkung auf die Brust, hier gilt je länger je höher das Risiko. Also gelten frühe Menarche und späte Menopause als Risikofaktoren. Daneben ist das Alter der ersten Geburt eine weitere Einflussgröße, hier gilt ein Alter unter 30 als Risikoverminderung. Frauen die in einem Alter über 30 erstmalig Schwanger werden haben ein erhöhtes Risiko gegenüber Nullipara, die aber grundsätzlich ein höheres Erkrankungsrisiko haben (Clemons et al. 2001; Kelsey et al. 1993). Es konnte darüber hinaus ein positiver Zusammenhang zwischen Hormonersatztherapie und Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken dargestellt werden (Rossouw et al. 2002).

### 1.1.3 Therapie

Als Prognosefaktoren und damit auch als Kriterien, die zur Therapiewahl herangezogen werden, gelten: Alter, Nodalstatus, Tumorgröße, Grading, Hormon- und Her<sub>2</sub>/NEU-Rezeptor- Expression, so wie das Vorhandensein oder Fehlen einer Lymph- oder Hä-mangiosis carcinomatosa (Goldhirsch et al., 2003, [www.oncoconferences.ch](http://www.oncoconferences.ch), 2005).

Die komplette Exstirpation des Tumors mit einem tumorfreien Resektionsrand (R0) ist die Basis der Therapie für alle nicht fortgeschrittenen Mammakarzinome. Der mikroskopisch gemessene Sicherheitsabstand zwischen Tumor und Resektionsrand sollte 1 mm oder mehr betragen.

Nach Brust erhaltender Operation kann die Nachbestrahlung der Restbrust die Rate an invasiven und nicht invasiven Rezidiven senken. Eine Nachbestrahlung ist im Allgemeinen indiziert (AWMF, [www.leitlinien.net](http://www.leitlinien.net), 2004).

Die adjuvante postoperative medikamentöse Behandlung wird in Form einer Chemotherapie, einer endokrinen Therapie oder einer Kombination der beiden Therapieformen durchgeführt (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1995).

Bei rezeptorpositiven Patientinnen mit niedrigem Risiko ist eine alleinige endokrine Behandlung angezeigt, bei intermediären- oder Hochrisiko- Patientinnen ist eine Kombinationstherapie, bestehend aus Chemo- und endokriner Therapie angestrebt worden (AWMF, [www.leitlinien.net](http://www.leitlinien.net), 2004). Als endokrine Therapie gilt Tamoxifen als Standard, sollte aber bei postmenopausalen Patientinnen um Aromatasehemmer erweitert



werden, welche bei prämenopausalen Patientinnen meist durch GnRH (Gonadotropin-releasing- Hormon- Analogen) plus Tamoxifen ersetzt werden.

Durch die adjuvante Kombinations- Chemotherapie lassen sich die Rezidivrate und die Mortalität reduzieren. Heute ist eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie standart, da sie insbesondere bei Patientinnen mit höherem Risiko eine geringfügige, jedoch signifikante Überlegenheit gegenüber der CMF- Therapie zeigt. Als Erweiterung sollte bei nodal-positiven Patientinnen eine taxanhaltige Chemotherapie durchgeführt werden (Schneeweiss et al., 2005).

Eine primäre (präoperative) systemische Therapie (neoadjuvante Therapie) wird heute als Standardbehandlung bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen oder inflammatorischen Mammakarzinomen angesehen. Daneben bietet die neoadjuvante Therapie Frauen mit großer Tumorlast, und damit den Kandidatinnen für eine Mastektomie die Möglichkeit einer Tumorreduktion und einer Brust erhaltenden Therapie. Es werden übliche Chemotherapieschemata verwendet, bei positivem ER- Status bietet sich jedoch die Hormontherapie an (AWMF [www.leitlinien.net](http://www.leitlinien.net), 2004).

Bei Patientinnen mit einer Her- 2- neu- Überexpression bietet das Medikament Trastuzumab, das mit einer Chemotherapie kombiniert wird, einen entscheidenden rezidivfreien Überlebensvorteil (Piccart-Gebhart et al., 2005).

Lokalrezidive nach Brust erhaltender Operation und Bestrahlung treten mit einer Häufigkeit von 5- 10% (nach 10 Jahren) auf, wobei die mediane 5- Jahres- Überlebenszeit 65% (45%-79%) beträgt (Goldhirsch et al., 2003). Prognostische Faktoren für das Auftreten eines Rezidives sind die Anzahl der befallenen Lymphknoten, die Tumorgroße, das Grading, der Hormonrezeptorstatus, der Resektionsstatus und die Fokalität. Bei operablen Lokalrezidiven ist die lokale Operation erste Wahl, bei bestehender Inoperabilität hingegen die Radiotherapie (Gill et al., 1993).

Ein metastasiertes Mammakarzinom ist in der Regel nicht kurabel, weshalb die Therapie nach individuellen Gesichtspunkten (Wünschen, Wertvorstellungen, Lebensqualität, Zielen) der Patientin erfolgen sollte. Als weitere Entscheidungskriterien gelten Alter, Schwere der Krankheit und Allgemeinzustand der Patientin ([www.ago-online.de](http://www.ago-online.de), 2005).

Es kommen bei dieser Therapie sequentielle Chemotherapie und endokrine Therapie zum Einsatz (Feyerabend et al., 2001; Sherar et al., 1997).

Bei Hochrisikopatienten ist eine präventive medikamentöse Therapie in Erwägung zu ziehen. Da die Dauer der Östrogenwirkung ein entscheidender Faktor zur Entwicklung eines Mammakarzinomes ist, kann man durch Antiöstrogene oder besser SERMS (Selective estrogen receptor modulators) diese Zeit verkürzen und so das Erkrankungsrisiko vermindern werden. Hier stehen zwei Medikamente zur Verfügung, Tamoxifen und Raloxifen, die beide signifikant das Risiko, an einem Östrogenrezeptor positiven Brustkrebs zu erkranken, verringern (Eisen et al., 2003; Cuzick et al., 2003; Martino et al., 2004)

## **1.2 Rezeptoren, Hormone**

### **1.2.1 Östrogen und Östrogenrezeptor**

Östrogen wird als Hormon in Follikeln der Ovarien, in der Plazenta und zu einem geringen Anteil in der Nebennierenrinde produziert und wird dort aus Cholesterol synthetisiert. Die entscheidenden Enzyme sind die Steroid- Dehydrogenase (Cholesterol zu Progesteron) und der Aromatase- Komplex (Testosteron zu Estradiol). Die Steroidhormone werden überwiegend in der Leber durch Konjugation inaktiviert und über die Galle ausgeschieden (Koolmann, Röhm, 1997; Linnemann, Kühl, 2002). Östrogen kontrolliert das Wachstum von Brustgewebe, reguliert den Menstruationszyklus, die Proliferation des Uterus- Endometriums, die Höhe des im Blut zirkulierenden Cholesterins und die Knochendichte (Jordan et al., 1996).

Bei Steroid- Hormonrezeptoren handelt es sich um intrazelluläre Rezeptoren. Die Hormone sind lipophiler Natur und können durch die Zellmembran diffundieren. Die Hormone binden zuerst an zytoplasmatische Rezeptorproteine, worauf dann der Hormonrezeptorkomplex in den Zellkern wandert (Translokation). Dort kommt es zur Genhemmung und/oder Geninduktion, die wiederum zu einer veränderten Transkription und Translation der Zelle führt (Silbernagel et al., 2001; Bartels et al., 1998).

In erster Linie nimmt Östrogen Einfluss auf die Expression von Myc-, wie auch Bcl2-Genen und darüber hinaus auch auf solche Gene, die für den Vascular- Endothelial-Growth- Factor (VEGF), den Insuline- Like- Growth- Factor (IGF) und den Transforming- Growth- Factor (TGF $\alpha$ ) kodieren (Osborne et al., 2005).

Beim Östrogenrezeptor (ER) existieren zwei Subtypen, ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Die beiden Rezeptoren sind in ihrer Struktur sehr homolog, und die Unterschiede scheinen eher funktioneller Natur zu sein. So konnte ER $\beta$  bei ER $\alpha$ - Knock- Out- Mäusen nicht die komplette Funktion übernehmen, so dass die Mäuse trotz normalen Östrogenspiegels keine regelrechten Geschlechtsorgane entwickelten, wohingegen ER $\alpha$  sehr wohl den Verlust von ER $\beta$  kompensieren kann (Lubahn et al., 1993; Couse et al., 1995; Korach et al., 1996). Ebenso scheint es sich so zu verhalten, dass ER $\alpha$  ER $\beta$  induzieren kann.

Das Vorhandensein von zwei Rezeptoren ist unter anderem für das verschiedene Verhalten (Agonist vs. Antagonist) von Antiöstrogenen in verschiedenen Geweben entscheidend (Kuiper et al., 1996).

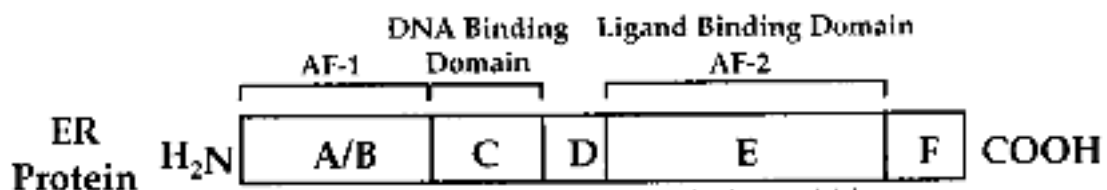


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des ER, der aus 6 Untereinheiten besteht (MacGregor et al., 1998).

Der ER besteht aus sechs verschiedenen Domänen, A bis F. In der A/B- Domäne liegt einer der beiden Aktivierungskomplexe (AF), der AF1, der die Transkription der Zelle auf bestimmte Weise beeinflusst (Groenemeyer, 1991). AF1 ist gewebespezifisch aktiv und scheint eine ligandenunabhängige Aktivität zu zeigen (Berry et al., 1990; Webster et al., 1988), wobei er nicht promotorspezifisch ist.

In der C- Region liegt die DNA- Bindungs- Domäne (DBD), die über zwei Zinkfinger mit der DNA interagiert. Dabei scheint es sich so zu verhalten, dass ein Zinkfinger receptorspezifisch ist, und der andere wie bei allen Steroidrezeptoren nur als strukturelle Bindungsverstärkung am Phosphatgerüst der DNA dient (Kumar et al., 1988; Parker et al., 1991; Umesono et al., 1985). Des Weiteren liegt in der C- Region die Bindungsstelle des Hitzeschockproteins (Chambraud et al., 1990), sie ist verantwortlich für die Lo-

kalisierung des Rezeptors im Zellkern. Die Bindung zwischen Hitzeschockprotein und C-Region geschieht über ligandenunabhängige Lokalisationsmoleküle, von denen es weitere im ER gibt, z.B. in der E-Region. Dort sind sie hingegen ligandenabhängig, was zu einer Lokalisationsänderung im Rezeptor bei der Bindung von Östrogen führt (Yilikomi et al., 1992).

Die E-Region beinhaltet die Ligandenbindungsstelle, die im Einzelnen aus der ligandenabhängigen AF2, Lokalisationsmolekülen (so.) und einer Bindungsstelle für Hitzeschockproteine besteht. Die E-Region ist dafür zuständig, spezifisch Östrogen als Ligand zu binden und die entsprechende festgelegte Transkription anzuregen. Bei der Bindung ändert sich die Konformation des ER so, dass die DBD an die DNA binden kann (Groenmeyer et al., 1991; Parker et al., 1991).

Wenn das Östrogen an den ER bindet, dissoziiert das Hitzeschockprotein und der Rezeptor verbinden sich zu einem Homodimer, so dass die Konformation des ER verändert wird. Es kommt auf verschiedenen Wegen zu einer Phosphorylierung des Rezeptors und damit zu einer Aktivierung desselben.

Es gibt neben dem eigentlichen Rezeptor auch unterschiedliche Komodulatoren, die entweder die Aktivierung verstärken oder zu einer Aktivierungsrepression führen können und wahrscheinlich einen erheblichen Anteil an der Östrogen-Wirkung haben. So wurde im Mammakarzinom eine Überexpression des Kofaktors AIB1 festgestellt (Osborne et al., 2001; Fuqua et al., 2004; Anzick et al., 1997; Bouras et al., 2001).

Ebenso wurde ersichtlich, dass die Struktur der Östrogenbindungsdomäne sich mit Östrogenen, wie auch mit medikamentösen Östrogen-Agonisten und -Antagonisten verbindet und damit die molekulare Grundlage für die Ligandeninteraktion bildet. Die Bindungstasche ist sehr groß und kann mit sehr vielen hydrophoben Gruppen interagieren, benötigt jedoch essentiell einen aromatischen Ring.

Wenn sich nun Östrogen in diese Bindungstasche setzt, kommt das Molekül so zu liegen, dass seine aktivierende Domäne nach außen zeigt und so zu einer Aktivierungskaskade mit Koaktivatoren führt. Antagonisten aus der Gruppe der SERMS (wie z.B. Raloxifene, siehe unten) kommen hingegen so zu liegen, dass sich keine aktivierende Gruppe nach außen drehen kann, es zu keiner Interaktion mit Koaktivatoren kommt und damit die Aktivierungskaskade ausbleibt oder abgeschwächt wird (Sadovsky et al., 1998).

Es gibt neben dem Weg über die Transkriptionsaktivierung auch noch einen anderen Wirkungsweg von Östrogen, der vermutlich im Zytoplasma abläuft. Es handelt sich dabei um den so genannten Membran Initiated Estrogen Signalling Pathway. Hierbei wird ein ER benutzt, der keine direkte Wirkung auf die DNA hat, sondern vielmehr Faktoren wie z.B. AKT über Phosphorylierung aktiviert oder zu einem erhöhten Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR)- Spiegel (zu dieser Gruppe gehört auch HER- 2) führt und so Einfluss auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung nimmt (Haynes et al., 2003; Figtree et al., 2003; Song et al., 2002; Shou et al., 2004).

Der Östrogenrezeptor bildet einen entscheidenden Regulator beim Wachstum, so wie bei der Differenzierung der weiblichen Brustdrüse und ist deswegen in die Entstehung von Mammakarzinomen involviert (Tong et al., 2002).

Eine relativ geringe Zahl an Zellen der Brustdrüse produziert ER. Es handelt sich um einen dissoziativen Zusammenhang zwischen Proliferation und Rezeptordichte. Nun ist aber ein Anstieg der Rezeptordichte, wie auch der Verlust des inversen Verhältnisses eindeutig mit früher Brustkrebsentstehung vergesellschaftet (Anderson et al., 2002).

So konnte, im Gegensatz zu einer nicht erkrankten Kontrollgruppe, ein signifikant erhöhter ER $\alpha$ - Spiegel bei Patientinnen mit einem progressiven Mammakarzinom nachgewiesen werden (Shaaban et al., 2002).

Rund 60% der Mammakarzinome sind zu Beginn Östrogenrezeptor- positiv oder -sensibel, jedoch kann man häufig einen erniedrigten Östrogenspiegel im Blut messen. Im Gegensatz dazu ist der Östrogenspiegel in den Tumorzellen eindeutig höher als im Plasma. Die Ursache könnte ein erhöhter Uptake von Östrogenen aus dem Plasma sein und in Zusammenhang mit einer erhöhten Aromatase- Aktivität der Zelle stehen (Pasqualini et al., 2004; Brüggemeier et al., 2003).

Es konnte generell eine positive Korrelation zwischen der 5- Jahres- Überlebensrate und einem positiven ER $\alpha$ - Status, so wie einem positiven Progesteronstatus und einem prognostisch günstigen Einfluss auf die 10- Jahres- Überlebensrate nachgewiesen werden (Chrabusta et al., 2004).

Ebenso scheint ein linearer Zusammenhang zwischen der Aromatase- Expression und dem damit erhöhtem Östrogen- wie ER $\alpha$ - Spiegel und der COX-2- Expression über den Prostaglandin- Pathway zu bestehen (Brüggemeier et al., 2003).

Diese Tatsache rückt einen weiteren Faktor ins Blickfeld, der zu einer malignen Transformation von Zellen führen kann, nämlich die Überexpression von Cyclooxygenase-2 (COX-2)- Genen und -Proteinen. Die Hochregulierung ist mit der Entstehung eines ductalen Karzinoma in situ assoziiert.

## 1.2.2 Cyclooxygenase-2: Eigenschaften, Wirkungsmechanismus

### 1.2.2.1 Physiologische Eigenschaften und Signaltransduktionswege

Prostaglandine (PG) sind eine Familie kleiner Lipidmoleküle, die von vielen Zellen aus Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen und Prostaglandin- Isomerasen/ -Synthetasen gebildet werden (Smith et al., 1996; Marnett et al., 1999).

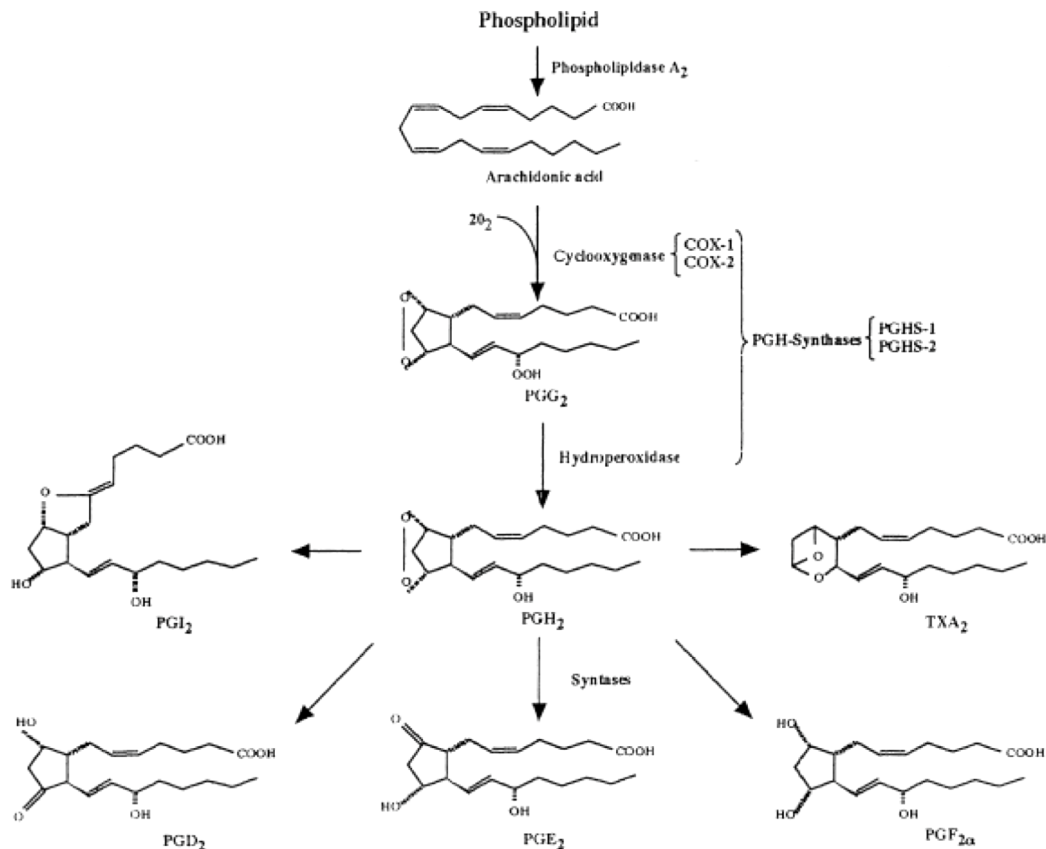


Abbildung 1-3: Prostaglandin- Synthese. Man sieht Arachidonsäure als Ausgangssubstanz, die über das limitierende Enzym COX-1/2 in PGE<sub>2</sub> umgewandelt wird, was sei-

nerseits wieder die Ausgangssubstanz für andere Prostaglandine darstellt (Everts et al., 2000).

PGH<sub>2</sub> ist die Muttersubstanz der Prostaglandine und wird über verschiedene Prostaglandin- Synthetasen (PS) zu spezielleren Endprodukten weiterverarbeitet. Unter den Prostaglandin- Synthetasen ist PSD (Produkt dieser Synthetase ist PGE<sub>2</sub>) in Mastzellen und im Gehirn wirksam, dilatiert Bronchial- und Gefäßmuskulatur, kontrahiert Darm und Uterus, wirkt schützend auf die Darmmukosa, hemmt die Lipolyse und ist auch an der Fieberentstehung beteiligt. PSF (Produkt: PGF<sub>2</sub>) und PSI (Produkt: PGI<sub>2</sub>) sind unter anderem im Uterus und in den Endothelzellen vorhanden, wo sie z.B. vasodilatativ wirken oder die Thrombozytenaggregation hemmen. Das Endprodukt PSE (Produkt: PGE<sub>2</sub>) aus PGH<sub>2</sub> wird von fast allen Zellen gebildet, während die Thromboxen-Synthetase (Produkt: Thromboxan<sub>2</sub>) in erster Linie in Thrombozyten und Makrophagen vorhanden ist.

Im Allgemeinen gilt, dass Prostaglandine von nahezu jeder Zelle hergestellt werden können und dort autokrin und/oder parakrin über spezielle Rezeptoren wirken (Zah, 2004 et al., Silbernagel et al., 2001).

COX besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten: einer Epidermal- Growth- Factor-Like- Domäne, einer Membranbindungseinheit und einer Enzymdomäne. Die aktive Seite von COX besteht aus einer langen, hydrophoben Kette (Picot et al., 1994).

Es existieren zwei verschiedene COX- Rezeptoren, COX-1 und COX-2, wobei der Unterschied zwischen beiden COX- Isoformen in erster Linie in ihrer unterschiedlichen Gewebeverteilung liegt.

COX-1 findet man in vielen verschiedenen Zellen, wo sie in erster Linie physiologische Stimuli im gesunden Gewebe vermitteln, indem sie zum Beispiel auf die Thrombozytenaggregation einwirken, Einfluss auf die Magensaftsekretion nehmen und das Renin-Angiotensin- Aldosteron- System steuern. COX-2 hingegen wird besonders in inflammatorischen Zellen unter Entzündungsstimuli und Schmerz, also besonderen Zuständen gebildet. Ansonsten sind sich die Isoformen sehr ähnlich, verwenden die gleichen Substrate, haben den gleichen Reaktionsweg und bilden die gleichen Produkte. Es wurden außerdem einige Faktoren gefunden, die COX-2 induzieren, wie z.B. der Epidermal-Growth Factor, der Plantelet- Derived- Growth- Factor und Interleukin- 1 $\beta$  (Xie et al., 1991; O'Banion et al., 1991; Kujubu et al., 1991; Gilbert et al., 1994).

### 1.2.2.2 COX-2 und die Tumorentstehung

Cyclooxygenasen (COX) sind Prostaglandin- Synthetasen, die unter anderem eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines Mammakarzinoms spielen.

Eine abweichende Expression von COX-2 wurde bei vielen soliden Tumoren beschrieben, so zum Beispiel beim Kolonkarzinom und beim Mammakarzinom (Half et al., 2002; Eberhart et al., 1994; Dempke et al., 2001). Mäuse mit einer transgenetischen Überexpression des humanen COX-2- Gens entwickelten ein metastasiertes Mammakarzinom, was die zentrale Rolle von COX-2 bei der Tumorentstehung nahe legt (Liu, Chang, Narko, 2001). In Mammakarzinomen besteht eine signifikante Steigerung der Expression und Translation, die mit den COX-2- Regulationsmechanismen im Zusammenhang stehen (Boland et al., 2004). Diese Steigerung von COX-2- Enzymen ist ein eher frühes Ereignis in der Tumorentstehung (Guo et al., 2003).

Durch die abweichende COX-2- Expression kommt es zu einer Kumulation von Prostaglandinen in den Zellen, und durch die über G- Proteine vermittelte Signaltransduktion mit Hilfe von Phospholipase- C zu einem intrazellulären  $Ca^{2+}$ - Anstieg.

Auf diese Weise können Prostaglandine, speziell  $PGE_2$ , auf direktem und indirektem Weg zu einer Tumorprogression führen.

Der direkte Weg führt über die Aktivierung von zellulären Mechanismen zum Wachsen und Metastasieren von tumorösem Gewebe. Beim indirekten Weg wird z.B. die antitumoröse Aktivität von Immunzellen, wie Makrophagen und natürliche Killerzellen, supprimiert, oder auch die Produktion von antiproliferativen Substanzen, wie die Zytokine TNF-  $\alpha$  oder Interferon-  $\gamma$ , in T- Lymphozyten gehemmt (Harris, Padilla, 2002).

Die Angiogenese ist für einen Tumor ein entscheidender Wachstumsfaktor, da es dem Tumor ohne diesen Vorgang nicht möglich ist, über eine bestimmte Größe hinauszuwachsen. Hinzu kommt, dass die Metastasierung durch Angiogenese erheblich gefördert wird. COX-2 kann sich auf die Invasivität und Angiogenese direkt auswirken (Rozic et al., 2001). Als zentrales Enzym der Angiogenese nimmt es maßgeblich über drei Stoffe auf die tumoröse Angiogenese Einfluss. Es handelt sich um Thromboxan A, Prostaglan-



din E und Prostaglandin I. Ein Anstieg dieser Eicosanoid-Produkte führt zu einem Produktionsanstieg des Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) und fördert die Blutgefäßeinsprossung (Gately et al., 2004). Des Weiteren sind Prostaglandine für das Wachstum von Endothelzellen unerlässlich, so dass auch bei einem COX-2-negativen Tumor die Angiogenese an den Endothelzellen über Hemmung von COX-2 direkt unterdrückt werden kann (Dermond et al., 2001).

COX-2 verstärkt die Antiapoptosesignale, wenn man von einem inversen Zusammenhang zwischen Bcl-2 (Antiapoptosegen) und Apoptose ausgeht. Ratten mit COX-2-überexpressionierenden Epithelzellen weisen einen erhöhten Bcl-2-Spiegel und somit eine höhere Resistenz gegen Apoptose auf (Dannenbergh et al., 2001). Darüber hinaus wurden viele Verbindungen zwischen der Überexpression von COX-2 und der Überaktivität von einigen Onkogenen beschrieben, wie z.B. v-src, v-Ha-ras, HER-2-neu, Wnt und p53 mutated (Guastalla et al., 2004).

Es gibt darüber hinaus auch noch organspezifische Nebeneffekte. PGE<sub>2</sub>, das Hauptprodukt von COX-2, kann zu einer Kumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führen, was eine Induktion der Translation von Genen zur Folge hat, die für Aromatase kodieren (CREB-Pathway). Aromatase ist das finale Enzym zur Östrogenkatalyse, das für hormonabhängige Tumoren einen Wachstumsfaktor darstellt (weiteres siehe unten) (Zhao et al., 1996; Danneberg et al., 2005).

Eine hohe COX-2-Expression in Brustkrebszellen korreliert mit einer schlechteren Prognose (Ristimäke et al., 2002; Sivula et al., 2002), vielen Lymphknotenmetastasen, schlechter Differenzierung, großer Tumormasse, starker vaskulärer Invasion und schlechteren Überlebensraten (Prosperi, Mallery, Kigerl et al., 2004).

## 1.3 Medikamente

### 1.3.1 Ly117018 (Raloxifene, Evista® - Analogon, Lilly)

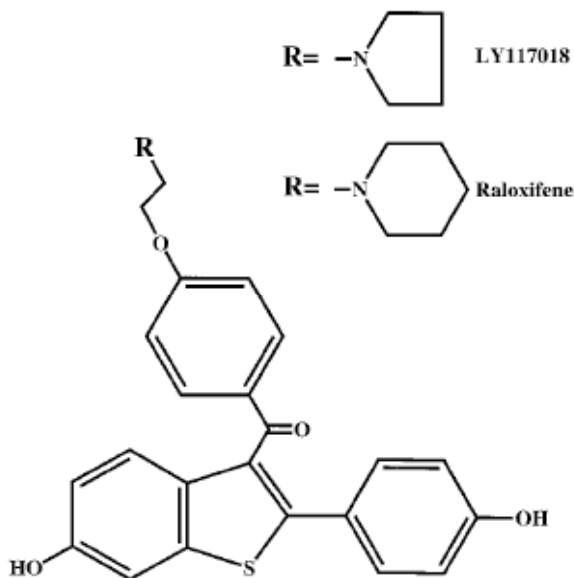


Abbildung 1-4: Strukturelle Charakterisierung von Ly117018 und Raloxifene

Selective estrogen receptor modulators (SERMs) gehören zur Gruppe nicht steroidaler (nicht hormoneller) Medikamente und wurden entwickelt, um Frauen die Vorteile einer Antiöstrogentherapie zukommen zu lassen, ohne negative Effekte auf die Reproduktion und bestimmte Gewebearten auszuüben.

Tamoxifen und Toremifen waren die ersten SERMs und werden weltweit in der adjuvanten und neoadjuvanten Brustkrebstherapie mit Erfolg eingesetzt.

Leider haben diese Medikamente der ersten Generation proliferative Effekte auf das Endometrium. Die zweite SERM- Generation mit Raloxifene (und seinem Analogon Ly117018) als ihrem Hauptvertreter beeinflusst den Uterus hingegen nicht proliferativ und wird im großen Stil zur Osteoporosetherapie postmenopausaler Frauen eingesetzt. Ihre Sicherheit und Effektivität wurde in vielen klinischen Studien, die häufig doppelblind und randomisiert waren, an mehr als 40.000 Frauen in 30 Staaten in 50 Kliniken weltweit getestet. Raloxifene wird von den Patientinnen gut toleriert (in klinischen Dosen zwischen 30- 600mg/Tag). Die häufigsten Nebenwirkungen sind heißer Flush und

leichte Beinkrämpfe (Morii et al., 2004). Weitere, jedoch sehr seltene Nebenwirkungen sind tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien und Retinathrombosen. Weiterhin kann Raloxifene auch teratogen wirken (Goldstein et al., 2000).

Raloxifene wirkt östrogenagonistisch auf den Knochen und wird so in erster Linie in der Behandlung von postmenopausaler Osteoporose (Delmas et al., 1997), meist in Kombination mit Calcium/Vitamin D, eingesetzt. Hier kommt es zu einer Verringerung vertebraler Frakturen um 30- 50%. Es wird überwiegend hepatisch metabolisiert, ohne dabei das Cytocrom- P450- System zu belasten. Als Kontraindikationen gelten Niereninsuffizienz und Leberinsuffizienz, so wie aktuelle und frühere thrombembolische Ereignisse (Karow et al., 2004).

Raloxifene zeigt weder Wirkung auf die Ovulation noch auf die Länge der Menstruation, bewirkt jedoch eine leichte Zunahme von FSH während der folliculären Phase und eine leichte Abnahme von LH in der Ovulationsphase. Weiterhin bewirkt Raloxifene eine Erniedrigung des Östrogen-, wie auch des Progesteronspiegels (Baker, 1998). Raloxifene hat außerdem agonistische Wirkungen auf den Lipidmetabolismus, so dass es zu einer Erniedrigung des Serum- LDLs ohne Effekte auf HDL kommt. Hinzu kommt, dass es zu einer Verringerung des C- reaktiven Proteins und Homocysteins, beide nicht lipide Marker für Arteriosklerose, so wie von Fibrinogen führt. Es scheint in diesem Zusammenhang zu einer Verbesserung des kardiovaskulären Risikos zu kommen (Walsh et al., 1998).

In einer vergleichende Studie zwischen Tamoxifen und Raloxifen, zeigte sich Raloxifen ebenso wirksam in der Verhinderung von invasiven Mammakarzinomen, lediglich scheint es eine nicht signifikant geringere Wirkung bei nicht invasiven Karzinomen zu geben. In der Raloxifen Gruppe kam es zu weniger Thrombembolischen Ereignissen und weniger Hysterektomien im Vergleich zu Tamoxifen. (STAR: Vogel et al., 2006) Auch andere Studienergebnisse legen die Wirksamkeit gegen Mammakarzinome nahe. In der MORE- Studie (multiple outcomes for raloxifene evaluation), wurde als zweiter Endpunkt gezeigt, dass Raloxifene das Risiko von Karzinoma in situ der Brust und Brustkrebs um 65% senkt. Die größte Signifikanz zeigt es für Frauen mit östrogenrezeptorpositivem Brustkrebs. Dieser Effekt scheint auf eine antitumoröse Wirkung oder Wachstumsverlangsamung mit einer Rechtsverschiebung der Zeit- Tumor- Kurve zu

deuten (Cummings et al., 1999; Dickler MN, Norton L. et al., 2001). Auch in einer dritten Studie RUTH (Raloxifene use for the heart) reduzierte Raloxifen signifikant das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, jedoch zeigte sich hier auch eine Wirksamkeitslücke bei nicht invasiven Karzinomen (Barrett-Connor et al., 2006). Ähnliche Ergebnisse lieferte einer Langzeitstudie (CORE), mit einem Beobachtungszeitraum von 8 Jahren, (Martino et al., 2004).

Als 2- arylbenzothiophenes Raloxifene- Analogon gehört Ly 117018 zur Gruppe der Antiöstrogene und ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM) der zweiten Generation mit ausgeprägter antiosteoporotischer Wirkung, Östrogen- antagonistischer Wirkung auf Brust und Uterus (ohne agonistischen Effekt auf das Endometrium) und agonistischer Wirkung auf Leber und Knochen (Goldstein et al., 2000).

Antiöstrogene, wie Tamoxifen und Raloxifene (und deren Analoga), binden an den intrazellulären Östrogenrezeptorkomplex, blockieren bzw. verändern den Signaltransduktionsweg für Wachstum und Proliferation und führen möglicherweise zu einem Zellzyklusarrest oder einer Apoptose (McGregor et al., 1998).

Es existieren wahrscheinlich drei entscheidende Wege, auf denen die SERMs antiöstrogen- bzw. östrogenanalog wirken.

Zum einen verhindern sie die Bindung von Östrogen an den ER (zum Teil kompetitiv), so dass nicht das gesamte Östrogen des Plasmas wirken kann. Daneben binden sie selber an den ER, verhindern aber die korrekte Konformationsänderung, so dass die aktivierende Domäne, bzw. die mit der DNA interagierende Domäne, nicht nach außen zeigen kann, und so die Transkription von bestimmten Genen ausbleibt, was zu einer antiöstrogenen Wirkung führt.

Zum anderen können sie die Bindung zwischen Östrogen und verschiedenen Promoterregionen der DNA vermitteln oder sogar selbst, zum Teil besser als Östrogen, binden, was zu einer Aktivierung von Transkription und Translation führt, wie z.B. der Transformierung des Wachstumsfaktors  $\beta 3$ , eines sehr wichtigen Faktors zum Knochenaufbau. Resultat ist daraufhin eine östrogenagonistische Wirkung (Goldstein et al., 2000, McGregor et al., 1998).

Es liegt auf der Hand, dass Raloxifene und dessen Analoga je nach Gewebeart entweder eine Aktivierung oder eine Repression von östrogeninduzierten Regelmechanismen bewirken, je nach dem, ob in den Zellen eher die Faktoren zur Aktivierung oder eher die Faktoren zur Hemmung bereit stehen. Es handelt sich wahrscheinlich am ehesten um Subtypen und Koaktivatoren des Östrogenrezeptors, die diese Unterschiede von Gewebe zu Gewebe ausmachen (Yang et al., 1996).

### 1.3.2 Celecoxib (Celebrex®, Pfizer)

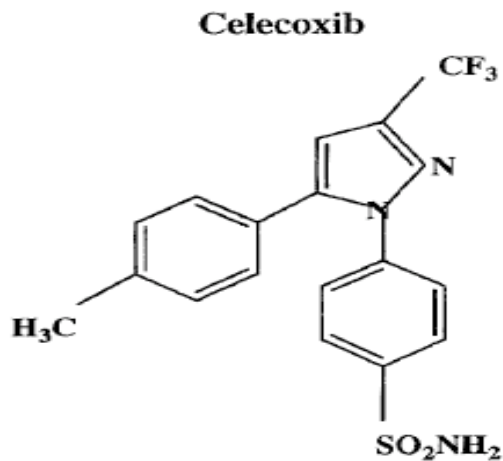


Abbildung 1-5: Chemische Struktur von Celecoxib.

Celecoxib ist der erste synthetisierte selektive COX-2- Hemmer und wurde 2000 in Deutschland zur Behandlung von Arthrose und rheumatoider Arthritis zugelassen. Nachgewiesene Wirkungen sind ferner, vergleichbare antiinflammatorische und analgetische Wirkung wie nicht selektive NSAR, mit geringeren gastroinestinalen Nebenwirkungen und einer geringeren Anzahl von gastralen und duodenalen Ulzera, wie auch präventives Wirken gegen die Entwicklung von Kolonkarzinomen

Celecoxib hat eine Bioverfügbarkeit von 40% und ist zu 97% an Plasmaproteine gebunden. Es wird überwiegend von der Leber über Cytochrom- P450 metabolisiert, wobei Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, die über die gleichen Enzyme metabolisiert werden, bekannt sind. Die Celecoxib- Metabolite sind nicht mehr aktiv.

Die häufigste renale Nebenwirkung sind Ödeme, die aufgrund einer Natrium- und Wasserretention in der Henleschen- Schleife auftreten. Des Weiteren sind Nebenwirkungen im Renin- Angiotensin- Aldosteron- System bekannt: Dabei kann es zu Bluthochdruck, Nierenversagen, Elektrolytstörungen und intestinaler Nephritis kommen.

In fünf klinischen Studien wurde eine vergleichbare antiinflammatorische und analgetische Wirkung im Vergleich zu nicht selektiven NSAR bei über 5200 Patienten mit rheumatoider Arthritis festgestellt. Bei vergleichbarer Wirksamkeit haben COX-2-Hemmer jedoch den großen Vorteil geringerer gastrointestinaler Nebenwirkungen, wobei dieses in einigen Studien, nur im ersten Behandlungshalbjahr nachweisbar war. Ebenso entfällt dieser Vorteil bei gleichzeitiger Gabe von ASS, auch in geringen Dosen, und bei vorhandenem Ulcusleiden. Die genaue protektive Wirkung bleibt Gegenstand aktueller Diskussionen (Simon et al., 1999; CLASS: Silverstein et al., 2000; VIGOR: Bombardier et al., 2000; Emery et al., 1999; Bensen et al., 1999; Burian et al., 2003; Jüni et al., 2002; Lisse et al., 2003).

Als wichtige Nebenbeobachtung, wurde in der schon oben erwähnten VIGOR- Studie eine Zunahme von kardiovaskulären Ereignissen in der COX-2- Hemmer Therapie, in dieser Studie Rofecoxib, im Vergleich zur Naproxen Gruppe nachgewiesen. Es zeigte sich eine Zunahme von Herzinfarkten und Schlaganfällen. Die Studienautoren gehen von mehreren Effekten aus: einem kardiotoxischen Schädigungsmechanismus, einer Blockierung der Synthese des Thrombozyten- Aggregationshemmers und einer Hemmung der Produktion des Vasodilatators Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) durch selektive COX-2-Hemmung ohne Beeinflussung des von COX1 abhängigen Plättchenaktivierungsfaktors Thromboxan A<sub>2</sub> (Bombardier et al., 2000). Dieses konnte jedoch in der entsprechenden Studie für Celecoxib CLAAS (Celecoxib Long- term Arthritis Safety Study) nicht eindeutig herausgearbeitet werden (Silverstein et al., 2000), sodass offen bleibt, ob es sich um ein Substanzgruppen oder Präparate spezifische Nebenwirkung handelt.

Celecoxib wird weiterhin meist experimentell zur Behandlung von Karzinomen eingesetzt. Dabei gilt es als gesichert, dass COX-2- Hemmer protektiv auf die Entstehung von Colonkarzinomen wirken, hier stehen jedoch noch weitere Ergebnisse z.B. der APPROVe und APC Studien aus. Auch andere Karzinome sind Gegenstand aktueller Forschungen, hier besonders das Mammakarzinom, wie auch andere Karzinome in denen eine erhöhte COX-2- Expression nachgewiesen werden konnte, hier sind die Hauptef-

Effekte der Tumorsuppression: Hemmung des Stoffwechsels und der Proliferation, Hemmung der Angiogenese, und Einleitung von Apoptose. (Sheng et al., 1997; Sheehan et al., 1999; Chow et al., 2005).

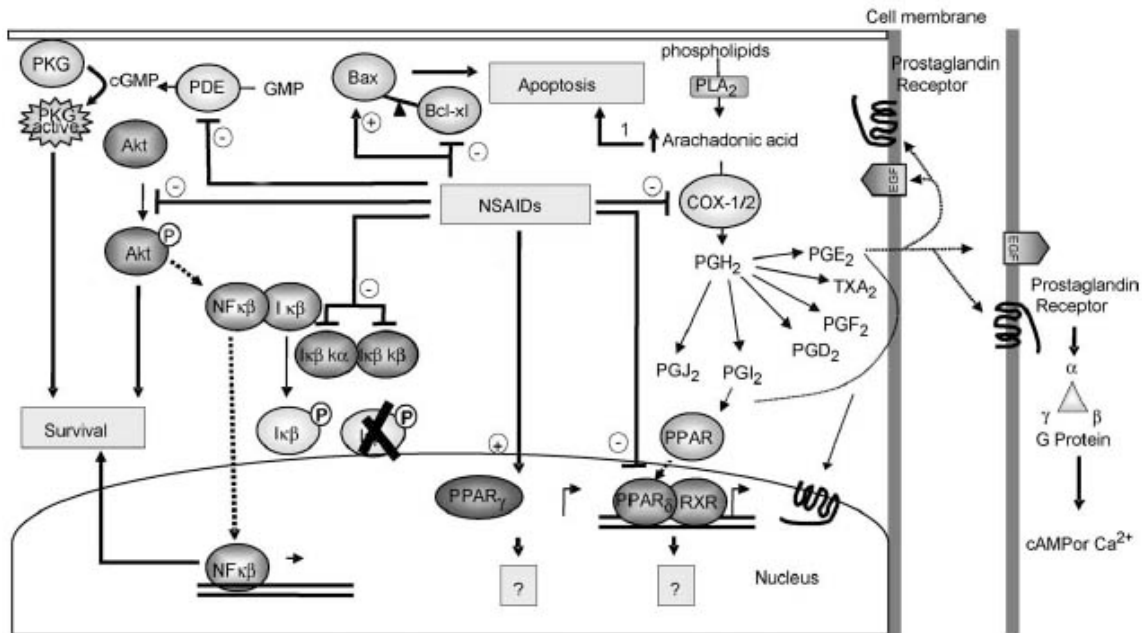


Abbildung 1-6: Molekulare Mechanismen von COX-2 und NSAR. Die rechte Seite zeigt die COX-2-abhängigen Reaktionen, die linke die COX-2-unabhängigen, die wie NSAR wirken und Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung nehmen können (nach Zha et al., 2004).

Celecoxib hemmt COX-2 um circa zwei Potenzen besser als COX-1. Hieraus ergibt sich das besondere Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil. Da COX-2 in erster Linie in Prostata, Gehirn, Niere, Follikeln vor der Ovulation und besonders nach inflammatorischer oder proliferativer Stimulation in den meisten Geweben nachweisbar ist, entfaltet es hier auch die stärkste Wirkung. Die Haupteinflüsse, die von Prostaglandinen ausgehen, sind oben beschrieben und werden in diesem Zusammenhang genauso gehemmt wie bei anderen NSAR. Prostaglandine spielen pathophysiologisch eine Rolle bei der Entstehung von Entzündung, Fieber und Schmerz, so wie bei der Zellproliferation, der Ovulation und der Nierenfunktion.

Jedoch hat Celecoxib anscheinend noch andere Wirkungen, die nicht über Prostaglandine vermittelt werden. Hier steht im Vordergrund die direkte Hemmung auf die Phosphorylierung von Akt zu P-Akt, die die Zelle an einem normalen Stoffwechsel hindert und auf diese Weise zum Zelltod führen kann (Zha et al., 2004; Turnheim et al., 2001). Akt ist eine Protein-Kinase, die durch verschiedene Growth-Factor (GF) über GF-Rezep-

toren aktiviert wird. Es nimmt Einfluss auf den Zellmetabolismus über den Glucoseumsatz und -transport, auf die Zellproliferation und den Zellzyklus über die Tumorsuppressorgene p53 und p27, verhindert Apoptose über die Hemmung des pro Apoptose Faktors BAD und beschleunigt das Zellwachstum über Tuberos Sklerosis Protein(TSC). Akt fördert die Angiogenese und die Invasivität von Zellen. Insgesamt gesehen ist Akt ein wichtiger Faktor, der die Tumorentstehung und Progression in vielerlei Hinsicht günstig beeinflussen kann (Bellacosa et al., 2004; Bellacosa et al., 2005).

## 1.4 Synergismus von Ly117018 und Celecoxib: Fragestellung

### 1.4.1 Synergismus

Wenn man zwei Substanzen, die einzeln verabreicht einen bestimmten Effekt auslösen, in Kombination gleichzeitig verabreicht, gibt es vier Möglichkeiten, wie sie zusammen wirken können. Es handelt sich um antagonistische, subadditive, additive und synergistische Effekte. Um synergistische Effekte darzustellen, kann man den Interaktionsindex berechnen. Hierbei wird ein konstanter Effekt  $\gamma$  definiert (z. B. IC 50), der durch bestimmte Konzentrationen von Einzelsubstanzen A bzw. B und durch eine bestimmte Konzentration einer Kombination aus A und B, bezeichnet als a,b, ausgelöst wird. Diese Konzentrationen werden miteinander verglichen und so ergibt sich:

$$\gamma = a/A + b/B$$

Ergibt diese Gleichung einen Wert  $> 1$  ist der Effekt antagonistisch oder subadditiv, der Wert 1 beschreibt additiv Gleichung, ein Wert von  $< 1$  weist auf Synergismus hin (Tallarida, 2002).

Nun stellt sich die Frage, wie es zu den jeweiligen Effekten kommt, bzw. wie man zu möglichst synergistisch wirkenden Kombinationen gelangt. Die einfachste Begründung für ein subadditives Verhalten ist die kompetitive Hemmung von zwei Substanzen an einem Rezeptor. Weitere Möglichkeit, dass es zu einem voraussagbaren subadditiven Verhalten der Pharmazeutika kommt, bilden z.B. eine gemeinsame Endstreckenwirkung, die auch bei Kombinationen nicht maximierbar ist (Sättigungseffekte), oder Medikamente, die sich auf Grund ihrer Hauptwirkung gegenseitig hemmen (Induktion und Hemmungseffekte), oder Medikamente, die sich auf Grund ihrer chemischen Struktur gegenseitig inaktivieren (Struktureffekte). Es gibt sicherlich noch mehr Voraussetzun-



gen, die von vornherein einen Synergismus ausschließen. Es ist jedoch durch die Darstellung ersichtlich, dass man eher Medikamente kombiniert, die möglichst einen komplett anderen Hauptwirkungsmechanismus haben, verschiedene Rezeptoren benutzen, verschiedene Hauptwirkungsstrecken haben, verschieden abgebaut, inaktiviert und ausgeschieden werden und trotzdem eine vergleichbare Wirkung auf den gewünschten zu erzielenden Effekt haben. Es liegt des Weiteren auf der Hand, dass die synergistische Wirkung entweder den Grund in einer positiven Beeinflussung in Sachen Bioverfügbarkeit, Wirkungsgradverbesserung, Bahnung oder ähnlichem, oder aber in einer Beeinflussung der Neben- und Seitenwirkungen von den Medikamenten hat (Tallarida, 2001, Gennings et al., 1990).

Wenn man sich nun die möglichen Kombinationspartner Celecoxib und Ly117018 anschaut, sieht man, dass diese Medikamenten die eben erläuterten grundsätzlichen Voraussetzungen für einen möglichen Synergismus mitbringen. Es sind keine Interaktionen in der Bioverfügbarkeit bekannt und beobachtet worden, Resorption, Abbau, Aufbau und Ausscheidung sind grundsätzlich verschieden. Gleiches gilt für die Rezeptoren, Zellangriffspunkte, Hauptwirkungswege und auch für einige Nebenwirkungen, und trotzdem führen sie beide zum programmierten Zelltod. So sind die theoretischen Voraussetzungen ideal, um einen möglichen Synergismus zu untersuchen.

#### **1.4.2 Fragestellung**

Die Kombinationstherapie an sich ist eine viel versprechende Maßnahme im Kampf gegen neoplastische Erkrankungen. Sie bietet da Chancen, wo die Einzelsubstanz- Therapie keine ausreichende Wirkung erbringt, oder die Einzelsubstanzen in so hohen Dosen verabreicht werden müssen, dass diese unakzeptable Nebenwirkungen hervorrufen würden. Auch in der antitumorösen Therapie können Synergismen zu einer besseren Wirkung mit geringeren Nebenwirkungen führen, so dass z.B. die Dosierungen der Substanzen so niedrig gewählt werden können, dass der Patient kaum oder sogar gar keine Einschränkungen im alltäglichen Leben hinzunehmen hat, ohne dabei auf eine effektive Therapie zu verzichten (Dannenbergh et al., 2005).

Man sollte sich überlegen, welches Patientenkollektiv von einer solchen Kombinationstherapie profitieren könnte. Hier ist es nahe liegend, dass am Kombinationstherapien die größte Chance in der adjuvanten Erhaltungstherapie und in der Erhaltungstherapie nach

Chemotherapie in rekurrenter Situation. Dieses bedingt, dass die synergistischen Effekte, die man mit einer sinnvollen chemo- antihormonellen Kombination erzielen möchte, zu einer Dosisreduzierung der einzelnen Medikamente führen sollte, so dass die Nebenwirkungen bei besserem oder gleichem Therapieerfolg minimiert werden können. Auf diese Weise steigt die Lebensqualität an, und es kommt zu einem längeren Intervall der geringeren Tumorprogression und damit zu einer langfristigeren Beschwerdeverringering.

Nun stellt sich die Frage, welche Medikamente am ehesten zu einem möglichen Synergismus führen, bzw. welche Pharmaka die besten Voraussetzung zu einer Kombination mitbringen. Die pharmakologischen Aspekte zu diesem Punkt sind schon unter 1.4.1 besprochen worden. Ein weiterer wichtiger Aspekt liegt in der genauen Betrachtung der Wirkungen der einzelnen Medikamente. So wurde beschrieben, dass gerade eine Kombination aus antihormoneller Therapie (z.B. Ly117018) und Medikamenten, die andere zellulären Wachstumsfaktoren beeinflussen (z.B. Celecoxib), eine äußerst viel versprechende Kombination darstellt (Nicholson et al., 2004).

Ein weiterer Punkt, der bei einer möglichen Kombinationstherapie zu bedenken ist, wird durch die Frage gebildet, in wie weit die Einzelwirkungen von den möglichen Medikamenten belegt sind. Bei Celecoxib gibt es zahlreiche Versuche, die die Wirksamkeit auf maligne Brusttumore nahe legen. So wurde in Tierversuchen eine signifikante Tumorreduktion durch eine Celecoxib- Behandlung festgestellt (Alshafie et al., 2000, Harris et al., 2000). Auch erste klinische Studien stellen eine antitumoröse Wirkung in Aussicht (Goss, 2003). Gleiches gilt auch für das Raloxifenanalogon Ly117018: In Tierexperimenten ist die Wirksamkeit belegt (Levine, 2004), wie auch in klinischen Studien (MORE und CORE: Martino et al., 2004).

Für beide Substanzen wurden zahlreiche in vitro Analysen durchgeführt. So konnte für Celecoxib signifikante Wachstumshemmung für ER+ wie auch ER- Mammakarzinomzelllinien nachgewiesen werden, es wurden Veränderungen in dem Zellzyklus in diesem Zusammenhang beschrieben (Basu et al., 2005; Zhang et al., 2004; Basu et al., 2004, Kundu et al., 2004 Howe et al., 2001). Gleiches gilt für Ly117018, wobei sich bei den in vitro Zellversuchen an Mammakarzinomzellen nur die ER+ Zelllinien als sensibel gezeigt haben. Diese reagierten mit einer Zellzyklusarrest auf die Behandlung (Freiss et al., 2005; Takahashi et al., 2004; Cypriani et al., 1988; Thompson et al., 1988).

Darüber hinaus sind auch direkte Überschneidungen in ihren Wirkungszusammenhängen bekannt. Hier seien ein paar beispielhaft dargestellt. So ist bekannt, dass Raloxifen die Prostacyclin Synthese verringert, hingegen die COX Aktivität steigert. Beide Medikamente nehmen auf unterschiedlich Wegen negativen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt (Haynes et al., 2003; Zah et al., 2004). Beide Medikamente induzieren einen Zellzykluseffekt (Guastalla et al., 2004, Takahashi et al., 2004) und andere biologische Effekte, wie in der Einleitung einzeln dargestellt. Und das Wichtigste, beide Medikamente verhindern das Wachstum von humanen Mammakarzinomen, respektive deren Zellen in in vitro und zum Teil in in vivo Versuchen.

Diese Betrachtungen führen zu folgender Fragestellung:

Führt die Kombinationstherapie aus Ly117018 und Celecoxib zu einem Synergismus in vitro, in einem Laborsetting mit Mammazellkarzinom -Zellen?

In dieser vorgelegten Arbeit werden folgende Fragestellungen behandelt:

- Beeinflussen Celecoxib und Ly117018 als Einzelsubstanzen das Wachstum an der ER positiven Zelllinie MCF- 7 oder an der ER negativen Zelllinien MDA-MB435?
- Beeinflussen Celecoxib und Ly117018 als Kombination das Wachstum an der ER positiven Zelllinie MCF- 7 oder an der ER negativen Zelllinien MDA-MB435 und entsteht bei der Kombinationen ein synergistischer Effekt?
- Verändern Celecoxib und Ly117018 den Zellzyklus der beiden Zelllinien als Einzelsubstanzen oder als Kombination?
- Wird die Phosphorylierung von Akt zu P-Akt durch Celecoxib oder Ly117018 als Einzelsubstanzen oder in der Kombination reguliert?

Es wurden verschiedene Kombination aus den Einzelsubstanzen Celecoxib und Ly117018 untersucht, um einen möglichen Synergismus nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden als erstes die Wirksamkeit der Einzelsubstanzen und anschließend eine Kombination von beiden an zwei unterschiedlichen Mammakarzinomzellen getestet. Als analytische Verfahren wurden Proliferationsassays, Flowcytometry und Western-Blot benutzt, die unter verschiedenen Aspekten ausgewertet wurden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung	Roth, Karlsruhe, GER
Ampuva	Braun, Melsungen, GER
APS (Aminopersulfat)	Merk, Darmstadt, GER
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, GER
Celecoxib	Pfizer, New York, USA
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Steinheim, GER
DMSO (Dimethyl Sulphoxide)	Sigma, Steinheim, GER
Drymilk	Roth, Karlsruhe, GER
ECL Reagenz (Chemiluminescence)	Amersham, Little Chalfont, UK
ECL plus Reagenz	Amersham, Little Chalfont, UK
Ethanol	Roth, Karlsruhe, GER
FACS-Clean	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Flow	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Rinse	BD Biosciences, San Jose, USA
FCS (Fetal Bovine Serum)	Biokrom AG, Berlin, GER
Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt, GER
Glycerol	Sigma, Steinheim, GER
Glycin	Serva, Heidelberg, GER
HCL	Merck, Darmstadt, GER
Kristallviolett	Sigma, Steinheim, GER
LY117018	Eli Lilly, Indiana, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, GER
Mg Cl <sub>2</sub>	Serva, Heidelberg, GER
Na-Citrat	Roth, Karlsruhe, GER
NaCl	Merck, Darmstadt, GER
NaN <sub>3</sub>	Serva, Heidelberg, GER
Na- Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Penicillin- Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride)	Fluka, Neu-Ulm, GER

PoncauS	Sigma, Steinheim, GER
Propidiumiodid	Calbiochem, Darmstadt
Protein Assay Kit	Pierce, Rockford USA
Proteinstandard	Biolabs, Beverly, USA
RNase	Serva, Heidelberg, GER
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin	PAA Laboratories, GmbH, Pasching, AU
SDS (Dedecylsulfate)	Serva, Heidelberg, GER
TEMED	Roth, Karlsruhe, GER
Towbin Puffer	Serva, Heidelberg, GER
Tris Hal (Trisaminomethane)	Serva, Heidelberg, GER
Triton X100	Bio Rad, Hercules, USA
Trypanblau	Sigma, Steinheim, GER
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Tween	Sigma, Steinheim, GER

## 2.2 Pharmazeutika

LY 117018	10M Stocklösung in Ethanol
Celecoxib	10M Stocklösung in DMSO

## 2.3 Zubehör und Plastikartikel

Cryo- Tube	Nunc, Roskilde, DK
FACS-Röhrchen. 2ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Filterpapier	Amersham, Little Chalfont, UK
Gewebekulturflasche 250, 550ml	Greiner, Frickenhausen, GER
Gewebekulturplatte 6well	Greiner, Frickenhausen, GER
Gewebekulturplatte 96well	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschalen 50, 100	Greiner, Frickenhausen, GER
Nitruccellosemembranen Optitran	Schleicher und Schuell, Dassel, GER
Serol. Pipetten 1, 2, 5, 10, 25, 50ml	Greiner, Frickenhausen, GER
Pipettenspitzen 10, 200, 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel, FR
Falcon Röhrchen 15, 50 ml	Greiner, Frickenhausen, GER
Reaktionsgefäße 1ml	Eppendorf, Hamburg, GER

Ritips 1,25, 2,5, 5, 12,5ml	Ritter, Schwabmünchen, GER
Röntgenfilm	Amersham, Little Chalfont, UK
Zellschaber mittel, groß	Sarstedt, Newton, USA

## 2.4 Software

Cell Quest pro	BD Biosciences, San Jose, USA
Excel	Microsoft, Unterschleißheim, GER
ImageJ	Rasband et al., 2005, Abramoff et al., 2004
Magelan (ELISA Reader)	Tecan, Grödig, AU
Minitab	Minitab, State College, US
Photoshop	Adobe, San Jose, USA
Word	Microsoft, Unterschleißheim, GER

## 2.5 Geräte

Blotting Kammer	Bio Rad, Hercules, USA
Brutschrank Hera cell	Heraeus, Hanau, GER
FACS Calibur	BD Biosciences, San Jose, USA
Fireboy plus	Integra Biosciences, Ferwald, GER
Gel Kammer	Thermo, Bremen, GER
Mikroskop ID03	Zeiss, Jena, GER
Multipette	Eppendorf, Hamburg, GER
Photometer ELISA Reader	Tecan, Grödig, AU
Pipetboy	Integra Biosciences, Ferwald, GER
Pipetman 2,10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, FR
Schüttler	Heidolph, Schwabach, GER
Stickstofftank Locator junior plus	Barnstead, Dubuque, USA
Transferpette-8	Brand, Wertheim, GER
Vortexer	Heidolph, Schwabach, GER
Wärmeblock	Heidolph, Schwabach, GER
Wasserbad	GFL, Burgwedel, GER
Zählkammer Neubauer improved	Planoptik, Elsoff, GER

Zellbank Hera safe	Heraeus, Hanau, GER
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, GER

## 2.6 Zelllinien

- MCF-7: Diese Zelllinie wurde 1973 von H.D. Soule aus dem Pleuraerguß einer Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma isoliert (Soule et al., 1973; Brooks et al., 1973). Es handelt sich um in Kultur adhärent wachsende, epitheliale Zellen, mit haufenförmigem Wachstum und östrogenpositivem Rezeptorstatus.
- MDA-MB435: Auch diese Zelle stammt aus einem Pleuraerguß einer 48-jährigen Patientin und wurde als humane Karzinomzelle der Brustdrüse identifiziert. Es handelt sich um eine epitheliare Zelle mit adhärentem Wachstum. Sie gilt als Östrogenrezeptor-negativ und hormonunabhängig. Freundlich zur Verfügung gestellt von der Unversitätsfrauenklinik Tübingen. (Brinkley et al., 1980; Siciliano et al., 1979; Cailleau et al., 1978).

## 2.7 Zellkultur

### 2.7.1 Lösungen

- Zellkulturmedium

RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin	88%
FCS	10%
Natriumpyruvat, 100 mM	1%
Penicillin-Streptomycin, 10.000 E/10.000 µg	1%
- Färbelösung zur Überprüfung der Zellvitalität und zur Zellzählung

PBS	54%
Trypanblau 0,4%	36%
Zellsuspension	10%
- Zellkultur Einfriermedium

FCS	80 %
DMSO	20 %

## 2.7.2 Methode

### 2.7.2.1 Kulturbedingungen

Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB435 wurden im Zellkulturmedium, in 550ml- oder 225ml- Gewebekulturflaschen bei 37 °C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank kultiviert. Das sterile Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter Sterilwerk-bänken mit vertikalem Luftstrom. Die Lagerung der Zellkulturmedien erfolgte bei 4°C, zur Anwendung wurden sie im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das Zellkulturmedium wured alle 3-4 Tage erneuert und es wurde auf Kontaminationsvermeidung und Zellse-paration geachtet. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert und zur Vermeidung von Mutationen nicht länger als 12 Wochen in Kultur gehalten. Zu diesem Zweck konser-vierte man zu Beginn der Arbeit die Zellen in Portionen von  $5 \cdot 10^6$  Zellen im Einfrier-medium in Stickstofftanks.

### 2.7.2.2 Passagieren von Zellen

Nach Erreichen von 90% konfluentem Wachstum wurden die Zellen umgesetzt. Hierzu wurde zunächst das alte Medium abgenommen und die Zellen für 2min mit 2- 3ml Trypsin aus der Adhärenz gelöst. Anschließend wurde durch Zugabe von 5 ml Zellkul-turmedium das Trypsin neutralisiert, und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Gewebekulturflasche abgeschabt. Diese Suspension wurde bei 1100 U/min 10min zentrifugiert und das Zellpallet anschließend mit 5ml frischem Medium re-suspendiert. Je nach Verwendungszweck wurden die Zellen auf neue Gewebekulturfla-schen mit 25 ml oder 15ml Medium gesetzt oder für Versuche verwendet.

### 2.7.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden zur längeren Aufbewahrung bei -196°C in flüssigem Stickstoff gela-gert. Sie wurden zunächst wie beim Passagieren trypsiniert und abzentrifugiert, die Re-



suspension des Zellpallets erfolgte hingegen mit 1 ml Einfriermedium, welches das Bilden von Eiskristallen verhindert. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend in einem Styroporbehälter einen Tag bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und dann in einen Stickstofftank überführt.

#### 2.7.2.4 Reaktivierung kryokonservierter Zellen

Die Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen, für 2- 3min im Wasserbad aufgetaut, in ein Falcon- Röhrchen überführt und mit 5 ml eiskaltem Medium bedeckt. Anschließend wurden die Zellen bei 1100 U/min 10min zentrifugiert und in die Gewebekulturflaschen mit 25ml oder 15ml Zellkulturmedium gesetzt.

#### 2.7.2.5 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Zellzahl wurde in Färbelösung zur Überprüfung der Zellvitalität und zur Zellzählung mit Hilfe der Neubauer- Kammer ermittelt, wobei gilt: Zellen/ml = gezählte Zellen pro Quadrat  $\times 10^4 \times$  Verdünnungsfaktor.

Es wurden  $10\mu\text{l}$  der Lösung in die Neubauer- Kammer gegeben und die Zellen ausgezählt. Das Volumen pro Quadrat entspricht  $0,1\mu\text{l}$ , zur Umrechnung auf 1ml muss mit  $10^5$  multipliziert werden (Verdünnungsfaktor 1:10).

### 2.8 Proliferationsassay (Kristallviolett- Methode)

#### 2.8.1 Lösungen

- Fixierung:  
Glutamataldehyd 11%                      in Ampuva
- Färbung:  
Kristallviolett 0,05%                      in 25% Methanol 75% Ampuva

- Entfärbung:  
0.1M Natriumcitrat in 50% Ethanol 50% Ampuva

### 2.8.2 Methode

MDA-MB435 wurde mit 500 Zellen pro Well von einer 96- Well- Platte und MCF-7 mit 2000 Zellen pro Well ausplattiert und je nach Experiment über einen Zeitraum von bis zu acht Tagen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 10 $\mu$ l Fixierlösung über 15min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie mit 100 $\mu$ l Färbelösung für 15 min unter Schütteln gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurde die 96- Well- Platte anschließend 30 min unter Schütteln mit 100 $\mu$ l Entfärbelösung behandelt. Anschließend wurde mit dem ELISA Reader bei 560nm die Extinktion gemessen und ausgewertet.

### 2.8.3 Zelldichte vs. Extinktion

Bei den MCF-7 Zellen wurden Zellkonzentrationen von 1000 bis 20000 Zellen pro Well von einer 96- Well- Platte, bei MDA-MB435 mit 500 bis 16000 Zellen pro Well ausplattiert. Die Zellen wuchsen 24h an, anschließend mit der Kristallviolett- Methode gefärbt und ausgewertet.

Es wurde eine Extinktionsänderung in Abhängigkeit von der Zellkonzentration festgestellt: Je mehr Zellen je höher die Extinktion und umgekehrt (siehe Abb.:2-1 und 2-2).

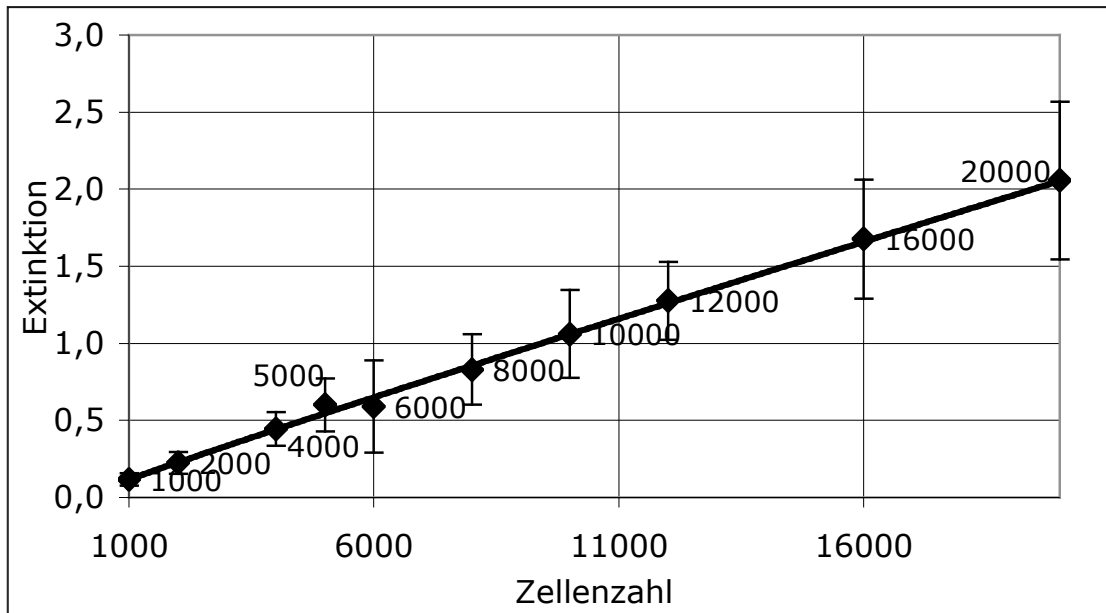


Abbildung 2-1: MCF-7 Zellen: mit steigender Zellzahl wächst die Extinktion

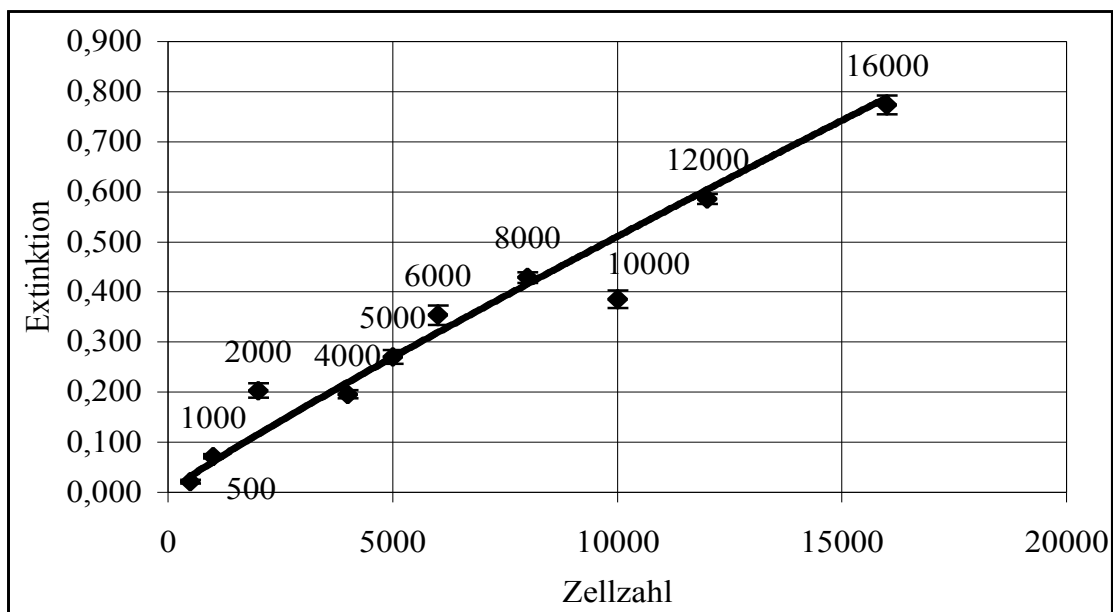


Abbildung 2-2: MDA-MB435 Zellen: mit steigender Zellzahl wächst die Extinktion

#### 2.8.4 Zeitabhängigkeiten

Die Zellen wurden in entsprechender Zellzahl in 96- Well- Platten ausplattiert und jeweils 2, 4, 6, und 8 Tage mit einer Ly117018- Konzentration von 1 bis  $0,001\mu\text{molar}$  (1, 0,1, 0,01,  $0,001\mu\text{molar}$ ) oder einer Celecoxib- Konzentration zwischen 50 und  $0,1\mu\text{molar}$  (50, 10, 1,  $0,01\mu\text{molar}$ ) inkubiert. Am vierten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Als Kontrolle dienten die Lösungsmittel Ethanol 0,1% bei Ly117018

und DMSO 0,1% bei Celecoxib. Hinterher wurden die Zellen mit der Kristallviolett-Methode angefärbt und das Assay ausgewertet.

Tabelle 2-1: Zeigt das Pipetierschema für die Zeitabhängigkeitsversuche. Cele= Celecoxib, Ly= Ly117018

Zeitabhängigkeit Celecoxib	Lösungsmittelkontrolle		Verdünnungsreihe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Celecoxib [Konzentration in $\mu\text{molar}$ ]									
MDA-MB435	DMSO 0,1%	DMSO 0,1%	0,1	0,1	1	1	10	10	50	50
MCF- 7	DMSO 0,1%	DMSO 0,1%	0,1	0,1	1	1	10	10	50	50

Zeitabhängigkeit Ly117018	Lösungsmittelkontrolle		Verdünnungsreihe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Ly117018 [Konzentration in $\mu\text{molar}$ ]									
MDA-MB435	Ethanol 0,1%	Ethanol 0,1%	0,001	0,001	0,01	0,01	0,1	0,1	1	1
MCF- 7	Ethanol 0,1%	Ethanol 0,1%	0,001	0,001	0,01	0,01	0,1	0,1	1	1

### 2.8.5 Konzentrationsabhängigkeiten

Die Zellen wurden in entsprechender Zellzahl vier Tage in 96- Well- Platten inkubiert. Bei Ly117018 wurden Konzentrationen zwischen 0,001 und 1 $\mu\text{molar}$  (Konzentrationen: 0,001, 0,01, 0,03, 0,06, 0,1, 0,3, 0,6 und 1 $\mu\text{molar}$ ) auf die Zellen gegeben, bei Celecoxib zwischen 50 und 0,1 $\mu\text{molar}$  (50, 25, 10, 6, 3, 1, 0,5, 0,1 $\mu\text{molar}$ ). Als Kontrolle dienten die Lösungsmittel Ethanol 0,1% bei Ly117018 und DMSO 0,1% bei Celecoxib. Hinterher wurden die Zellen mit der Kristallviolett- Methode angefärbt und das Assay ausgewertet.

Tabelle 2-2: Zeigt das Pipetierschema der Konzentrationsabhängigkeitsversuche. Cele= Celecoxib, Ly= Ly117018

Konzentrations- abhän- gigkeit Cele- coxib	Lösungsmittelkontrolle		Verdünnungsreihe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
			Celecoxib [Konzentration in $\mu\text{molar}$ ]							
MDA-MB435	DMSO 0,1%	DMSO 0,1%	0,1	0,5	1	3	6	10	25	50
MCF- 7	DMSO 0,1%	DMSO 0,1%	0,1	0,5	1	3	6	10	25	50

Konzentrati- ons- abhän- gigkeit Ly117018	Lösungsmittelkontrolle		Verdünnungsreihe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
			Ly117018 [Konzentration in $\mu\text{molar}$ ]							
MCF- 7	Ethanol 0,1%	Ethanol 0,1%	0,001	0,01	0,03	0,1	0,1	0,3	1	1

### 2.8.6 Kombinationsversuche

Die Zellen wurden in entsprechender Zellzahl vier Tage in 96-Well- Platten nach folgendem Schema inkubiert:

Die Experimente wurden so gestaltet, dass jeweils entweder Ly117018 oder Celecoxib als Basis mit einer Konzentrationsreihe der jeweils anderen Substanz auf die Zellen aufgetragen wurden. Die Basiskonzentrationen richteten sich nach den IC50 Werten aus den Konzentrationsabhängigkeitsexperimenten. Die Verdünnungsreihen entsprachen den Verdünnungen der Konzentrationsabhängigkeiten.

Für MCF-7 ergaben sich damit bei LY117018 als Basis Konzentrationen von 0,3, 0,6 und  $1\mu\text{molar}$  mit Celecoxib zwischen 50 und  $0,1\mu\text{molar}$  (50, 25, 10, 6, 3, 1, 0,5,  $0,1\mu\text{molar}$ ), bei Celecoxib als Basis Konzentrationen von 10, 20,  $30\mu\text{molar}$  mit Ly117018 zwischen 1 und  $0,001\mu\text{molar}$  (1, 0,6, 0,3, 0,1, 0,06, 0,03, 0,01 und  $0,001\mu\text{molar}$ ).

Für MDA-MB435 mit Ly117018 als Basis wurden die höchsten von uns benutzten Verdünnungen verwendet, da MDA-MB435, wie in den Vorversuchen gesehen, nicht auf Ly117018 ansprach. So ergaben sich bei Ly117018 als Basis Konzentrationen von 0,3, 0,6 und  $1\mu\text{molar}$  mit Celecoxib zwischen 50 und  $0,1\mu\text{molar}$  (50, 25, 10, 6, 3, 1, 0,5,

0,1µmolar), und bei Celecoxib als Basis 30, 40 und 50µmolar mit Ly117018 zwischen 1 und 0,001µmolar (1, 0,6, 0,3, 0,1, 0,06, 0,03, 0,01 und 0,001 µmolar).

Als Kontrollen wurden die jeweiligen Lösungsmittel, sprich 0,1% Ethanol+ 0,1% DMSO, die Basiskonzentrationen ohne Kombinationspartner und die Verdünnungsreihe ohne Basismedikament benutzt.

Tabelle 2-3: Pipetierschema der Kombinationsversuche: Cele= Celecoxib, Ly= Ly117018

MCF- 7	Lösungsmittel- kontrolle	Basiskontrolle	Verdünnungsreihenkontrolle bzw. Synergismus							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kombination Ly-Basis+ Celecoxib	DMSO 0,1%	DMSO 0,1%	Celecoxib [Konzentration in µmolar]							
			0,1	0,5	1	3	6	10	25	50
	DMSO 0,1%+	Ly-Basis in	Ly- Basis + Cele [Konzentration in µmolar]							
	Ethanol 0,1%	0,3, 0,6 oder 1µmolar	0,1	0,5	1	3	6	10	25	50
Kombination Cele-Basis+ Ly117018	Ethanol 0,1%	Ethanol 0,1%	Ly [Konzentration in µmolar]							
			0,001	0,01	0,03	0,1	0,3	0,6	0,1	1
	DMSO 0,1%+	Cele-Basis in	Cele- Basis + Ly [Konzentration in µmolar]							
	Ethanol 0,1%	10, 20 oder 30µmolar	0,001	0,01	0,03	0,1	0,3	0,6	0,1	1

MDA- MB435	Lösungsmittel- kontrolle	Basiskontrolle	Verdünnungsreihenkontrolle bzw. Synergismus							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kombination Ly-Basis+ Celecoxib	DMSO 0,1%	DMSO 0,1%	Celecoxib [Konzentration in µmolar]							
			0,1	0,5	1	3	6	10	25	50
	DMSO 0,1%+	Ly-Basis in	Ly- Basis + Cele [Konzentration in µmolar]							
	Ethanol 0,1%	0,3, 0,6 oder 1µmolar	0,1	0,5	1	3	6	10	25	50
Kombination Cele-Basis+ Ly117018	Ethanol 0,1%	Ethanol 0,1%	Ly [Konzentration in µmolar]							
			0,001	0,01	0,03	0,1	0,3	0,6	0,1	1
	DMSO 0,1%+	Cele-Basis in	Cele- Basis + Ly [Konzentration in µmolar]							
	Ethanol 0,1%	30, 40 oder 50µmolar	0,001	0,01	0,03	0,1	0,3	0,6	0,1	1

Hinterher wurden die Zellen mit der Kristallviolett- Methode angefärbt und das Assay ausgewertet.

Anschließend wurden die Analysen mit dem T- Test statistisch ausgewertet und der Interaktionsindex ( $y = a/A + b/B$ ; a bzw b = Substanzkonzentration im Synergismus- Versuch A bzw. B im Einzelexperiment;  $y = 1$  additiv,  $y < 1$  synergistisch,  $y > 1$  subadditiv; Tallarida et al. 2002) bestimmt.

## 2.9 Flowcytometry, Zellzyklusanalyse

### 2.9.1 Lösungen

- Fixierlösung 70% Ethanol + 30% Ampuwa
- Propidiumiodid Stammlösung 1mg/ml Ampuwa
- RNase Stammlösung 1mg/ml PBS, 5 min 100°C
- Waschpuffer PBS+ 0,01% NaN<sub>3</sub>+ 2% FCS

### 2.9.2 Methode

$6 \cdot 10^5$  Zellen MCF-7 und  $3 \cdot 10^5$  Zellen MDA-MB435 wurden in jeweils einem Well einer 6- Well- Zellkulturplatte plattiert und vier Tage mit dem entsprechenden Medikament und der vorgegebenen Dosis inkubiert. Anschließend wurden aus jedem Well die Zellen gewonnen, in 3ml Fixierlösung fixiert und 1h bei 4°C gekühlt. Hinterher wurden sie zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden sie 20min bei 37°C mit 100µl RNase- Stammlösung behandelt. Als letzte Maßnahme wurden die Zellen mit 1ml Waschpuffer und 10µl Propidiumbromid- Stammlösung für 30min lichtgeschützt angefärbt. Nun konnte man eine Zellzyklusanalyse am FACS durchführen.

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander dreimal durchgeführt und jeweils der Mittelwert gebildet.

### 2.9.3 Einzelsubstanzversuche

Ly117018 wurde nur an MCF-7 Zellen getestet. Dabei verwendeten wir folgende Konzentrationen: Ly117018 in 0,001, 0,1 und 1  $\mu$ molar. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel Ethanol 0,1%.

MCF-7 und MDA-MB435 wurden mit 50, 10 und 1  $\mu$ molar Celecoxib behandelt. Als Kontrolle diente DMSO 0,1%.

Die Experimente wurde nach der Flowcytometry- Methode durchgeführt, angefärbt und ausgewertet.

### 2.9.4 Kombinationsversuche

Beide Zelllinien wurden mit verschiedenen Verdünnungen von Ly117018 und Celecoxib, so wie mit Kombinationen von beiden behandelt. Die Konzentrationen stammten aus den Proliferationsassays und hatten sich dort als besonders wirksam herausgestellt.

Im Einzelnen sind diese bei MCF-7:

- Ly117018 0,3  $\mu$ molar, Celecoxib 10  $\mu$ molar und Ly117018 0,3  $\mu$ molar+ Celecoxib 10  $\mu$ molar
- Ly117018 0,03  $\mu$ molar, Celecoxib 10  $\mu$ molar und Ly117018 0,03  $\mu$ molar+ Celecoxib 10  $\mu$ molar.

Bei MDA-MB435:

- Ly117018 0,6  $\mu$ molar, Celecoxib 30  $\mu$ molar und Ly117018 0,6  $\mu$ molar+ Celecoxib 30  $\mu$ molar
- Ly117018 1  $\mu$ molar, Celecoxib 3  $\mu$ molar und Ly117018 1  $\mu$ molar+ Celecoxib 3  $\mu$ molar

Als Kontrolle diente bei allen Experimenten eine Kombination aus beiden Medikamentenlösungsmitteln, 0,1% Ethanol+ 0,1% DMSO. Die Experimente wurden mit der Flowcytometry- Methode durchgeführt, angefärbt und ausgewertet.



## 2.10 Western-Blot

### 2.10.1 Lösungen

- Blotting Puffer: 100ml 10fach konzentrierter Towbin Buffer, 200ml Methanol, mit Aqua Bidest auf 1l auffüllen
- Laufpuffer (10fach konzentriert): 250mM Tris- Base, 1,92 M Glycin, 1% SDS
- Lyse Puffer: 10mM Tris HCL, 140mM NaCl, 3mM Mg Cl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 pH 8,0, 1mM PMSF
- Probenpuffer: pH 6,8, 2g Tris-HCL, 25mg Bromphenolblau, 25ml H<sub>2</sub>O bidest, 5ml 20% SDS, mit Glycerol auf 45ml auffüllen
- Sammelgel: 4 ml Sammelgellösung, 6µl TEMED, 12 µl 10% APS
- Sammelgellösung: 25 ml Sammelgelpuffer, 59 ml H<sub>2</sub>O bidest, 16 ml Acrylamid (30%/0,8%)
- Sammelgelpuffer: pH 6,8 0,5 M Tris-Base, 0,4% SDS
- Stop- Gel: 200µl Trenngel- Lösung , 1µl TEMED, 1µl APS
- TBS (10fach konzentriert): 1,5 M NaCL, 0,1M Tris Base pH 7,5
- TBST: 100 ml TBS (10-fach), 5ml Triton X 100 20%ig
- Trenngel 12,5% Gel: 2,5 ml Trenngelpuffer, 3,0 ml H<sub>2</sub>O bidest, 4,0 ml Acrylamid-lösung (30%/0,8%), 0,5 ml Glycerol, 6 µl TEMED, 12 µl 10% APS
- Trenngelpuffer: pH 8,8, 1,5 M Tris- Base, 0,4% SDS, 4 x SDS
- Trockenmilch- Blockpuffer: 7% Drymilk, 50 ml TBST

### 2.10.2 Antikörper

- Anti- Akt: 1:1000 BD Biosciences, Pharmingen, GER
- Anti- Aktin: 1:3000 Santa Cruz, Santa Cruz, USA
- Anti- mouse: 1:10000 Cell Signalling New England Biolabs, Hitchin, UK
- Anti- rabbit: 1:10000 Cell Signalling New England Biolabs, Hitchin, UK
- Anti- COX2: 1:250 BD Biosciences, Pharmingen, GER
- Anti- P-Akt: 1:1333 R&D, Minneaoplis, USA

### 2.10.3 Methode

Für die zum Western- Blot benötigten Zelllysate, wurden MCF-7 und MDA-MB435 24h in Zellkulturschalen mit  $10^7$  Zellen pro Schale und folgenden Medikamentenkonzentrationen inkubiert:

MCF-7:

- Ly117018 0,3 $\mu$ molar, Celecoxib 10 $\mu$ molar und Ly117018 0,3 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar
- Ly117018 0,03 $\mu$ molar, Celecoxib 10 $\mu$ molar und Ly117018 0,03 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar.

MDA-MB435:

- Ly117018 0,6 $\mu$ molar, Celecoxib 30 $\mu$ molar und Ly117018 0,6 $\mu$ molar+ Celecoxib 30 $\mu$ molar
- Ly117018 1 $\mu$ molar, Celecoxib 3 $\mu$ molar und Ly117018 1 $\mu$ molar+ Celecoxib 3 $\mu$ molar

Als Kontrolle dienten die Medikamentenlösungsmittel Ethanol 0,1%+ DMSO 0,1%

Nach der Behandlung wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen im Lysepuffer 30min auf Eis gelyst. Die Lysate wurden bei  $-24^{\circ}\text{C}$  eingefroren und eine Proteinmengenbestimmung mit Hilfe des Protein Assay Kit durchgeführt, siehe Abb.:2-3.

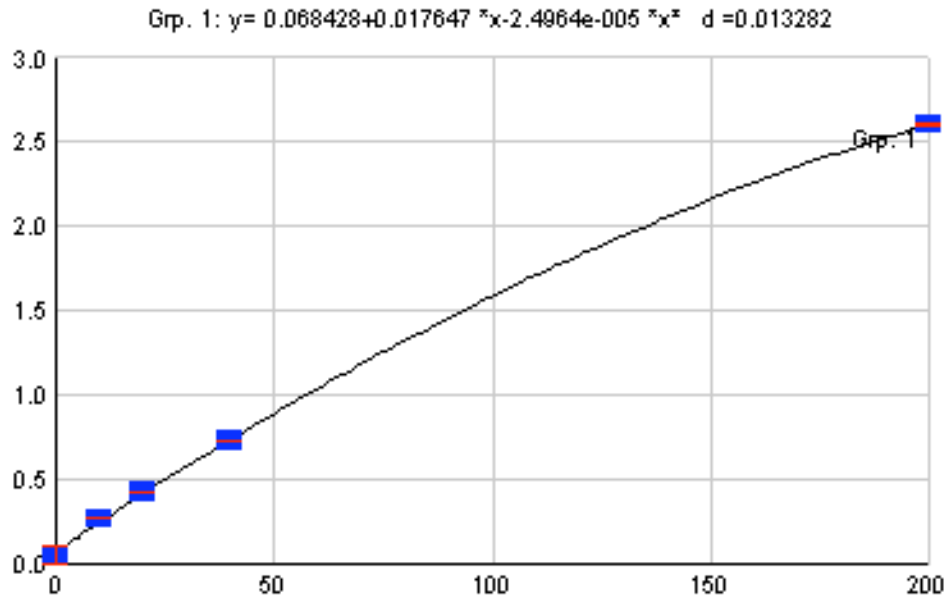


Abbildung 2-3: Zeigt die Protein Standardkurve, anhand derer die Proteinmengen in den Lysaten für den Western- Blot eingestellt wurden. X-Achse Extinktion, y- Achse Proteinmenge in µg/ml.

Die Proben wurden mit PBS verdünnt und so auf 10µg Protein je Probe eingestellt. Die Lysate wurden mit 10µl Probenpuffer versetzt und in die Taschen des vorher vorbereiteten Gels gegeben, hinzu kam pro Gel ein Protein- Marker. Nun wurden die Proteine in der Gel- Kammer nach Größe bei 20mA aufgetrennt, als Lösung geschah dieses im Laufpuffer, bis die Proben einmal komplett durch das Gel gelaufen waren.

Daraufhin wurde das Gel für 1h in einer Blotting- Kammer zwischen Filterpapieren liegend und in Blotting- Puffer getaucht, bei 1,5mA/cm<sup>2</sup> auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

Das Gel wurde hinterher mit Silberfärbung und die Membran mit Ponceau- Rot angefärbt, so dass man die Proteinlademenge kontrollieren konnte.

Anschließend wurde die Membran für 1h in Drymilk zum Blocken gelegt. Es folgten dreimal 10min Waschen in TBST und 1h Inkubieren bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper. Danach wurde wieder dreimal 10min mit TBST gewaschen und der zweite Antikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei 10minütigen TBST- Waschschritten wurde die Membran in ECL+ gelegt und in einer Röntgenkassette ein Film belichtet und entwickelt.

Die Antikörperinkubation, wie auch die Waschschrirte wurden unter Schütteln durchgeführt. Die Antikörperinkubation des Erst- oder des Zweitantikörpers, konnte wahlweise durch eine Übernachtsinkubation bei 3°C ausgetauscht werden.

Belichtungszeiten für die Antikörper bei Verwendung von ECL+(außer Aktin):

Anti- Aktin (mit ECL): 10sec

Anti- Akt: 10sec

Anti- P-Akt: 20min

Anti- COX: 30min

Die Versuche wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Proliferationsassay

Im ersten Schritt wurde mit der Kristallviolett- Methode (siehe 2.8) eine Abnahme der Extinktion bei Verringerung der Zelldichte nachgewiesen, diese Extinktionsverringerng korreliert mit einer verminderten Zellzahl. Danach untersuchte man die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit von Celecoxib und Ly117018 jeweils als Einzelsubstanz, um anschließend die Konzentrationsabhängigkeit in Kombination mit Hilfe des in Kapitel 2 beschriebenen Kristallviolett- Proliferationsassays zu prüfen. Diese drei Versuche sind jeweils für die ER+ Zelllinie MCF- 7 und die ER- Zelllinie MDA- MB435 analysiert worden, wobei nach Durchführung von mindestens drei unabhängigen Experimenten der Mittelwert gebildet wurde. Aus den Einzelsubstanz- Experimenten errechnete sich der IC30 und IC50, um die optimale Konzentration für die Kombinationsversuche zu bestimmen. Die Experimente wurden hinterher mit Hilfe des T-Testes statistisch ausgewertet.

#### 3.1.1 Zeitabhängigkeit von Ly117018

Die Zellen sind nach der in Kapitel 2.8.4 beschriebenen Methode behandelt worden.

Bei der Zelllinie MCF- 7 ist eine Veränderung der Extinktionen im Experiment zu verzeichnen, die jedoch bei unterschiedlichen Ly117018- Konzentrationen über die Zeit verschieden ausfällt. Die stärkste relative Absorptionsabnahme ist in der Konzentration von 1µmolar Ly117018 zu sehen und dann jeweils schwächer in den geringeren Konzentrationen (0,1 0,01 0,001µmolar) (Abb3- 1).

Man sieht eine Veränderung über die Zeit, so dass die Extinktion der Kontrolle von Tag zu Tag ansteigt. Die Absorption der behandelten Zellen zeigt am zweiten Tag geringe Unterschiede zur Kontrolle, um dann jedoch deutlich langsamer anzusteigen, so dass am achten Tag die Extinktion der behandelten Zellen eindeutig tiefer liegt als die der Kontrolle. Dieser Effekt fällt mit steigender Konzentration stärker aus. Bei einer Konzentration von 1µmol beträgt der Extinktionsabfall am vierten Tag ca. 28% und am achten

Tag ca. 60% gegenüber der Kontrolle, bei 0,01 $\mu$ molar Ly117018 hingegen am vierten Tag 16% und am achten 46%.

Statistisch ist die Konzentration 1 $\mu$ molar Ly117018 am vierten Tag signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle mit einem p-Wert von 0,022

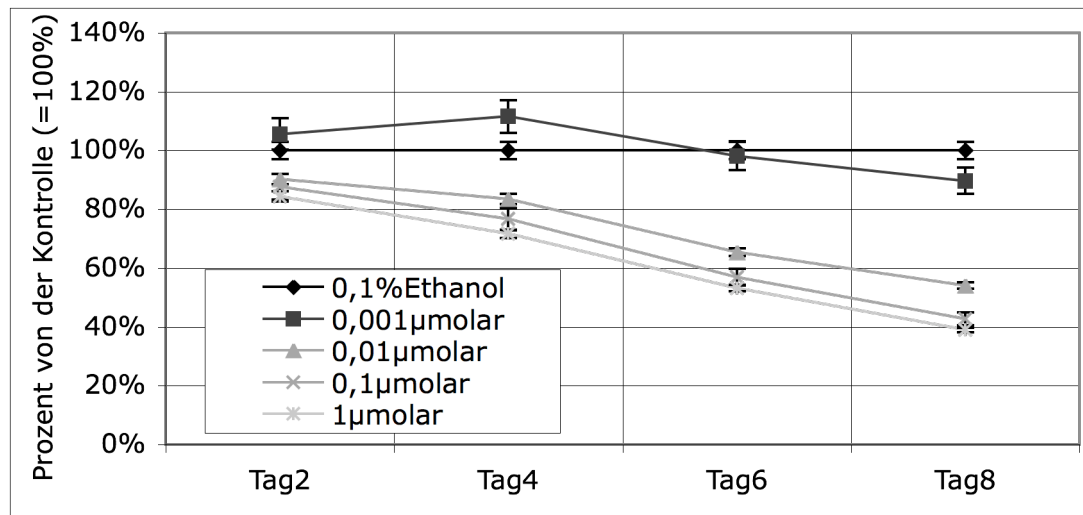


Abbildung 3-1: Zeitabhängigkeit über acht Tage von MCF-7 mit Ly117018 in verschiedenen Konzentrationen (in  $\mu$ mol). Die Kontrolle gilt an allen Tagen als 100%, davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Man sieht im Vergleich mit der Kontrolle eine eindeutige Extinktionsverringern bei den behandelten Zellen in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und ihre Standardabweichungen.

Die Zelllinie MDA-MB435 wächst auch unter Einfluss von Ly117018 in allen Medikamentenkonzentrationen (1, 0,1, 0,01, 0,001 $\mu$ molar) ähnlich wie die Kontrolle (0,1% Ethanol), zeigt also keinen zeitabhängigen, wie auch konzentrationsabhängigen Effekt (siehe Abb. 3-2). Man kann davon ausgehen, dass Ly117018 keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten von MDA-MB435 nimmt.

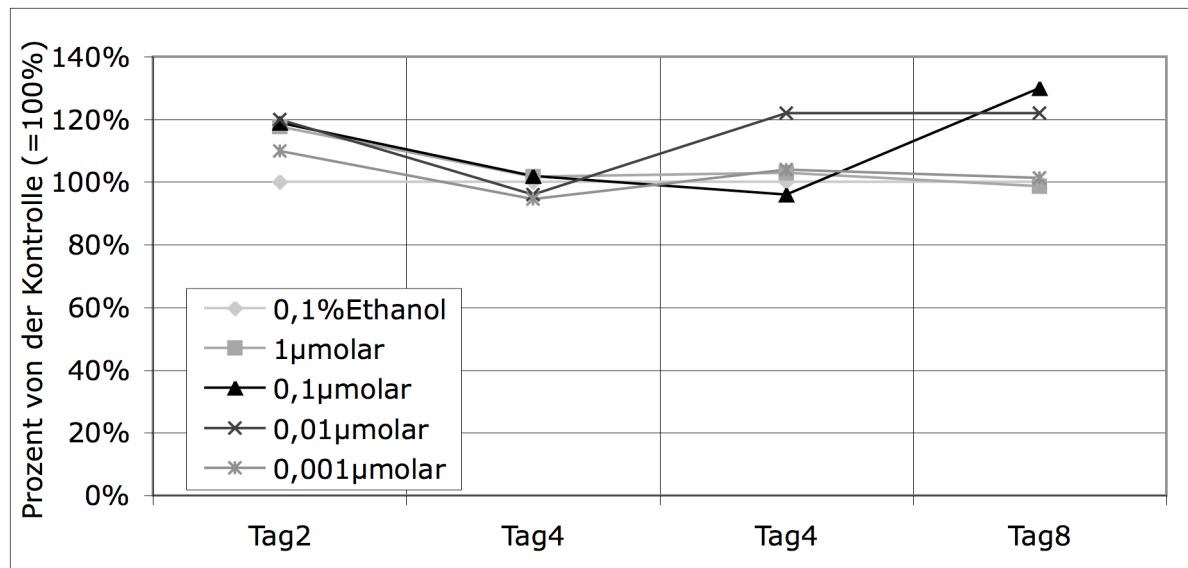


Abbildung 3-2: Zeitabhängigkeit über acht Tage von MDA- MB435 mit LY117018 in verschiedenen Konzentrationen (in  $\mu\text{mol}$ ). Die Kontrolle gilt an allen Tagen als 100%, davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Man sieht im Vergleich mit der Kontrolle keine Extinktionsverringerng bei den behandelten Zellen in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und ihre Standardabweichungen.

### 3.1.2 Zeitabhängigkeit von Celecoxib

Die Zellen sind nach der in Kapitel 2.8.4 beschriebenen Methode behandelt worden.

Man sieht bei der Zelllinie MCF- 7 eine deutliche Abnahme der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit. Dieser Effekt ist in der Konzentration 50  $\mu\text{molar}$  Celecoxib eindeutig vorhanden und fällt am vierten Tag mit einem p-Wert von 0,0024 statistisch signifikant aus.

Es ist keine effektive Zunahme der Extinktion vom zweiten Tag bis zum achten Tag vorhanden. Die stärkste Extinktionsabnahme ist bei den behandelten Zellen vom zweiten bis zum vierten Tag zu sehen, worauf danach am sechsten und achten Tag die Abnahme schwächer ausgeprägt ist (bei MCF- 7: 72% weniger Extinktion gegenüber der Kontrolle am vierten Tag, und 74,025% weniger am achten Tag).

Man sieht eindeutig, dass die Extinktion in der Kontrolle stetig steigt und bis zum achten Tag zunimmt. Ein gleiches gilt auch für die Konzentrationen 10, 1, 0,1  $\mu\text{molar}$ , wo-

hingegen die Extinktion von mit 50µmolar Celecoxib behandelten Zellen schon am zweiten Tag zurückbleibt, ein Effekt, der bis zum achten Tag noch deutlicher wird.

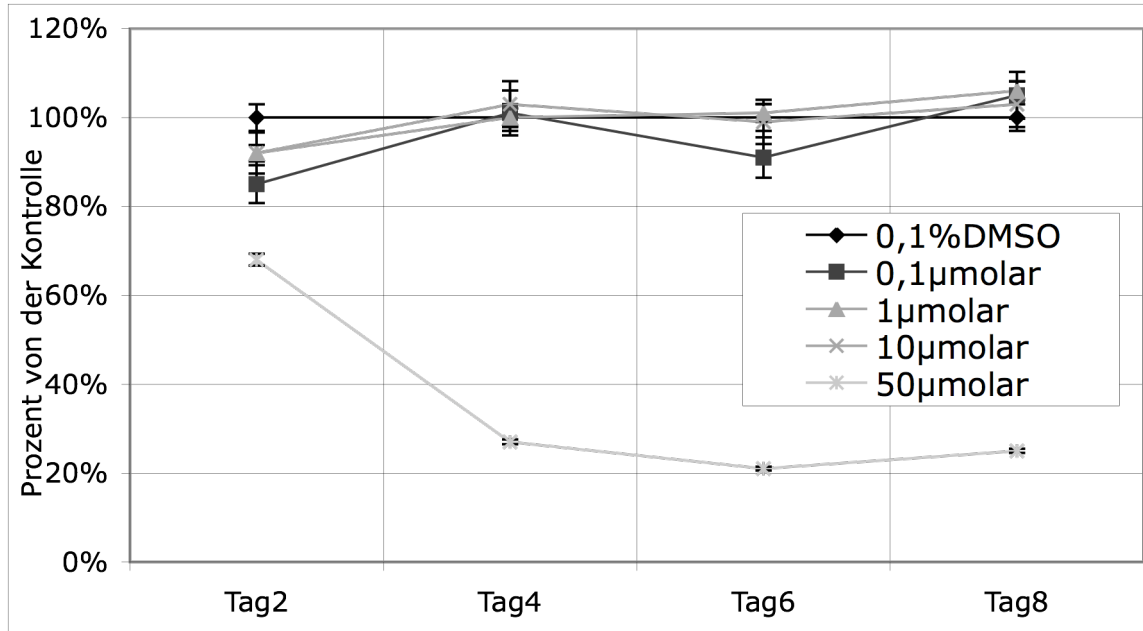


Abbildung 3-3: Zeitabhängigkeit über acht Tage von MCF- 7 mit Celecoxib in verschiedenen Konzentrationen (selbige in µmol). Die Kontrolle gilt an allen Tagen als 100%, davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Man sieht im Vergleich zu der Kontrolle eine deutliche Extinktionsverringernng bei den mit 50µmolar Celecoxib behandelten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten und ihre Standardabweichungen.

Bei MDA- MD435 zeigt sich ein ähnliches Ergebnis wie bei MCF- 7. Man sieht gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verringerung der Extinktion in der Konzentration von 50µmolar Celecoxib bei den über acht Tage behandelten Zellen. In Prozenten ausgedrückt bedeutet dies: 53,74% weniger Wachstum am vierten Tag gegenüber der Kontrolle und 68,23% geringeres Wachstum am achten Tag. Der größte hemmende Effekt findet in den ersten zwei Tagen statt und ist am vierten Tag mit einem p- Wert von 0,0024 signifikant geringer gegenüber der Kontrolle mit 0,1% DMSO.

Die anderen Konzentrationen (10, 1, 0,1 µmolar Celecoxib) zeigen keinen deutlich sichtbaren Hemmungseffekt gegenüber der Kontrolle.



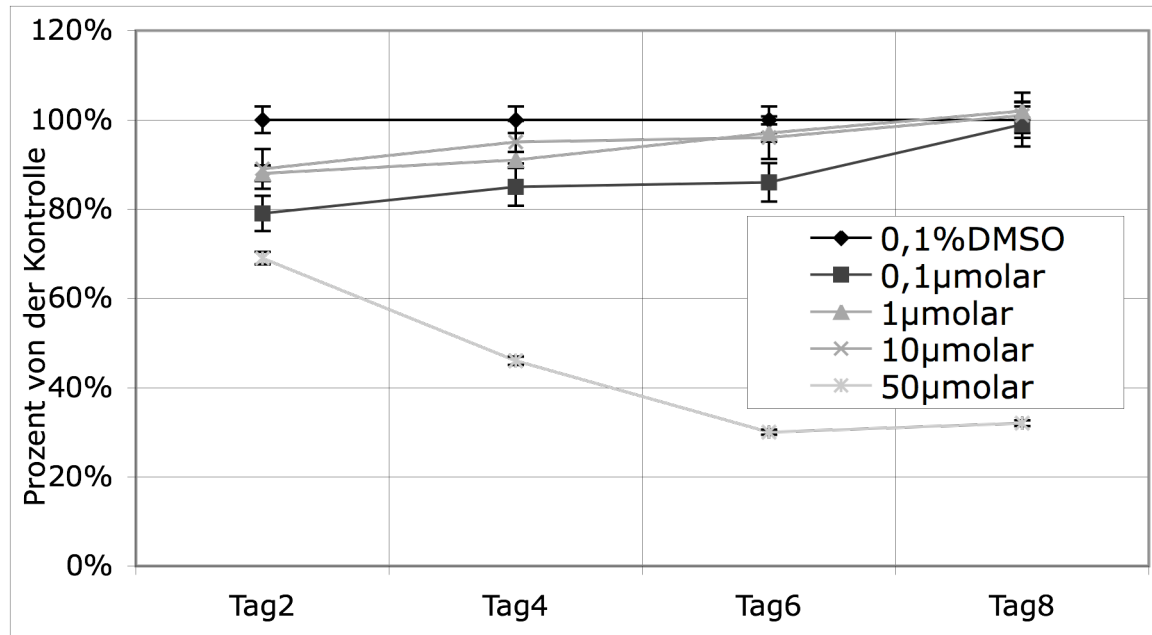


Abbildung 3-4: Zeitabhängigkeit über acht Tage von MDA- MB435 mit Celecoxib in verschiedenen Konzentrationen (in  $\mu\text{molar}$ ). Die Kontrolle gilt an allen Tagen als 100%, davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Man sieht eine deutliche Extinktionsverringern bei den mit  $50\mu\text{molar}$  Celecoxib behandelten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit im Vergleich zu der Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten und ihre Standardabweichungen.

### 3.1.3 Konzentrationsabhängigkeit von Ly117018

Aufgrund der Vorversuche wurden die Zellen vier Tage inkubiert und nach der Methode, die im Kapitel 2.8.5 beschrieben ist, behandelt.

Da MDA- MB435- Zellen im Vorversuch nicht auf LY117018 ansprachen, wurde die Konzentrationsabhängigkeit nur an MCF- 7- Zellen getestet.

Es ist eine deutliche Wachstumshemmung der behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle vorhanden. So ist die Extinktion der Zellen, die vier Tage mit einer Ly117018-Konzentration von  $0,001\ \mu\text{molar}$  inkubiert wurden, gegenüber der Kontrolle um 21% geringer. Dieser Trend setzt sich auch unter höheren Konzentrationen fort. In der  $0,3\mu\text{molar}$ - Konzentration kommt es zu einem kleinen Sprung, so dass die Absorption nur noch 67% von der Kontrolle ausmacht. Danach lässt die Extinktion nur noch um 3% zwischen  $1\mu\text{molar}$  Ly117018 und  $0,3\mu\text{molar}$  nach (im Einzelnen siehe Abbildung 3- 5 und 3- 6).

Der IC50 für Ly117018 mit MCF- 7 Zellen wurde bei dieser Untersuchung experimentell nicht erreicht und liegt damit über 1µmolar, der IC30 befindet sich bei 0,235µmolar.

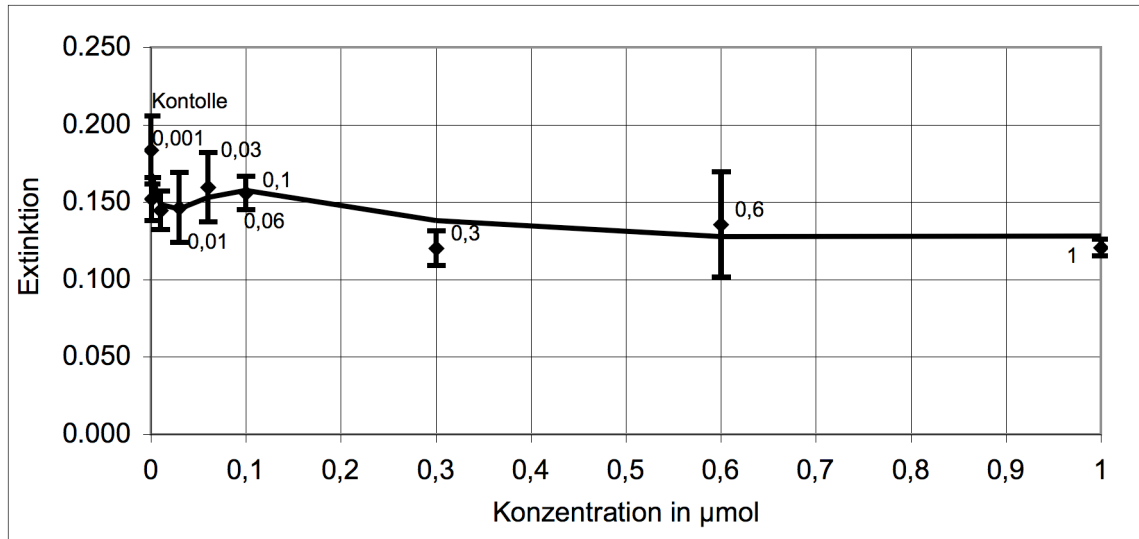


Abbildung 3-5: Konzentrationsabhängigkeit von MCF- 7 mit Ly117018 in aufsteigender Konzentration (in µmolar). Die Grafik zeigt die gemessenen Extinktionswerte aufgetragen gegen die Konzentration. 0 = Kontrolle mit Ethanol 0,1% (ohne Wirkstoff). Man sieht eine deutliche Extinktionsverringern mit steigender Konzentration. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Kurve veranschaulicht errechnete Tendenzen und ihre Standardabweichung.

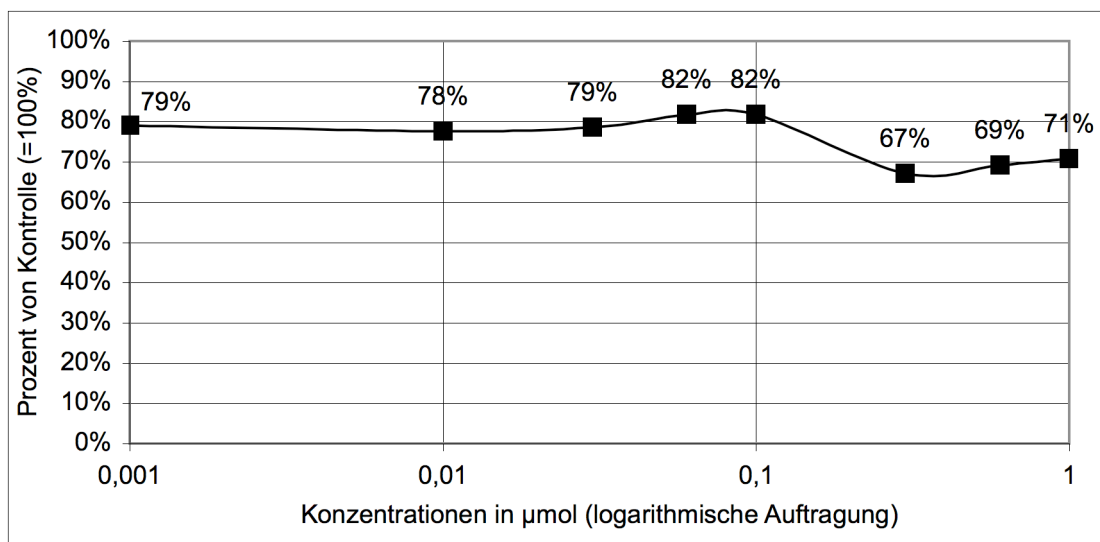


Abbildung 3-6: Konzentrationsabhängigkeit von MCF- 7 und Ly117018: Man sieht das prozentuale Wachstum der Zellen in verschiedenen Konzentrationen relativ zu der Kontrolle. Die Kontrolle entspricht somit 100%. Davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung bzw. -steigerung berechnet. Man sieht verglichen mit der Kontrolle eine prozentuale Extinktionsverringern bei den behandelten Zellen in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 15%.

### 3.1.4 Konzentrationsabhängigkeit von Celecoxib

Aufgrund der Vorversuche wurden beide Zelllinien vier Tage lang mit Celecoxib nach der im Kapitel 2.8.5 beschriebenen Methode behandelt.

Man sieht eine deutliche Wachstumshemmung bei beiden Zelllinien, die mit steigenden Konzentrationen stärker wird.

So ist bei MCF- 7, behandelt mit 50 $\mu$ molar Celecoxib, das Wachstum um 85% schwächer im Vergleich zu der aus DMSO 0,1% bestehenden Kontrolle. Auch bei einer Konzentration von 25 $\mu$ molar beträgt die Hemmung noch 54%. Bei 10 bis 3 $\mu$ molar Celecoxib befindet sich eine Art Plateau mit einer 20% bis 14% geringeren Absorption gegenüber der Kontrolle. In den niedrigeren Verdünnungen (1- 0,1 $\mu$ molar) ist keine relevante Extinktionsverringerng von behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle festzustellen (Abb.: 3-7 und 3-8).

Der IC50 liegt bei 27,7 $\mu$ molar, der IC30 bei 15,5 $\mu$ molar Celecoxib.

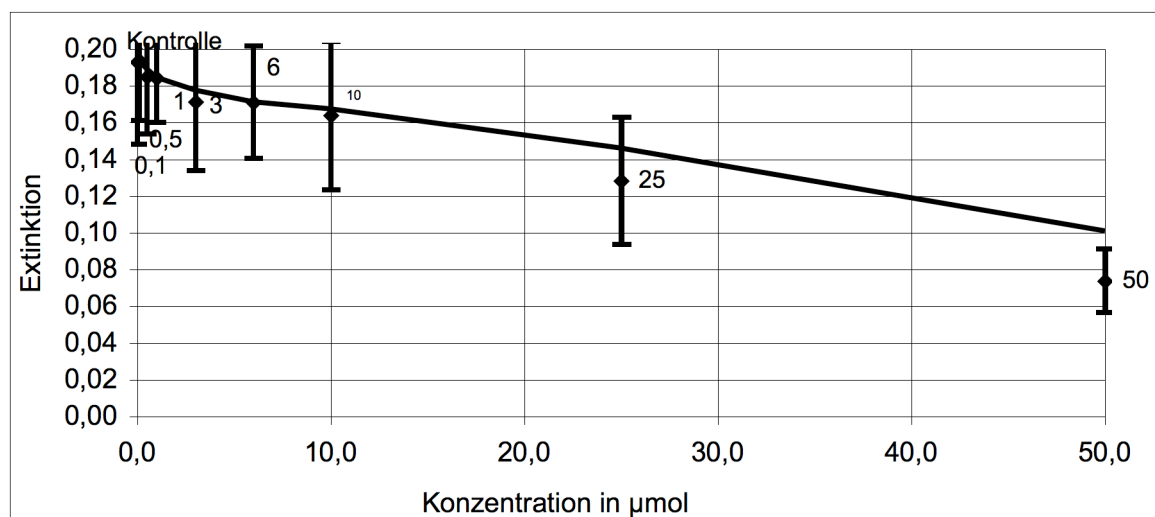


Abbildung 3-7: Konzentrationsabhängigkeit von MCF- 7 mit Celecoxib in aufsteigender Konzentration (in  $\mu$ molar). Die Grafik zeigt gemessene Extinktionswerte aufgetragen gegen die Konzentration. 0 = Kontrolle mit DMSO 0,1% (ohne Wirkstoff). Man sieht mit steigender Konzentration eine deutliche Extinktionsverringerng. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Kurve veranschaulicht errechnete Tendenzen und ihre Standardabweichungen.

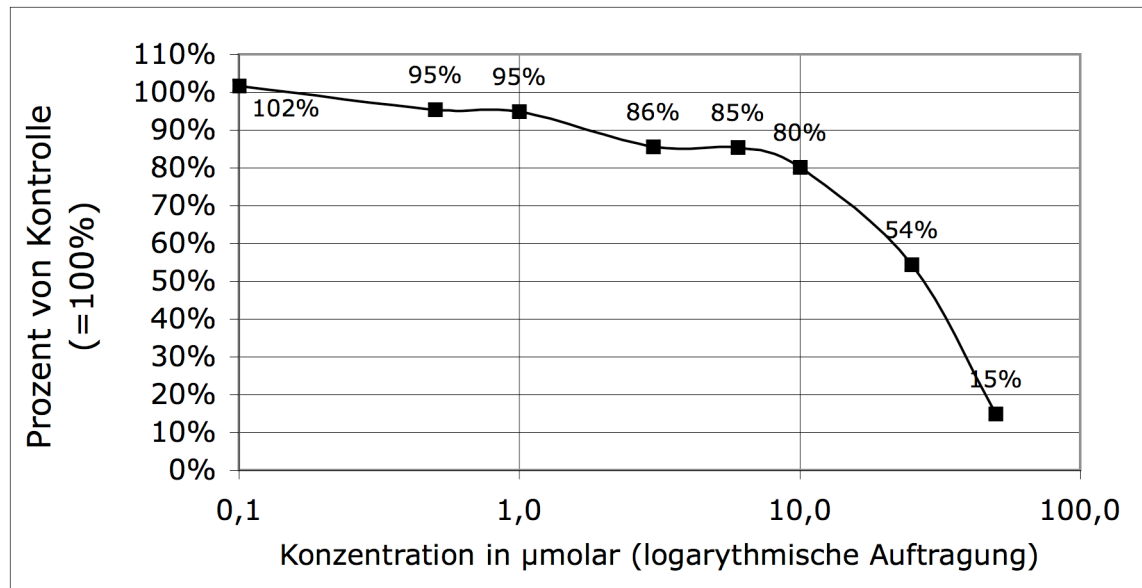


Abbildung 3-8: Konzentrationsabhängigkeit von MCF- 7 mit Celecoxib: Man sieht das prozentuale Wachstum der Zellen in verschiedenen Konzentrationen relativ zur Kontrolle. Die Kontrolle entspricht somit 100%. Davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Man sieht verglichen mit der Kontrolle eine prozentuale Extinktionsverringerng bei den behandelten Zellen in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Standartabweichungen kleiner 20%.

Bei den MDA- MB435- Zellen ergibt sich ein ähnlichen Bild: Bei den mit höchster Celecoxib- Konzentration (50 $\mu\text{molar}$ ) behandelten Zellen sinkt die Absorption relativ auf 33% zur Kontrolle ab. Bei 25 $\mu\text{molar}$  ist noch eine Hemmung von 25% zu beobachten. In den niedrigeren Konzentrationen ist eher eine Induktion zu sehen: So liegt die prozentuale Extinktion von 10 bis 3 $\mu\text{molar}$  Celecoxib zwischen den Werten von 108% bis 109%. Zwischen 1 und 0,1 $\mu\text{molar}$  ist kein nennenswerter Effekt zu beobachten (Abb.: 3- 10 und 3- 11).

Der IC50 liegt bei 42  $\mu\text{molar}$  und der IC30 bei 32,7 $\mu\text{molar}$  Celecoxib.

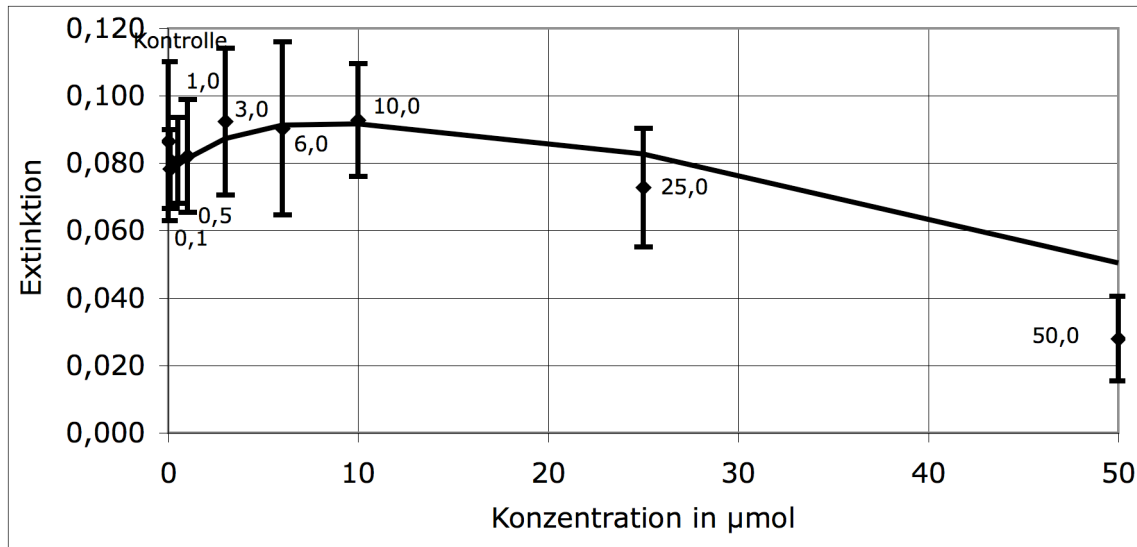


Abbildung 3-9 Konzentrationsabhängigkeit von MDA- MB435 mit Celecoxib in aufsteigender Konzentration (in  $\mu\text{molar}$ ). Die Grafik zeigt die gemessenen Extinktionswerte aufgetragen gegen die Konzentration. 0 = Kontrolle mit DMSO 0,1% (ohne Wirkstoff). Man sieht eine deutliche Extinktionsverringern mit steigender Konzentration. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Kurve veranschaulicht die errechneten Tendenzen und ihre Standardabweichungen.

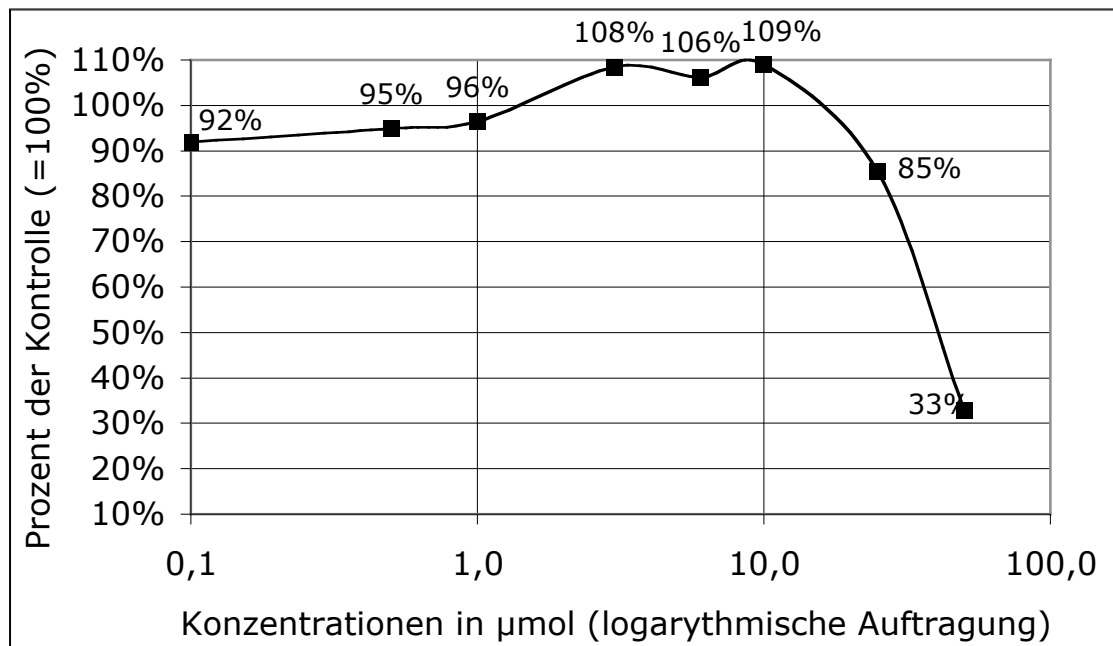


Abbildung 3-10: Konzentrationsabhängigkeit von MDA- MB435 mit Celecoxib: Man sieht das prozentuale Wachstum der Zellen in verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Kontrolle. Die Kontrolle entspricht somit 100%. Davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Man sieht verglichen mit der Kontrolle eine prozentuale Extinktionsverringern bei den behandelten Zellen in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 30%.

### 3.1.5 Zusammenfassung der IC- Werte

Tabelle 3-1 zeigt eine Zusammenfassung der IC 50- und IC30- Werte aller Konzentrationsabhängigkeitsversuche. Man sieht, dass der IC50 bei allen Celecoxib- Versuchen erreicht wurde, was die hohe Wirksamkeit des Medikamentes verdeutlicht. Auch bei Ly117018 reichte es zum IC30, so dass man hier ebenfalls von einer starken Wirkung sprechen kann.

Zelllinie	Medikament	IC30	IC50
MCF7	Ly117018	0,235µmolar	>1µmolar (extrapoliert)
MCF7	Celecoxib	15,5µmolar	27,7µmolar
MDA- MB435	Celecoxib	32,7µmolar	42µmolar

### 3.1.6 Kombinationen aus Ly117018 und Celecoxib

Es wurde versucht, antiproliferative Synergismen mit folgenden Experimenten zu klären: Die Zellen wurden vier Tage mit jeweils drei verschiedenen Basiskonzentrationen Celecoxib oder Ly117018 und dem entsprechenden anderen Medikament als Verdünnungsreihe aus den Vorversuchen (Konzentrationsabhängigkeiten 3.2.) behandelt. Eine genauere Methodenbeschreibung ist unter 2.8.6. zu finden.

Tabelle 3-2: Eine Kurzzusammenfassung des Pipettierschemas von den Kombinationsversuchen. Jedes Kästchen entspricht einer pipettierten Konzentration. Im ersten Well ist die Kontrolle (Lösungsmittel), im zweiten jeweils die Basis alleine, im dritten eine Kombination aus Basis und Verdünnungsreihe zu sehen. Cele = Celecoxib, Ly = Ly117018, Basis = Basismedikament

MDA- MB435	DMSO 0,1%+	Ly-Basis in	Ly- Basis + Cele in... $\mu$ molar							
	Ethanol 0,1%	0,3, 0,6 oder 1 $\mu$ molar	0,1	0,5	1	3	6	10	25	50
MDA- MB435	DMSO 0,1%+	Cele- Basis in	Cele- Basis + Ly in... $\mu$ molar							
	Ethanol 0,1%	30, 40 oder 50 $\mu$ molar	0,001	0,01	0,03	0,06	0,3	0,6	0,1	1
MCF- 7	DMSO 0,1%+	Ly-Basis in	Ly- Basis + Cele in... $\mu$ molar							
	Ethanol 0,1%	0,3, 0,6 oder 1 $\mu$ molar	0,1	0,5	1	3	6	10	25	50
MCF- 7	DMSO 0,1%+	Cele- Basis in	Cele- Basis + Ly in... $\mu$ molar							
	Ethanol 0,1%	10, 20 oder 30 $\mu$ molar	0,001	0,01	0,03	0,06	0,3	0,6	0,1	1

Bei den MCF- 7- Zellen mit Celecoxib als Basis imponiert in erster Linie die Wirkung von Celecoxib. Die Extinktionen bei steigenden Konzentrationen kommen parallel untereinander zu liegen. Lediglich in der Kontrollverdünnungsreihe, in der ja nur Ly117018 (ohne Basismedikament) inkubiert wurde, ist eine Ly117018- Wirkung eindeutig feststellbar. Bei den Zellen mit einer Kombination aus Celecoxib und Ly117018 dominiert Celecoxib.

In den Versuchen mit dem Basismedikament Celecoxib und dem Verdünnungsmedikament Ly117018 sieht man jedoch leichte Ly117018- Effekte, so dass man in jedem Fall eine gegenseitige Hemmung ausschließen kann.

Bei genauerer Analyse fallen in einigen Kombinationen klare synergistische Effekte auf. So ist eine relative Wachstumsminderung um 22% bei Ly117018 0,003 $\mu$ molar mit Basis- Celecoxib 10 $\mu$ mol gegenüber Celecoxib 10 $\mu$ molar (als Basiskontrolle), 31% weniger Extinktion gegenüber der Kontrolle mit nur Ly117018 0,03 $\mu$ molar (als Verdünnungsreihenkontrolle) und 35% Verringerung gegenüber DMSO 0,1%+ Ethanol 0,1% zu konstatieren (Lösungsmittelkontrolle).

Von diesen herausragenden Konzentrationskombinationen gibt es mehrere, wie z.B. 0,1 $\mu$ molar Ly117018 und 10 $\mu$ molar Celecoxib, oder Ly117018 0,1 mit Celecoxib 30 $\mu$ molar (siehe Abb.: 3- 12).

Es sind also Konzentrationen vorhanden, in denen sich die beiden Medikamente besonders gut ergänzen und damit Erfolg versprechender sind als andere Kombinationen oder als die jeweiligen Einzelmedikamente. Diese Folgerung führt zu bestimmten Verdünnungskombinationen, die für die nachfolgenden Versuche (Flowcytometrie und Western- Blot, 3.2 und 3.3) benutzt und statistisch ausgewertet wurden.

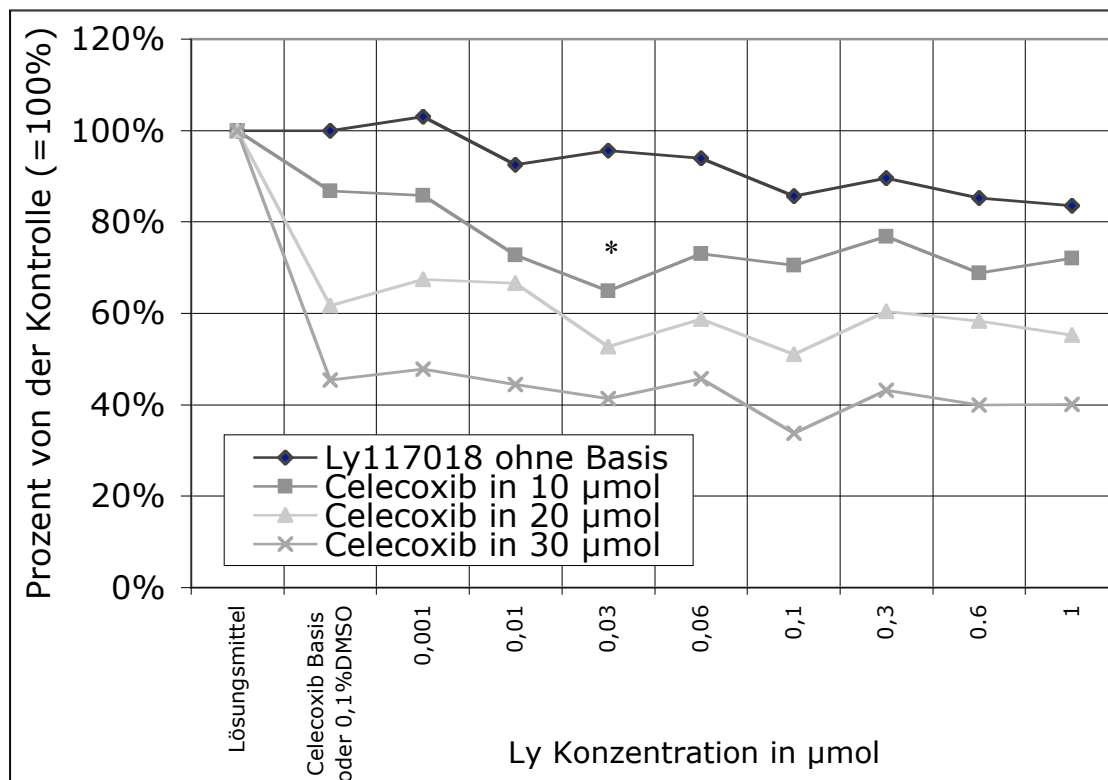


Abbildung 3-11: MCF- 7 mit Celecoxib als Basis und LY117018 als Verdünnungsreihe. Man sieht das prozentuale Wachstum der Zellen in verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Kontrolle. Die Kontrolle entspricht somit 100%. Davon ausge-



hend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Alle Konzentrationen sind in  $\mu\text{mol}$  dargestellt. Die Ly117018 ohne Basis stellt die alleinige Ly117018- Inkubation als Verdünnungsreihenkontrolle dar, die anderen sind jeweils eine Kombination mit drei verschiedenen Celecoxib- Basen plus Ly117018- Verdünnungskonzentration (horizontale Achse). Die Zellen wurden vor jeder Kombination jeweils mit dem Medikamentenlösungsmittel (Ethanol 0,1% + DMSO 0,1%; erster x-Wert) und mit der Basis alleine behandelt (Celecoxib 10, 20 oder 30  $\mu\text{molar}$ ; zweiter x-Wert). Man sieht eine deutliche Celecoxib- Beeinflussung und eine unauffälligere Ly117018- Wirkung. Mit Stern (\*) sind die besonders viel versprechenden Kombinationen markiert. Diese werden in den nachfolgenden Versuchen weiterverwendet und statistisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 10%.

Mit Ly117018 als Basis und Celecoxib als Verdünnungsreihe sieht man bei behandelten MCF- 7 in erster Linie eine Senkung der Extinktion mit steigender Celecoxib- Konzentration, so dass die Ly117018- Komponente nicht sehr deutlich wird.

Die Extinktionen, bei denen mit Ly117018 in einer Basis von 1  $\mu\text{molar}$  inkubiert wurde, verlaufen sehr ähnlich wie die Celecoxib- Verdünnungsreihenkontrolle, fallen jedoch bei höheren Celecoxib- Konzentrationen stärker ab.

Die geringsten Werte zeigen die Kombinationsversuche mit Ly117018 in einer Basis von 0,1  $\mu\text{molar}$ . Diese verlaufen durchgehend tiefer als die Celecoxib- Verdünnungskontrolle, und in den höheren Celecoxib- Konzentrationen sind sie geringer als die Basis-Kontrolle (Ly117018 0,3  $\mu\text{molar}$  ohne Celecoxib) und die Kontrolle des Lösungsmittels (DMSO 0,1% + Ethanol 0,1%).

Im Einzelnen bedeutet das bei Ly117018 0,3 mit Celecoxib 10  $\mu\text{molar}$  eine Extinktionsverringerung von 16% gegenüber der Kontrolle mit 0,1%DMSO+ 0,1%Ethanol, gegenüber der Kontrolle mit 10  $\mu\text{molar}$  Celecoxib eine relative Verringerung von 16% und gegenüber einer reinen Ly117018- Konzentration von 0,3  $\mu\text{molar}$  eine Abnahme um 14%. Die Kombination Ly117018 0,3+ Celecoxib 10  $\mu\text{molar}$  erweist sich also in jeder Hinsicht als den Einzelsubstanzen überlegen und weiterhin auch als wirksamer als die Lösungsmittelkontrolle (Abb.: 3- 13).

In Ly117018- Basisverdünnungen mit 0,6  $\mu\text{mol}$  sieht man keine bedeutsamen Unterschiede zur Celecoxib- Verdünnungskontrolle (ähnlich der Basis mit 1  $\mu\text{molar}$ ). Jedoch wird die in der Celecoxib- Kontrolle auftretende Extinktionssteigerung bei geringen Celecoxib- Konzentrationen, dieser Effekt wurde auch schon bei den MDA- MB435 Zel-

len in den Celecoxib- Konzentrationsabhängigkeit beschrieben, in bestimmten Kombinationen (z.B 0,1µmolar Celecoxib + 0,6µmolar Ly117018) unterdrückt.

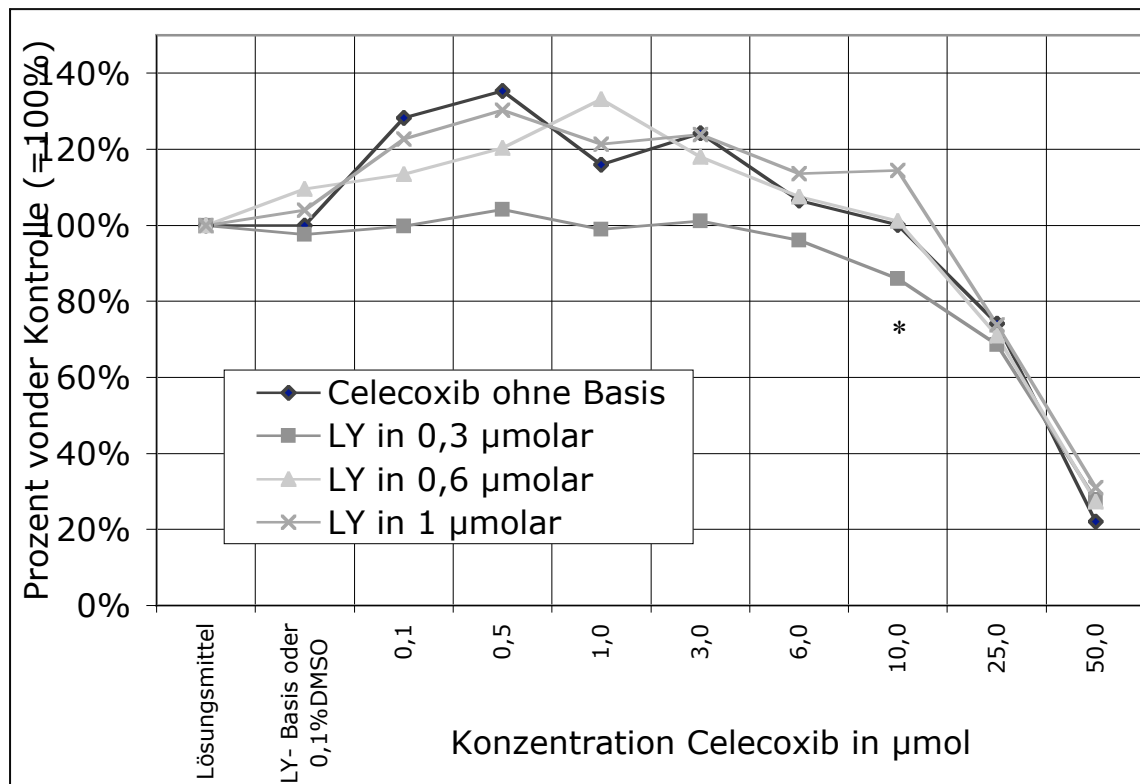


Abbildung 3-12: MCF- 7 mit Ly117018 als Basis und Celecoxib als Verdünnungsreihe. Man sieht das prozentuale Wachstum der Zellen in verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Kontrolle. Die Kontrolle entspricht somit 100%. Davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Alle Konzentrationen sind in µmol dargestellt. Die Celecoxib ohne Basis stellt die alleinige Celecoxib- Inkubation als Verdünnungsreihenkontrolle dar, die anderen bestehen jeweils aus einer Kombination mit drei verschiedenen Ly117018- Basen plus Celecoxib- Verdünnungskonzentration (horizontale Achse). Die Zellen wurden vor jeder Kombination jeweils mit dem Medikamentenlösungsmittel (Ethanol 0,1% + DMSO 0,1%; erster x- Wert) und mit der Basis alleine behandelt (Ly117018 10, 20 oder 30µmolar; zweiter x- Wert). Man sieht eine deutliche Celecoxib- Beeinflussung und eine unauffälligere Ly117018- Wirkung. Mit Stern (\*) sind die besonders viel versprechenden Kombinationen markiert, diese werden in nachfolgenden Versuchen weiterverwendet und statistisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 10%.

Insgesamt bleibt nach diesen Experimenten mit MCF- 7 festzuhalten, dass nur bestimmte Kombinationen zu einer deutlich stärkeren Extinktionsverringering gegenüber den Einzelsubstanzen führen, und somit ein Kombinationseffekt nahe liegt (Synergismus). Die anderen Kombinationen verhalten sich nicht, oder nur sehr gering synergistisch.

Für die Folgeversuche wurden aufgrund der Erkenntnislage durch die Experimente folgende Kombinationen für die Zelllinie MCF- 7 ausgesucht:

1. Celecoxib 10 $\mu$ molar+ Ly117018 0,03 $\mu$ molar
2. Celecoxib 10 $\mu$ molar+ Ly117018 0,3 $\mu$ molar.

Statistisch aufgearbeitet mit dem Two- Sample T- Test ergibt sich für diese beiden Punkte:

- Celecoxib 10 $\mu$ molar+ Ly117018 0,03 $\mu$ molar vs. Celecoxib 10 $\mu$ molar:
  - T- Test of difference = 0 (vs not =): P- Value = 0,077
- Celecoxib 10 $\mu$ molar+ Ly117018 0,03 $\mu$ molar vs. Ly117018 0,03 $\mu$ molar:
  - T- Test of difference = 0 (vs not =): P- Value = 0,017
- Celecoxib 10 $\mu$ molar+ Ly117018 0,3 $\mu$ molar vs. Celecoxib 10 $\mu$ molar:
  - T- Test of difference = 0 (vs not =): P- Value = 0,103
- Celecoxib 10 $\mu$ molar+ Ly117018 0,3 $\mu$ molar vs. Ly117018 0,3 $\mu$ molar:
  - T- Test of difference = 0 (vs not =): P- Value = 0,372

In dem Proliferationsassay mit MDA- MB435- Zellen, Celecoxib in der Basis und Ly117018 als Verdünnungsreihe (Abb.: 3-13) sieht man in erster Linie die Celecoxib-Wirkung, was ein ähnliches Bild ergibt wie bei dem Versuch von MCF- 7- Zellen mit Celecoxib als Basis. Es entstehen auf der Extinktionsachse vier parallel untereinander liegende Reihen, die jeweils die ansteigende Celecoxib- Konzentration beschreiben. Die Ly117018- Beeinflussung ist gering.

Celecoxib 30 $\mu$ molar zeigt durchschnittlich eine Wachstumshemmung von ungefähr 40%, Celecoxib 40 $\mu$ molar liegt bei 53% und Celecoxib 50 $\mu$ molar bei 78%. Es ist jedoch auffällig, dass bei allen Kombinationsreihen eine leichte Extinktionsverringernung eintritt, sobald Ly117018 hinzugefügt wird, wobei keine weitere Extinktionsminderung bei steigender Ly117018- Konzentration in Kombination mit Celecoxib- Basisverdünnungen beobachtet werden kann.

Es ist weiterhin auffällig, dass gerade die geringen Ly117018- Konzentrationen (hierbei insbesondere 0,001 $\mu$ molar) zu einer deutlichen Wachstumshemmung führen, vor allem

wenn man sich vergegenwärtigt, dass Ly117018 in den Vorversuchen keine Wirkung auf die Zelllinie hatte, und auch die Verdünnungsreihenkontrolle (bei der ja nur mit Ly117018 inkubiert wurde) keine Wirkung in diesem Versuch zeigt.

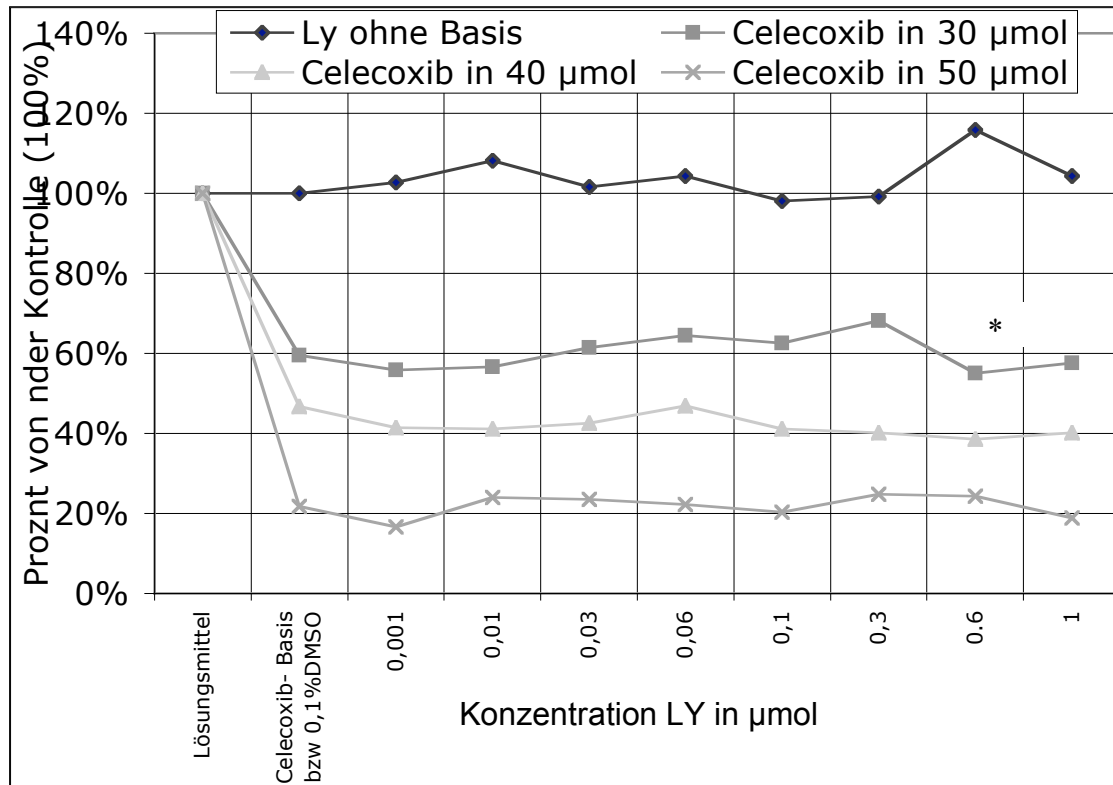


Abbildung 3-13: MDA- MB435 mit Celecoxib als Basis und LY117018 als Verdünnungsreihe. Man sieht das prozentuale Wachstum der Zellen in verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Kontrolle. Die Kontrolle entspricht somit 100%. Davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Alle Konzentrationen sind in µmol dargestellt. Die Ly117018 ohne Basis stellt die alleinige Ly117018- Inkubation als Verdünnungsreihenkontrolle dar, die anderen sind jeweils eine Kombination mit drei verschiedenen Celecoxib- Basen plus Ly117018- Verdünnungskonzentration (horizontale Achse). Die Zellen wurden vor jeder Kombination jeweils mit dem Medikamentenlösungsmittel (Ethanol 0,1% + DMSO 0,1%; erster x-Wert) und mit der Basis alleine behandelt (Celecoxib 30, 40 oder 50µmolar; zweiter x-Wert). Man sieht eine deutliche Celecoxib- Beeinflussung, so dass die interpolierten Linien parallel untereinander zu liegen kommen. Ly117018 zeigt nur eine dezente aber sichtbare Zusatzwirkung. Mit Stern (\*) sind die besonders viel versprechenden Kombinationen markiert, diese werden in nachfolgenden Versuchen weiterverwendet und statistisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 10%.

Bei den umgekehrten Versuchen mit Ly117018 als Basis an der Zelllinie MDA- MB435 ergibt sich ein etwas anderes Ergebnis als bei der Celecoxib- Basis.

Am stärksten imponiert auch bei diesem Versuch die Absorptionsverringering durch steigende Celecoxib- Konzentration, jedoch werden die proliferativen Eigenschaften, die bei Celecoxib in niedrigeren Konzentrationen (Verdünnungsreihenkontrolle) auch schon in den Konzentrationsabhängigkeiten (3.1.5) sichtbar auftraten, von der Ly117018- Basis unterdrückt. Es ist jedoch bei diesem Effekt kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Ly117018- Basiskonzentrationen auszumachen, da sie alle sehr dicht aneinander liegen (Abb.: 3- 14).

Es bleibt aber festzuhalten, dass bei allen zusätzlich mit Ly117018 behandelten Zellen die Extinktion niedriger ausfällt als bei den nur mit Celecoxib behandelten (Verdünnungsreihenkontrolle). So ist die Extinktion bei 0,6 $\mu$ molar Ly117018 und Celecoxib 10 $\mu$ molar um 5% geringer als bei Celecoxib 10 $\mu$ molar alleine, so wie um 45% geringer gegenüber Ly117018 0,3 $\mu$ molar und der Kontrolle mit 0,1%DMSO+ 0,1%Ethanol. Es ist also bei der Kombination von Ly117018 und Celecoxib im Vergleich zu den Einzelsubstanzen eine stärkere Wirkung zu erkennen. Dabei scheint es der Fall zu sein, dass dieser Effekt nicht auf eine bestimmte Ly117018- Konzentration zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf das bloße Vorhandensein von Ly117018, da in anderen Konzentrationskombinationen ähnliche Effekte mit ähnlicher Stärke auftreten.

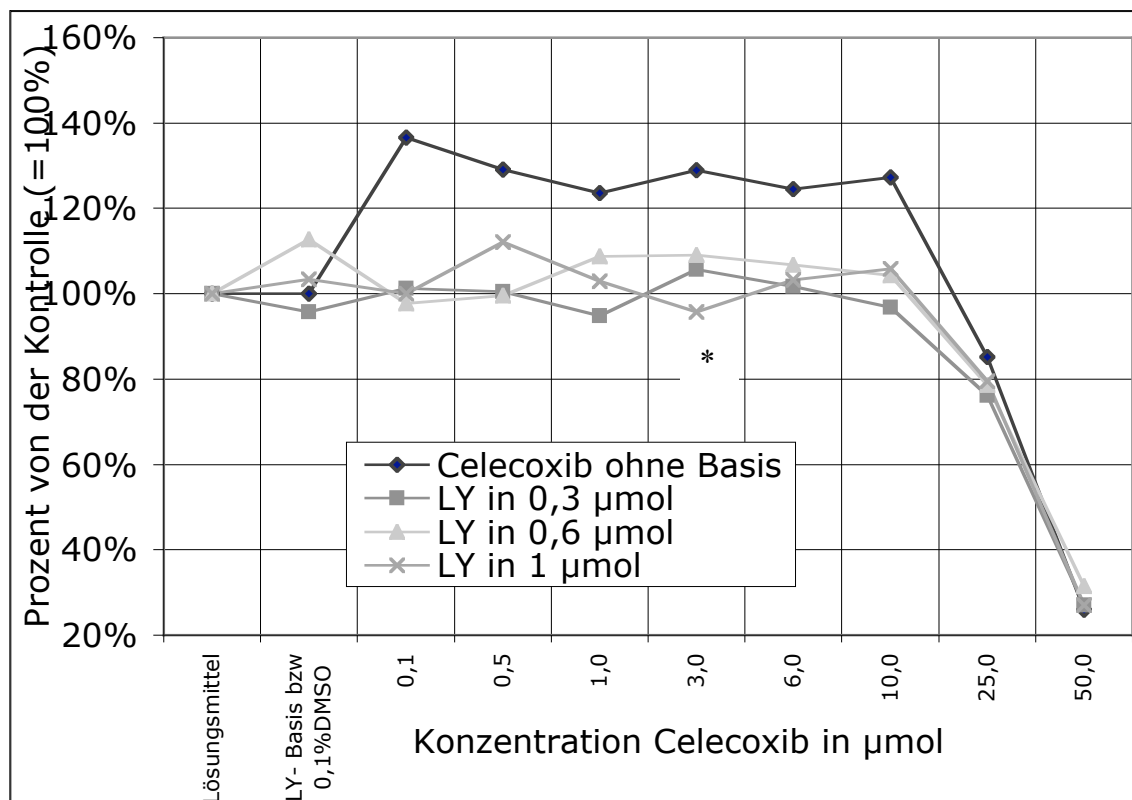


Abbildung 3-14: MDA- MB435 mit LY117018 als Basis und Celecoxib als Verdünnungsreihe. Man sieht das prozentuale Wachstum der Zellen in verschiedenen Konzent-

rationen in Abhängigkeit von der Kontrolle. Die Kontrolle entspricht somit 100%. Davon ausgehend wird die prozentuale Extinktionsminderung, bzw. -steigerung berechnet. Alle Konzentrationen sind in  $\mu\text{mol}$  dargestellt. Die Ly117018 ohne Basis stellt die alleinige Ly117018- Inkubation als Verdünnungsreihenkontrolle dar, die anderen sind jeweils eine Kombination mit drei verschiedenen Celecoxib- Basen plus Ly117018- Verdünnungskonzentration (horizontale Achse). Die Zellen wurden vor jeder Kombination jeweils mit dem Medikamentenlösungsmittel (Ethanol 0,1% + DMSO 0,1%; erster x-Wert) und mit der Basis alleine behandelt (Ly117018- Basis 0,3, 0,6, 1  $\mu\text{molar}$ ; zweiter x-Wert). Man sieht eine deutliche Celecoxib- Beeinflussung, so dass die die Graphen fast auf einer Ebene verlaufen und mit steigender Celecoxib- Konzentration abfallen. Die Ly117018- Wirkung wird nur dezent deutlich, wobei alle drei die Celecoxib- Induktion unterdrücken und auch einzelne synergistische Effekte zeigen- siehe hierzu die mit Stern (\*) markierten Punkte, die statistisch ausgewertet und für nachfolgende Experimente weiterverwendet wurden. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 10%.

Aus den MDA- MB435- Experimenten sind

1. Celecoxib 3  $\mu\text{molar}$  + Ly117018 1  $\mu\text{molar}$
2. Celecoxib 30  $\mu\text{molar}$  + Ly117018 0,6  $\mu\text{molar}$

die Erfolg versprechendsten Konzentrationen, die dann auch in den folgenden Versuchen weiter verwendet werden.

Die statistische Auswertung der beiden Konzentrations- Kombinationen von MDA- MB435 mit Hilfe des Two- Sample T-Test ergibt:

- Celecoxib 3  $\mu\text{molar}$ + Ly117018 1  $\mu\text{molar}$  vs. Celecoxib 3  $\mu\text{molar}$ :
  - T- Test of difference = 0 (vs not =): P- Value = 0,32
- Celecoxib 3  $\mu\text{molar}$ + Ly117018 1  $\mu\text{molar}$  vs. Ly117018 1  $\mu\text{molar}$ :
  - T- Test of difference = 0 (vs not =): P- Value = 0,0027
- Celecoxib 30  $\mu\text{molar}$ + Ly117018 0,6  $\mu\text{molar}$  vs. Celecoxib 30  $\mu\text{molar}$ :
  - T- Test of difference = 0 (vs not =): P- Value = 0,539
- Celecoxib 30  $\mu\text{molar}$ + Ly117018 0,6  $\mu\text{molar}$  vs. Ly117018 0,6  $\mu\text{molar}$ :
  - T- Test of difference = 0 (vs not =): P- Value = 0,247

Über die statistischen Werte hinaus wurde der Inderaktionsindex berechnet, siehe Einleitung:

Tabelle 3-3: Interaktionsindizes. Die Tabelle zeigt für die statistisch ausgewerteten Punkte die Interaktionsindizes ( $y=a/A+b/B$ ;  $y=1$  additiv,  $>1$  sub-additiv,  $<1$  synergistisch).

Zelllinie	Kombination	Interaktionsindex(y)
MCF- 7	Celecoxib 10 $\mu$ molar+Ly117018 0,03 $\mu$ molar	$y < 1$ (0,039)
MCF- 7	Celecoxib 10 $\mu$ molar + Ly117018 0,3 $\mu$ molar	$y > 1$ (303,3)
MDA- MB435	Celecoxib 3 $\mu$ molar + Ly117018 1 $\mu$ molar	$y > 1$ (3)
MDA- MB435	Celecoxib 30 $\mu$ molar+Ly117018 0,6 $\mu$ molar	$y < 1$ (0,7576)

## 3.2 Flowcytometry, Zellzyklusanalyse

Zuerst wurden die Einzelsubstanzen Ly117018 und Celecoxib in der Zellzyklusanalyse getestet, danach die Kombinationen, die sich in den Proliferationsassays als besonders wirksam herausgestellt hatten. Die Zellen wurden jeweils vier Tage inkubiert. Als Kontrolle diente bei den Einzelsubstanzexperimenten (Celecoxib und Ly117018; 3.2.1) das Lösungsmittel (Ethanol 0,1% bei Ly117018 und DMSO 0,1% bei Celecoxib), so wie bei den Kombinationen aus Celecoxib und Ly117018 die Einzelsubstanzkonzentrationen einerseits und die dazugehörigen Lösungsmittelkombination (DMSO 0,1% + Ethanol 0,1%) andererseits. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

### 3.2.1 Ly117018- Konzentrationsabhängigkeit

Da MDA- MB435 wie in den Vorversuchen nicht auf Ly118017 ansprach, wurde dieser Versuch nur an MCF- 7- Zellen durchgeführt. Es wurden die Konzentrationen 1, 0,1, 0,001 $\mu$ molar getestet. Als Kontrolle diente Ethanol 0,1% (Lösungsmittelkontrolle).

Bei den behandelten Zellen wurden neben der Abnahme von Zellen im Markerfeld M2 (entspricht der G2- Phase) und Markerfeld M3 (entspricht der Synthese- "S"- Phase) erheblich mehr Events im Markerfeld M1 (entspricht im Zellzyklus der G1- Phase) geteet, siehe Abb. 3-15 und 3-16.

Dieser Effekt nimmt mit steigender Konzentration zu. So sind bei der Kontrolle 60,69% der gemessenen Zellen im M1, 19,83% im M2 und 13,07% im M3 zu finden. Bei den mit 1 $\mu$ molar Ly117018 behandelten Zellen sind es hingen im M1- Feld 77,86% (was einer relativen Zunahme von 28,29% entspricht), im M2 11,57%, so wie 5,96% im M3. Die Werte von 0,1 $\mu$ molar und 0,01 $\mu$ molar Ly117018 liegen aufsteigend zwischen Kontrolle und Ly117018 1 $\mu$ molar (0,1 $\mu$ molar: M1 75,72%, M2 13,24%, M3 5,79%; 0,001 $\mu$ molar: M1 64,31%, M2 17,74%, M3 13,24%).



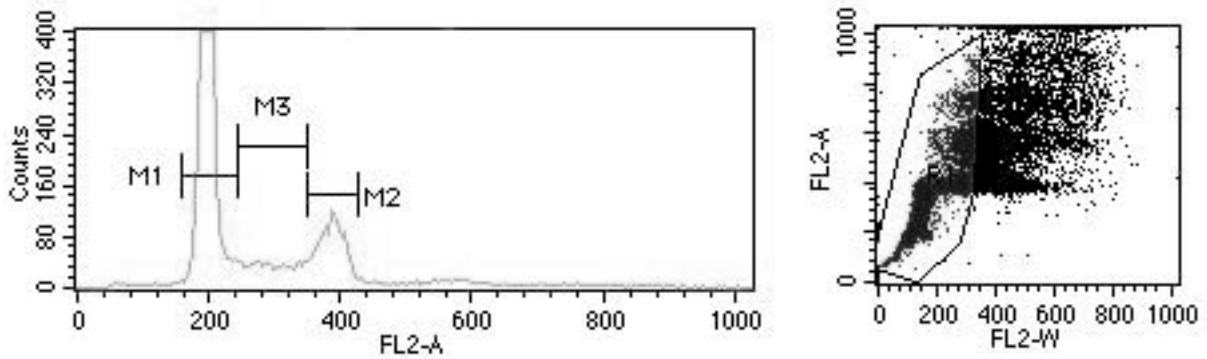


Abbildung 3-15: MCF- 7, mit 0,1% Ethanol behandelt, rechts die graphische Auftragung des linken Gate R1 der Zellmesswolke. Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung eines Experimentes von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen.

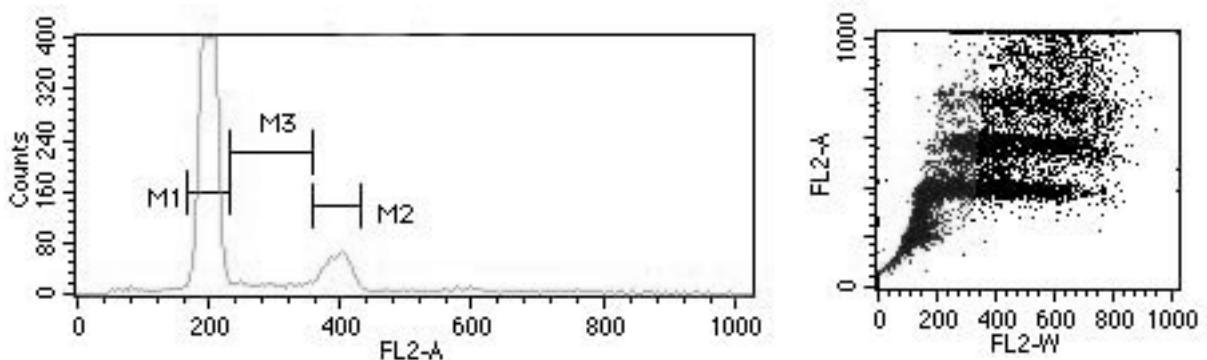


Abbildung 3-16: MCF- 7, mit 1 $\mu$ molar Ly117018 behandelt. Man sieht im Vergleich zu Abbildung 3- 15 eine deutliche Verbreiterung des M1- Peeks, eine Verflachung der M3- Sole und die Abnahme des M2- Peeks, wobei auch die Zellwolke erhebliche Abweichungen zeigt. Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung eines Experimentes von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen.

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der relativen prozentualen Veränderungen verglichen mit der Kontrolle mit Ethanol 0,1%, wobei die Kontrolle 100% entspricht. Davon ausgehend wird die Veränderung der gegateten Zellen in positiven oder negativen Prozent angegeben. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

MCF- 7	G1- Phase (M1)	G2- Phase (M2)	S- Phase (M3)
Ly117018 1 $\mu$ molar	28,29%	-54,40%	-41,65%
Ly117018 0,1 $\mu$ molar	24,77%	-55,70%	-33,23%
Ly117018 0,01molar	5,96%	1,30%	-10,54%

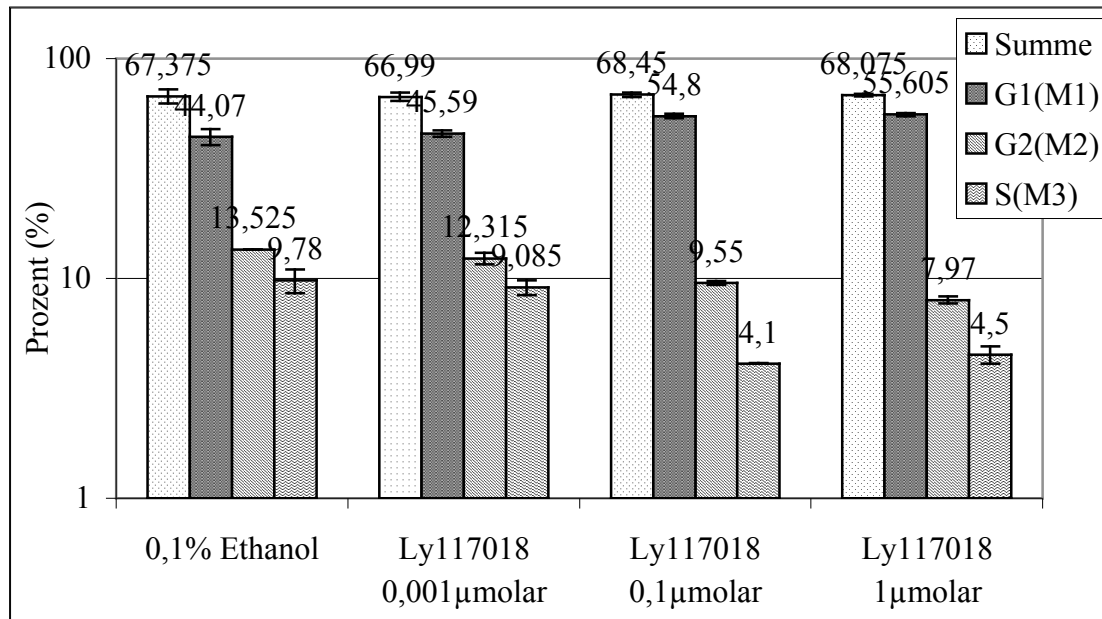


Abbildung 3-17: MCF-7 mit Ly117018 in verschiedenen Konzentrationen vier Tage inkubiert. Man sieht die prozentuale Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen und die Summe aller im Gate registrierten Zellen. Es wird eine Verschiebung der Zellen von der G2 und S-Phase in die G1 Phase deutlich. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

### 3.2.2 Celecoxib- Konzentrationsabhängigkeit

Die Zellen beider Zelllinien MCF-7 und MDA-MB435 wurden vier Tage mit den Konzentrationen 1, 10 und 50 µmolar Celecoxib inkubiert. Als Kontrolle diente DMSO 0,1% (Lösungsmittelkontrolle).

Die mit 50 µmolar Celecoxib behandelten MCF-7-Zellen zeigen eine mengenmäßige Zunahme, die nicht in den Markerfeldern M1-3, sondern vor den erfassten Events stattfindet. Da die Gates auf deutliche Zellzyklusphasen hin analysiert wurden, konnten mehr Zell (DNA)-Trümmer registriert werden, die bei der prozentualen Verteilung in den verschiedenen Markerfeldern nicht erfasst werden. Es zeigt sich aber ein deutlicher Zelluntergang und damit eine Wirkung, die eher auf Apoptose oder Zelluntergang deutet, denn auf Zellzyklusarrest. Man sieht diesen Effekt deutlich, wenn man die prozentuale Verteilung der Events betrachtet:

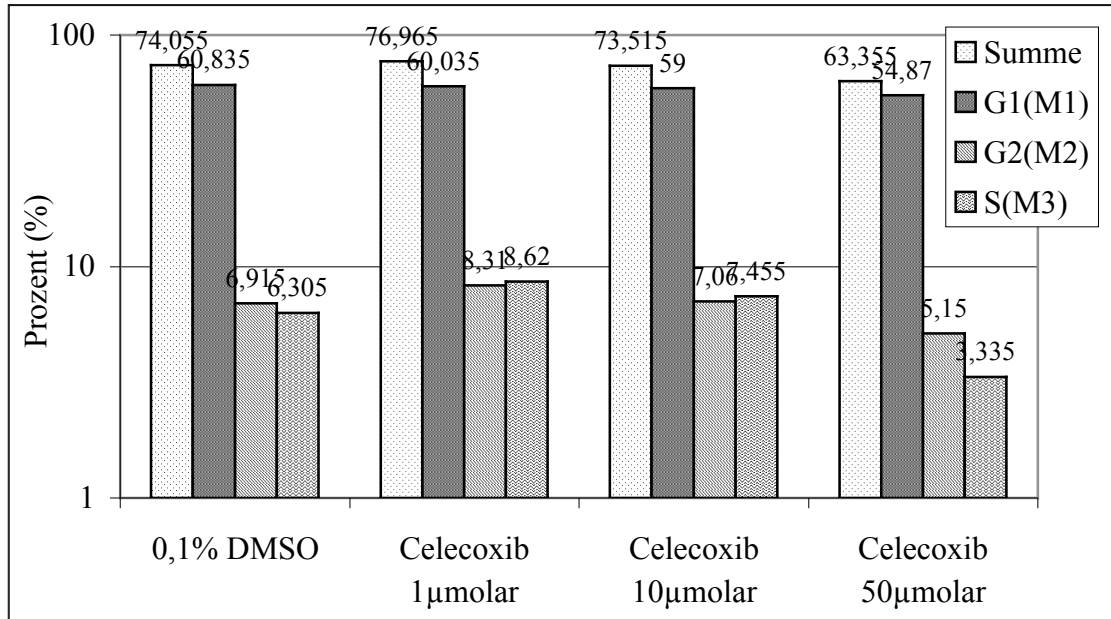


Abbildung 3-18: MCF- 7 mit Celecoxib in verschiedenen Konzentrationen vier Tage inkubiert. Man sieht die prozentuale Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen und die Summe aller im Gate registrierten Zellen. Es wird eine Verringerung der Zellen in der G2 und S-Phase aus dem gateden Bereich (Summe nimmt ab). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 10%.

Tabelle 3-5: MCF- 7 mit Celecoxib verglichen mit der Kontrolle, prozentuale Verteilung der im Flowcytometer gated Events. In Klammern ist die relative prozentuale Veränderung ergänzt. Gesamt = Zellen in den Markerfeldern aller gateden Zellen. Man sieht eine deutliche Abnahme in der S- und G2- Phase, wobei die G1 unverändert bleibt. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

MCF- 7	M1 (G1)	M2 (G2)	M3 (S)	Gesamt
Kontrolle	80,38%	7,62%	9,73%	97,73%
Celecoxib 50µmolar	79,07% (-1,63%)	6,15% (-19,30%)	4,85% (-50,15%)	90,07% (-7,84%)

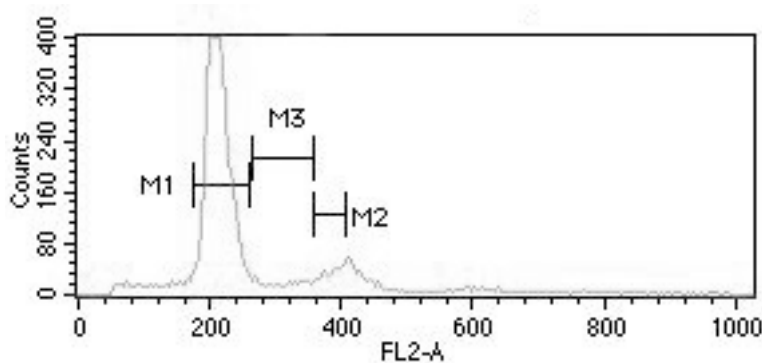


Abbildung 3-19: MCF- 7, mit DMSO 0,1% behandelt. Die Graphik zeigt die gateden Events in einer zweidimensionalen Auftragung mit eingefügten Markerfeldern M1- M3.

Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung eines Experimentes von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen.

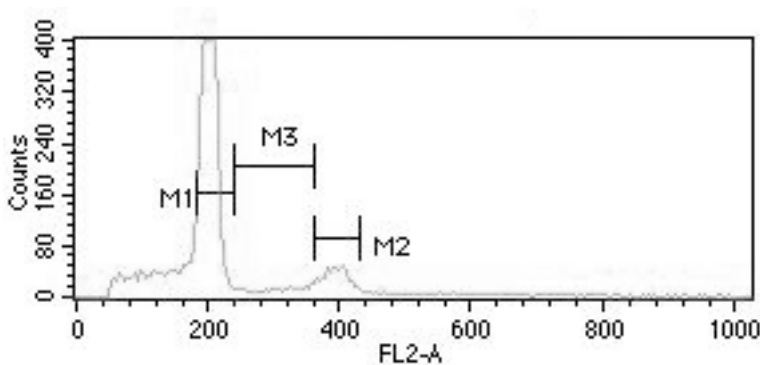


Abbildung 3-20: MCF- 7, mit 50µmolar Celecoxib behandelt. Man sieht im Vergleich zu Abbildung 3- 19 eine deutliche Abnahme des M1- Peaks, die Abnahme des M2- Peaks und eine deutliche Zunahme der gemessenen Zellen vor dem M1- Peek, d.h. im Zelltrümmer- oder DNA- Fragmentanteil. Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung eines Experimentes von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen.

Es fällt auf, dass bei Celecoxib 50µmolar, immerhin 7,66% der Gesamtzellen in der prozentualen Verteilung fehlen, da sie sich, wie schon erwähnt, in den nicht erfassten Zelltrümmerbereichen befinden. Diese Abnahme ist in erster Linie im Markerfeld M2 zu finden, was der G2- Phase entsprechen würde.

Des weiteren fällt die starke relative Abnahme um 50,15% in der S- Phase und die starke relative Abnahme um 19,30% in der G2 auf.

Bei einer Konzentration von 10µmolar sind die Effekte ähnlich, jedoch insgesamt etwas schwächer ausgeprägt (Abb.:1- 19). 1µmolar Celecoxib zeigt hingegen nur noch marginale Unterschiede gegenüber der Kontrolle, wobei hier ein kleiner Randeffekt auffällt: Man sieht eine leichte Zunahme der Zellen im M3, was für Induktion sprechen würde.

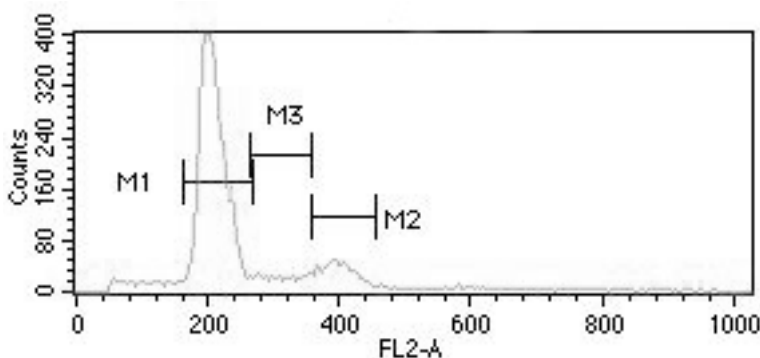


Abbildung 3-21: MCF- 7, mit 10 $\mu$ molar Celecoxib behandelt. Man sieht im Vergleich zu Abbildung 3- 17 (Kontrolle) eine leichte Abnahme des M1- und M2- Peaks. Die S-Phase (M3) ist unverändert. Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung eines Experimentes von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen.

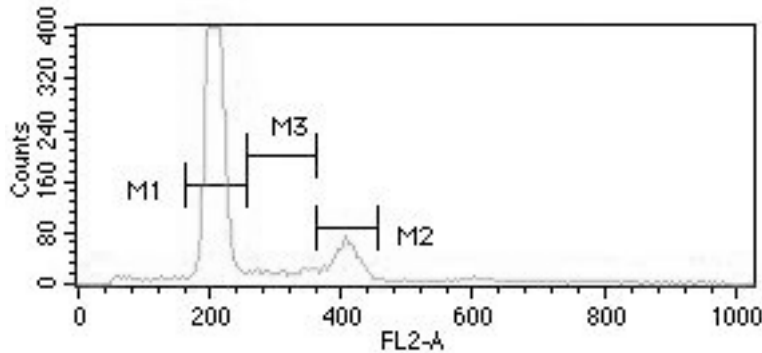


Abbildung 3-22: MCF- 7, mit 1 $\mu$ molar Celecoxib behandelt. Man sieht im Vergleich zu Abbildung 3- 19 (Kontrolle) eine leichte Verschmälerung von Markerfeld M1, ansonsten keine Veränderungen. Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung eines Experimentes von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen.

Die mit Celecoxib behandelten MDA- MB435- Zellen zeigen in der Kontrolle die folgende prozentuale Verteilung:

M1: 74,26%; M2: 11,925; M3: 10,785; Gesamt (Zellen in den Markerfeldern aller getesteten Zellen): 94,35%.

Wenn man diese Ergebnisse den mit 50 $\mu$ molar Celecoxib behandelten Zellen gegenüberstellt, fällt eine Abnahme in M2 (9,77%) auf. Ebenso zeigt sich eine leichte Zunahme in M1 (75,35%), M3 (11,05) und im Zelltrümmer- Bereich (insgesamt 92,78%)- siehe relative prozentuale Veränderungen in Tabelle 3- 6.

Bei den Zellen, die mit niedrigeren Konzentrationen (Celecoxib 10 $\mu$ molar und 1 $\mu$ molar) behandelt wurden, sieht man keine eindeutigen Veränderungen gegenüber der Kontrolle. Jedoch fällt als Nebeneffekt auf, dass Celecoxib in niedrigen Konzentrationen induzierend auf die Zellen wirkt. Ähnliches wurde auch schon bei den Proliferationsassays nachgewiesen. So fällt bei den Zellen, die mit 1 $\mu$ molar Celecoxib behandelt wurden, eine Zunahme in der S- Phase (M3) auf, die mit einer Abnahme im M1 (70,45%) vergesellschaftet ist (siehe hierzu Tabelle 3- 6).

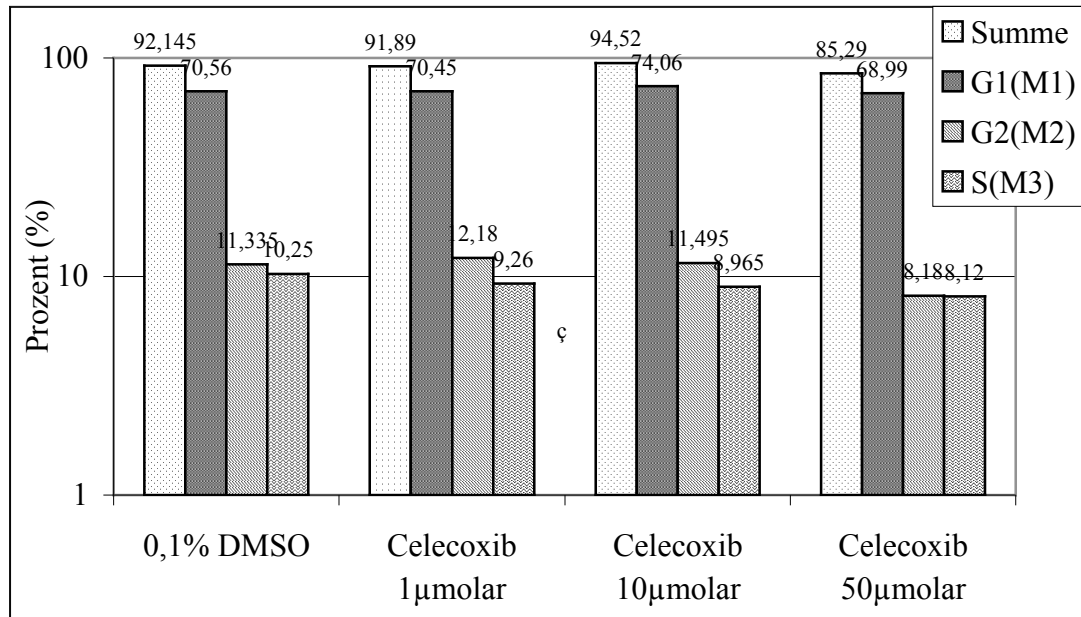


Abbildung 3-23: MDA- MB435 mit Celecoxib in verschiedenen Konzentrationen vier Tage inkubiert. Man sieht die prozentuale Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen und die Summe aller im Gate registrierten Zellen. Es wird eine Verringerung der Zellen in der G2 und S-Phase aus dem gegateten Bereich (Summe nimmt ab). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Standartabweichungen kleiner 10%.

Tabelle 3-6: Zusammenfassung der relativen prozentualen Veränderungen verglichen mit der Kontrolle mit DMSO 0,1%. Die Kontrolle entspricht 100%. Davon ausgehend wird die Veränderung der gegateten Zellen in positiven oder negativen Prozent angegeben. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

MDA- MB435	G1- Phase (M1)	G2- Phase (M2)	S- Phase (M3)
Celecoxib 50µmolar	-2,24%	-18,071%	-16,77%
Celecoxib 10µmolar	+4,8%	+1,7%	-12,79%
Celecoxib 1molar	-0,2%	+13,2%	-10,18%

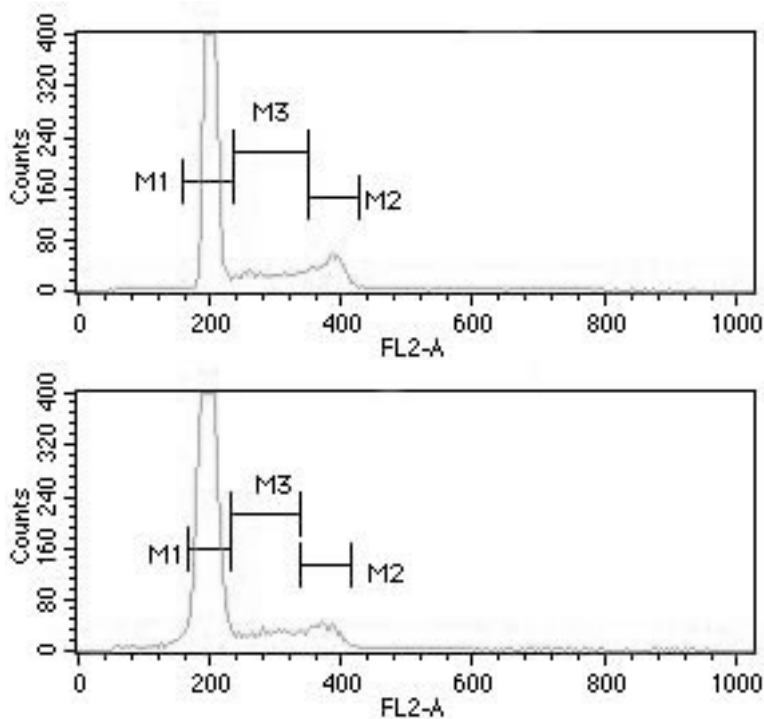


Abbildung 3-24: MDA- MB435. Oben die Kontrolle (0,1%DMSO), unten Celecoxib 50µmolar: Man sieht eine Zunahme des M1- Peaks (entspricht der G1- Phase) und eine Abnahme in M2. Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung eines Experimentes von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen.

### 3.2.3 Kombinationen aus Celecoxib und Ly117018

Die Zellen wurden vier Tage, wie unter 2.9.4 beschrieben, behandelt.

MCF- 7- Zellen reagieren in der Zellzyklusanalyse bei dem Kombinationsversuch mit Ly117018 0,03µmolar+ Celecoxib 10µmolar mit einer leichten Zunahme im Markerfeld M1. Gegenüber der Lösungsmittelkontrolle handelt es sich dabei um eine relative Zunahme von 8,48% im Vergleich mit 12,1% bei Ly117018 und 31,03% bei Celecoxib. Diese Vermehrung von in Kombination behandelten Zellen im M1 geht mit einer Verringerung der Zellen im M2 und M3, verglichen mit der Lösungsmittel- und Celecoxibkontrolle, einher: Die relative prozentuale Verringerung, verglichen mit Ethanol 0,1%+ DMSO 0,1% (Lösungsmittelkontrolle), beträgt 14,4%, im M3 16,23%, verglichen mit Celecoxib 10µmolar (Einzelsubstanzkontrolle), in Markerfeld M2 10,03% und M3 56,38%. Betrachtet man die Veränderungen, die zwischen der Einzelsubstanzkontrolle Ly117018 und dem Synergismusversuch liegen, sieht man ein etwas anderes Bild in M2 und M3. Hier ist eine Zunahme in M2 (G2- Phase) um 1,16% zu verzeichnen

(Ly117018: 5,58%, Kombination:6,74%), so wie eine Abnahme um 1,88% (Ly117018: 2,87%, Kombination: 4,75%) in M3 (S- Phase)- siehe auch zur Übersicht Tabelle 3- 7 und Abb.: 3-25.

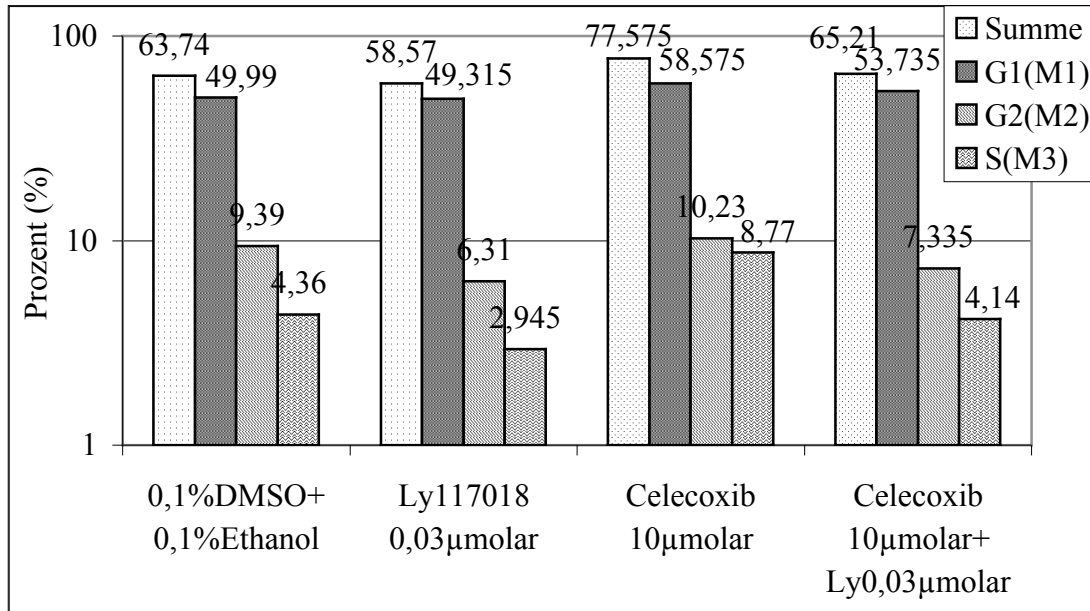


Abbildung 3-25: MCF- 7 im Kombinationsversuch mit Celecoxib und Ly117018 in verschiedenen Konzentrationen vier Tage inkubiert. Man sieht die prozentuale Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen und die Summe aller im Gate registrierten Zellen. Es wird eine Verringerung der Zellen in der G2 und S-Phase aus dem gegateten Bereich (Summe nimmt ab). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 10%.

Als Randeffekt ist eine starke relative Zunahme in der S- Phase (M3) bei Zellen zu bemerken, die mit der Einzelsubstanzkontrolle Celecoxib 10µmolar behandelt wurden. Es handelt sich um eine relative Zunahme von 92,06% (reelle prozentuale Verteilung: Celecoxib 10,89%, Lösungsmittelkontrolle 5,67%).



Tabelle 3-7: Die Tabelle zeigt die Veränderung der Zellverteilung in Prozent, die entstehen, wenn man die Ergebnisse des Kombinationsversuches Celecoxib 10 $\mu$ molar+ Ly117018 0,03 $\mu$ molar und ihre Einzelsubstanzkontrollen Ly117018 und Celecoxib mit der Lösungsmittelkontrolle vergleicht. K= Kontrolle. Gesamt = Zellen in Markerfeldern aller gegateten Zellen. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten

MCF- 7	Gesamt	M1 (G1)	M2 (G2)	M3 (S- Phase)
Celecoxib- K. 10 $\mu$ molar	+21,7%	+17,2%	+08,9%	+101,1%
Ly117018- K. 0,03 $\mu$ molar	-8,1%	-1,4%	-32,8%	-43,49%
Celecoxib 10+ Ly117018 0,03 $\mu$ molar	+2,3%	+7,4%	-21,9%	-6%

In der Kombination Ly117018 0,3 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar fallen ebenfalls Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und der Kontrolle auf. Es gibt eine Verschiebung von Zellen aus der G1-, G2-, und S- Phase in den nicht in Markerfeldern verteilten Zelltrümmerbereich- prozentuale Verteilung und Veränderung siehe Tabelle 3- 8.

Wenn man die Kombination mit der Einzelsubstanzkontrolle Ly117018 vergleicht, ereignen sich ähnliche Verschiebungen aus den Markerfeldern heraus in den Zelltrümmerbereich, wobei die prozentuale Verschiebung schwächer als bei der Lösungsmittelkontrolle ausfällt (Tabelle 3- 8).

Insgesamt scheint es eine Verlagerung der gemessenen Zellen in den nicht in Markerfeldern verteilten Bereich zu geben, sprich, eine Zunahme von DNA- Fragmenten oder Zelltrümmern.

Tabelle 3-8: Die Tabelle zeigt die relativen prozentualen Veränderungen, die entstehen, wenn man die Ergebnisse des Kombinationsversuches Celecoxib 10 $\mu$ molar+ Ly117018 0,3 $\mu$ molar und ihre Einzelsubstanzkontrollen Ly117018 und Celecoxib mit der Lösungsmittelkontrolle vergleicht. K= Kontrolle. Gesamt = Zellen in Markerfeldern aller gegateten Zellen. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

MCF- 7	Gesamt	M1 (G1)	M2 (G2)	M3 (S- Phase)
Celecoxib- K. 10 $\mu$ molar	-5,4%	-9,6%	+10%	+17,1%
Ly117018- K.0,3 $\mu$ molar	-11,4%	-7,3%	-17,3%	-40,6%
Celecoxib 10+ Ly117018 0,3 $\mu$ mol	-13,1%	-8,7%	-23,3%	-46,1%

MDA- MB435 reagiert auf eine Behandlung mit Ly117018 0,6 $\mu$ molar, kombiniert mit Celecoxib 30 $\mu$ molar im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1% kombiniert mit Ethanol 0,1%) mit einer Abnahme um 4,54% im Markerfeld M3 (S- Phase) (relativ um 42,01%), einer Zunahme von 1,25% (relativ um 16,21%) in M2 und einer Zunahme von 1,71% in M1- siehe Tabelle 3- 9. Vergleicht man diesen Synergismus-Versuch mit den Einzelsubstanzkontrollen, so sieht man zweierlei Resultate: Erstens bemerkt man bei der Celecoxib- Kontrolle, wie auch bei der Kombination gleich viele Zellen in der S- Phase, und zweitens sieht man verglichen mit Ly117018 eine 2,66%-Zunahme im M2- Markerfeld, siehe Abb.: 3-26 und Tabelle 3- 9.

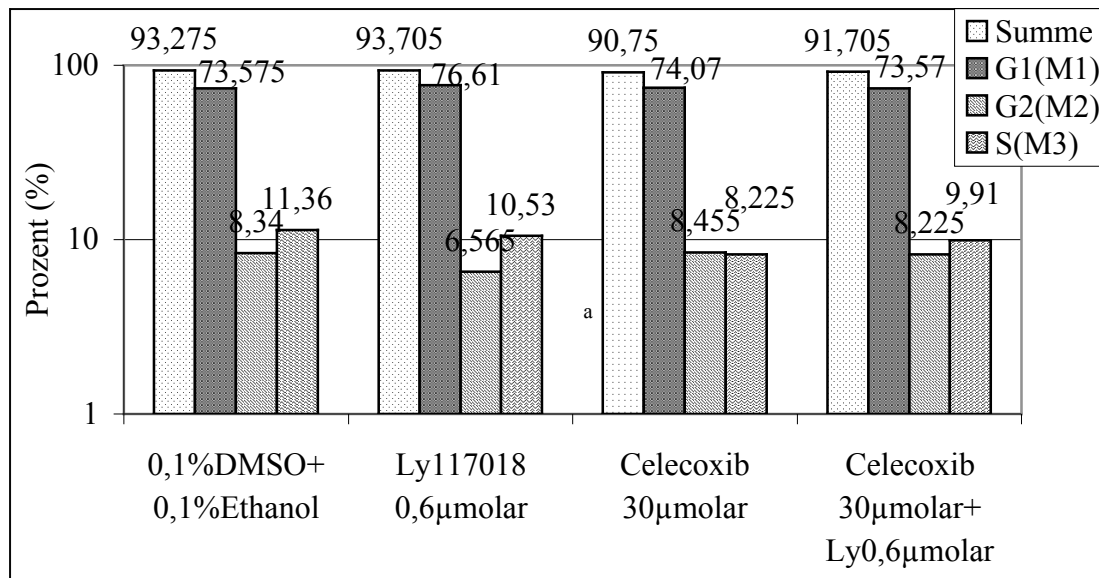


Abbildung 3-26: MDA- MB435 im Kombinationsversuch mit Celecoxib und Ly117018 in verschiedenen Konzentrationen vier Tage inkubiert. Man sieht die prozentuale Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen und die Summe aller im Gate registrierten Zellen. Es wird eine Verringerung der Zellen in der G2 und S-Phase aus dem gegateten Bereich (Summe nimmt ab). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen kleiner 10%.

Tabelle 3-9: MDA- MB435, behandelt mit Ly117018 0,6 $\mu$ molar+ Celecoxib 30 $\mu$ molar: Man sieht die prozentuale Verteilung der gemessenen Zellen in den verschiedenen Markerfeldern M1- M3. Gesamt = Zellen in Markerfeldern aller gegateten Zellen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

MDA- MB435	M1	M2	M3
Kontrolle	74,10%	7,71%	10,81%
Ly117018 0,6 $\mu$ molar	77,48%	6,23%	10,43%
Celecoxib 30 $\mu$ molar	75,94%	9,40%	6,67%
Ly117018+ Celecoxib	75,81%	8,96%	6,27%

Bei dem anderen Kombinationsversuch mit Ly117017 1 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar sind keine Veränderungen zwischen der Kontrolle und den in Kombination behandelten Zellen auszumachen. Ebenso gibt es nur marginale Unterschiede zwischen den Einzelsubstanzkontrollen (Celecox 10 $\mu$ molar und Ly117018 1 $\mu$ molar) und dem Synergismusversuch- siehe Details in Tabelle 3- 10 und Abb. 3- 26.

Das einzig Auffällige besteht darin, dass in der Kontrolle sehr wenige Zellen in der S-Phase sind, sich in der Kombination wie auch in den Einzelsubstanzkontrolle mehr Zellen in dieser Phase befinden, was zu Lasten der G2- Phase (M2) geht.

Tabelle 3-10: MDA- MB435, behandelt mit Ly117018 1 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar. Man sieht die prozentuale Verteilung der gemessenen Zellen in den verschiedenen Markerfeldern M1- M3. Gesamt = Zellen in Markerfeldern aller gegateten Zellen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

MDA- MB435	M1	M2	M3
Kontrolle	76,97%	10,39%	5,88%
Ly117018 1 $\mu$ molar	77,09%	8,37%	6,82%
Celecoxib 10 $\mu$ molar	77,63%	9,35%	6,31%
Ly117018+ Celecoxib	74,84%	8,02%	8,15%

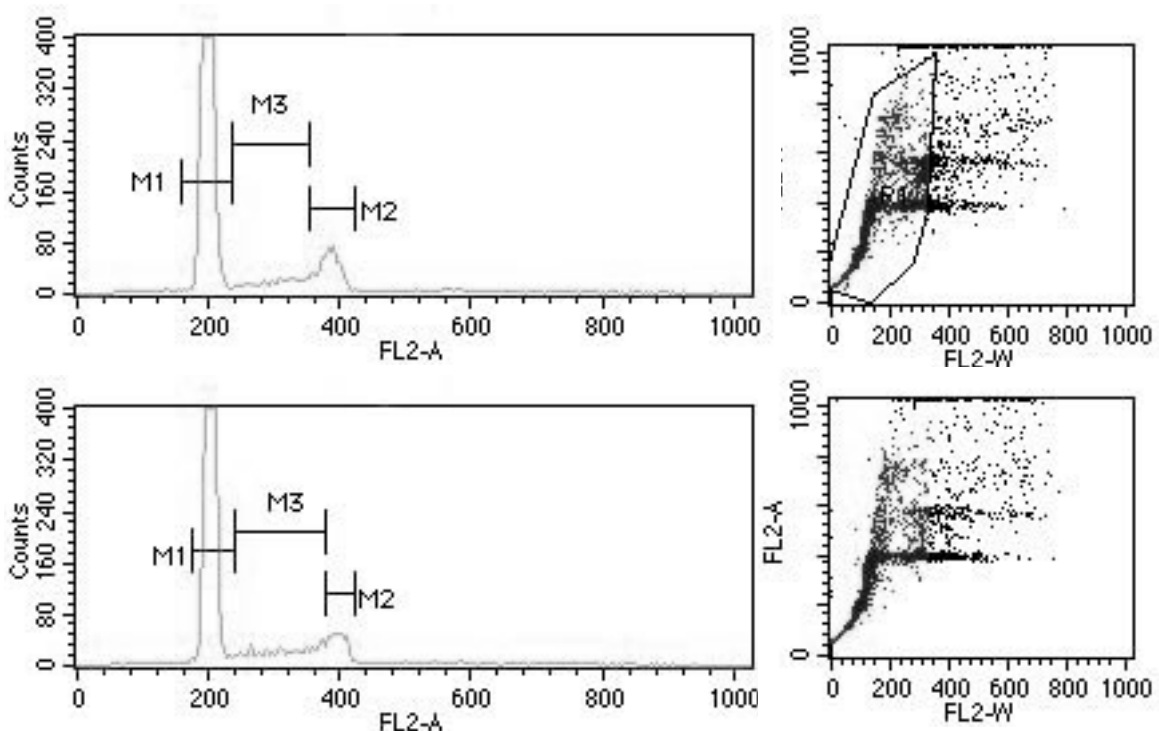


Abbildung 3-27: MDA- MB435. Oben Kontrolle mit 01%DMSO+ 0,1%Ethanol, unten Ly117018 0,6 $\mu$ molar+ Celecoxib 30 $\mu$ molar. Links die zweidimensionale Auftragung

der rechten Zellpopulation: Man sieht keine starken Veränderungen, lediglich der M2-Peak (G2) ist flacher und die M3- Sohle (S) in der Kombination ausgefüllter. Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung eines Experimentes von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen.

### 3.3 Western- Blot

Tabelle 3-11: Western- Blot- Taschenbefüllung

Taschen	MCF- 7- Konzentration in $\mu\text{molar}$	MDA- 435- Konzentration in $\mu\text{molar}$
1	Kontrolle: 0,1%Ethanol+ 0,1DMSO	Kontrolle: 0,1%Ethanol+ 0,1DMSO
2	Ly117018 0,03	Ly117018 1
3	Ly117018 0,3	Ly117018 0,6
4	Celecoxib 10	Celecoxib 10
5	Ly117018 0,03+ Celecoxib 10	Celecoxib 30
6	Ly117018 0,3+ Celecoxib 10	Ly117018 1+ Celecoxib 10
7	-----	Ly117018 0,6+ Celecoxib 30

Die in Tabelle 3.11 dargestellte Taschenbefüllung gilt für die komplette Western- Blot- Versuchsreihe.

#### 3.3.1 Silberfärbung, Ponceau- Färbung, Aktin

Um zu kontrollieren, ob in allen Geltaschen gleich viel Protein geladen wurde, haben wir das Gel silbern und die Nitrocellulosemembran mit Ponceau- Rot angefärbt. Anschließend wurden die Membranen zum gleichen Zweck mit Anti-  $\beta$ - Aktin- Antikörper inkubiert.

Man sieht bei beiden Zelllinien, in beiden Experimenten und für alle Medikamentenkonzentrationen (siehe 2.10.3) keine Bandenunterschiede in den drei unterschiedlichen Ladekontrollen, so dass man von gleicher Proteinbeladung ausgehen kann- siehe Abb. 3- 28, 3- 29 und 3- 30.

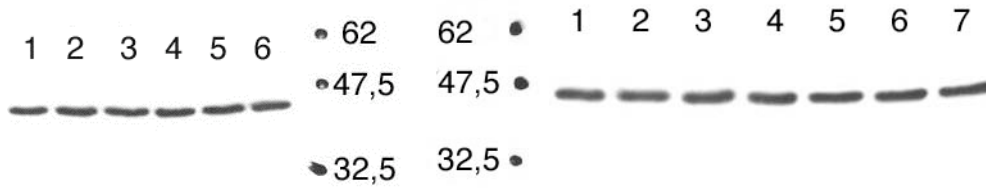


Abbildung 3-28: Ladekontrolle mit Anti-  $\beta$ - Aktin- Antikörper. Links MCF- 7, rechts MDA- MB435, Proteingröße in kD. Es handelt sich um ein repräsentatives Gel von zwei Versuchen, Taschenbefüllungstabelle siehe Tab.3- 11.

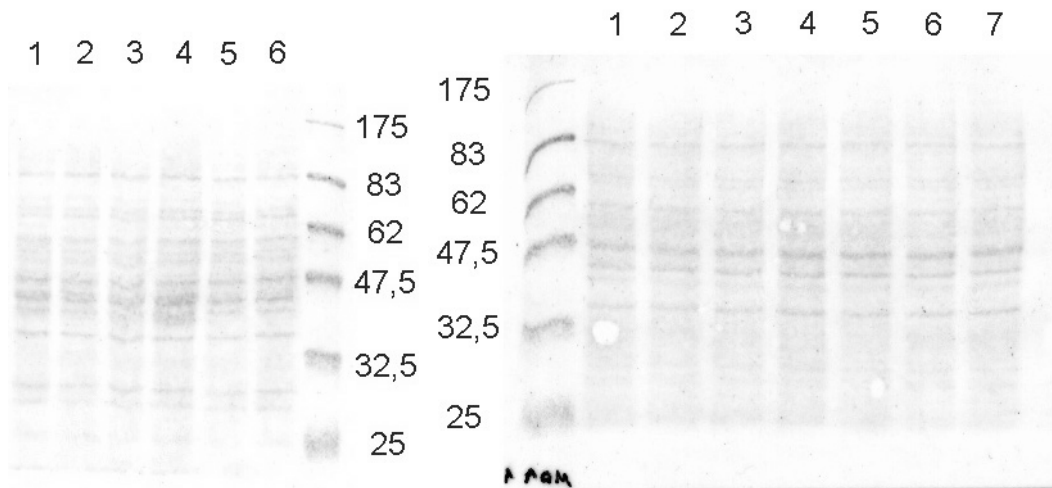


Abbildung 3-29: Ladekontrolle und Blottingkontrolle mit Ponceau- Färbung. Links MCF- 7, rechts MDA- MB435, Proteingröße in kD. Es handelt sich um ein repräsentatives Gel von zwei Versuchen, Taschenbefüllungstabelle siehe Tab.3- 11.

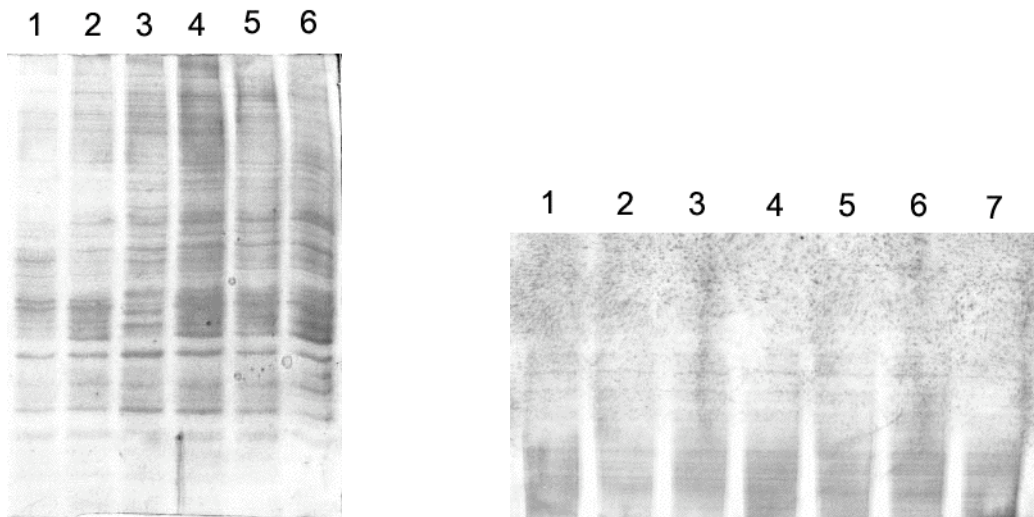


Abbildung 3-30: Ladekontrolle und Laufkontrolle mit Silber- Färbung. Links MCF- 7, rechts MDA- MB435, Proteingröße in kD. Es handelt sich um ein repräsentatives Gel von zwei Versuchen, Taschenbefüllungstabelle siehe Tab.3- 11.

### 3.3.2 Akt

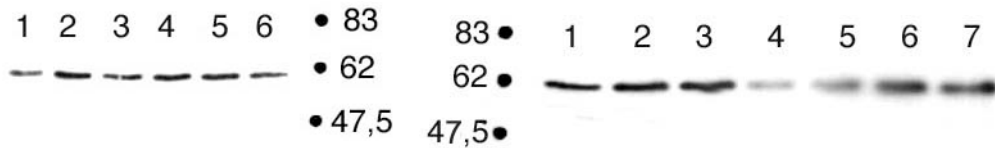


Abbildung 3-31: Akt. Links MCF- 7, rechts MDA- MB435, Proteingröße in kD. Es handelt sich um ein repräsentatives Gel von zwei Versuchen, Taschenbefüllungstabelle siehe Tab.3- 11.

Die MCF- 7- Zellen reagieren im Vergleich zu der Kontrolle (Bande 1) mit einer leichten Verstärkung der Banden von behandelten Zellen. Besonders imponieren die Bande 2 mit Ly117018 0,03 $\mu$ molar, die Bande 4 mit Celecoxib 10 $\mu$ molar und die Bande 6 mit Ly117018 0,3+ Celecoxib 10 $\mu$ molar. Insgesamt am stärksten fällt die Reaktion der Bande 5 (Ly117018 0,03 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar), am schwächsten hingegen die der Bande 1 aus. Die Streifen 6 und 3 sind ebenfalls etwas dunkler als die Kontrolle, reichen jedoch nicht an 2, 4 und 5 heran. Wenn die Kontrolle als 100% gesetzt wird, ergibt sich für die Banden 2: 166%; 3:134%; 4:146%; 5:156%; 6:134%.

Vergleicht man nun die Einzelsubstanzkontrollen mit den Kombinationsversuchen, kommt man bei Ly117018 0,03 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar (Bande 5) zu dem Ergebnis, dass bei der Kontrolle mit Ly117018 mehr Anti- Akt detektiert wurde als bei der Kombination und bei der Celecoxib- Kontrolle weniger (Ly117018 um 10% stärker (Bande 2), Celecoxib um 22% schwächer (Bande 4)). Auch bei dem anderen Synergismus- Versuch (Ly117018 0,3 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar (Bande 6)) sind beide Einzelsubstanzkontrollen stärker detektiert (Ly117018 (Bande 2) um 32%, Celecoxib (Bande 4) um 12% stärker).

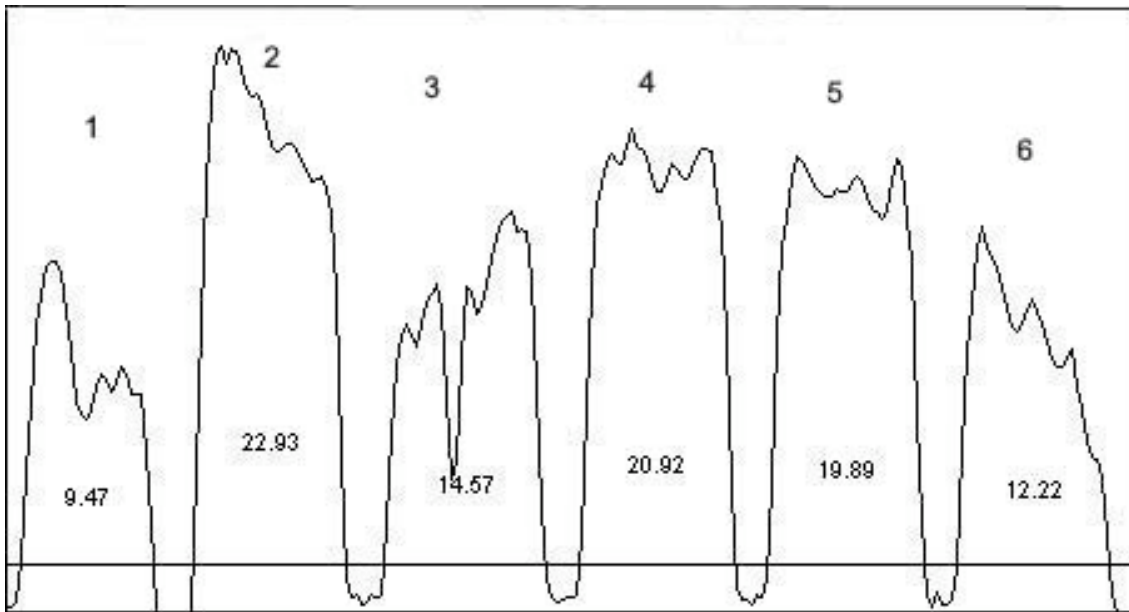


Abbildung 3-32: MCF- 7. Eine graphische Auftragung der Grey Value und prozentualen Kurvenfläche des linken Western Blots- Abb.3- 26. Zahlen über den Kurven= Taschenbefüllung (siehe Tab. 3- 11), Zahlen in den Kurven= prozentuale Verteilung der Flächen unter der Kurve in Relation zur Gesamtfläche in Prozent. Die Grey Value nimmt nach oben hin zu. Man sieht, dass Lane 2 die dunkelste und die größte ist. Die Kontrolle fällt am hellsten und auch am kleinsten aus. Dazwischen reihen sich die anderen Banden ein.

Bei den MDA- MB435- Zellen sieht man eine deutliche Regulierung von Akt. So ist zu bemerken, dass bei den Kombinationsexperimenten die Akt- Banden (6+7) stärker detektiert sind als in der Kontrolle (1). Wenn man die Kontrolle als 100% nimmt, sind dies für die Bande 6 133% und für die Bande 7 123%, verglichen mit der Kontrolle. Auf Bande 7 (Ly117018 0,6+ Celecoxib 30µmolar) wurde etwas weniger Akt detektiert als bei Bande 6 (Ly117018 1+ Celecoxib 3µmolar). Auch die Celecoxibstreifen (4+5) als Einzelsubstanzkontrollen fallen eindeutig schwächer aus als die Kontrolle und auch schwächer gegenüber den Kombinationen: Im Einzelnen erscheinen Bande 4 um 74% und Bande 5 um 52% schwächer als die Kontrolle (100%). MDA- MB435 mit LY117017 in 0,6µmolar (Bande 2 mit 107%, verglichen mit der Kontrolle) erscheint als leicht stärker, bzw. zeigt ein der Kontrolle sehr ähnliches Ergebnis, wohingegen Ly117018 in 1µmolar (Bande 3) etwas heller imponiert (13% schwächer als die Kontrolle) und damit zwischen Celecoxib und der Kontrolle liegt.

Vergleicht man nun die beiden Synergismusversuche (Line 6 + 7) mit den Einzelsubstanzkontrollen, so wurde hier deutlich mehr Akt detektiert. Die Grey Value von Ly117018 1µmolar+ Celecoxib 3µmolar liegt gegenüber der Einzelsubstanzkontrolle



Celecoxib 3 $\mu$ molar um 34% höher, auch das Ausmaß der Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche ist größer (siehe Abb.3- 28). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei dem Vergleich mit Ly117018: Hier ist die Grey Value um 12% erhöht.

Bei einer genaueren Analyse der Veränderungen zwischen den Einzelsubstanzkontrollen und dem Synergismusversuch Ly117018 0,6 $\mu$ molar+Celecoxib 30 $\mu$ molar zeigt sich ebenfalls das Bild, dass die Einzelsubstanzkontrollen schwächer sind als der Synergismus (Ly117018 um 4% und Celecoxib um 9% schwächer).

Insgesamt sind die Banden der Kombinationsversuche eindeutig stärker angefärbt als die Lösungsmittel- wie auch Einzelsubstanzkontrollen.

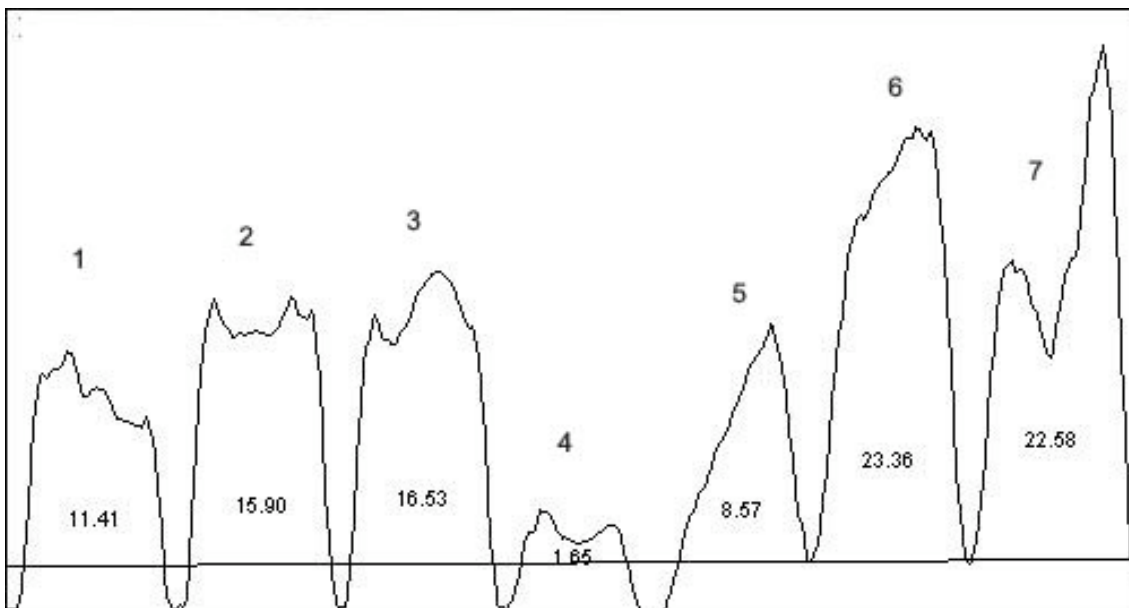


Abbildung 3-33: : MDA- MB435. Eine graphische Auftragung der Grey Value und der prozentualen Kurvenfläche des rechten Western Blots- Abb.3- 26. Zahlen über den Kurven= Taschenbefüllung (siehe Tab. 3- 11), Zahlen in den Kurven= prozentuale Verteilung der Flächen unter der Kurve in Relation zur Gesamtfläche in Prozent. Die Grey Value nimmt nach oben hin zu. Man sieht, dass Lane 2 die dunkelste und auch die größte ist. Die Kontrolle fällt am hellsten und auch am kleinsten aus. Dazwischen reihen sich die anderen Banden ein.

### 3.3.3 P- Akt



Abbildung 3-34: P- Akt. Links MCF- 7, rechts MDA- MB435, Proteingröße in kD. Es handelt sich um ein repräsentatives Gel von zwei Versuchen. Taschenbefüllungstabelle siehe Tab.3- 11.

Man sieht bei den MCF- 7- Zellen eine leichte Abnahme der Bandenstärke von 1 bis 6. So sind 4 (Celecoxib 10 $\mu$ molar), 5 (Ly117018 0,03+ Celecoxib 10 $\mu$ molar) und 6 (Ly117018 0,3+ Celecoxib 10 $\mu$ molar) auf einem etwa gleichen Anti- P- Akt- Nachweisniveau, insgesamt aber geringer als Bande 3 (Ly117018 0,3 $\mu$ molar). Die Streifen 1 (Kontrolle) und 2 (Ly117018 0,03 $\mu$ molar) sind ungefähr gleich stark angefärbt und imponieren deutlicher als Bande 3, die damit zwischen beiden Extremen liegt.

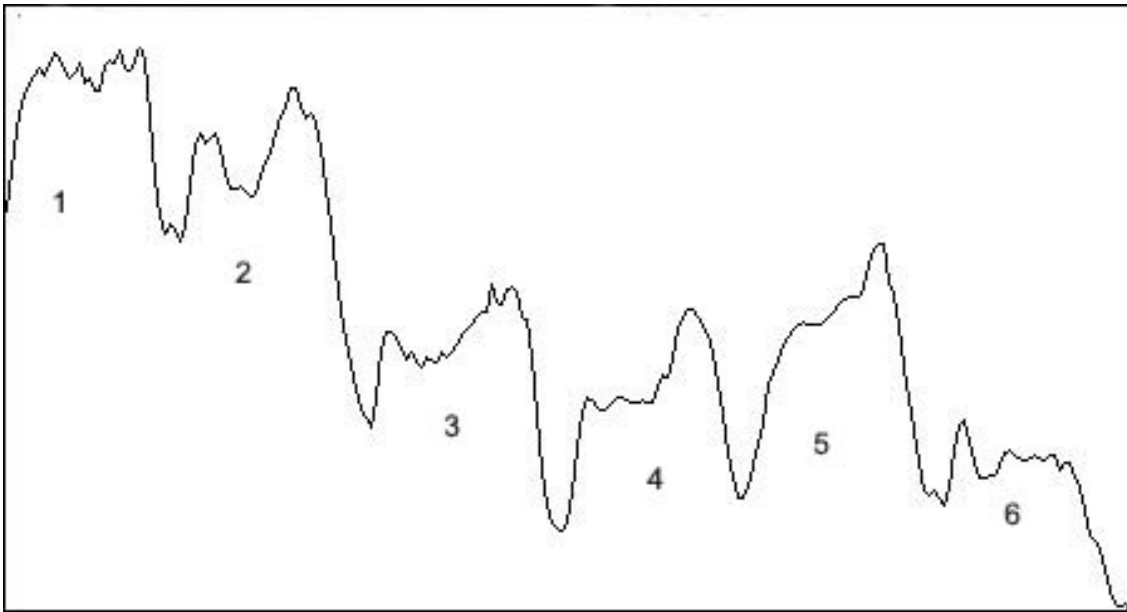


Abbildung 3-35: MCF- 7. Eine graphische Auftragung der Grey Value des linken Western Blots- Abb.3- 29. Zahlen in den Kurven= Taschenbefüllung (siehe Tab. 3- 11). Die Grey Value nimmt nach oben hin zu. Man sieht eine stetige Abnahme der Grey Value von Line 1 bis 6. Kurve 5 von Bande 5 fällt aus dieser Abnahme leicht heraus und zeigt eine kleine Steigerung zu Line 4.

Zusammengefasst ist im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle ein schwächerer Nachweis von P- AKT in den Kombinationsversuchen und in der Kontrolle von Celecoxib solo zu konstatieren. In Prozent ausgedrückt ergibt sich nach der Grey Value-Analyse, wenn Bande 1 (Kontrolle) als 100% gesetzt wird, 2: 98%; 3: 84%; 4: 75%, 5: 78% und 6: 69% (siehe auch Abb.3- 30).

Vergleicht man nun die Einzelsubstanzkontrollen mit der Kombination, so ist bei der Kombination Ly117018 0,03 $\mu$ molar + Celecoxib 10 $\mu$ molar (Bande 5) die Ly117018-Kontrolle (Bande 2) deutlich stärker (20%) und die Celecoxib- Kontrolle (Bande 4) auf gleichem Niveau (3% schwächer). Auch bei der anderen getesteten Kombination, beste-

hend aus Ly117018 0,3 $\mu$ molar+ Celecoxib 10 $\mu$ molar, wurde bei der Ly117018- Einzelsubstanzkontrolle deutlich mehr Anti- P- Akt detektiert (15% mehr). Ein gleiches war bei der Celecoxib- Kontrolle zu bemerken, wo 6% weniger detektiert wurden.

Bei den MDA- MB435 imponiert die Kontrolle am schwächsten (27% schwächer als Bande 2). Die mit Ly117018 (2 und 3) behandelten Zellen wurden etwas stärker detektiert als die Lösungsmittelkontrolle. Bei Celecoxib ergibt sich ein inkonstantes Bild, bei dem Celecoxib 10 $\mu$ molar etwas stärker heraus sticht als Celecoxib 30 $\mu$ molar (Lines 4 und 5). Die Banden 6 und 7 der Kombinationsversuche sehen gleich aus und bewegen sich auf einem ähnlichen Niveau wie Celecoxib 30 $\mu$ molar.

Insgesamt gesehen lässt sich bei MDA- MB435 keine durch alle Versuche konstante Regulation feststellen, wobei es sich so verhält, dass bei den mit Celecoxib behandelten Zellen weniger P- Akt nachweisbar ist (das gilt auch für die Kombinationen). In Prozenten ausgedrückt sind die Celecoxib- Banden (4 und 5) um 21% schwächer als die Ly117018- Banden (2+ 3) und die Kombinationen mindestens 13% schwächer als die Banden 2 und 3.

### 3.3.4 Vergleich Akt und p- Akt

Es ist durchaus eine interessante Frage, ob sich in dem Verhältnis von Akt zu p- Akt etwas ändert, bzw. angebracht, zu untersuchen, ob auf der einen Seite eine Abnahme oder Zunahme erfolgt, oder auf der anderen Seite beide Proteine gleichermaßen ansteigen.

Die MCF- 7- Zellen verhalten sich in den Akt- und p- Akt- Versuchen etwas unterschiedlich: Während Akt von Bande 1 bis 6 tendenziell zunimmt, sieht man bei p- Akt eine Abnahme, so dass sie sich also antiparallel verhalten. Bei p- Akt ist die Kontrolle am stärksten, wohingegen sie bei Akt am schwächsten ausfällt. Die Behandlung mit einer Kombination aus Ly117018 und Celecoxib löst bei p- Akt eine Schwächung und bei Akt eine Stärkung der Detektion aus. Celecoxib liegt bei p- Akt eher im schwächeren Mittelfeld, wohingegen es bei Akt erheblich stärker imponiert als die Kontrolle. Bei Ly117018 ist kein einheitliches Bild beschreibbar.



Abbildung 3-36: MCF- 7. Dieses Bild zeigt die Unterschiede- difference: image J. (Rasband et al., 2005, Abramoff et al., 2005) zwischen den Western- Blot von Anti- Akt (untere Linie, Abb.3- 26) und Anti- P- Akt (obere Linie, Abb.3- 29). Man sieht eindeutig das antiparallele Verhalten der beiden abgebildeten Reihen, bei denen die eine heller, die andere hingegen dunkler wird und umgekehrt.

In Folge dessen sieht man bei MCF- 7 ein antiparallel anmutendes Bild, bei dem die Kontrolle in Akt am schwächsten und die Kombinationen am stärksten ausfällt. Bei P- Akt tritt hingegen ein umgekehrtes Verhalten auf.

Tabelle 3-12: MCF- 7. Relative Veränderung von Anti- P- Akt und Anti- Akt zur Kontrolle (100%). Im direkten Vergleich: Es fällt das gegenläufige Verhalten von Anti- Akt und Anti- P- Akt auf. Akt ist in der Kontrolle am schwächsten und nimmt bei Behandlung mit den Substanzen zu. Bei Anti- P- Akt verhält es sich hingegen andersherum. Man sieht in der Lösungsmittelkontrolle (Bande 1) und in den Ly117018- Kontrollen (Bande 2+3) die schwächste Detektion, um anschließend über eine stärkere Celecoxib- Kontrolle (Bande 4) zu den Synergismusversuchen zu gelangen (Bande 5+6).

Taschenbefüllung	1	2	3	4	5	6
Anti- Akt	100%	+66%	+34%	+46%	+56%	+34%
Anti- P- Akt	100%	-2%	-16%	-25%	-22%	-31%

Bei MDA- MB435 lässt sich eine ebenfalls eine Abnahme p- Akt und eine Zunahme von Akt beobachten. So wurde bei den Ly117018- Versuchen (Bande 2+ 3) am meisten Akt und leicht verringertes p- Akt detektiert. Die Celecoxib- Streifen zeigen bei beiden tendenziell das schwächste Resultat. Auch die Kombinationen verhalten sich in beiden Experimenten gleich mit einer Zunahme von Akt verglichen mit der Kontrolle und einer Abnahme von p- Akt verglichen mit der Kontrolle, bewegen sich jedoch zwischen Ly117018 und Celecoxib.

Bei diesem Vergleich ist zu sehen, dass sich Akt und p- Akt in beiden Experimenten bei gleicher Behandlung durch die Medikamente auch ähnlich verhalten, so dass Celecoxib am schwächsten, die Kombination im mittleren Bereich und Ly117018 am stärksten detektiert wurde.

Tabelle 3-13: MDA- MB435. Relative prozentualer Veränderung von Anti- P- Akt zu Anti- Akt verglichen mit der Kontrolle. Es fällt auf das Anti- Akt eher zunimmt und Anti- P- Akt abnimmt bzw. gleich bleibt. Dieses weißt auf eine prozentuale Abnahme von phosphoryliertem Akt hin.

Taschenbefüllung	1	2	3	4	5	6	7
Anti- Akt	100%	+165%	+173%	+127%	+135%	+119%	+157%
Anti- P- Akt	100%	-1,1%	-23%	-72%	-52%	-19%	-21%

### 3.3.5 COX2

Bei beiden Zelllinien lag COX2 unter der Nachweisgrenze, so dass es nicht möglich war, einen Western- Blot herzustellen, der eindeutig beurteilbare COX2- Banden zeigte. Als positiv ausgefallene Kontrolle, dass der funktionsuntaugliche Nachweis nicht etwa an der Methode gescheitert sein könnte, sei hier ein COX2- Nachweis mit Ovarialkarzinomzellen dargestellt, bei dem das gleiche Verfahren benutzt wurde.

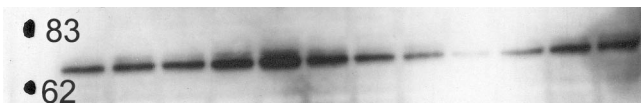


Abbildung 3-37: Positive Kontrolle von COX2- Western- Blot anhand der Ovarialkarzinomzelle SKOV- 3 (Eggemann, 2004).

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Es gibt viele Strategien, gegen maligne Neoplasien vorzugehen, und es gibt wohl kaum ein Forschungsfeld, in dem so viele Experimente und neue Wege entwickelt werden. Leider stellt sich bei vielen Versuchen und Neuentwicklungen nicht der erwünschte therapeutische Effekt ein. Besonders deutlich sind solche therapeutischen Entwicklungen in der Pharmakologie zu verfolgen: Hier werden laufend neue Wege in der Behandlung entdeckt und immer wieder Medikamente untersucht, die über neue Zellzykluswege eine mögliche Vorgehensweise gegen Tumore darstellen könnten. Neben solchen zielstrebigem Entwicklungen kommt es auch häufig zu Zufallsbeobachtungen, die zu der Erkenntnis führen, dass bestimmte Arzneimittel eine antitumoröse Neben-, bzw. Zusatzwirkung haben. Ein Aspekt ist aber beiden Herangehensweisen gemeinsam, nämlich die Tatsache, dass sie meist nicht den erhofften starken Behandlungserfolg zeigen, der bei einer Heilung von Krebserkrankungen nötig wäre. Jedoch haben solche gezielten pharmakologischen Ansätze im Sinne der so genannten target therapy meist einen entscheidenden Vorteil, indem sie für die Patienten/innen meist erheblich besser verträglich sind als die üblichen Chemotherapieschemata.

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Medikamenten Celecoxib und im weiteren Sinne auch Ly117018 handelt es sich um eben solche oben beschriebene Medikamente aus dem Formenkreis der target therapy (Brown et al., 2005, Gajos et al., 2002). Also um Medikamente, die spezifisch auf ein target, hier Rezeptoren, wirken. Es handelt sich um zwei in der aktuellen Diskussion sehr spannende und relevante Medikamente, die zwar gezielt an Rezeptoren wirken und daher relativ nebenwirkungsarm sind, jedoch für sich alleine genommen nicht genügend Wirkung auf die Tumorzellen ausüben, um eine Remission der Krankheit herbeizuführen. Folgende Überlegung liegt nun auf der Hand: Wenn zwei Medikamente sehr viel versprechende antineoplastische Wirkungen haben, jedoch nicht in der Lage sind, zu einer kompletten Remission von Tumorgewebe zu führen, warum wird dann nicht versucht, die Einzelwirkungen zu bündeln und damit eine Präparatenkombination zu schaffen, die durch synergistische Effekte doch noch das Potenzial entwickelt, eine Heilung oder zumindest eine Progression von malignen Tumoren zu bewirken? Hier wird zum ersten Mal die Kombination aus Ly117018, einem

bekannten SERM, und Celecoxib, einem spezifischen COX- 2- Hemmer unter dem Aspekt des möglichen Synergismus an ER+ und ER- Zelllinien untersucht, um einen antiproliferativen Effekt darzustellen. Es sind mehrere mögliche zelluläre Signalwege denkbar, über die sich diese Medikamente gegenseitig beeinflussen, darüber hinaus gelten beide Medikamente als gut verträglich und sind, zum Teil in einem anderen Zusammenhang, schon klinisch etabliert.

#### 4.1.1 Ly117018

Schon 1983 wurde von Scholl et al. die Wirkung von Ly117018 auf die Östrogenrezeptor- positiven (ER+) MCF- 7- Zellen beschrieben. Scholl zeigte, dass Ly117018 eine starke Wachstumshemmung bei den behandelten Zellen aufweist, 100- 1000mal stärker wirkt als Tamoxifen und keine Progesteron- Rezeptoren induziert (Scholl et al., 1983). Fünf Jahre später beschrieben Thompson et al. ebenfalls eine Wachstumshemmung und ein Rückgang der Invasivität der Zelllinie unter Ly117018- Behandlung- wieder verglichen mit Tamoxifen (Tabelle 4-1). Des Weiteren testete er die Wirkung auf die Östrogenrezeptor- negative (ER-) Zelllinie MDA- MB231, eine der MDA- MB435 ähnlichen Zelllinie, und zeigte hier die Wirkungslosigkeit von Östrogenen und Antiöstrogenen, unter denen auch Ly117018 vertreten war (Thompson et al., 1988). Auch 2005 wurde die Wirksamkeit von Ly117018 auf ER+- Zelllinien veröffentlicht und belegt (Freiss et al., 2005). Es konnten in den Versuchen dieser Arbeit die Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Ly117018 ist ein potenter Wachstumshemmer in ER+ Zelllinien (MCF- 7) und hat keine hemmende Wirkung auf ER- Rezeptor negative Zelllinien (MDA- MB435). Es liegt also auf der Hand, dass die Hauptwirkungskomponente über den Östrogenrezeptor vermittelt wird.

Die Wirksamkeit von Ly117018 konnte auch in der Flowcytometry bestätigt werden: Hier sieht man bei den behandelten Zellen eine Veränderung im Zellzyklusmuster, die auf einen Zellzyklusarrest schließen lässt. Die Reduktion der Zellen, die sich in der G2-, wie auch in der S- Phase befinden, und die Vermehrung von Zellen in der G1- Phase lässt in erster Linie an einen G1- Zyklusarrest denken. Die Gründe für diese Wirkung sind wohl in der für Östrogen- positives Brustgewebe essentiellen Hemmung der Wachstumsstimulation durch Östrogene mit Hilfe von Ly117018 zu suchen. Es wird also einer der wichtigsten Wachstumsstimulatoren gehemmt, was konsequenter Weise zu

einer Wachstumshemmung in Form eines Zellzyklusarrestes führt (Takahashi et al., 2004). Eine Zellzyklusanalyse wurde von der ER- Zelllinie nicht durchgeführt.

Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, um mögliche Zufallseffekte zu vermeiden. Es bleibt noch anzumerken, dass die in dieser Arbeit verwendete ER+ Zelllinie MCF- 7, verglichen mit zitierten Arbeiten, relativ schwach auf Ly117018 reagierte, hier wird trotz regelmäßigen Passagieren und relativ kurzen Kulturzeiten von einer stetigen Veränderung der Zelllinien ausgegangen, was eine geringere Ansprechbarkeit zur Folge hätte.

Tabelle 4-1: Darstellung von zusammengefassten Versuchsergebnissen über Proliferation, Zellzyklusanalysen und Akt- Phosphorylierung, auch im Vergleich mit den eigenen erarbeiteten Ergebnissen.

Freiss et al.; 2005	MCF- 7 (ER+)	Ly117018 0,01 $\mu$ mo- lar	Proliferation	- (30-40%)
Freiss et al.; 2005	MCF- 7	Ly117018 0,01 + 0,001 $\mu$ molar Estra- diol	Proliferation	- (70-80%)
Thomson et al., 1988	MCF- 7	LY117018 0,1 $\mu$ mo- lar	Proliferation	- (10-20%)
Thomson et al., 1988	MDA MB 231 (ER-)	LY117018 0,1 $\mu$ mo- lar	Proliferation	+ (0-10%)
Eigene Daten	MCF- 7	Ly117080 0,001- 1 $\mu$ molar	Proliferation	- (18-33%)
Eigene Daten	MDA- MB435	Ly117080 0,001- 1 $\mu$ molar	Proliferation	+ (0-22)

Eigene Daten	MCF- 7	Ly117080 0,001- 1 $\mu$ molar	Zell- zyklus	6-28% mehr Zellen in G <sub>1</sub>
--------------	--------	----------------------------------	-----------------	--

Freiss et al., 2005	MCF- 7	Ly117018 5x 0,01+ 2x0,001 $\mu$ molar IGF- I	Phosphorylie- rungshemmung Akt zu P- Akt	- (80-85%)
Eigene Daten	MCF- 7	Ly117080 0,03- 0,3 $\mu$ molar	Phosphorylie- rungshemmung Akt zu P- Akt	- (2-16%)



### 4.1.2 Celecoxib

Eine ähnlich starke Wirkung konnte durch die Experimente mit Celecoxib an ER<sup>+</sup>-, wie auch an ER<sup>-</sup> Zelllinien erreicht werden. So konnte für beide Zelllinien (MDA- MB435 und MCF- 7) eine signifikante Wachstumshemmung nachgewiesen werden (Tabelle 4-2). Dieses Ergebnis zeigt, dass COX2- Inhibitoren zu einer Wachstumshemmung führen können, bzw., dass eine COX2- Überexpression das Wachstum von malignen Tumoren begünstigen kann (Zhang et al., 2004). Diese Ergebnisse konnten in der Zellzyklusanalyse bestätigt werden: Hier konnte für die ER<sup>+</sup>- Zelllinie MCF- 7 ein Zellzyklusarrest mit einer Zellzahlreduzierung in der G<sub>2</sub>- und S-Phase nachgewiesen werden, aber auch ein Rückgang in der Gesamtzahl der gemessenen Zellen, was eine Zunahme der toten Zellen und eine vorhergehende Mitosehemmung annehmen lässt. Gleiches gilt für die ER<sup>-</sup> Zelllinie MDA- MB435: Hier konnte ebenfalls einer Verringerung der Zellen in der G<sub>2</sub>- Phase und in der Gesamtzellzahl nachgewiesen werden und ein Mechanismus der Wachstumshemmung aufgezeigt werden. Diese Resultate reihen sich in die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen ein (Basu et al., 2004, Kundu et al., 2002).

Die Gründe für diese Wirkung bestehen in erster Linie darin, dass Arachidonsäure antiapoptotische Eigenschaften besitzt, und eine COX2- Überregulierung zu einem höheren Arachidonsäure- Umsatz führt, der durch Celecoxib unterdrückt wird. Ein weiterer Grund könnte die Eigenschaft von COX2 sein, die Prostaglandin- 2 (PGE<sub>2</sub>)- Aktivität zu erhöhen, was mit einer BCL- 2- Überregulation einhergeht. Es handelt sich hierbei also um zwei antiapoptotische Signalwege. Diese Effekte werden von Celecoxib unterdrückt und tragen zur Proliferationshemmung bei (Howe et al., 2001, Basu et al., 2005).

Ein weiterer Aspekt der durchgeführten Versuche ist die Fähigkeit von Celecoxib, in niedrigen Dosen, zwischen 1 und 10 μmolar, gering induzierend und nicht hemmend zu wirken. Han et al. beschrieben, dass man sehr hohe Konzentrationen benötigte, um Wachstumshemmung auszulösen (Han et al., 2004). Es ist also möglich, dass Celecoxib zu einer weiteren Induktion von COX2 führen könnte (im Sinne einer negativen Rückkopplung). Dieser COX2- Überschuss kann dann nicht ausreichend gehemmt werden, da nicht genügend Celecoxib vorhanden ist, was dann netto zu einem höheren COX2- Level führt, das wiederum mit einer Proliferationssteigerung einhergeht.

Die beiden bis jetzt diskutierten Ergebnisse zeigen, dass beide in dieser Arbeit benutzte Substanzen in Einzelexperimenten zu einer Wachstumshemmung führen und mit Zell-

zyklusveränderungen einhergehen, wohingegen die Wirkung des benutzen SERM (Selektiv Estrogen Receptor Modulator) nur auf der Östrogen- Rezeptor- positiven Zelllinie nachweisbar war. Diese Ergebnisse reihen sich ein in die Anzahl vieler bis dahin veröffentlichter und hier zitierter Artikel.

Tabelle 4-2: Darstellung von zusammengefassten Versuchsergebnissen über Proliferation, Zellzyklusanalysen und Akt- Phosphorylierung, auch im Vergleich mit den hier erarbeiteten Ergebnissen.

Lois et al., 2003	MCF-18	SC236 1-10µmolar	Proliferation	- (14-55%)
Fife et al., 2004	MDA-MB-435	Celecoxib 1,25µg/ml	Proliferation	- (55-65%)
Fife et al., 2004	PaCA2	Celecoxib 1,25µg/ml	Proliferation	- (10-20%)
Basu et al., 2004	MDA-MB-231	Celecoxib 20-60µmol/l	Proliferation	- (80-20%)
Kundu et al., 2002	66.1	Celecoxib 25-400µmolar	Proliferation	- (30->90%)
Eigene Daten	MCF- 7	Celecoxib 0,1- 50 µmolar	Proliferation	- (5-85%)
Eigene Daten	MDA-MD435	Celecoxib 0,1- 50 µmolar	Proliferation	- (8-67%)
Basu et al., 2004	MDA-MB-231	Celecoxib 40, 60µmolar	Apoptoseinduktion	22-100% mehr apoptotische Zellen
Kundu et al., 2002	66.1	Celecoxib 50µmolar	Zellzyklus	43% mehr Zellen in G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>
Basu et al., 2004	MDA-MB-468	Celecoxib 20- 60µmolar	Zellzyklus	signifikanter Arrest G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>
Eigene Daten	MCF- 7	Celecoxib 50 µmolar	Zellzyklus	50% weniger Zellen in der S, keine Veränderung G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>
Eigene Daten	MDA- MD435	Celecoxib 1- 50 µmolar	Zellzyklus	18-27% weniger Zellen in G <sub>2</sub>
Basu et al., 2004	MDA-MB-231	Celecoxib 20- 60µmolar	Phosphorylierungshemmung Akt zu P- Akt	bis zu 20%
Hsu et al., 2000	BCL-2, LN-Cap, PC3	Celecoxib 50µmolar	Phosphorylierungshemmung Akt zu P- Akt	signifikante Abnahme der Phosphorylierung
Eigene Daten	MCF- 7	Celecoxib 10 µmolar	Phosphorylierungshemmung Akt zu P- Akt	-25%
Diese Arbeit	MDA-MD435	Celecoxib 10- 30 µmolar	Phosphorylierungshemmung Akt zu P- Akt	-(52-72%)

### 4.1.3 Kombination, Synergismus

Die ersten Versuche, die den Zweck hatten, sich ein Bild des möglichen Synergismus zu machen, ergaben nicht für alle getesteten Konzentrationen eindeutige Synergismen, es wurden jedoch Tendenzen beschrieben, die einen Synergismus mehr als wahrscheinlich machen. Es fällt zwar bei allen Versuchen die Wirkung von Celecoxib stärker ins Auge, wobei man jedoch bei genaueren Analysen die Wirkung von Ly117018 nicht von der Hand weisen kann, auch wenn es in einigen Experimenten in erster Linie die induzierende Wirkung von Celecoxib unterdrückt. Es ist weiterhin davon auszugehen, dass durch die Konzentrationswahl, die sich am IC<sub>50</sub> der Substanzen orientierte, die Effekte, die Ly117018 in einem Synergismusexperiment hätte, von der Celecoxib- Einzelwirkung überlagert werden. Insgesamt gesehen ist es jedoch nicht gelungen, in allen möglichen Kombinationen ein klares Ergebnis herauszuarbeiten. Des Weiteren ist durch die Versuche noch ein wichtiger Aspekt deutlich geworden: In den Versuchen, in denen die ER- Zelllinie MDA- MB435 mit dem SERM Ly117018 behandelt wurde, zeigte sich keine Wirkung. In den Kombinationsversuchen konnte es auf der einen Seite die proliferativen Eigenschaften von Celecoxib in niedrigen Dosen nicht nur unterdrücken, sondern auch zum Teil die Wirkung von Celecoxib verstärken.

Bei den genaueren Untersuchungen von bestimmten Kombinationen kam es zu verschiedenen Ergebnissen. Für bestimmte Kombinationen sind signifikante und auch durch den Interaktionsindex belegbare Synergismen bewiesen worden. Zum anderen ergab sich bei sehr ähnlichen Kombinationen kein Synergismus, sondern zum Teil sogar ein subadditives Verhalten, also das Gegenteil eines Synergismus. Bei den Versuchen, bei denen eine synergistische Wachstumshemmung der beiden Substanzen nachgewiesen wurde (Celecoxib 30µmolar + Ly117018 0,6µmolar und Celecoxib 10µmolar + Ly117018 0,03µmolar), ergab sich in der Zellzyklusanalyse ein G1- Zellzyklusarrest mit weniger Zellen in der G2- und S- Phase, der mit einer Verringerung der Zellen im erfassten Gate einherging, was auf einen Zelltod und/oder Mitosehemmung hindeutet. So zeigen die Zellzyklusanalysen eine Mischung aus den Wirkungen der Einzelsubstanzen und damit eine Kombination aus Zellzyklusarrest und verringerter vitaler Zellzahl.

Wenn man von pharmakologischer Seite an diesen vermeintlichen Widerspruch zwischen super- und subadditivem Verhalten herangeht, kann es mehrere Erklärungen für dieses Phänomen geben. Es ist davon auszugehen, dass eine synergistische Wirkung von zwei Medikamenten, die nicht über den gleichen Rezeptor wirken, in erster Linie durch ihre eher unspezifischen Nebenwirkungen entsteht, oder es in der dem Rezeptor nachgeschalteten Signaltransduktionskette zu einem sich gegenseitig in der Wirkung verstärkenden Verhalten kommt. Es liegt damit auf der Hand, dass es in diesen Signalwegen auch zu Sättigungserscheinungen kommt, so dass ab bestimmten hohen Konzentrationen kein Aufpotenzieren der Einzelwirkungen über diese Seitenwege möglich ist. Der zweite wichtige Aspekt für eine mögliche gegenseitige Hemmung von bestimmten Konzentrationen liegt in einer möglichen chemischen Interaktion. Da die Substanzen gleichzeitig gegeben wurden und damit zusammen in einer Lösung waren, kommt es unter Umständen bei bestimmten Konzentrationskombinationen zu einer gegenseitigen chemischen oder sogar resorptiven Hemmung, d.h. zu momentan nicht bekannten Interaktionen. Es ist außerdem vorstellbar, dass gerade eine geringe Hemmung jeder Einzelsubstanz zu einer Verstärkung des Interaktionswirkungskreises führt, und es aufgrund dieser jeweils zu schwachen Hemmung zu einer Verstärkung der Signalwege kommt (Signalkette siehe nächster Abschnitt).

Viel interessanter als die nicht superadditiven Effekte sind hingegen die synergistischen und die damit verbundene Frage, wie und über welche Wege synergistische Wirkungsweisen überhaupt möglich sind. Die wichtigste Signalschleife, die Celecoxib und Ly117018 verbindet, führt über das COX2-Enzym. Östrogen kann über einen Regelmechanismus COX2 induzieren, was ein höheres COX2-Level zur Folge hat. COX2 synthetisiert seinerseits PGE<sub>2</sub>, was wiederum zu einer erhöhten Aromatase-Aktivität führt, einem zentralen Enzym der Östrogen-Produktion. Des Weiteren führt PGE<sub>2</sub> zu einer Erhöhung des HER2-Levels, was wiederum hemmend auf das RAS-Onkogen wirkt. Dieses forciert auf der einen Seite die Phosphorylierung von Akt zu P-Akt und führt auf der anderen Seite zu einer Steigerung der COX2-Produktion (Goss et al., 2004, Zaho et al., 1996, Michael et al., 1997, Bundred et al., 2005). Hemmt man nun diese Schleifen an zwei Stellen, so wird die gegenseitige Induktion blockiert, was zu einem Synergismus führen kann.

In den Western-Blots konnte in der ER<sup>+</sup>-Ziellinie unter der Behandlung von Ly117018 und Celecoxib, so wie auch in der Kombination eine Abnahme der Phosphorylierung von

Akt festgestellt werden. Der Effekt ist in den mit Ly117018 behandelten Zellen nur leicht ausgeprägt, nimmt bei der Celecoxib- Behandlung zu und ist in der Kombination am stärksten. In gleicher Reihenfolge nimmt auch die Anti- Akt- Detektion zu.

Bei der ER- Zelllinie nimmt P- Akt unter Celecoxib, so wie der Kombination aus Celecoxib und Ly117018 ab. Die Abnahme ist unter der Celecoxib- Behandlung am stärksten. Bei Zellen, die nur mit Ly117018 behandelt wurden, sieht man, verglichen mit der Kontrolle, geringe Veränderungen in der Akt- Phosphorylierung (Wu et al., 2003, Tabelle 4-1 und 4-2). Dieses zeigt, dass die Wirkungen der Substanzen über Signaltransduktionsketten mit einander verbunden sein müssen, da auf der einen Seite die Phosphorylierung von Akt durch Celecoxib, bei ER+- Zelllinien aber auch durch Ly117018 gehemmt wird. In der Kombination kommt es sogar in der ER+- Zelllinie zu einer Verstärkung des hemmenden Effektes, vor allem, wenn man sich vor Augen führt, dass die Akt Detektion, verglichen mit der Kontrolle, zunimmt. Ein möglicher Signalweg führt über PGE<sub>2</sub> und RAS- Onkogene, die jeweils einen steigenden Effekt auf die Phosphorylierung haben (siehe auch vorheriger Abschnitt).

Es bleibt zu bemerken, dass in den Synergismus- Untersuchung, wie auch in den Voruntersuchungen gezeigt wurde, Celecoxib stärker als Ly117018 wirkt, so dass die Ly117018- Zusatz- oder synergistische Wirkung zum Teil messmethodisch von Celecoxib überlagert sein könnte. Insgesamt fügen sich die Ergebnisse, die hier vorgelegt wurden, gut in die bekannte Literatur ein. Einige weiterführende Fragen über die genauen Signaltransduktionswege bleiben offen. Jedoch sind die Ergebnisse sehr viel versprechend und berechtigen in jedem Fall zu eine weiteren Verfolgung und Vertiefung der hier experimentell dargestellten Versuche und Ergebnisse.

## 4.2 Diskussion zu Celecoxib

In der Studie ,The Adematous Polyp Prevention on VIOXX (APPROVe- Studie), eine multizentrische, doppelblinde, placebokontrollierte Studie über eine dreijährige Behandlung mit Rofecoxib (VIOXX), einem selektiven COX2- Hemmer, erlitten 3,5% der mit Rofecoxib behandelten Patienten eine Myocardinfarkt oder einen Schlaganfall, in der Placebogruppe hingegen nur 1,9%. Die Unterschiede im Hinblick auf thrombembolische Ereignisse wurden nach 18 Monaten Behandlung deutlich. Nach Bekanntwerden dieser Ergebnisse wurde VIOXX, das zur Behandlung von Arthritis und Schmerzen zu-

gelassen worden war, von dem Hersteller Merck & Co am 30. September 2004 vom Markt genommen (Bresalier et al., 2005).

Im Gegensatz zu Rofecoxib wurden Celecoxib (Celebrex, Pfizer), so wie auch Valdecoxib (Bextra, Pfizer) von den behördlichen Zulassungsstellen - allen voran der FDA (US Food and Drug Administration) - für gut befunden und der Verkauf nicht weiter gestoppt (Ruschitzka, 2005).

Für Valdecoxib liegen ebenfalls Studien vor, bei denen es in der mit Valdecoxib behandelten Gruppe im Vergleich zur Placebo- Gruppe zu einer Clusterung von Myocardinfarkten kommt (Ott et al., 2003).

Bei Celecoxib steht man einer anderen Situation gegenüber: Hier konnte bislang noch keine signifikante Steigerung des Risikos für thrombembolische Ereignisse nachgewiesen werden, wobei Daten noch ausstehen. Zwischenanalysen und Metaanalysen lieferten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse, die auf eine Risikosteigerung hindeuten würden. Es muss jedoch noch angemerkt werden, dass in allen Studien, die zu diesem Problem herangezogen wurden, die Risikopatienten für Herzinfarkte und Schlaganfälle unterrepräsentiert waren (Graham, 2004).

Aus diesem Kontext heraus stellen sich zwei Fragen. Sind die einzelnen Coxibe unterschiedlich in ihrem Risiko für eine Erhöhung von Myokardinfarkten und Schlaganfällen zu bewerten? Es scheint so zu sein, dass die Risikoverteilung bei den unterschiedlichen Medikamenten auch verschieden ausfällt. Es ist wohl so, dass Rofecoxib die stärkste Risikoerhöhung zeigt und Celecoxib die geringste. Auch im direkten Vergleich ist das Myokardinfarkttrisiko bei einer Behandlung von Rofecoxib größer im Vergleich mit Celecoxib oder keiner NSAR- Einnahme (Solomon et al., 2004). Diese Risikounterschiede kommen wohl in erster Linie durch unterschiedliche chemische Strukturen zustande (Celecoxib ist ein Sulfoamid, Rofecoxib ein Sulfone). Darüber hinaus konnten mehrere Forschungsgruppen bei der Behandlung mit Celecoxib eine Verringerung der Entzündungsparameter (z. B. C- reaktives- Protein) für Endothelien feststellen. Celecoxib besitzt antioxidative Eigenschaften und führt insgesamt gesehen zu einer Verbesserung der Endozellfunktionen. Dysfunktionen wie auch Inflammation von Endothelien sind hingegen Pathomechanismen für Myokardischämien (Topol et al., 2004). Diese Effekte teilt Rofecoxib nicht mit Celecoxib, und sie sind nicht COX2- vermittelt (Ruschitzka, 2005).

Als Zweites stellt sich hier die Frage, warum in dieser Arbeit mit Coxiben gearbeitet wird. Die Antwort liegt auf der Hand. Celecoxib zeigt erstens nicht die starken Nebenwirkungen des vom Markt genommenen Rofecoxib. Ein weiterer Grund ist die sehr gut belegte Wirkung gegen Tumore verschiedenster Art. Hier sind besonders bei intestinalen Polypen, aber auch bei malignen Tumoren, wie dem Mammakarzinom gute Therapieansätze entstanden. In den vorliegenden Versuchen konnte die Wirkung auf Brustkrebszellen wieder bestätigt werden, was eine Forschung mit dieser Substanz nicht nur als berechtigt, sondern auch als nötig erscheinen läßt (Yodfat, 2004). Man muss zwar einräumen, dass mögliche vaskuläre Nebenwirkungen bei einer Behandlung von Celecoxib auftreten können, jedoch werden sich Regime finden lassen, in denen die Risiko-Nutzen- Abwägung zu Gunsten des Nutzens ausfallen könnte. Des Weiteren sind die Versuche an Zelllinien durchgeführt worden, auch wenn man dabei das Ziel einer klinischen Relevanz nicht aus den Augen verloren hat, aber die Untersuchungen stützen sich momentan nur auf einen theoretischen Nutzen, der in Form von Zellanalysen ein Wirk-samkeit nachweisen will, nicht aber eine bloße Nebenwirksamkeit.

### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Man konnten in den Versuchen die wachstumshemmende Wirkung von Ly117018 mit einem Zellzyklusarrest und eine Hemmung der Phosphorylierung von Akt an einer ER+-Zelllinie (MCF- 7) nachweisen. Auch für Celecoxib konnte eine Wachstumshemmung für ER+, wie auch ER- (MDA- MB435)- Zelllinien experimentell dargestellt werden. Die Zellzyklusanalyse zeigte Ergebnisse, die auf einen Arrest und auf Zelluntergang bzw. auf Mitosehemmung hindeuten, so wie auf eine gehemmte Phosphorylierung von Akt zu p- Akt. In den Kombinationsversuchen konnte in Zellwachstums- Übersichtsversuchen ein möglicher Synergismus nachgewiesen werden, der dann anschließend für bestimmte Kombinationen (Celecoxib 10 + Ly117018 0,03µmolar und Celecoxib 30 + Ly117018 0,6µmolar) auch validiert werden konnte, wobei dieses nicht mit allen Konzentrations- Kombinationen eindeutig nachgewiesen werden konnte. Erzielt wurden Wachstumshemmungen, Zellzyklusveränderungen im Sinne eines kombinierten Arrests mit Zelluntergang (möglicherweise Apoptose) und eine Hemmung der Phosphorylierung von Akt.

Insgesamt bleibt festzuhalten:

1. Celecoxib ist ein Medikament, das das Wachstum von ER- und ER+ Mammakarzinomzellen in vitro über Veränderungen im Zellzyklus und eine Verringerung der Aktivierung von Akt hemmen kann.
2. Ly117018 kann über Zellzyklusarrest und Verringerung der Phosphorylierung von Akt zu P- Akt eine Hemmung im Wachstum bei ER+- Mammakarzinomzellen in vitro bewirken.
3. Beide Medikamente sind auf diese Weise mögliche Substanzen in der antitumörösen Therapie.
4. Die Kombination aus Ly117018 und Celecoxib ist theoretisch eine viel versprechende Kombination, die zu einem Synergismus führen kann. Es konnten experimentell Hinweise für einen Synergismus gefunden werden, der für bestimmte Kombinationen auch nachgewiesen werden konnte. Der Synergismus geht mit stärkerer Wachstumshemmung einher, führt zu Veränderungen im Zellzyklus (eine Kombination aus Mitosehemmung, Zelluntergang und Zyklusarrest) und zu einer Hemmung der Phosphorylierung von Akt zu P- Akt bei Mammakarzinomzellen (sowohl ER+-, als auch Er- Zellen) in vitro.

Selbst wenn in vitro ein möglicher Synergismus auf der Grundlage dieser Versuche nahe liegt, ist noch keine Aussage über eine in vivo- Wirkung gemacht worden. Des Weiteren wurde nur an zwei Zelllinien geforscht, so dass die Versuche noch an weiteren Zelllinien wiederholt werden müssten, auch wenn sich beide Medikamente in klinischen Studien befinden. Es bleibt abzuwarten, wie sich die Substanzen im Synergismus in vivo verhalten. Für die Einzelsubstanzen ist die Wirksamkeit wie auch die Verträglichkeit weitgehend belegt, nicht jedoch für die Kombination. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Untersuchung der Signalwege, über die der Synergismus abläuft. Auch dazu sind in dieser Arbeit nur erste Erkenntnisse und weitergehende im Zusammenhangstehende Möglichkeiten geäußert worden, so dass hier noch weiterführende Experimente anzustreben sind.



## 5 Zusammenfassung

Mammakarzinome sind die häufigsten malignen Tumore der Frau. Die Analyse der Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptoren (PR) wird routinemäßig durchgeführt. Der Rezeptorstatus stellt einen Prädiktions- und Prognosefaktor dar. ER+- Mammakarzinome lassen sich mit Selective estrogen receptor modulators (SERMs) behandeln. Zu dieser Gruppe gehört Ly117018, ein Raloxifenanalogon: Raloxifen besitzt ein chemopräventives Potential, in klinischen Studien konnte die Verringerung der Inzidenz des invasiven Mammakarzinoms gezeigt werden. Cyclooxygenasen (COX) sind die Schlüsselenzyme für die Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure, zwei Enzymproteine, COX1 und COX2 sind molekular charakterisiert. Eine hohe COX2- Expression in Brustkrebszellen korreliert mit einer schlechteren Prognose, dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen, schlechter Differenzierung, großer Tumormasse und starker vaskulärer Invasion. Ein selektiver COX2- Hemmer ist Celecoxib, das in Studien das Brustkrebsrisiko signifikant senkte.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Hypothese experimentell geprüft, dass Celecoxib und Ly117018 synergistisch die Proliferation von zwei Mammakarzinom- Zelllinien, eine ER+- (MCF- 7) und eine ER- (MDA- MB435)- Linie, hemmt. Die Hypothese des möglichen Synergismus basiert auf bekannten Interaktionen in der Signaltransduktion, die zwischen Prostaglandinen ( $\text{PGE}_2$ ) und dem RAS- Onkogen beschrieben sind, der regulatorischen Wechselwirkung zwischen ER-, Aromatase- und COX2-Expression und Aktivität, so wie membraninduzierten Effekten von Östrogen.

Als Methoden wurden Proliferationsassays in vitro mit colorimetrischer Analyse und Zellzyklusanalysen mit Hilfe der Flowcytometry durchgeführt. Mittels Western- Blots und Immunocetektion wurden die Akt- Proteinmenge und die Akt- Phosphorylierung semiquantitativ bestimmt.

Für Ly117018 wurde eine signifikante Wachstumshemmung (bei  $1\mu\text{molar}$  mit  $P < 0,05$ ) mit einem Zellzyklusarrest in der G1- Phase und Hemmung der Phosphorylierung von Akt bei der ER+- Zelllinie festgestellt. Ly117018 hatte als Einzelsubstanz keinen Effekt auf die ER- Zelllinie. Celecoxib verursachte eine signifikante Proliferationshemmung (bei  $50\mu\text{molar}$  mit  $P < 0,05$ ) in beiden behandelten Zelllinien. MCF- 7 reagierte mit einem Zellzyklusarrest, MDA- MB mit Zelluntergang und Zellzyklusarrest. Beide Zelllinien zeigten eine Hemmung der Phosphorylierung von Akt zu P- Akt infolge der Be-

handlung mit den Substanzen. Es konnte für die Kombinationen Celecoxib 30 $\mu$ molar + Ly117018 0,6 $\mu$ molar und Celecoxib 10 $\mu$ molar + Ly117018 0,03 $\mu$ molar ein Synergismus mit einem Interaktionsindex  $< 1$  nachgewiesen werden. Im Synergismus reagierten die Zellen mit einer Kombination aus Zellzyklusarrest und Zelluntergang. Ebenso konnte für die erfolgreichen Kombinationen eine Hemmung der Phosphorylierung von Akt nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Celecoxib ein potenter Wachstumshemmer für ER $^{+/-}$ , wie auch für ER $^{-}$  Mammakarzinomzellen in vitro ist. Ly117018 ist ein potenter Wachstumshemmer für ER $^{+}$  Mammakarzinomzelllinien. Erstmalig konnte ein Synergismus experimentell für ausgewählte Konzentrationen, in Proliferationsexperimenten, Zellzyklusanalysen und Akt- Phosphorylierungen, nachgewiesen werden, so für die Kombinationen Celecoxib 30 $\mu$ molar + Ly117018 0,6 $\mu$ molar und Celecoxib 10 $\mu$ molar + Ly117018 0,03 $\mu$ molar mit einem Interaktionsindex  $< 1$ . Die erzielten Ergebnisse zeigen erstmalig einen synergistischen antiproliferativen Effekt von Celecoxib und Ly117018 bei hormonabhängigen und –unabhängigen Mammakarzinomzellen in vitro, assoziiert ist ein Verminderung der Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase Akt. Die neuen Daten dieser Arbeit sowie aus der Literatur rechtfertigen weitere Versuche mit beiden Substanzen an Mammkarzinomzelllinien und unterstützen die Perspektive, beide Substanzen beim Mammakarzinom auch in klinischen Studien zu prüfen.

## 6 Literatur

1. Alpert TE, Haffty BG. Conservative management of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. *Clin Breast Cancer* 2004;5(1):37-42.
2. Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, Harris RE. Chemotherapeutic evaluation of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model. *Oncol Rep* 2000;7(6):1377-81.
3. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997;277(5328):965-8.
4. AWMF. [www.leitlinien.net](http://www.leitlinien.net), 2004.
5. Baker VL, Draper M, Paul S, et al. Reproductive endocrine and endometrial effects of raloxifene hydrochloride, a selective estrogen receptor modulator, in women with regular menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(1):6-13.
6. Barrett-Connor E, Wenger NK, Grady D, et al. Coronary heart disease in women, randomized clinical trials, HERS and RUTH. *Maturitas* 1998;31(1):1-7.
7. Bartels B. Physiologie. München, 1998.
8. Bässler R. Pathologie der Brustdrüse. Berlin: Bässler,R, 1978.
9. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7(4):R422-35.
10. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ, Mukherjee P. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res* 2004;2(11):632-42.
11. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989;56(3):335-44.
12. Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 1996;61(4):240-51.
13. Becker N. [Development of the incidence and mortality of breast cancer]. *Radiologie* 2001;41(4):337-43.
14. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005;94:29-86.
15. Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther* 2004;3(3):268-75.
16. Bensen WG, Fiechtner JJ, McMillen JI, et al. Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc*

- 1999;74(11):1095-105.
17. Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *Embo J* 1990;9(9):2811-8.
  18. Boland GP, Butt IS, Prasad R, Knox WF, Bundred NJ. COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer* 2004;90(2):423-9.
  19. Bombardier C, Laine L, Reicin A, 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):1520-8, 2 p following 1528.
  20. Borrás M, Jin L, Bouhoute A, Legros N, Leclercq G. Evaluation of estrogen receptor, antiestrogen binding sites and calmodulin for antiestrogen resistance of two clones derived from the MCF-7 breast cancer cell line. *Biochem Pharmacol* 1994;48(11):2015-24.
  21. Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res* 2001;61(3):903-7.
  22. Bremer M, Steinmann D, Dork T, Borger J, Rades D, Karstens JH. [Bilateral breast carcinoma and local recurrence: prevalence of BRCA-1 and BRCA-2 gene mutations in an unselected patient sample]. *Strahlenther Onkol* 2001;177(7):325-9.
  23. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005;352(11):1092-102.
  24. Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS, Cailleau RM. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1980;40(9):3118-29.
  25. Brooks SC, Locke ER, Soule HD. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 1973;248(17):6251-3.
  26. Brown JR, DuBois RN. COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol* 2005;23(12):2840-55.
  27. Brueggemeier RW, Richards JA, Petrel TA. Aromatase and cyclooxygenases: enzymes in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86(3-5):501-7.
  28. Bundred NJ, Barnes NL. Potential use of COX-2-aromatase inhibitor combinations in breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93 Suppl 1:S10-5.
  29. Burian M, Geisslinger G. [Clinical pharmacology of the selective COX-2 inhibi-

- tors]. *Orthopade* 2003;32(12):1078-87.
30. Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 1978;14(11):911-5.
  31. Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 1990;265(33):20686-91.
  32. Chen PL, Sellers TA, Rich SS, Potter JD, Folsom AR. Examination of the effect of nongenetic risk factors on the familial risk of breast cancer among relatives of postmenopausal breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3(7):549-55.
  33. Chow LW, Loo WT, Toi M. Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2005;59 Suppl 2:S281-4.
  34. Chrabusta SJ. Long-term survival in primary breast cancer: correlation with estrogen and progesterone receptor assay results and adjuvant tamoxifen therapy. *MEDSCIMONIT* 2004.
  35. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344(4):276-85.
  36. Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, et al. Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 1995;9(11):1441-54.
  37. Cummings. MOORE-Studie. 1999.
  38. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* 1999;281(23):2189-97.
  39. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, et al. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* 2003;361(9354):296-300.
  40. Cypriani B, Tabacik C, Descomps B. Effect of estradiol and antiestrogens on cholesterol biosynthesis in hormone-dependent and -independent breast cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1988;972(2):167-78.
  41. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, et al. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001;2(9):544-51.
  42. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Lin DT, Subbaramaiah K. Inhibition of cyclooxygenase-2: an approach to preventing cancer of the upper aerodigestive tract. *Ann N Y Acad Sci* 2001;952:109-15.
  43. Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxy-

- genase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol* 2005;23(2):254-66.
44. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997;337(23):1641-7.
  45. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127(7):411-7.
  46. Dermond O, Ruegg C. Inhibition of tumor angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: emerging mechanisms and therapeutic perspectives. *Drug Resist Updat* 2001;4(5):314-21.
  47. Dickler MN, Norton L. The MORE trial: multiple outcomes for raloxifene evaluation--breast cancer as a secondary end point: implications for prevention. *Ann NY Acad Sci* 2001;949:134-42.
  48. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312(3):146-51.
  49. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107(4):1183-8.
  50. Eisen GM, Goldstein JL, Hanna DB, Rublee DA. Meta-analysis: upper gastrointestinal tolerability of valdecoxib, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, compared with nonspecific nonsteroidal anti-inflammatory drugs among patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21(5):591-8.
  51. Eisen SF, Brown HA. Selective estrogen receptor (ER) modulators differentially regulate phospholipase D catalytic activity in ER-negative breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2002;62(4):911-20.
  52. Emery P. Clinical aspects of COX-2 inhibitors. *Drugs Today (Barc)* 1999;35(4-5):267-74.
  53. Emery P, Zeidler H, Kvien TK, et al. Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomised double-blind comparison. *Lancet* 1999;354(9196):2106-11.
  54. Everts B, Wahrborg P, Hedner T. COX-2-Specific inhibitors--the emergence of a new class of analgesic and anti-inflammatory drugs. *Clin Rheumatol* 2000;19(5):331-43.
  55. Feyerabend T, Wiedemann GJ, Jager B, Vesely H, Mahlmann B, Richter E. Local hyperthermia, radiation, and chemotherapy in recurrent breast cancer is feasible and

- effective except for inflammatory disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49(5):1317-25.
56. Fife RS, Stott B, Carr RE. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cancer cells in vitro. *Cancer Biol Ther* 2004;3(2):228-32.
57. Figtree GA, McDonald D, Watkins H, Channon KM. Truncated estrogen receptor alpha 46-kDa isoform in human endothelial cells: relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation* 2003;107(1):120-6.
58. Frankfurt A. Conference Paper. AGO, 2005.
59. Freiss G, Galtier F, Puech C, et al. Anti-growth factor activities of benzothiophenes in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94(5):451-60.
60. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, et al. Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters. *Cancer Res* 2003;63(10):2434-9.
61. Gajdos C, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators as a new therapeutic drug group: concept to reality in a decade. *Clin Breast Cancer* 2002;2(4):272-81.
62. Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for anti-angiogenic therapy. *Semin Oncol* 2004;31(2 Suppl 7):2-11.
63. Gennings C, Carter WH, Jr., Campbell ED, et al. Isobolographic characterization of drug interactions incorporating biological variability. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;252(1):208-17.
64. Gilbert RS, Reddy ST, Kujubu DA, Xie W, Luner S, Herschman HR. Transforming growth factor beta 1 augments mitogen-induced prostaglandin synthesis and expression of the TIS10/prostaglandin synthase 2 gene both in Swiss 3T3 cells and in murine embryo fibroblasts. *J Cell Physiol* 1994;159(1):67-75.
65. Gill PG, Gebiski V, Snyder R, et al. Randomized comparison of the effects of tamoxifen, megestrol acetate, or tamoxifen plus megestrol acetate on treatment response and survival in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 1993;4(9):741-4.
66. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(17):3357-65.
67. Goldstein SR, Siddhanti S, Ciaccia AV, Plouffe L, Jr. A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. *Hum Reprod Update* 2000;6(3):212-24.
68. Goss PE. Breast cancer prevention--clinical trials strategies involving aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86(3-5):487-93.
69. Goss PE, Strasser-Weippl K. Prevention strategies with aromatase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 2):372S-9S.

70. Graham D. Risk of acute cardiac events among patients treated with cyclooxygenase-2 selective and non-selective nonsteroidal antiinflammatory drugs. 20th Annual Meeting of The International Society for Pharmacoepidemiology Conference on Pharmacoepidemiology, 2004.
71. Gronemeyer H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet* 1991;25:89-123.
72. Group EBCTC. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, 1995.
73. Guastalla JP, Bachelot T, Ray-Coquard I. [Cyclooxygenase 2 and breast cancer. From biological concepts to therapeutic trials]. *Bull Cancer* 2004;91 Spec No:S99-108.
74. Guo GL, Yao ZX, Wu J. [The clinical significance of expression of cyclooxygenase-2 gene in breast cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003;83(19):1661-4.
75. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002;62(6):1676-81.
76. Han C, Leng J, Demetris AJ, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004;64(4):1369-76.
77. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res* 2000;60(8):2101-3.
78. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002;23(3):144-50.
79. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(3):229-37.
80. Haynes BP, Dowsett M, Miller WR, Dixon JM, Bhatnagar AS. The pharmacology of letrozole. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;87(1):35-45.
81. Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001;8(2):97-114.
82. Institut RK. [www.rki.de](http://www.rki.de), 2003.
83. Jordan VC. Antiestrogens and the reduction in circulating cholesterol. *J Clin Oncol* 1996;14(8):2407-8.
84. Juni P, Rutjes AW, Dieppe PA. Are selective COX 2 inhibitors superior to traditional non steroidal anti-inflammatory drugs? *Bmj* 2002;324(7349):1287-8.



85. Karow. Pharmakologie und Toxikologie, 2004.
86. Kelsey JL. Breast cancer epidemiology: summary and future directions. *Epidemiol Rev* 1993;15(1):256-63.
87. Kelsey JL, Fischer DB, Holford TR, et al. Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1981;67(2):327-33.
88. Koolman JR, K-H. Taschenatlas der Biochemie. 2 ed. Stuttgart: Koolman,Röhm, 1997.
89. Korach KS, Couse JF, Curtis SW, et al. Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res* 1996;51:159-86; discussion 186-8.
90. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138(3):863-70.
91. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(12):5925-30.
92. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. 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):12866-72.
93. Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988;55(1):145-56.
94. Kundu JK, Chun KS, Kim SO, Surh YJ. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse skin: MAPKs and AP-1 as potential molecular targets. *Biofactors* 2004;21(1-4):33-9.
95. Kundu N, Smyth MJ, Samsel L, Fulton AM. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res Treat* 2002;76(1):57-64.
96. Levine L. Tamoxifen and the Raloxifene analog LY117018: their effects on arachidonic acid release from cells in culture and on prostaglandin I<sub>2</sub> production by rat liver cells. *BMC Cancer* 2004;4:49.
97. Linnemann K. Biochemie für Mediziner. 6 ed. Berlin: Linnemann,Kühl, 2002.
98. Lisse JR, Perlman M, Johansson G, et al. Gastrointestinal tolerability and effectiveness of rofecoxib versus naproxen in the treatment of osteoarthritis: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2003;139(7):539-46.

99. Liu CH, Chang SH, Narko K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276(21):18563-9.
100. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(23):11162-6.
101. MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998;50(2):151-96.
102. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 1999;274(33):22903-6.
103. Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E, et al. Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(23):1751-61.
104. Michael MD, Michael LF, Simpson ER. A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol Cell Endocrinol* 1997;134(2):147-56.
105. Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, et al. Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, oestrogen receptor-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001;8(3):175-82.
106. Nicoletto MO, Donach M, De Nicolo A, Artioli G, Banna G, Monfardini S. BRCA-1 and BRCA-2 mutations as prognostic factors in clinical practice and genetic counselling. *Cancer Treat Rev* 2001;27(5):295-304.
107. O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, Young DA. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* 1991;266(34):23261-7.
108. Onkologie Ag. [www.ago-online.de](http://www.ago-online.de), 2005.
109. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005;23(8):1616-22.
110. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res* 2001;7(12 Suppl):4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
111. Ott E, Nussmeier NA, Duke PC, et al. Efficacy and safety of the cyclooxygenase 2 inhibitors parecoxib and valdecoxib in patients undergoing coronary artery bypass

- surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125(6):1481-92.
112. Parker MG, Fawell SE, Danielian P, Arbuckle N. Role of ligand in oestrogen-receptor function. *Biochem Soc Trans* 1991;19(4):897-9.
113. Pasqualini JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 2004;1654(2):123-43.
114. Peto J, Mack TM. High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. *Nat Genet* 2000;26(4):411-4.
115. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1659-72.
116. Picot D, Garavito RM. Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure. *FEBS Lett* 1994;346(1):21-5.
117. Prosperi JR, Mallery SR, Kigerl KA, Erfurt AA, Robertson FM. Invasive and angiogenic phenotype of MCF-7 human breast tumor cells expressing human cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2004;73(3-4):249-64.
118. Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(3):632-5.
119. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 2002;288(3):321-33.
120. Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 2001;93(4):497-506.
121. Ruschitzka FT. Clinical trials report. The APPROVe study: what we should learn from the VIOXX withdrawal. *Curr Hypertens Rep* 2005;7(1):41-3.
122. Sadosky Y, Adler S. Selective modulation of estrogen receptor action. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(1):3-5.
123. Schneeweiss S, Glynn RJ, Tsai EH, Avorn J, Solomon DH. Adjusting for unmeasured confounders in pharmacoepidemiologic claims data using external information: the example of COX2 inhibitors and myocardial infarction. *Epidemiology* 2005;16(1):17-24.
124. Scholl SM, Huff KK, Lippman ME. Antiestrogenic effects of LY 117018 in MCF-7 cells. *Endocrinology* 1983;113(2):611-7.
125. Schulz K-D AU. Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland. München: Zuckschwerdt-Verlag, 2003.

126. Schwab M, Claas A, Savelyeva L. BRCA2: a genetic risk factor for breast cancer. *Cancer Lett* 2002;175(1):1-8.
127. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 2002;160(2):597-604.
128. Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *Jama* 1999;282(13):1254-7.
129. Sheng H, Shao J, Hooton EB, Tsujii M, DuBois RN, Beauchamp RD. Cyclooxygenase-2 induction and transforming growth factor beta growth inhibition in rat intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* 1997;8(4):463-70.
130. Sherar M, Liu FF, Pintilie M, et al. Relationship between thermal dose and outcome in thermoradiotherapy treatments for superficial recurrences of breast cancer: data from a phase III trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;39(2):371-80.
131. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(12):926-35.
132. Siciliano MJ, Barker PE, Cailleau R. Mutually exclusive genetic signatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker. *Cancer Res* 1979;39(3):919-22.
133. Silbernagel S. Taschenatlas der Physiologie. 5 ed. Stuttgart: Silberna-gel, Despopolos, 2001.
134. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama* 2000;284(10):1247-55.
135. Simon LS, Weaver AL, Graham DY, et al. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Jama* 1999;282(20):1921-8.
136. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271(52):33157-60.
137. Solomon DH, Schneeweiss S, Glynn RJ, et al. Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. *Circulation* 2004;109(17):2068-73.
138. Song RX, McPherson RA, Adam L, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol*

- Endocrinol* 2002;16(1):116-27.
139. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973;51(5):1409-16.
140. Takahashi K, Ohmichi M, Yoshida M, et al. Both estrogen and raloxifene cause G1 arrest of vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol* 2003;178(2):319-29.
141. Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298(3):865-72.
142. Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain* 2002;98(1-2):163-8.
143. Tallarida RJ, Stone DJ, Jr., Raffa RB. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sci* 1997;61(26):PL 417-25.
144. Thompson EW, Katz D, Shima TB, Wakeling AE, Lippman ME, Dickson RB. ICI 164,384, a pure antagonist of estrogen-stimulated MCF-7 cell proliferation and invasiveness. *Cancer Res* 1989;49(24 Pt 1):6929-34.
145. Thompson EW, Reich R, Shima TB, et al. Differential regulation of growth and invasiveness of MCF-7 breast cancer cells by antiestrogens. *Cancer Res* 1988;48(23):6764-8.
146. Tong D, Schuster E, Seifert M, Czerwenka K, Leodolte S, Zeillinger R. Expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2002;71(3):249-55.
147. Topol EJ. Failing the public health--rofecoxib, Merck, and the FDA. *N Engl J Med* 2004;351(17):1707-9.
148. Turnheim K. [Coxibs: cyclooxygenase-2 inhibitors]. *Wien Klin Wochenschr* 2001;113(15-16):558-65.
149. Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989;57(7):1139-46.
150. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama* 2006;295(23):2727-41.
151. Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, et al. Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *Jama* 1998;279(18):1445-51.
152. Webster NJ, Green S, Jin JR, Chambon P. The hormone-binding domains of the

- estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 1988;54(2):199-207.
153. Witters LM, Crispino J, Fraterrigo T, Green J, Lipton A. Effect of the combination of docetaxel, zoledronic acid, and a COX-2 inhibitor on the growth of human breast cancer cell lines. *Am J Clin Oncol* 2003;26(4):S92-7.
154. Wu T, Leng J, Han C, Demetris AJ. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3(3):299-307.
155. www.leitlinien.net. Gynäkologische Leitlinien, 2004.
156. www.oncoconferences.ch. 2004.
157. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(7):2692-6.
158. Yang NN, Venugopalan M, Hardikar S, Glasebrook A. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17beta-estradiol and raloxifene. *Science* 1996;273(5279):1222-5.
159. Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *Embo J* 1992;11(10):3681-94.
160. Yodfat Y. [Is there a future for COX-2 inhibitors?]. *Harefuah* 2004;143(11):820-4, 837.
161. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* 2004;215(1):1-20.
162. Zhang S, Lawson KA, Simmons-Menchaca M, Sun L, Sanders BG, Kline K. Vitamin E analog alpha-TEA and celecoxib alone and together reduce human MDA-MB-435-FL-GFP breast cancer burden and metastasis in nude mice. *Breast Cancer Res Treat* 2004;87(2):111-21.
163. Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 1996;137(12):5739-42.

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem sehr engagiertem Betreuer, Herrn Dr. K. Baumann, so wie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. U. Wagner, die diese Arbeit initialisierten und sie mich in ihren Abteilungen anfertigen ließen. Für ihre freundliche Unterstützung, die gute Betreuung und die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmittel bin ich ihnen zu großem Dank verpflichtet.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. S. Reinartz, Herrn A. Allmeroth und Frau T. Plaum so wie dem ganzen Team des onkologischen Forschungslabors der Frauenklinik, die diese Arbeit wissenschaftlich, technisch, lehrreich und emotional sehr gewissenhaft betreuten und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich bin ebenfalls sehr dankbar für das äußerst angenehme Arbeitsklima, in dem es sich wunderbar arbeiten ließ, und für die gute Unterstützung besonders bei technischen Problemen.

Daneben möchte ich I. Eggemann für ein perfektes Arbeitsteam danken, H. Curth für die technische Hilfe und Unterstützung, so wie F. Müller für das permanente Korrekturlesen.

Meinen Eltern möchte ich für die dauerhafte Unterstützung danken, die mir mein Studium ermöglicht hat, meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und vor allem ihre Geduld.

## 7.2 Akademische Lehrer

Meine Akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Aumüller, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Baum, Prof. Dr. Behr, Prof. Dr. Bertalanffy, Prof. Dr. Bien, Prof. Dr. Cetin, Prof. Dr. Christiansen, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Dr. Doss, Prof. Dr. Fruhstorfer, Prof. Dr. Gemsa, Prof. Dr. Göke, Prof. Dr. Görg, Dr. Görg, Prof. Dr. Gotzen, Prof. Dr. Griss, Prof. Dr. Grzeschik, Prof. Dr. Happle, Prof. Dr. Dr. Hartmann, Prof. Dr. Hasilik, Prof. Dr. Heeg, Prof. Dr. Hofmann, Prof. Dr. Joseph, Prof. Dr. Kern, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Klose, Prof. Dr. Krause, Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Kuhn, Prof. Dr. Lennartz, Prof. Dr. Lorenz, Prof. Dr. Maisch, , Prof. Dr. Maier, Prof. Dr. Mennel, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Moosdorf, Prof. Dr. Mueller, Prof. Dr. Niessing, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Remschmidt, Prof. Dr. Richter, Prof. Dr. Rothmund, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmidt, Prof. Dr. Schüffel, Prof. Dr. Schulz, Prof. Dr. Schwarz, Prof. Dr. Seitz, Prof. Dr. Seyberth, Prof. Dr. Slenczka, Prof. Dr. Sommer, Prof. Dr. Steiniger, Dr. Stiletto, Prof. Dr. Sturm, Prof. Dr. Vohland, Prof. Dr. Voigt, , Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Werner, Prof. Dr. von Wichert