Aus der Klinik für Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie und Onkologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. U.Wagner

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Synergistische Effekte von Celecoxib und Zoledronsäure beim humanen Ovarialkarzinom in vitro

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

vorgelegt von

Isabel Eggemann

aus Aachen

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 24.09.2009
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Prof. Dr. Uwe Wagner
1. Korreferent: Prof. Dr. K.-H. Pflüger

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 4

1.1 OVARIALKARZINOM 4

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie 4

1.1.2 Prognose 4

1.1.3 Risikofaktoren 5

1.1.4 Therapie 5

1.2 ZOLEDRONSÄURE 6

1.2.1 Aufbau 6

1.2.2 Wirkungsweise 7

1.2.3 In vitro Effekte 9

1.2.4 In vivo Effekte 10

1.2.5 Im Synergismus mit anderen Therapeutika 11

1.3 CELECOXIB 12

1.3.1 Wirkungsweise 13

1.3.1.1 COX-abhängige Wirkmechanismen 14

1.3.1.2 COX-unabhängige Wirkmechanismen 15

1.3.2 In vitro Studien 15

1.3.3 In vivo Studien 16

1.3.4 Im Synergismus mit anderen Therapeutika 16

1.3.5 Akt/ Proteinkinase B 16

1.3.5.1 Aktivierung von Akt/ PKB 17

1.3.5.2 Wirkung von Akt/ PKB 17

1.3.5.3 Akt/ PKB als Angriffspunkt der Anti-Tumor-Therapie 18

1.4 SYNERGISMUS 19

1.4.1 Definition 19

1.4.2 Anwendung von synergistischen Wirkungen 19

1.4.3 Theorie des Synergismus 19

1.4.4 Molekulare Hintergründe 21

1.4.5 Anwendung der Synergismus-Theorie auf Celecoxib und Zoledronsäure 21

1.5 FRAGESTELLUNG 22

2 MATERIAL UND METHODEN 24

2.1 MATERIAL 24

2.1.1 Zellkultur 24

2.1.2 Proliferationsassay 26

2.1.3 FACS 27

2.1.4 Western Blot 28

2.2 METHODEN 32

2.2.1 Zellkultur 32

2.2.1.1 Kulturbedingungen 32

2.2.1.2 Passagieren von Zellen ... 33
2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen ... 33
2.2.1.4 Reaktivierung kryokonservierter Zellen ... 33
2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl ... 33
2.2.2 Proliferationsassay mittels Kristallviolettfärbung ... 34
2.2.2.1 Durchführung ... 34
2.2.2.2 Bestätigung der Abhängigkeit der Extinktion von der Zelldichte ... 34
2.2.2.3 Zeitabhängigkeit ... 35
2.2.2.4 Konzentrationsabhängigkeit ... 36
2.2.2.5 Kombinationsversuch ... 37
2.2.3 FACS ... 38
2.2.3.1 Präparation von Zellen für die Zellzyklusanalyse am FACS-Gerät ... 38
2.2.3.2 Durchführung der FACS-Messung ... 39
2.2.3.3 Auswertung der Daten ... 40
2.2.4 Western-Blot ... 40
2.2.4.1 Prinzip der Western-Blot-Methode ... 40
2.2.4.2 Vorbereitung der Zellen ... 41
2.2.4.3 Lyse ... 41
2.2.4.4 Proteinbestimmung mittels PIERCE Protein Assay Kit ... 41
2.2.4.5 Direkte Vorbereitung des Blots ... 42
2.2.4.6 Auftrennung der Proteine und Blotting ... 43
2.2.4.7 Ponceau-S Färbung ... 43
2.2.4.8 Silberfärbung ... 44
2.2.4.9 Blocken ... 44
2.2.4.10 Detektion ... 44
2.2.4.11 Stripping ... 45
2.2.5 Statistik ... 45

3 ERGEBNISSE ... 46

3.1 PROLIFERATIONSASSAY ... 46
3.1.1 Zeitabhängigkeit Celecoxib ... 46
3.1.1.1 BG1- Zellen ... 46
3.1.1.2 SKOV-3-Zellen ... 48
3.1.2 Zeitabhängigkeit Zoledronsäure ... 49
3.1.2.1 BG1-Zellen ... 49
3.1.2.2 SKOV-3-Zellen ... 50
3.1.3 Konzentrationsabhängigkeit Celecoxib ... 51
3.1.3.1 BG1-Zellen ... 51
3.1.3.2 SKOV-3-Zellen ... 52
3.1.4 Konzentrationsabhängigkeit Zoledronsäure ... 53
3.1.4.1 BG1-Zellen ... 53
3.1.4.2 SKOV-3-Zellen ... 54
3.1.5 Zusammenfassung der IC-Werte ... 55
3.1.6 Kombination aus Celecoxib und Zoledronsäure ... 55
3.1.6.1 BG1-Zellen ... 56

3.1.6.2 SKOV-3-Zellen ... 58
3.1.6.3 Interaktionsindizes ... 61
3.2 ZELLZYKLUSANALYSE ... 64
3.2.1 Zellzyklusanalyse von BG1-Zellen ... 64
3.2.1.1 Applikation von Celecoxib ... 64
3.2.1.2 Applikation von Zoledronsäure ... 66
3.2.1.3 Applikation der Kombination ... 67
3.2.2 Zellzyklusanalyse von SKOV-3-Zellen ... 69
3.2.2.1 Applikation von Celecoxib ... 69
3.2.2.2 Applikation von Zoledronsäure ... 70
3.2.2.3 Applikation der Kombination ... 72
3.3 WESTERN BLOT ... 73
3.3.1 Darstellung der Ladekontrolle als Basis der Beurteilung der Blot-Ergebnisse ... 73
3.3.1.1 Silberfärbung ... 74
3.3.1.2 Ponceau-S-Rot-Färbung ... 75
3.3.1.3 Aktin ... 76
3.3.2 Darstellung der Ergebnisse der untersuchten Proteine ... 77
3.3.2.1 Akt ... 77
3.3.2.2 p-Akt ... 80
3.3.2.3 Vergleich Akt/p-Akt ... 82
3.3.2.4 COX-2 ... 83
4 DISKUSSION ... 84
4.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE ... 84
4.1.1 Proliferationshemmung ... 84
4.1.1.1 Celecoxib ... 84
4.1.1.2 Zoledronsäure ... 85
4.1.2 FACS Analyse ... 86
4.1.2.1 Celecoxib ... 86
4.1.2.2 Zoledronsäure ... 87
4.1.3 Western Blot ... 89
4.1.3.1 Akt/ PKB ... 89
4.1.3.2 COX ... 92
4.1.4 Synergismus ... 93
4.2 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK ... 96
5 ZUSAMMENFASSUNG ... 98
6 LITERATURLISTE ... 100
7 ANHANG ... 109
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 109
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ... 110
DANKSAGUNG ... 111
LEBENSLAUF ... 112

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....114

1 Einleitung

1.1 Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

2002 erkrankten 9.950 Frauen in Deutschland an einer Neubildung des Ovars. Damit entfallen 4,8% aller bösartigen Neubildungen der Frau auf das Ovarialkarzinom. Es liegt hinter dem Endometriumkarzinom an fünfter Stelle der Gesamtkrebserkrankungen der Frau. Die Sterblichkeit ist hoch, der Anteil an der Zahl der Krebssterbefälle in Deutschland lag im Jahr 2000 bei 14,5 auf 100.000 Frauen [26]. Somit ist das Ovarialkarzinom das gynäkologische Karzinom mit der höchsten Mortalität [66]. Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms hat sich in den letzen Jahren nicht wesentlich verändert, wohingegen die Mortalität sinkt (s. Abb. 1-1). Dies ist auf die Fortschritte in der Behandlung des Ovarialkarzinoms zurückzuführen.

Für die Inzidenz besteht innerhalb von Europa ein Nord-Süd-Gefälle, das Ovarialkarzinom tritt in den nördlichen Ländern deutlich häufiger auf [35].

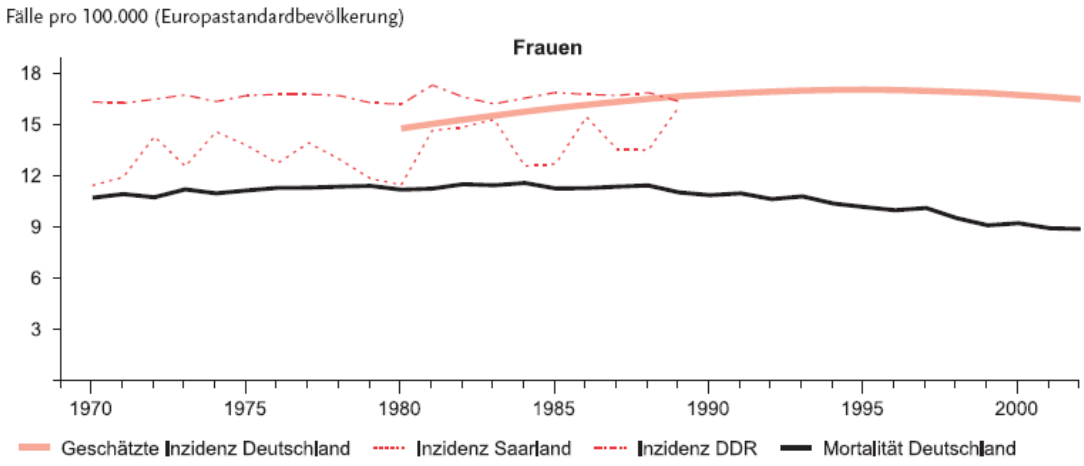


Abb. 1-1: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1970-2002 (aus Krebs in Deutschland RKI 2006).

1.1.2 Prognose

Die Prognose des Ovarialkarzinoms ist schlecht. Die Gesamt-Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei 30-40%, der Verlust an Lebenserwartung für eine Frau mit Ovarialkarzinom beträgt statistisch 11 Jahre. Die Prognose ist jedoch stark stadienab-

hängig. Problematisch ist beim Ovarialkarzinom vor allem die Symptomlosigkeit des Frühstadiums und die damit verbundene späte Erstdiagnose (70-80% d. F. werden im ungünstigen Stadium FIGO IIB-IV diagnostiziert) [41]. Als Prognosefaktoren dienen u.a. Tumorstadium, Alter, Allgemeinzustand und postoperativer Tumorrest [26].

1.1.3 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom gelten zunehmendes Lebensalter, belastende Familienanamnese (BRCA1 und BRCA 2 Gen, sowie HNPCC [1]) und endokrine Faktoren (frühe Menarche, späte Menopause, primäre Sterilität, fehlende Stillzeit, PCO, Hormonsubstitution). Protektiv wirken Ovulationshemmer, Parität, Hysterektomie und Tubenligatur [26,66,86,112].

1.1.4 Therapie

Die Therapie des Ovarialkarzinoms ist stadiumabhängig und umfasst im wesentlichen die zwei Säulen Chirurgie und Chemotherapie. Die Radiotherapie spielt bei der Therapie des Ovarialkarzinoms eine eher untergeordnete Rolle.

Die primäre Therapie des Ovarialkarzinoms ist die Chirurgie mit dem Ziel der kompletten Entfernung des Primärtumors (sofern möglich) und aller intraperitonealer Metastasen [85], da der Erfolg der nachfolgenden Chemotherapie mit zurückbleibendem Tumorgewebe negativ korreliert. Das Vorgehen ist sehr radikal und umfasst Adnexexstirpation beidseits, Hysterektomie, Omentektomie, Inspektion und Palpation der gesamten Abdominalhöhle mit Biopsieentnahme aus auffälligen und unauffälligen Stellen, sowie Entnahme einer Peritonealzytologie. Unabdingbar ist auch die paraaortale und pelvine Lymophonodektomie, ein Befall der Lymphknoten wurde im Stadium pT_1 in 24%, im Stadium pT_2 in 50% und im Stadium pT_3 in 74% gefunden [11]. Auch bei fortgeschrittenem Stadium sollte auf einen radikalen Eingriff nicht verzichtet werden. Bei dieser Operation wird zusätzlich die Netzresektion von infrakolisch auf infragastrisch erweitert, das parietale Peritoneum einschließlich des Zwerchfellperitoneums wird resiziert. In der AGO Ovar 3 Studie zeigte sich ein eindeutiger Überlebensvorteil nur für die tumorfrei operierten Patienten.

Auch die Chemotherapie des Ovarialkarzinoms ist stadiumabhängig. Im Stadium FIGO IA kann auf eine Chemotherapie verzichtet werden [51]. Patientinnen mit Stadium I-II benötigen eine platin-haltige Chemotherapie [100]. Für Kombinationstherapien im

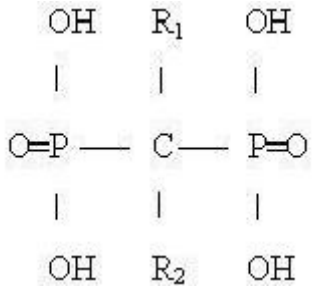
Vergleich zur Platinmonotherapie gibt es bisher keine Daten aus randomisierten Studien zum frühen Ovarialkarzinom. Die Standard-Chemotherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms FIGO IIb-IV besteht aus einer platinhaltigen Kombinationstherapie, derzeit Carboplatin/AUC 5 und Paclitaxel (175mg/m^2) über drei Stunden i.v.
Ein großes Problem in der Therapie des Ovarialkarzinoms stellt das Rezidiv dar. Mehr als zwei Drittel der Patientinnen benötigen nach einiger Zeit erneute Therapiemaßnahmen. Das weitere Vorgehen wird durch die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber platinhaltiger Chemotherapie bestimmt. Mittel der Wahl beim platinrefraktären Rezidiv ist die nicht platinhaltige Monotherapie, dabei wurde für Topotectan und Paclitaxel bei nicht mit Taxan vorbehandelten Patienten Effektivität nachgewiesen [73]. Beim platinsensiblen Ovarialkarzinom steht die platinhaltige Kombinationstherapie im Sinne einer Reinduktionstherapie im Vordergrund [84].

1.2 Zoledronsäure

Die Zoledronsäure gehört zu der Gruppe der Bisphosphonate. In der Klinik findet diese Substanzgruppe vorrangig Anwendung bei der Behandlung von Knochenmetastasen und der Osteoporose sowie des Morbus Paget. Neueren Erkenntnissen zufolge wirkt Zoledronsäure jedoch auch selbst gegen Tumorzellen [38].

1.2.1 Aufbau

Der Aufbau der Bisphosphonate entspricht weitgehend dem des Pyrophosphates mit dem Unterschied, dass an der Stelle der Anhydridbindung durch den Sauerstoff im Bisphosphonat ein Kohlenstoff sitzt. Dadurch erhält das Molekül folgende Eigenschaften: Durch die Vierbindigkeit des Kohlenstoffes können zusätzlich zwei Reste an das Molekül gebunden werden; diese charakterisieren dann die Eigenschaften des jeweiligen Bisphosphonates [18].



Modell Bisphosphonat

Die zwei Hauptgruppen der Bisphosphonate werden durch die unterschiedlichen Reste am C-Atom charakterisiert:

1. Bisphosphonate ohne Stickstoff-Atom im Rest
2. Bisphosphonate mit Stickstoff-Atomen im Rest meist in Heterozyklen

1.2.2 Wirkungsweise

Die Bisphosphonate der ersten Gruppe wie z. B. Etinodrat, Clodronat oder Tiludronat wirken vor allem über die Inhibierung ATP-abhängiger Enzyme, dadurch kommt es zum Aufstau von zytotoxischen ATP-Analoga [87].

Die Bisphosphonate der zweiten Gruppe sind wesentlich potenter. Darunter fallen z.B. die Zoledronsäure, Alendronsäure, Ibandronsäure etc.
Pharmakologisch spielen folgende Mechanismen eine wichtige Rolle:

- Aufstauung von Isopentenyldiphosphat: Dieses wird mit AMP zu Apppi (triphosphoric acid 1-adenosin-5´yl ester 3-[3-methyl-3-enyl] ester) umgesetzt und kann somit als ATP Analogon über die Hemmung der ATP/ADP Translokase (=> Cytochrom c Freisetzung => Aktivierung von Caspasen) die Apoptose induzieren [39].
- Hemmung der Farnesyldiphosphatsynthetase: Die meisten Effekte der Zoledronsäure lassen sich mit der Hemmung dieses Enzyms begründen (siehe Abbildung). Dadurch kommt es zu:
    - Einer gestörten posttranslationalen Modifikation von GTP bindenden Proteinen wie Ras, Rho und Rac, die eine entscheidende Rolle im Zellzyklus spielen. Die Prenylation dieser Proteine mit Farnesyl- und Geranylpyrophosphat kann durch die Hemmung der FPP-Synthase nicht mehr ablaufen [87]. Die Proteine können nicht mehr in der Zellmembran verankert werden und ein z. B. mutiertes Ras Onkogen wird wirkungslos. (Diese GTP bindenden Proteine sind essentiell für die normale Zellfunktion und das Überleben der Zelle [38]). Auch die Funktion der PKB (s. K. 1.3.5) wird durch die verminderte Prenylation beeinträchtigt.

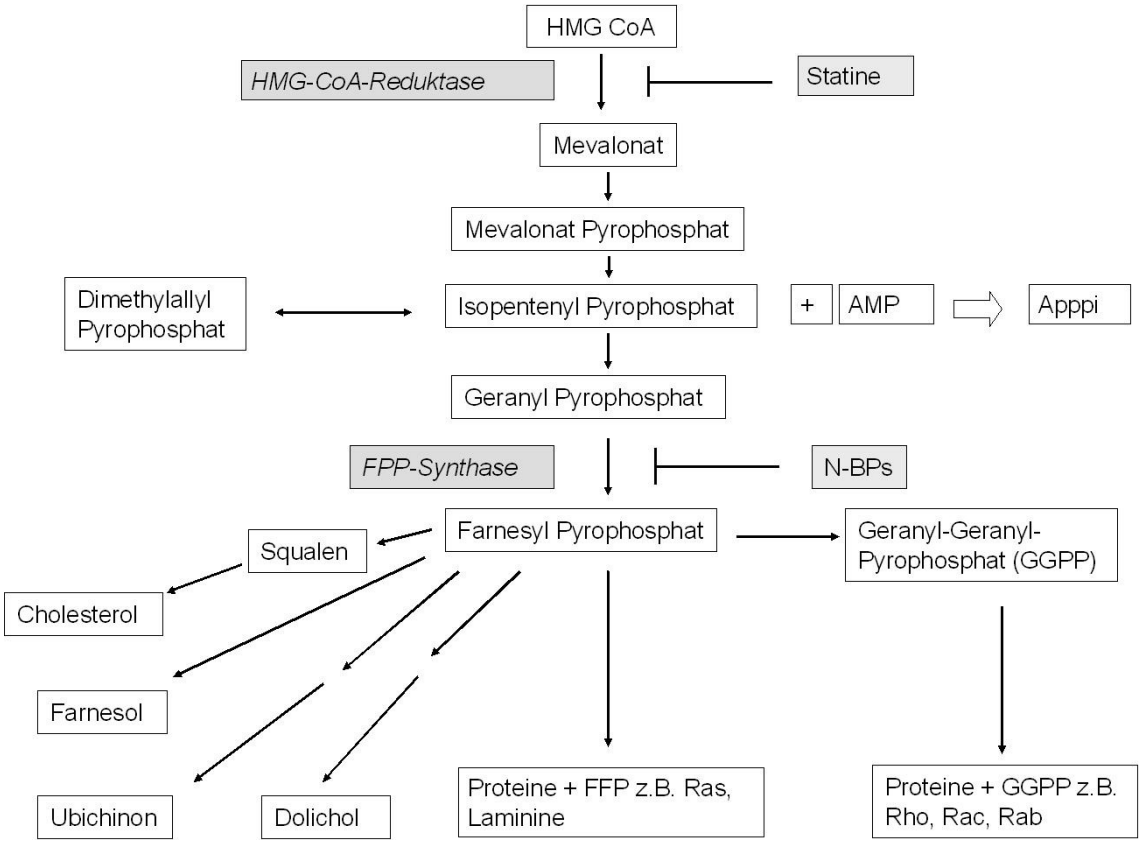


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Mevalonat-Syntheseweges und der Wirkung stickstoffhaltiger Bisphosphonate (NBP)

- Einer Hemmung der proteolytisch wirkenden Metalloproteinasen. Die spezifische Anordnung von Zellen in den verschiedenen Geweben ist lebensnotwendig und wird durch die Verankerung in extrazellulären Matrix gewährleistet [50]. Matrixmetalloproteinasen besitzen die Fähigkeit, Bestandteile der extrazellulären Matrix als auch Oberflächenproteine der Zellen abzubauen. Dadurch erhalten sie beim Prozess der Metastasierung und der Tumorangiogenese eine besondere Bedeutung: Sie ermöglichen dem malignen Gewebe den Anschluss an ein umgebendes Gefäß zu gewinnen und stellen somit Angriffsziel der onkologischen Forschung und Therapie dar [103].

- Einer Downregulation $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_V\beta_5$ der Integrine [3], die an der Angiogenese beteiligt sind. Das führt zu Apoptoseinduktion in Endothelzellen [30].

1.2.3 In vitro Effekte

Entscheidende Schritte bei der Metastasierung von malignen Tumorzellen sind die Tumorzelladhäsion und die Tumorzellinvasion. Beide Prozesse werden von Bisphosphonaten beeinflusst.

1. Bisphosphonate hemmen dosisabhängig die Tumor-Zell-Adhäsion von Brust- und Prostatatumorzellen an Knochengewebe [7]. Dieser Effekt scheint eine Folge der oben beschriebenen Hemmung der G-Protein-Geranylation zu sein [20].
2. Weiterhin wird die Behinderung der Tumor-Zell-Invasion in verschiedenen Tumorarten beschrieben. In Mamma- und Prostatakarzinomzellen wird dieser Effekt auf zwei verschiedene Mechanismen zurückgeführt:

   In niedrigen Konzentrationen (10^{-8}-10^{-6} M) hemmen die Bisphosphonate den Mevalonat-Syntheseweg [104], in höheren Konzentrationen (10^{-4} M) inhibieren die Bisphosphonate die Aktivität der proteolytisch wirkenden MMPs durch Chelatisierung des Zink-Atoms der MMPs [6]. Bei der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 kann zusätzlich sowohl eine verminderte Expression von CXCR-4 als auch eine reduzierte Cox-2-Expression festgestellt werden. Beide Faktoren sind an der Tumorzellmigration beteiligt [25].

   Auch für das Ovarialkarzinom stellt die Verhinderung der Tumorzellinvasion aufgrund der aggressiven Metastasierung ein Therapieziel dar. Die Behandlung von Caov-3 Zellen (einer humanen Ovarialkarzinomzelllinie) mit Alendronsäure zeigt eine Inaktivierung von Rho, Veränderungen der Zellmorphologie, Verlust der Stress-Faser-Formation und Suppression der Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten und Adhäsions-Proteinen. In der Konsequenz ergibt sich hieraus eine Herabsetzung der Tumorzellmigration [91].

Bisphosphonate wirken weiter antikanzerogen über Proliferationshemmung und zwar über die Induktion von Apoptose und/ oder über zytostatische Wirkungen in vielen verschiedenen Tumorzellarten, wie z. B. Prostata-, Mamma-, Myelom-, Melanom-und Ovarialkarzinomzellen etc. [17,70,75,93,117].

Zur Kanzerogenese tragen auch indirekte Faktoren bei wie z. B. die Angiogenese und Faktoren des Immunsystems. Auch diese Prozesse werden durch Bisphosphonate beeinflusst:

Alendronsäure hemmt die Migration von Endothelzellen und die Ausbildung von Kapillarstrukturen in humanem Nabelschnurgewebe [43]; Zoledronsäure inhibiert die Proliferation von humanen Endothelzellen nach Stimulation mit bFGF und VEGF [114] und für eine Gruppe von Bisphosphonaten kann Apoptoseinduktion in Endothelzellen und herabgesetzte Kapillarstrukturbildung nachgewiesen werden [33].

γδT-Zellen verhalten sich gegenüber Tumorzellen zytotoxisch. Zoledronsäure induziert eine monozytenabhängige Aktivierung von γδT-Zellen und steigert die Immunosensitivität der Tumorzellen zu γδT-Zellen [68,71]. In Monozytenkulturen zeigt sich nach Stimulation mit Aminobisphosphonaten eine signifikante Expansion der γδT-Zellen [57].

Der Effekt der Aminobisphosphonate auf die Tumorzellen in vitro zeigt eine deutliche Dosisabhängigkeit. In niedrigen Konzentrationen (<1µM) werden die Tumorzelladhäsion und Invasion beeinflusst. Bei steigenden Konzentrationen (10-100µM) bewirken die Bisphosphonate eine Reduktion der Tumorzellproliferation und die Induktion der Apoptose. In hohen Konzentrationen (ca. 200µM) hemmen sie die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen [18].

1.2.4 In vivo Effekte

Die Wirkung der Bisphosphonate auf Knochenmetastasen ist wissenschaftlich belegt und findet im klinischen Alltag täglich Anwendung [5].

Die in vivo Effekte der Zoledronsäure auf den Primärtumor sowie der viszeralen Metastasen werden in der Literatur sehr kontrovers beschrieben. Neue Studien zeigen eine deutliche Reduktion des Primärtumors und eine Verlängerung des Überlebens im Tiermodell z. B. bei der Mesotheliom tragenden Maus [106] oder der Chondrosarkom tragenden Ratte [37].

Im Mammakarzinom tragenden 4T1 Maus Modell zeigte sich nach Applikation von Zoledronsäure sowohl die erwartete Reduktion von Knochenmetastasen, als auch eine signifikante Reduktion von Leber und Lungenmetastasen, sowie eine Verlängerung des Überlebens [45]. Die Applikation von Ibandronat hat keinen Effekt auf die Lungenmetastasen im 4T1 Maus Modell, wohl im MDA-231 Modell [76]. Eine ältere Studie zeigt im

Widerspruch dazu die Reduktion der Knochenmetastasen im MDA-231 Maus Modell, jedoch eine Zunahme der viszeralen Metastasen nach Applikation von Bisphosphonaten [118].

Die Studien über die in vivo Effekte von Bisphosphonaten bei Ovarialkarzinomzellen sind bis jetzt vielversprechend. So zeigte sich eine deutliche Reduktion von Stromainvasion, der Tumorlast und der Aszitesbildung bei immundefizienten Mäusen im in vivo Ovarialkarzinom-Modell nach Applikation von Alendronsäure [42].

Ein Großteil der in vivo betrachteten Effekte betrifft die Angiogenese: In verschiedenen Studien konnte die signifikante Senkung von VEGF und/oder bFGF, z. B. in der Zervixkarzinom bzw. Melanom tragenden Maus [36,117] und in einem Mausmodell mit Angiogenese-Stimulation durch ein subkutanes mit bFGF versetztes Implantat [114], beobachtet werden. Dieser Sachverhalt bestätigt sich in klinischen Studien bei Karzinompatienten. Zoledronsäure senkt den VEGF-Spiegel signifikant 2 Tage nach Applikation [31,88] auch in Low-dose-Therapie [89].

1.2.5 Im Synergismus mit anderen Therapeutika

Der Großteil der Studien zu synergistischen Wirkungen von Zoledronsäure und anderen Therapeutika sind in vitro Experimente, die deutliche additive oder synergistische Effekte zeigen. In Kombination mit klassischen Chemotherapeutika können verstärkte inhibitorische Effekte auf das Wachstum beobachtet werden: in Kombination mit Docetaxel beim Mammakarzinom [113] und beim Prostatakarzinom [101]; in Kombination mit Paclitaxel beim Mammakarzinom [48] und beim SCLC [79]. Beim SCLC zeigt sich auch eine synergistische Wirkung von Zoledronsäure mit Etoposid, Cisplatin und Irinotecan sowie in der Kombination mit Imatinib, einem Tyrosinkinaseinhibitor, eine additive Wirkung. Doxorubicin, auch ein Medikament der klassischen Chemotherapie, induziert in Kombination mit Zoledronsäure verstärkt Apoptose in Brust- und Prostatakarzinomzellen [115,80]. In Osteosarkomzellen wird durch 24h vorherige Applikation von Zoledronsäure die Sensitivität der Osteosarkomzellen gegenüber Doxorubicin erheblich gesteigert [46]. Weitere synergistische Effekte werden bei Gemcitabin-Gabe und Flavostatin-Gabe in Kombination mit Zoledronsäure bei Mammakarzinomzelllinien beobachtet. In dieser Versuchsreihe zeigen sich die Wirkungen von Epirubicin und Zoledronsäure bei Mammakarzinomzelllinien antagonistisch [10].

Auch die Kombination von Zoledronsäure und einem Cox-2-Inhibitor ist bereits untersucht worden: Es zeigt sich in vitro eine Verstärkung des inhibitorischen Effektes gegenüber den Einzelsubstanzen an den Mammakarzinomzelllinien MCF 18 und MCF 18 HER-2/neu transfiziert [113].

Imantinib wirkt bei Philadelphia Chromosom positiven Leukämiezellen synergistisch mit Zoledronsäure in vitro und führt zu verlängertem Überleben im immundefizienten Mausmodell (infiziert mit BV173 Leukämie Zellen) [58]. Weitere in vivo Effekte konnten beim SCLC in den oben angegebenen Kombinationen [69] und beim multiplen Myelom in der Kombination mit Dexamethason beschrieben werden [99]. Beim Prostatakarzinom wurde im Mausmodell eine Verringerung der Inzidenz von Metastasen in der Kombination mit Paclitaxel beobachtet [52].

1.3 Celecoxib

Celecoxib gehört zur Gruppe der COX-2 Inhibitoren, einer Untergruppe der NSAR, die in der Klinik breite Anwendung, v.a. bei der Analgesie, Entzündungshemmung und Hemmung der Thrombozytenaggregation finden. Problematisch zeigte sich bei den NSAR als deutlichste Nebenwirkung ein verstärktes Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen, wie z. B. dem Magenulkus oder gastrointestinalen Blutungen, die auf die Hemmung der COX-1 zurückgeführt werden. Die selektiven COX-2-Inhibitoren wie z. B. Celecoxib wurden daher als große Hoffnungsträger in der Schmerztherapie gesehen. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind z. B. Rofecoxib und Valdecoxib. 2004 zeigte sich in der APPROVe Studie jedoch eine erhöhte Rate an kardiovaskulären Ereignissen bei Therapie mit Rofecoxib, so dass Merck gezwungen war, das deutlich COX-2-selektivere Rofecoxib (Vioxx®) vom Markt zu nehmen [32]. Für Celecoxib konnte nur in einer Studie ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse festgestellt werden [94], in zwei weiteren Studien (Prevention of Spontaneous Adenomatous Polyps Trial (PreSAP) und Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT)) wurde dies jedoch nicht bestätigt, so dass Celecoxib weiter auf dem Markt verblieb.

Celecoxib wird weiterhin meist experimentell v.a. zur Behandlung von Karzinomen eingesetzt. Es konnte ein präventiver Einfluss auf die Entwicklung von Kolonkarzinomen [54] beobachtet werden.

1.3.1 Wirkungsweise

Celecoxib wirkt über die Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2), die mit dem Isoenzym Cyclooxygenase-1 (COX-1) zur Gruppe der Cyclooxygenasen gehört. Diese Enzyme katalysieren die Prostaglandinbildung aus Arachidonsäure. Beide Isoenzyme führen zu gleichen Reaktionsprodukten, sind aber im Organismus unterschiedlich verteilt und unterliegen einer verschiedenen Regulation, wodurch sich ihr unterschiedliches Wirkspektrum begründet. Das Vorkommen der COX-1 ist konstitutiv in fast allen Geweben und verantwortlich für die Produktion der Prostaglandine, die physiologische Funktionen kontrollieren. COX-2 ist unter physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben nicht nachweisbar, aber schnell induzierbar durch mitogene und entzündliche Stimuli. Daraus resultiert eine verstärkte Prostaglandinsynthese in neoplastischem und entzündlichem Gewebe [21] und somit erklärt sich ein Teil der antikanzerogenen Wirkung von Celecoxib aus der COX-2-Inhibition.

Celecoxib kann die Kanzerogenese jedoch auch unabhängig von der COX-2 Hemmung beeinflussen [40], so dass sich das Wirkprofil in zwei Hauptgruppen unterteilt:

1. COX-abhängige Mechanismen
2. COX-unabhängige Mechanismen

Zum besseren Verständnis werden die Wirkmechanismen des Celecoxib anhand einer Abbildung dargestellt:

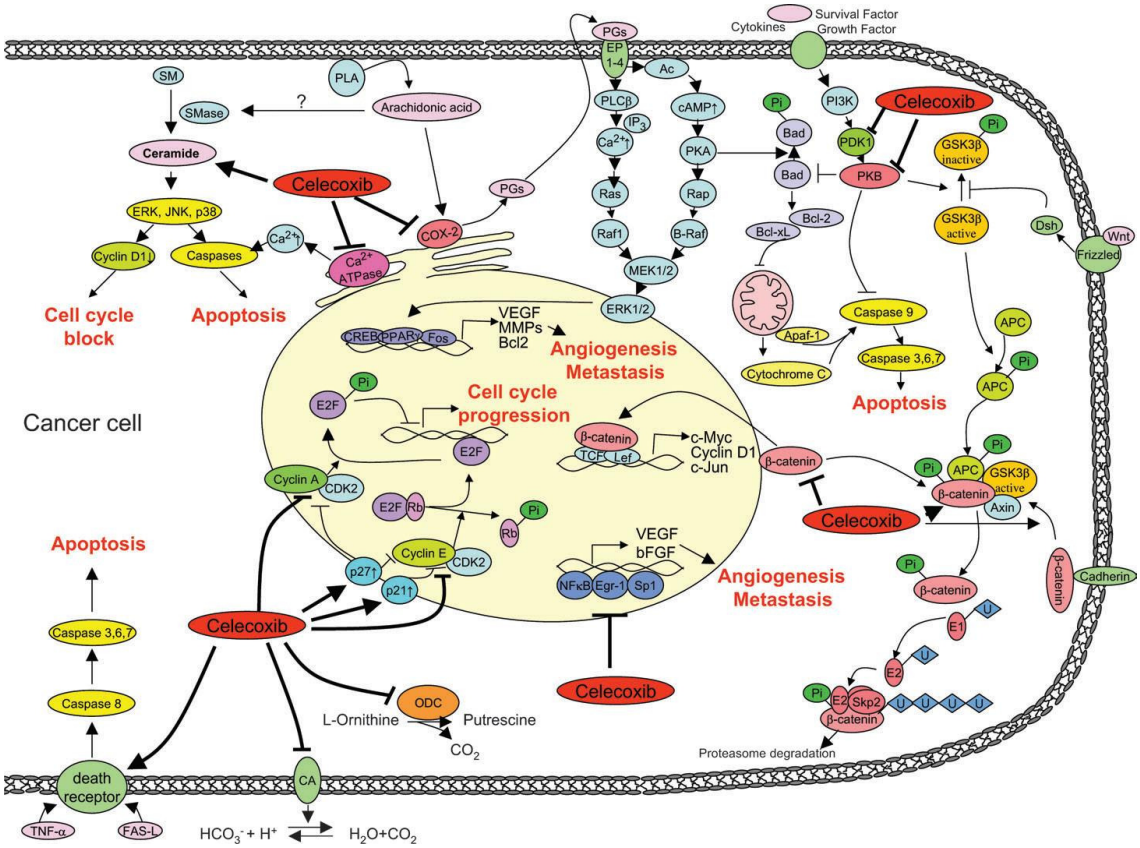


Abb. 1-3: Molekulare Mechanismen von Celecoxib und seiner antikarzinogenen Effekte (Quelle: Grosch et al. 2006 [40])

1.3.1.1 COX-abhängige Wirkmechanismen

COX-2 führt über die Prostaglandinwirkung zur Aktivierung

- von Proteinkinase A, die ihrerseits durch Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bad dieses inaktiviert [92].
- der Kaskade Raf → MEK 1/2 → ERK ½, daraus resultiert die verstärkte Expression von VEGF, MMPs und Bcl2 [23,72].

COX-2 führt u.a. über diese Wege zu einer erhöhten Zellteilungsrate, Anti-Apoptose, Angiogenese und Metastasierung und somit die Hemmung dieses Enzyms durch Celecoxib zu seinem antikanzerogenen Potential.

1.3.1.2 COX-unabhängige Wirkmechanismen

Die COX-2 unabhängigen Wirkmechanismen sind zahlreich und greifen in viele Regelkreise der Zelle ein. Sie werden im Folgenden anhand der Abbildung 1-3 beschrieben: (von links oben beginnend, dann im Uhrzeigersinn)

Celecoxib wirkt über

- die Erhöhung des Ceramidspiegels. Dies führt über verringerte Cyklin-D1-Expression zum Zellzyklusarrest [56,78] und über Caspasenaktivierung zu Apoptose [63].
- die Inhibition der Ca^{2+}-abhängigen ATPase. Dies hat die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels zur Folge [49] und führt letztendlich zu einer Erhöhung der Cytochrom c Freisetzung und Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges [109].
- die Inhibition von Proteinkinase B (PKB/Akt) oder ihrer vorgeschalteten Phosphoinositol abhängige Kinase (Wirkung s. Kapitel 1.3.5 PKB) [55].
- die Inhibition von Sp1, dadurch kommt es zu einer verringerten Expression von VEGF [111].
- erhöhte Expression der Zell-Zyklus-Inhibitoren p21 und p27; daraus resultiert ein Zell-Zyklus-Arrest [67].
- die Inhibition der Carboanhydrase IX [110]. Dieses Enzym ist involviert in die Acidierung von hypoxischen Tumoren, die durch sehr aggressives Wachstum gekennzeichnet sind; weiterhin wird die Expression durch Hypoxie erhöht [29].
- die verstärkte Expression von Todesrezeptoren, die zur Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose führen [64].

1.3.2 In vitro Studien

Aufgrund der Vielzahl der zu Celecoxib bzw. COX-2 Hemmern durchgeführten Studien werden an dieser Stelle nur die auf das Ovarialkarzinom bezogenen vorgestellt:

Celecoxib bewirkt in SKOV-3-Zellen eine dosis-abhängige Inhibition der Zellproliferation sowie Apoptoseinduktion [108] über Caspase-3-Aktivierung [105] und verminderte Expression von COX-2 [107]. Im Widerspruch dazu steht eine Studie, die die Celecoxibwirkung auf den p53 Status zurückführt: Bei der „Null Typ p53 Zelllinie“ SKOV-3 zeigte sich hier keine bzw. nur geringe Apoptoseinduktion und Proliferationsinhibition [96].

Die Inhibition des Zellwachstums konnte auch für CAOV3 und OVCAR3 Zellen nachgewiesen werden, jedoch keine Apoptoseinduktion [108].

1.3.3 In vivo Studien

Aufgrund der Vielzahl der zu Celecoxib bzw. COX-2 Hemmern durchgeführten Studien wird an dieser Stelle nur auf die Ovarialkarzinom bezogenen Studien eingegangen:
In der mit SKOV-3 Ovarialkarzinomzellen infizierten Nacktmaus bewirkt Celecoxib eine Reduktion der COX-2 Expression [107] sowie dosisabhängige Verringerung der durchschnittlichen Tumorgröße [108].
In der ES-2 und OVCAR3 tragenden Maus konnte eine Inhibition des Tumorwachstums durch Celecoxib gezeigt werden [90].

1.3.4 Im Synergismus mit anderen Therapeutika

Aufgrund der Vielzahl der zu Celecoxib bzw. COX-2 Hemmern durchgeführten Studien werden an dieser Stelle nur die auf das Ovarialkarzinom bezogenen vorgestellt:
In vitro bewirkt die Kombination aus dem COX-2 Hemmer NS389 sowohl bei Cisplatin sensitiven als auch bei Cisplatin resistenten Zelllinien eine deutliche Steigerung der Cytotoxizität gegenüber der alleinigen Gabe von Cisplatin oder Docetaxel [2]. Eine weiterführende in vitro Studie untersucht die Abhängigkeit der Wirkung von der Reihenfolge der Kombination der Medikamentenverabreichung mit Docetaxel und NS389. Es zeigt sich sowohl bei gleichzeitiger Gabe von beiden Substanzen als auch bei der vorherigen Applikation von NS398 eine Reduktion gegenüber der allein durch Docetaxel induzierten Apoptose. Wird Docetaxel vor NS398 appliziert, ist die Apoptoserate gegenüber der Alleingabe deutlich gesteigert [77].
In vivo zeigt die Kombination von Celecoxib mit Doxorubicin in der ES2 bzw. OVCAR 3 tragenden Maus ca. nach zehn bis fünfzehn Tagen gesteigerte Inhibition des Tumorwachstums gegenüber der Einzelgabe der Substanzen [90].

1.3.5 Akt/ Proteinkinase B

Akt/ Proteinkinase B ist ein Enzym des PIP3K-Akt-Signalweges und spielt in zahlreichen Zellfunktionen wie Stoffwechsel, Zellwachstum, Transkriptionsregulation und im Überleben der Zelle eine wichtige Rolle [8]. Sowohl Zoledronsäure als auch Celecoxib beeinträchtigen die Phosphorylierung von Akt/ PKB und damit seine Aktivierung (s.o.).

1.3.5.1 Aktivierung von Akt/ PKB

Die initiale Aktivierung des PIP3K-Akt Signalweges findet an der Zellmembran statt: EGFR, IGF-1R, Zell-Adhäsions-Moleküle wie Integrine, G-Protein assoziierte Rezeptoren und Onkogene wie Ras etc. führen über die Aktivierung der PI3 Kinase zur Phosphorylierung von PIP2 zu PIP 3, welches dann von der PKB/ Akt gebunden wird. Die PKB wird an die Zellmembran gebunden und kann im nächsten Schritt durch die Phospholipidabhängige Kinase (PDK1), die ebenfalls PIP3 abhängig ist, phosphoryliert und damit aktiviert werden [65].

1.3.5.2 Wirkung von Akt/ PKB

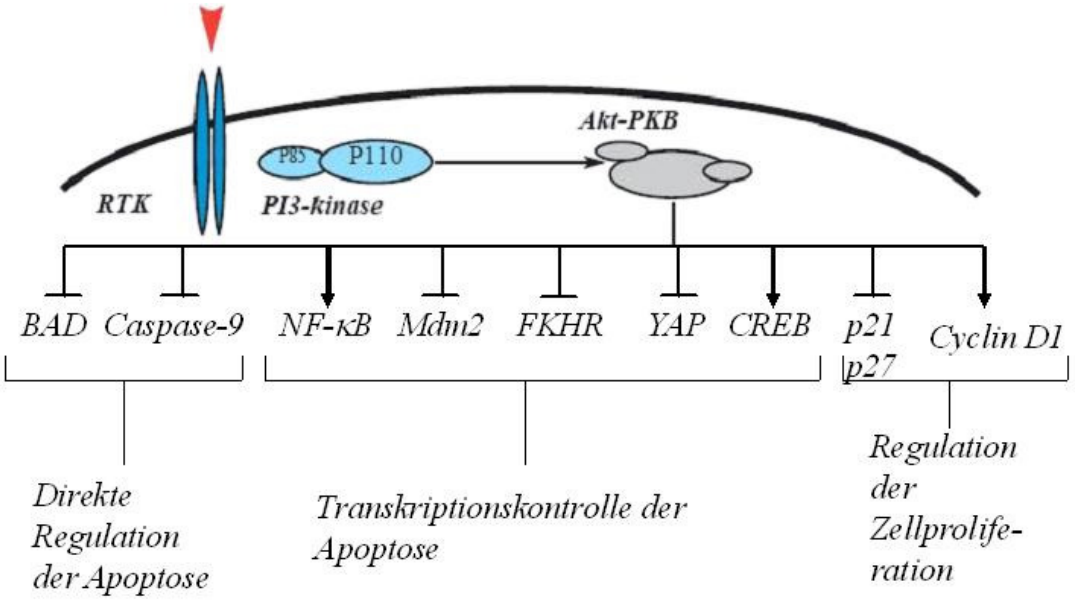


Abb. 1-4: Folgen der PKB/ Akt Aktivierung in der Zelle

Zur besseren Übersicht werden die Konsequenzen der Akt Aktivierung in Abbildung 1-4 dargestellt und im folgenden Text von links nach rechts beschrieben:

1. Akt wirkt direkt antiapoptotisch
    - über die Phosphorylierung und damit verbundene Inaktivierung von Bad, einem proapoptotischen Protein [22].
    - über die Phosphorylierung und damit verbundene Inaktivierung von Procaspase 9 [14].

2. Akt wirkt indirekt antiapoptotisch über die verstärkte Transkription von antiapoptotischen Genen, wie z. B. NFκB. Dieser Transkriptionsfaktor ist Schlüsselenzym der Immunantwort und die Deregulation seiner Aktivität ist assoziiert mit der Entwicklung von Erkrankungen wie Autoimmunkrankheiten und Krebs [61]. Weitere Apoptose-assoziierte Transkriptionsfaktoren die durch Akt beeinflusst werden und sind FoxO Forkhead, Mdm2, YAP und CREB [95].

3. Akt/ PKB bewirkt Steigerung der Zellproliferation über
    - Phosphorylierung und dabei Inaktivierung von CDK Inhibitoren p21 und p27. Daraus resultiert über mehrere Zwischenschritte DNA-Replikation und Zell-Proliferation.
    - Verlängerung der Halbwertszeit von Cyklin D [28,62].

1.3.5.3 Akt/ PKB als Angriffspunkt der Anti-Tumor-Therapie

Die Aktivierung von Akt/ PKB ist unter anderem mit Anti-Apoptose und Zellproliferation verbunden. Aktiviertes Akt/ PBK ist in vielen Tumorzellen wie dem Multiplen Myelom, dem Bronchialkarzinom, dem Mammakarzinom, bei Hirntumoren, dem Magenkarzinom, der AML, dem Endometriumkarzinom, dem Melanom, dem Ovarialkarzinom und dem Prostatakarzinom nachweisbar. Weiterhin ist die Aktivierung von Akt in etlichen Tumorarten (z. B. der Haut, des Pankreas, der Leber, der Prostata, der Mamma, des Endometrium, des Magens) mit einer schlechten Prognose verbunden [65].
In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die Inhibition von Akt mit Apoptoseinduktion und/oder Zellzyklusarrest einhergeht und eine erhöhte Responderrate auf Standard-Chemotherapie oder Strahlentherapie in vitro oder in vivo beobachtet wurde [9,16].
Durch den Nachweis von aktiviertem Akt/ PKB bei diversen Tumoren in Verbindung mit schlechter Prognose, dem Nachweis antitumoröser Effekte durch Inhibition von Akt/ PKB in zahlreichen in vitro und in vivo Versuchen und ihrer zentralen Funktion bei der Regulation von Zellzyklus und Apoptose steht Akt/ PKB im Mittelpunkt des onkologischen Interesses und stellt einen wichtigen Angriffspunkt der modernen Tumorforschung dar.

1.4 Synergismus

1.4.1 Definition

Der Begriff Synergismus oder sein Synonym Synergie kommt aus dem griechischen *synergismós* „*die Zusammenarbeit*“ und bezeichnet im medizinischen Sinn: „das Zusammenwirken mehrerer verabfolgter Therapeutika, die eine gesteigerte oder neuartige Wirkung hervorrufen sollen“.

1.4.2 Anwendung von synergistischen Wirkungen

Synergistische Wirkungen sind in vielen Bereichen in der Klinik gewünscht, z. B. in der Schmerztherapie. Der Vorteil ist klar ersichtlich. Wenn durch die Verabreichung zweier niedrig dosierter Medikamente der gleiche oder ein größerer Effekt erzielt werden kann als bei Einzelgabe eines hochdosierten Medikamentes, wird das definierte Ziel (z.B. die Schmerzfreiheit) bei weniger Nebenwirkungen erreicht. Durch Kenntnis und Anwendung von Synergismen kann damit die Verträglichkeit einer Pharmakotherapie verbessert werden.

1.4.3 Theorie des Synergismus

Die Theorie des Synergismus wird im folgenden Modell mit zwei Substanzen A und B und deren Dosen A´ und B´ dargestellt:
Substanz A soll mit Dosis A´ die halbmaximale Wirkung (50%) erzielen. Gleiche Voraussetzungen gelten für Substanz B mit Dosis B´. Durch die Kombination der beiden Medikamente können verschiedene Wirkungen erreicht werden:

- Es kann zu einer additiven Wirkung der beiden Medikamente kommen. Additives Verhalten liegt vor, wenn die Gesamtwirkung der Summe der Einzelwirkungen entspricht. Das wäre der Fall, wenn z. B. die Dosis a =A´/2 der Substanz A und die Dosis b= B´/2 der Substanz B verabreicht würde und es ebenfalls zu einer halbmaximalen Wirkung kommen würde.
- Es kann zur subadditiven (antagonistischen) Wirkung kommen. Subadditives Verhalten liegt vor, wenn der aus der Kombination zweier Pharmaka erzielte Gesamteffekt kleiner ist als die Summe der Einzeleffekte Das wäre der Fall, wenn z. B. die Dosis a= A´/2 der Substanz A und die Dosis b =B´/2 der Sub-

stanz B verabreicht würde und es nur zu 30% der maximalen Wirkung kommen würde.

- Es kann zur superadditiven (synergistischen) Wirkung kommen. Superadditives Verhalten liegt vor, wenn der aus der Kombination zweier Pharmaka erzielte Gesamteffekt größer ist als die Summer der Einzeleffekte. Das wäre der Fall, wenn z. B. die Dosis a= A´/2 der Substanz A und die Dosis b= B´/2 der Substanz B verabreicht würde und es zu 70% der maximalen Wirkung kommen würde [81, 97].

Zur Veranschaulichung von synergistischen Wirkungen wurde das Modell der Isobologramme entwickelt. Dabei wird die Dosis der Einzelsubstanzen, die zum IC 50 geführt haben, auf die x und die y Achse in einem Koordinatensystem, welches als Löwe Kombinationsquadrat bezeichnet wird, aufgetragen. Die Linie, die diese beiden Punkte verbindet, entspricht der Linie der Isobole. Sie verbindet die Punkte für die isoeffektiven Kombinationen dieser beiden Stoffe, in diesem Fall der halbmaximalen Wirkung. Bei subadditiver Wirkung kommen die Koordinatenpaare über der Isobole, bei superadditiver Wirkung unter der Isobole zu liegen [59,97].

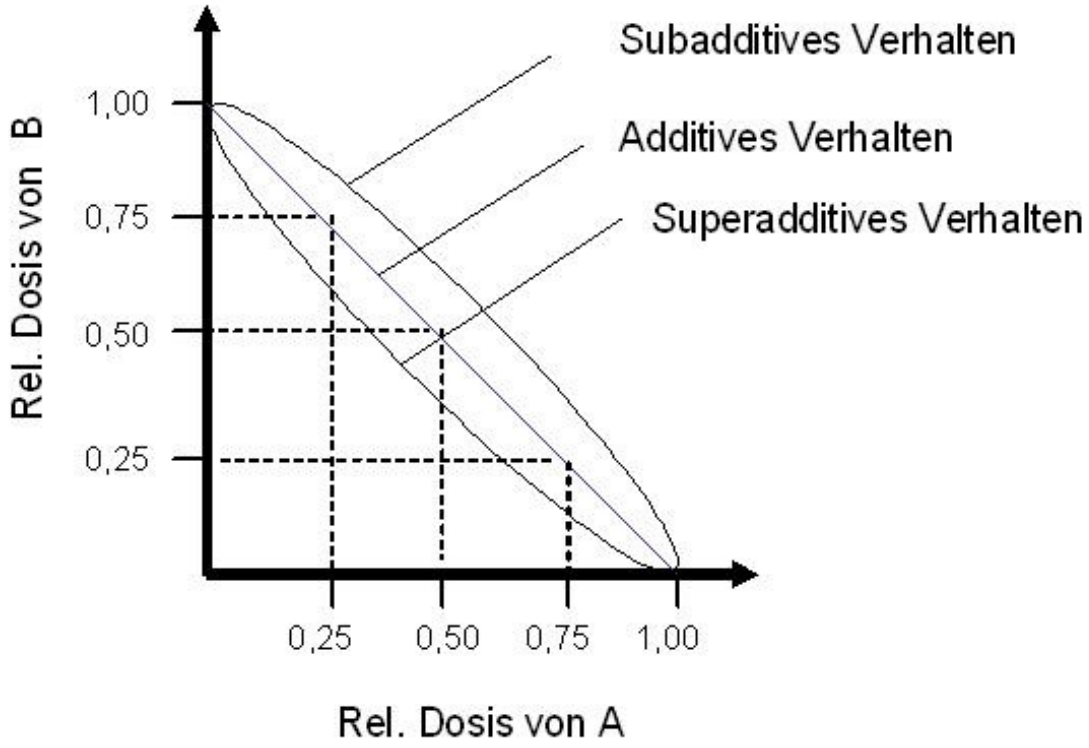


Abb. 1-5: Loewe Kombinationsquadrat zur Darstellung von subadditivem, additivem und superadditivem Verhalten. Jeder Punkt auf der Isobole entspricht 50% Wirkung.

Zur Berechnung von synergistischen Wirkungen wurde der Interaktionsindex γ (nach Tallarida) definiert, abgeleitet aus der Theorie der Isobolen [98]:

$\gamma = a/A´ + b/B´$

(wobei gelten soll:
a= Dosis von A, in Kombination mit einer Dosis von B
b= Dosis von B, in einer Kombination mit einer Dosis von A
A´= Dosis der Einzelgabe von A, die der Wirkung der Kombination aus a und b entspricht
B´= Dosis der Einzelgabe von B, die der Wirkung der Kombination aus a und b entspricht)

Es ergeben sich die Möglichkeiten:

- $\gamma = 1 \Leftrightarrow$ die Wirkungen der Kombination sind additiv
- $\gamma > 1 \Leftrightarrow$ die Wirkungen der Kombination sind subadditiv (antagonistisch)
- $\gamma < 1 \Leftrightarrow$ die Wirkungen der Kombination sind superadditiv (synergistisch)

1.4.4 Molekulare Hintergründe

Die Anwendung einer Kombination von zwei Substanzen kann zu den oben genannten Wirkungen führen; die Hintergründe für das unterschiedliche Verhalten seien im Folgenden erläutert:

- Gründe für subadditives Verhalten können kompetetiver Antagonismus, nicht-kompetetiver Antagonismus oder funktioneller Antagonismus sein.
- Gründe für superadditives Verhalten können differente Wirkmechanismen beider Substanzen bei ähnlichen oder gleichen Wirkungen sein.
  Ein klinisches Beispiel ist die Kombination mehrerer Antihypertensiva, wie z. B. Betablocker, Ca-Antagonisten, ACE-Hemmern [53].

1.4.5 Anwendung der Synergismus-Theorie auf Celecoxib und Zoledronsäure

Die Kombination aus Celecoxib und Zoledronsäure erfüllt die Grundvorrausetzungen für synergistische Wirkung. Beide führen zum programmierten Zelltod, zu einem Zell-Zyklus-Arrest und zur Hemmung der Angiogenese. Zoledronsäure hat als primäres molekulares Ziel die Hemmung der Farnesyldiphosphatsynthetase und die Bildung von ATP Analoga. Celecoxib verfügt bei vergleichbarem Wirkungsprofil über völlig andere Wirkungsmechanismen: Celecoxib hemmt die COX-2 und zeigt etliche COX-2 unabhängige Wirkmechanismen, die nicht mit der der Zoledronsäure interferieren. Die

theoretischen Vorraussetzungen für einen Synergismus zwischen Celecoxib und Zoledronsäure sind somit ideal.

1.5 Fragestellung

Aus der hohen Mortalität des Ovarialkarzinoms, der hohen Rezidivrate und den nur eingeschränkten Therapiemöglichkeiten mit zum Teil hochtoxischen Substanzen sowie den daraus resultierenden Nebenwirkungen, ergibt sich die Notwendigkeit, nach neuen Therapieansätzen zu suchen, die bei möglichst geringer Störung der Hömöostase des Organismus die Tumorzellen gezielt schädigen. Eine Möglichkeit ist die Hemmung der COX-2, die in vielen Ovarialkarzinomen überexprimiert ist [34]. Ein großes Problem in der Therapie des Ovarialkarzinoms ist die frühe und aggressive Metastasierung des Tumors. Neue Studienergebnisse wecken die Hoffnung, mit der Zoledronsäure auch ein potentes Mittel gegen viszerale Metastasierung gefunden zu haben. Beide Wirkstoffe sind gut verträglich und Gegenstand der aktuellen Tumorforschung, beide zeigen antikanzerogenes Potential sowohl in vitro als auch in vivo Versuchen.

Daraus ergibt sich folgende Fragestellung:
Führt die Kombinationstherapie aus Celecoxib und Zoledronsäure synergistisch zu einem antiproliferativen Effekt in vitro an humanen Ovarialkarzinomzelllinien?

Zur Klärung der Fragestellung wurden folgende Unterpunkte bearbeitet:

- Bestätigt sich die in vorangehenden Studien beschriebene Wachstumshemmung von Celecoxib bei den humanen Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und BG1?
- Wirkt Zoledronsäure proliferationshemmend auf die humanen Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und BG1?
- Schlägt sich die Proliferationshemmung durch Zoledronsäure und Celecoxib in einer Veränderung des Zellzyklus nieder?
- Modulieren Celecoxib und Zoledronsäure die Expression von Akt/PKB und seine Phosphorylierung?
- Wirkt die Kombination von Celecoxib und Zoledronsäure synergistisch, additiv oder subadditiv? Was bewirkt die Kombination der beiden Substanzen im Zellzyklus und wie wirkt sich die Applikation der Kombination auf Akt/ pAkt aus?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die humanen Ovarialkarzinomzelllinien mit Zoledronsäure und Celecoxib in verschiedenen Konzentrationen als Einzelsubstanz und in Kombination versetzt. Zur Analyse wurden Proliferationsassays, Flowcytometry und Western-Blot genutzt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Charakterisierung der Zelllinien:

SKOV-3-Zellen Die SKOV-3 Zelllinie ist eine humane Ovarialkarzinomzelllinie. Die östrogenrezeptorpositive, jedoch östrogeninsensitive Adenokarzinomzelllinie wurde von der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zur Verfügun gestellt.

BG1-Zellen Die östrogenrezeptorpositive und –sensitive Adenokarzinomzelllinie wurde ebenfalls von der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

Chemikalien und Lösungen:

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze	
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
FKS	Biokrom AG	Berlin, GER		
Na-Pyruvat	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
Einfriermedium				10% DMSO
			+	90% FCS
DMSO	Sigma	Steinheim, GER		

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze	
Zellkultur-Färbelösung zur Überprüfung der Zellvitalität				54% PBS
			+	36% Trypanblau 0,4%
			+	10% Zellsuspension
PBS	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
Trypanblau	Sigma	Steinheim, GER		
Ampuva	Braun	Melsungen, GER		

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
Zellbank Hera safe	Heraeus	Hanau, GER
Zentrifuge	Heraeus	Hanau, GER
Wasserbad	GFL	Burgwedel, GER
Brutschrank Hera cell	Heraeus	Hanau, GER
Mikroskop ID03	Zeiss	Jena, GER
Zählkammer Neubauer improved	Planoptik	Jena, GER
Pipetten Pipetman 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000 µl	Gilson	Villiers-le-Bel, FR
Pipetboy	Integra Biosciences	Ferwald, GER
Fireboy plus	Integra Biosciences	Ferwald, GER
Stickstofftank Locator junior plus	Barnstead	Dubuque, USA

Verbrauchsmaterialien:

Produkt	Hersteller	Ort
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson	Villiers-le-Bel, FR
Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg, GER
Zellschaber mittel, groß	Sarstedt	Newton, USA
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner	Frickenhausen, GER
Gewebekulturflasche 250 ml, 550 ml	Greiner	Frickenhausen, GER
Pipetten in ml: 1, 2, 5, 10, 25, 50	Greiner	Frickenhausen, GER
Cryo-Tube	Nunc	Roskilde, DK

2.1.2 Proliferationsassay

Chemikalien und Lösungen:

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze	
Celecoxib	Pfizer	New York, USA		
Zoledronsäure	Novartis	Basel, CH		
Glutaraldehyd 25%	Merck	Darmstadt, GER		
Kristallviolett 0,05%				0,05%Kristallviolett
			+	25% Methanol
			+	75% Ampuwa
Entfärberlösung				0,1M Natriumcitrat
			+	50 % Ethanol
			+	50% Ampuwa
Kristallviolett	Sigma	Steinheim, GER		
Methanol	Merck	Darmstadt, GER		
Ethanol	Roth	Karlsruhe, GER		
Na-Citrat	Roth	Karlsruhe, GER		

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
Photometer ELISA Reader	Tecan	Grödig, AU
ELISA-Software Magellan	Tecan	Grödig, AU
Schüttler	Heidolph	Schwabach,GER
Multipette	Eppendorf	Hamburg, GER
Transferpette-8	Brand	Wertheim, GER

Verbrauchsmaterialien:

Produkt	Hersteller	Ort
Gewebekulturplatte 96well	Greiner	Frickenhausen-GER
Ritips 1,25	Ritter	Schwabmünchen, GER
Ritips 2,5	Ritter	Schwabmünchen, GER
Ritips 5	Ritter	Schwabmünchen, GER
Ritips 12,5	Ritter	Schwabmünchen, GER
Gewebekulturschalen 100	Greiner	Frickenhausen, GER

2.1.3 FACS

Chemikalien und Lösungen:

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze	
Waschpuffer				PBS
			+	0,01% NaN_3
			+	2% FCS
NaN_3	Serva	Heidelberg, GER		
RNAse Stamm-lösung			1mg /ml PBS, 5 min 100°C	
RNAse	Serva	Heidelberg, GER		
Propidiumiodid Stammlösung			1mg/ml H_2O	
Propidiumiodid	Calbiochem	Darmstadt		
Fixierlösung				70% Ethanol
			+	30% Ampuwa

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze
FACS-Clean	BD Biosciences	San Jose, USA	
FACS-Rinse	BD Biosciences	San Jose, USA	
FACS-Flow	BD Biosciences	San Jose, USA	

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
FACS Calibur	BD Biosciences	San Jose, USA
Vortexer	Heidolph	Schwabach,GER
Auswertungssoftware Cell Quest Pro	BD Biosciences	San Jose, USA

Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller	Ort
FACS-Röhrchen. 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Falcon	Franklin Lakes, USA
Gewebekulturplatte 6well	Greiner	Frickenhausen, GER

2.1.4 Western Blot

Chemikalien:

Produkt	Hersteller	Ort
DTT	Sigma	Steinheim, GER
Acrylamidlösung	Roth	Karlsruhe, GER
APS	Merk	Darmstadt, GER
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg, GER
Dry milk	Roth	Karlsruhe, GER
Essigsäure	Merck	Darmstadt, GER
Formaldehyd	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Glycerol	Sigma	Steinheim, GER
Glycin	Serva	Heidelberg, GER
HCl	Merck	Darmstadt, GER

Produkt	Hersteller	Ort
$MgCl_2$	Serva	Heidelberg, GER
Natriumacetat	Merck	Darmstadt, GER
NaCl	Merck	Darmstadt, GER
Natriumthiosulfat	Roth	Karlsruhe, GER
Silbernitrat	Riedel-de Haen	Seelze, GER
PMSF	Fluka	Neu-Ulm, GER
SDS	Serva	Heidelberg, GER
TEMED	Roth	Karlsruhe, GER
Towbin Puffer	Serva	Heidelberg, GER
Tris Hcl	Serva	Heidelberg, GER
Triton X100	Bio Rad	Hercules, USA
ECL plus Reagenz	Amersham	Little Chalfont, UK
ECL Advanced Reagenz	Amersham	Little Chalfont, UK
Protein Assay Kit	Pierce	Rockford USA
Proteinstandard	Biolabs	Beverly, USA

Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller	Ort
Nitrucellulosemembranen 0,45µm Optitran BA-S 85	Schleicher und Schuell	Dassel, GER
Filterpapier	Amersham	Little Chalfont, UK

Geräte

Produkt	Hersteller	Ort
Röntgenfilm	Amersham	Little Chalfont, UK
Gel Kammer	Thermo	Bremen, GER
Blotting Kammer	Bio Rad	Hercules, USA
Wärmeblock	Heidolph	Schwabach,GER

Lösungen:

Lösungen	**Ansätze**	
Lyse Puffer		10mM Tris Hcl pH 8,0
	+	140 mM NaCl
	+	3 mM Mg Cl_2
	+	1% Triton X-100 pH 8,0
	+	1mM PMSF frisch dazugeben
Sammelgelpuffer pH 6,8		0,5 M Tris-Base
	+	0,4% SDS
Sammelgellösung		25 ml Sammelgelpuffer
	+	59 ml H_2O bidest
	+	16 ml Acrylamid (30% /0,8%)
Trenngelpuffer pH 8,8		1,5 M Tris-Base
	+	0,4% SDS
4 x SDS Probenpuffer pH 6,8		2g Tris-HCl
	+	25mg Bromphenolblau
	+	25ml H_2O bidest
	+	5ml 20% SDS
	+	mit Glycerol auf 45ml auffüllen
Laufpuffer (10fach konzentriert):		250mM Tris-Base
	+	1,92 M Glycin
	+	1% SDS
TBS (10 fach konzentriert)		1,5M NaCL
	+	0,1M Tris Base pH 7,5
TBST		100 ml TBS (10-fach)
		5ml Triton X 100 20%ig
Trockenmilch-Blockpuffer		7% Trockenmilch
	+	50 ml TBST
Stop-Gel		200µl Trenngel-Lösung
	+	1µl TEMED
	+	1µl APS

Lösungen	**Ansätze**	
Sammelgel		4 ml Sammelgellösung
	+	6µl TEMED
	+	12 µl 10% APS
Trenngel 12,5% Gel		2,5 ml Trenngelpuffer
	+	3,0 ml H_2O bidest
	+	4,0 ml Acrylamidlösung (30%/0,8%)
	+	0,5 ml Glycerol
	+	6 µl TEMED
	+	12 µl 10% APS
Blotting Puffer		100ml 10fach konzentrierten Towbin Buffer
	+	200ml Methanol
	+	mit Aqua Bidest auf 1l auffüllen
Stripping-Lösung		5ml Glycin 1M
	+	500µl HCl 1M
	+	45 ml Auqua dest.
Fixierer		30% Ethanol
	+	10% Essigsäure
	+	60% H_2O bidest
Na-Thiosulfatlösung		0,2% Na-Thiosulfat
	+	0,1M Na-Acetatpuffer
	+	30% Ethanol
	+	70% H_2O bidest
Silbernitratlösung		0,1% Silbernitrat
	+	0,025% Formaldehyd in H_2O bidest
Entwickler		2,5% Natriumcarbonat
	+	0,05% Formaldehyd in H_2O bidest

Antikörper:

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

2.2 Methoden

Wenn nichts anders angegeben wurde, sind die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt worden.

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Die Zelllinien SKOV-3 und BG1 wurden in RPMI 1640-Medium, versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) 1% Na-Pyruvat und 1% Penicillin/Streptomycin, in 550ml Gewebekulturflaschen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2-Begasung im Brutschrank kultiviert. (Die Begasung mit 5% CO_2 erfolgte zur Konstanthaltung des pH-Wertes der mit Hydrogencarbonat gepufferten Kulturmedien). Das sterile Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter Sterilwerkbänken mit vertikalem Luftstrom. Alle Gewebekulturmedien wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert und nur zur Anwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das Wachstumsmedium wurde alle 3-4 Tage erneuert und die verschieden Zelllinien wurden zur Kontaminationsvermeidung aus separaten Mediumflaschen versorgt. Die Zellen wurden nach zwei Passagen für die Versuche eingesetzt und wurden, zur Vermeidung von Veränderungen der Zelllinien, die mit

zunehmender Kulturdauer auftreten können, nicht länger als 12 Wochen kultiviert. Zu diesem Zweck wurden zu Beginn der Arbeit die Zellen in Portionen von $5*10^6$ Zellen im Einfriermedium konserviert.

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen von 90% konfluentem Wachstum wurden die Zellen umgesetzt. Hierzu wurde zunächst das alte Medium abgenommen und die Zellen für 2 min mit 2ml Trypsin inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 5ml Medium das Trypsin neutralisiert und die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellscrapers vom Boden der Gewebekulturflasche abgeschabt. Diese Suspension wurde bei 1100 U/min 10 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend mit 5ml frischem Medium resuspendiert. Je nach Verwendungszweck wurden die Zellen auf neue Gewebekulturflaschen mit 25ml Medium oder Gewebekulturplatten gesetzt.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen über einen längeren Zeitraum zu konservieren, wurden sie bei -196 °C gelagert. Dazu bedurften die Zellen einer gewissen Vorbereitung. Die Zellen wurden zunächst wie beim Passagieren trypsiniert und abzentrifugiert. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte nun mit 1ml Einfriermedium, welches sich aus 10% DMSO und 90% FCS zusammensetzt. Das lipophile DMSO reduziert den Wassergehalt der Zelle und verhindert so die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellmembran zerstören würden. Die Zellsuspension wurde in ein 1,8ml Kryoröhrchen überführt und anschließend in einem Styroporbehälter einen Tag bei -80°C eingefroren. Schließlich wurden die Zellen in einem Flüssigstickstofftank bei -196°C gelagert.

2.2.1.4 Reaktivierung kryokonservierter Zellen

Die Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen, für zwei bis drei Minuten im Wasserbad aufgetaut, in ein Zentrifugierröhrchen überführt und mit 5ml eiskaltem Medium vermischt. Anschließend wurden die Zellen bei 1100 U/min zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und auf Gewebekulturflaschen mit 25ml Medium gesetzt.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Um alle Versuche unter den gleichen Bedingungen durchzuführen, ist es notwendig, stets mit der gleichen Zellzahl zu arbeiten. Die Zellzahl in einer Suspension z.B. beim Passagieren wurde mit Hilfe der Neubauer-Kammer ermittelt, wobei gilt:

Zellen/ml = gezählte Zellen pro Quadrat x 10^4 x Verdünnungsfaktor

Es wurden 10µl der Zellsuspension mit 54µl PBS und 36µl Trypanblau 0,4% vermischt. Von diesem Gemisch wurden 10µl in die Neubauerkammer gegeben und die Zellen pro Quadrat ermittelt.

Da das Volumen in einem Quadrat 0,1µl entspricht, wurde die ermittelte Zellzahl zur Umrechnung auf 1ml mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:10, so dass die ermittelte Anzahl pro Kammer mit dem Faktor 10^5 multipliziert werden musste, um zur tatsächlichen Zellzahl pro ml zu gelangen.

2.2.2 Proliferationsassay mittels Kristallviolettfärbung

2.2.2.1 Durchführung

Die Zellen wurden zu je 1000/ Zellen/well in 96-well-Gewebekulturplatten ausgesät, einen Tag später je nach Versuch mit unterschiedlichen Substanzen behandelt und verschieden lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bis zu diesem Zeitpunkt fanden die Versuche unter sterilen Bedingungen statt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zur Fixierung in jedes well 10µl 25%iges Glutaraldehyd gegeben und auf dem Schüttler 15 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100µl Kristallviolettlösung und eine 15-minütige Inkubation auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Platten gewaschen (Abwaschen der Färbelösung unter fließendem Leitungswasser) und bei Raumtemperatur getrocknet. Die vorhandenen Proteine der am Boden haftenden Zellen stellten sich violett dar.Tote Zellen wurden beim Fixieren und Waschen entfernt. Schließlich wurde die Platten 30 min mit 100µl Entfärberlösung inkubiert; anschließend wurde die Extinktion bei 560 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.2.2.2 Bestätigung der Abhängigkeit der Extinktion von der Zelldichte

Zur Bestätigung der Methode wurden zunächst drei 96-well-Gewebekulturplatten mit aufsteigender Zellzahl von 1.000 Zellen bis 20.000 Zellen (SKOV-3) bzw. von 1.000 Zellen bis 40.000 Zellen (BG-1) bestückt. Die Zellen wurden 24h im Brutschrank inkubiert und anschließend wie oben beschrieben mit Kristallviolettlösung gefärbt. Dabei zeigte sich deutlich, dass die Extinktion mit der pipettierten Zellzahl positiv korreliert.

Die Graphen der Abb. 2.1 und 2.2 stellen den Mittelwert aus drei Versuchen dar. Es ist zu erkennen, dass die Kurve am Anfang relativ linear verläuft und bei größer werdender

Zellzahl langsam abflacht, so dass die Extinktion für SKOV-3 optimal im Bereich von 0,1 bis 0,4 und für BG-1 optimal im Bereich 0,1 bis 0,3 mit der Zellzahl korreliert. Dies wurde in den Folgeversuchen berücksichtigt.

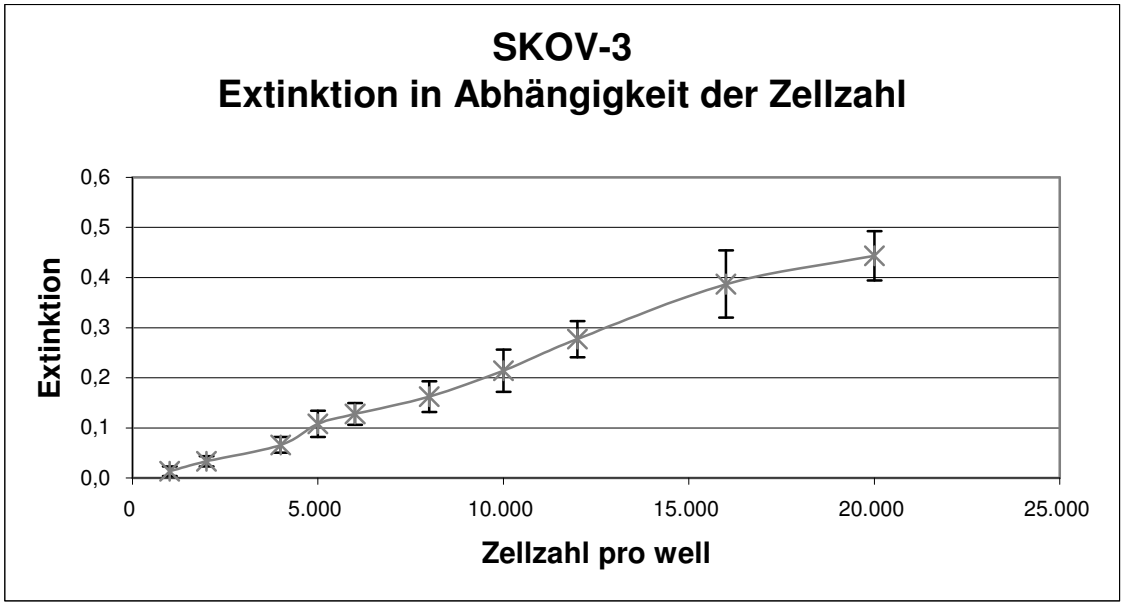


Abb. 2-1: **Extinktion der SKOV-3-Zellen in Abhängigkeit der Zellzahl;** der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, die Werte wurden pro Versuch sechsfach erstellt; dargestellt sind die Messwerte ± Standardabweichung.

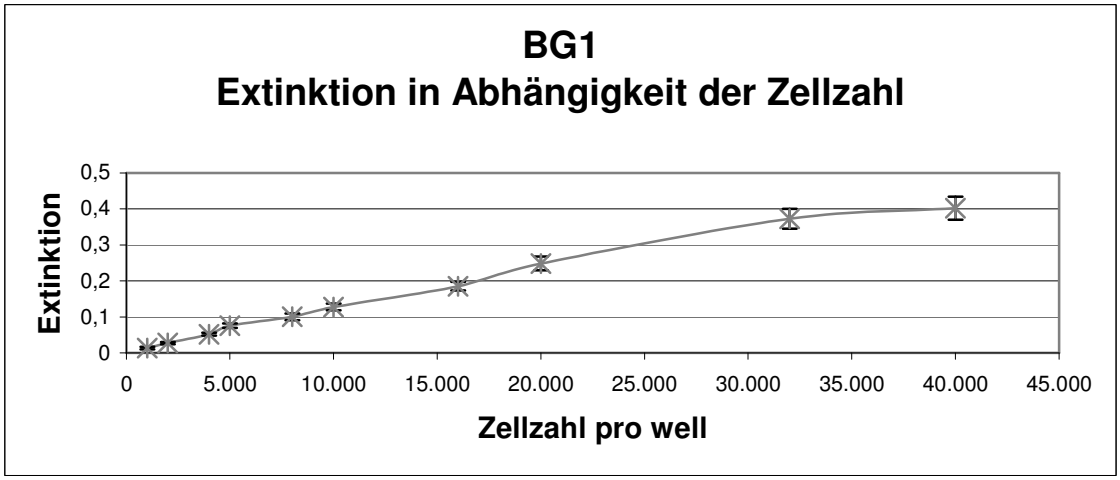


Abb. 2-2: **Extinktion der BG1-Zellen in Abhängigkeit der Zellzahl;** der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, die Werte wurden pro Versuch sechsfach erstellt; dargestellt sind die Messwerte ± Standardabweichung.

2.2.2.3 Zeitabhängigkeit

Beide Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von jeweils 1.000 Zellen in 100ml Medium pro well auf 96well Platten ausgesät. Dabei wurden die wells am Außenrand der Platten nur mit 100µl Medium bestückt, da hier die Verdunstung höher ist und diese

Werte zum Ermittlung der Leerwert-Extinktion verwendet wurden. Am Folgetag wurde in den mit Zellen bestückten wells ein Mediumwechsel durchgeführt - das alte Medium wurde mit einer sterilen Multipipette abgenommen, das frische Medium war jetzt aber mit den Substanzen Celecoxib oder Zoledronsäure versetzt. Jeweils zwölf wells wurden mit der gleichen Konzentration behandelt und zwar:

1. Kontrolle 0,5% DMSO in Medium oder 0,5% H_2O in Medium
2. 50µmolar Celecoxib in Medium oder 50µmolar Zoledronsäure in Medium
3. 10µmolar Celecoxib in Medium oder 10µmolar Zoledronsäure in Medium
4. 1µmolar Celecoxib in Medium oder 1µmolar Zoledronsäure in Medium
5. 0,1µmolar Celecoxib in Medium oder 0,1µmolar Zoledronsäure in Medium

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
B	M	Kontrolle	Kontrolle	50µmolar	50µmolar	10µmolar	10µmolar	1µmolar	1µmolar	0,1µmolar	0,1µmolar	M
C	M											M
D	M											M
E	M											M
F	M											M
G	M											M
H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

Abb. 2-3: **Pipettierschema Zeitversuche;** die äußeren wells der 96-well-Gewebekulturplatten wurden mit 100µl Medium (M) bestückt, jeweils zwölf der inneren wells wurden mit der gleichen Konzentration des Medikamentes versehen; die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Bei der Herstellung der Medikamentenverdünnungen wurde, um eine möglichst exakte Konzentration der Lösungen zu erreichen, nur das Medium bei der höchsten Konzentration mit der jeweiligen Substanz versetzt und von dieser Konzentration ausgehend eine Verdünnungsreihe durchgeführt.

Die Inkubationszeit betrug zwei, vier, sechs und acht Tage. Am vierten Tag wurde ein Mediumwechsel nach dem oben angegebenen Pipettierschema vorgenommen. Nach Ablauf der Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Platten mit Kristallviolett nach oben beschriebenem Protokoll gefärbt. Insgesamt wurde jeder Versuch dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.2.4 Konzentrationsabhängigkeit

Die Konzentrationsabhängigkeitsversuche wurden vom Prinzip her so wie die Zeitabhängigkeitsversuche durchgeführt. Die 96-well-Gewebekulturplatten wurden mit 1000 Zellen pro 100µl und well bestückt, am darauf folgenden Tag fand ein Mediumwechsel

versetzt mit Celecoxib oder Zoledronsäure statt. Die Verdünnungsreihe wurde jedoch mit mehr Zwischenstufen hergestellt und zwar:

1. Kontrolle 0,5% DMSO in Medium oder 0,5% H_2O in Medium
2. 50µmolar Celecoxib in Medium oder 50µmolar Zoledronsäure in Medium
3. 25µmolar Celecoxib in Medium oder 25µmolar Zoledronsäure in Medium
4. 10µmolar Celecoxib in Medium oder 10µmolar Zoledronsäure in Medium
5. 6µmolar Celecoxib in Medium oder 6µmolar Zoledronsäure in Medium
6. 3µmolar Celecoxib in Medium oder 3µmolar Zoledronsäure in Medium
7. 1µmolar Celecoxib in Medium oder 1µmolar Zoledronsäure in Medium
8. 0,5µmolar Celecoxib in Medium oder 0,5µmolar Zoledronsäure in Medium
9. 0,1µmolar Celecoxib in Medium oder 0,1µmolar Zoledronsäure in Medium
10. 0,01µmolar Celecoxib in Medium oder 0,01µmolar Zoledronsäure in Medium

Daraus ergibt sich folgendes Pipettierschema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
B	M	Kontrolle	50µmolar	25µmolar	10µmolar	6µmolar	3µmolar	1µmolar	0,5µmolar	0,1µmolar	0,01µmolar	M
C	M											M
D	M											M
E	M											M
F	M											M
G	M											M
H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

Abb. 2-4: **Pipettierschema Konzentrationsversuche;** die äußeren wells der 96-well-Gewebekulturplatten wurden mit 100µl Medium (M) bestückt, jeweils sechs der inneren wells wurden mit der gleichen Konzentration des Medikamentes versehen; die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Schließlich wurden die Zellen vier Tage inkubiert und mit Kristallviolettlösung gefärbt. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.2.5 Kombinationsversuch

Der Ablauf des Kombinationsversuchs gestaltete sich wie der des Konzentrationsversuchs. Auch in diesem Versuch wurden die Zellen mit aufsteigender Konzentration von Zoledronsäure behandelt, allerdings wurde dem Medium zusätzlich kein Celecoxib oder eine Grundkonzentration von 15µmolar oder 35µmolar Celecoxib zugesetzt, so dass die beiden Medikamente miteinander kombiniert wurden. Zugunsten der Kontrolle ohne jegliche Substanzzugabe wurde auf die letzte Verdünnungsstufe 0,01µmolar Zoledronsäure verzichtet.

Die Kontrolle wurde mit 0,5% H_20 und 0,35% DMSO durchgeführt. Es ergibt sich eine sechsfache Bestimmung pro Konzentration. Die Versuche wurden dreimal voneinander unabhängig durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
B	M	H2O 0,5% + DMSO 0,35%	H2O 0,5% + Celecoxib 35µmolar	Zoledronsäure 0,1µmolar + Celecoxib 35µmolar	Zoledronsäure 0,5µmolar + Celecoxib 35µmolar	Zoledronsäure 1µmolar + Celecoxib 35µmolar	Zoledronsäure 3µmolar + Celecoxib 35µmolar	Zoledronsäure 6µmolar + Celecoxib 35µmolar	Zoledronsäure 10µmolar + Celecoxib 35µmolar	Zoledronsäure 25µmolar + Celecoxib 35µmolar	Zoledronsäure 50µmolar + Celecoxib 35µmolar	M
C	M											M
D	M											M
E	M											M
F	M											M
G	M											M
H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

Abb. 2-5: **Pipettierschema Kombinationsversuch,** die äußeren wells der 96-well-Gewebekulturplatten wurden mit 100µl Medium (M) bestückt, jeweils sechs der inneren wells wurden mit der gleichen Kombinations-Konzentration des Medikamentes versehen; die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt; die Celecoxibkonzentration ist je nach Versuch durch 0µmolar bzw. 15µmolar zu ersetzen.

2.2.3 FACS

2.2.3.1 Präparation von Zellen für die Zellzyklusanalyse am FACS-Gerät

Die Zellen wurden in Konzentrationen von $5x10^4$ pro well (SKOV-3) bzw. $2x10^5$ pro well (BG1) in 6-well Gewebekulturplatten ausgesät. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Celecoxib bzw. Zoledronsäure oder mit einer Kombination der beiden Medikamente versetzt wurde. Diese Platten wurden vier Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 0,5ml Trypsin behandelt, diese Reaktion wurde mit 1,5ml Medium abgestoppt. Die Zellen wurden in ein 15ml Falkon-Röhrchen überführt und 10 min bei 1.100 U/min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Zugabe von 2ml Waschpuffer zum Zellpellet und eine erneutes fünfminütiges Zentrifugieren bei 1.400 U/min. Der Überstand wurde wieder abgenommen und die Zellen wurden durch tropfenweises Zugeben von eiskaltem 70%igem Ethanol unter ständigem Vortexen fixiert. Die nun in Ethanol gelösten Zellen wurden bei 4°C eine Nacht gelagert und dann bei 1.400 U/min 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit 2ml Waschpuffer resuspendiert, nochmals bei

1400 U/min zentrifugiert. Schließlich erfolgte nach Abnahme des Überstandes die RNAse-Behandlung durch Zugabe von 100µl RNAse Stammlösung. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben bei 37°C 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Propidiumiodid-Färbung durch Zugabe von 1ml Waschpuffer und 10µl Propidiumiodid. Die Proben wurden 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend am FACS-Calibur gemessen.

2.2.3.2 Durchführung der FACS-Messung

Die Zellzyklus-Analysen wurden mit einem FACS Calibur (Becton Dickenson BD, Heidelberg) nach allgemein geltendem Standard durchgeführt und die erhaltenen Daten mit der Software Cellquest Pro (BD) ausgewertet. Das Prinzip der Messung beruht dabei auf der Tatsache, dass der Farbstoff Propidiumiodid in die DNA interkaliert. Die Zellen werden gefärbt und können im Fluoreszenzkanal gemessen werden. Wird Propiumiodid im Überschuss zur Probe gegeben, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem DNA-Gehalt der Zelle und der Fluoreszenzintensität.

Bei der Daten Akquisition wurde das FACS-Gerät so eingestellt, dass im FL2A gegen FL2W Dotplot die Meanwerte der Zellen der G1 Phase bei Kanal 200 lagen; Zellen der G2-Phase besitzen den doppelten DNA-Gehalt und lagen somit im Kanal 400.

Um die Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Zahl der gewerteten Events auf 20.000 festgesetzt.

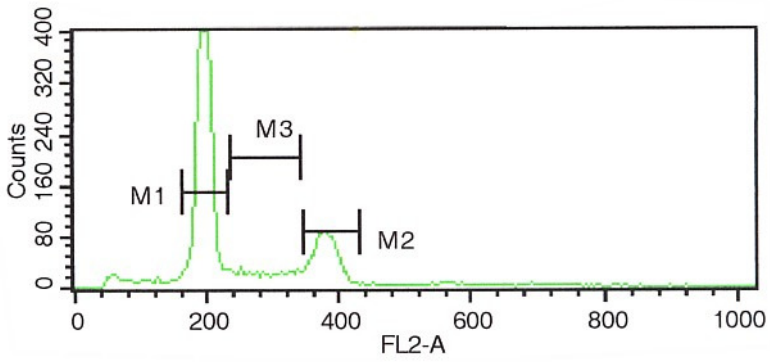


Abb. 2-6: **Darstellung eines Zellzyklus;** die G1 Phase liegt bei Kanal 200 und die G2 Phase bei Kanal 400.

Ein Problem bei der Messung im FACS-Gerät stellen die durch die Ethanol-Fixierung produzierten Zell-Dupletten dar. Eine Zell-Duplette aus der G1 Phase weist den gleichen DNA-Gehalt auf wie eine Zelle in der G2 Phase. Um in der Auswertung keine überhöhte G2 Phase durch G1-Dupletten-Artefakte zu bekommen, wurden die Dupletten bzw. mehrfach zusammenklebende Zellen ausgegated. Sie brauchen länger um

durch den Laserfokus zu gelangen, erzeugen somit einen breiteren Peak und ein größeres FL2W Signal, wie in Abb. 2-7 dargestellt ist.

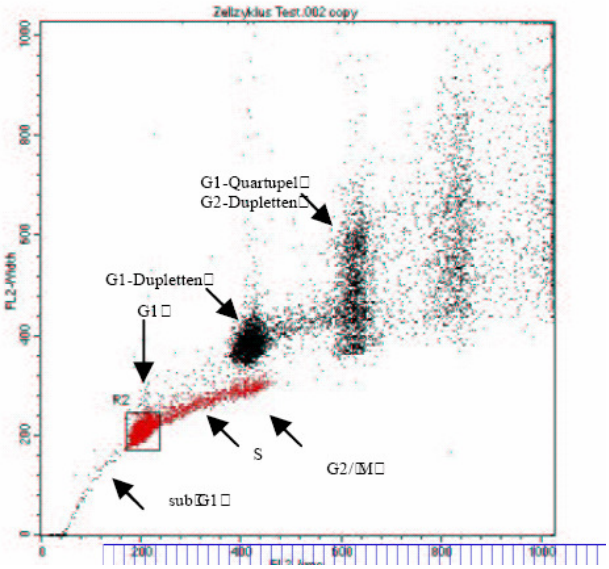


Abb. 2-7: **Duplettendiskriminierung;** Erläuterungen s. Text.

2.2.3.3 Auswertung der Daten

Zur Auswertung der Daten wurde mithilfe der Kontrollprobe die Bereiche für G1, S, und G2 Phase mithilfe der Marker s. Abb. 2-6 festgelegt. Diese Markereinstellungen wurden nun zur Auswertung der mit Zoledronsäure und/oder Celecoxib behandelten Zellen übernommen. Es ergab sich eine prozentuale Verteilung der einzelnen Zellphasen, die statistisch ausgewertet werden konnte.

2.2.4 Western-Blot

2.2.4.1 Prinzip der Western-Blot-Methode

Western-Blot ist eine Methode zur Identifizierung von Proteinen. Sie werden zunächst unter Einwirkung von SDS denaturiert und erhalten eine einheitlich negative Ladung. Des Weiteren werden die Proteine linearisiert. Dies geschieht durch die Auflösung von Disulfidbrücken durch Reduktion mit DTT. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wandern die vorbehandelteten Proteine von der Kathode zur Anode und werden nun nach ihrer Größe aufgetrennt. Diese Trennung erfolgt in den Poren des Trenngels, so dass sich die Mobilität der Proteine durch die Porengröße des Trenngels beeinflussen lässt. Proteine mit kleinem Molekulargewicht werden mit stärker vernetzten Gelen getrennt als solche mit einem hohen Molekulargewicht. Um die Proteine für die Detektion zugänglich zu machen, werden sie auf Nitrocellulosemembranen transferiert.

2.2.4.2 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden zu je 10^7 Zellen in großen Gewebekulturflaschen mit 10ml Medium ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Zoledronsäure bzw. Zoledronsäure kombiniert mit Celecoxib versetztem Medium behandelt. Die Zellen wurden einen weiteren Tag bebrütet und schließlich geerntet. Dazu wurden die Zellen mit 0,5ml Trypsin versetzt, nach ca. 1,5 min wurde die Reaktion mit 5ml PBS abgestoppt. Die Zellen wurden gescrabbt und schließlich in ein 15ml Falkon-Röhrchen überführt.

2.2.4.3 Lyse

Die wie in 1.2.4.2 vorbehandelten Zellen wurden 5 min bei 1100 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Zellpellet abgekippt und mit 5ml PBS durch Vortexen vermischt. Es wurde bei 1.600 U/min 5 min zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette vollständig abgenommen. Schließlich wurde 1ml Lyse-Puffer pro Probe zugegeben, gevortext und die Proben 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 4°C bei 1.300 U/min zentrifugiert und der gewonnene Überstand schließlich eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.4.4 Proteinbestimmung mittels PIERCE Protein Assay Kit

Um im Western-Blot verschiedene Proben vergleichen zu können, ist es nötig, gleiche Proteinmengen auf das Gel aufzutragen. Dies erfordert im Vorfeld die exakte Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben.

Prinzip:

Bei dieser Methode handelt es sich um eine kolometrische Bestimmung und Quantifizierung der Gesamtproteinmenge duch Komplexbilung von Proteinen mit Kupfer. In alkalischem Milieu reagiert Cu^{2+} mit Proteinen zu Cu^{1+}. In einem zweiten Schritt entsteht durch die Interaktion von zwei BCA-Molekülen mit einem Cu^{1+}-Ion ein wasserlösliches, violettes Reaktionsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Der Anteil des produzierten violetten Reaktionskomplexes ist somit direkt proportional zur Proteinmenge. Dies erlaubt die photometrische Quantifizierung von Proteinen in wässriger Lösung.

Vorgehensweise:

Jeweils 150µl des Proteinstandards bzw. der unbekannten Probe wurde in ein well der Mikrotiterplatte gegeben. Dazu wurden 150µl Reaktionslösung pipettiert, die sich zu 50% aus dem alkalischen Reagenz A (enthält u.a. Na_2CO_3, $NaHCO_3$), zu 48% aus dem

Reagenz B (enthält Bichinonsäure) und zu 2% aus dem Reagenz C (enthält Kupfer-Sulfat) zusammensetzt. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt. Die Mikrotiterplatte wurde zwei Stunden auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert, dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Schließlich wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen und daraus die Proteinkonzentration berechnet.

Ermitteln der Proteinstandardkurve:

Als Referenz zu den Proben wurde eine Eichkurve mit Rinderalbumin in den Konzentrationen: 0µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml und 200µg/ml hergestellt. Der Rinderalbuminstandard mit der Konzentration 2mg/ml wurde dem Kit entnommen und eine Verdünnungsreihe mit PBS in den oben angegebenen Konzentrationen angefertigt. Die Proben wurden doppelt bestimmt und aus den ermittelten Werten die unten dargestellte Eichkurve berechnet.

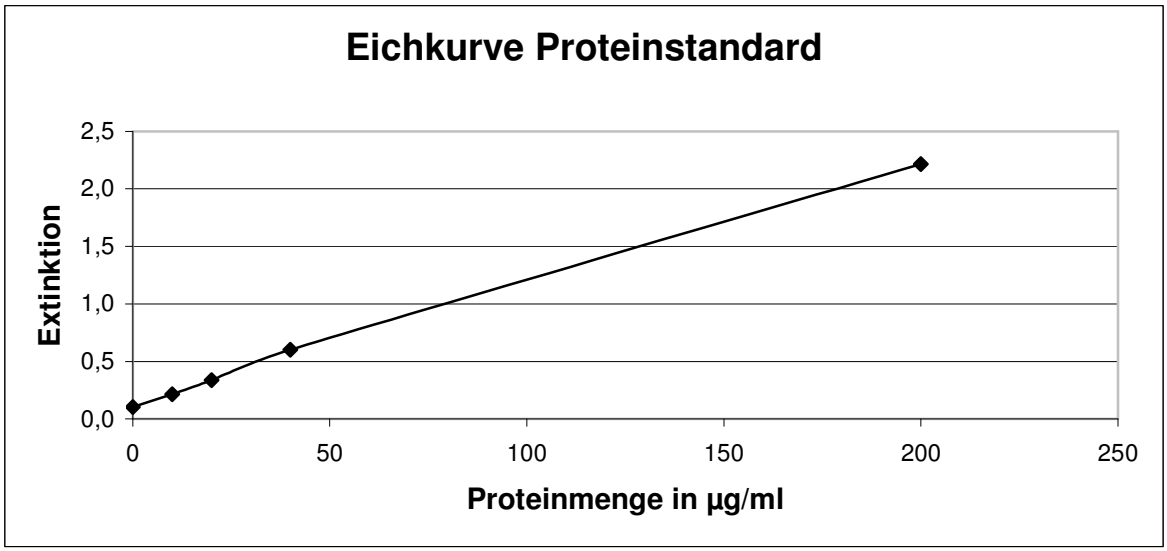


Abb. 2-8: Eichkurve Proteinstandard; die Standardabweichung betrug weniger als drei Prozent.

Durch die Linearität (Extinktionskoeffizient/ Proteinmenge) konnte die effektive Proteinmenge der unbekannten Proben quantifiziert werden.

2.2.4.5 Direkte Vorbereitung des Blots

Gel gießen

Die Gele für das Western Blot setzen sich aus zwei Komponenten zusammen:

1. Sammelgel — Hier werden durch Einsetzen von Kämmen Geltaschen gebildet, aus denen die Proteinwanderung startet.
2. Trenngel — Hier findet die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe statt.

Die Lösungen der einzelnen Gele sind im Materialteil aufgelistet. Sie werden zusammenpipettiert und in vorbereitete Gelkammern gegeben. Diese wird aus zwei Glasplatten mit einem Gummizug als Spacer und Abdichtung zusammmengebaut und mit zwei Klammern fixiert. Zuerst wird die Stoppgellösung in die Kammer gegeben. Hier ist der APS und der TEMED Anteil höher, so dass die Lösung schneller polymerisiert. Anschließend wird die Trenngel-Lösung bis 5mm unterhalb der Probentaschen gegossen und sofort die Sammelgellösung bis zum oberen Rand der Glasplatten dazugegeben. Der Kamm wurde luftblasenfrei eingesteckt und das Gel schließlich ca. 45 min ausgehärtet.

Proben vorbereiten

Aus den Lysaten wurde eine Stocklösung mit 200µg/100µl hergestellt. Aus diesem Stock wurden 10µl Probe (d.h. 20µg Protein) entnommen und mit jeweils 4 µl 4xSDS Probenpuffer sowie 1,6µl DDT 1M versetzt. Die Proben wurden gevortext, kurz anzentrifugiert und schließlich 5 min bei 95°C inkubiert. Dann wurden die Proben vollständig in die Taschen des Gels pipettiert. Mit dem zur Größenbestimmung der Probenproteine verwendeteten Standard wurde ebenso verfahren.

2.2.4.6 Auftrennung der Proteine und Blotting

Die Auftrennung der Proteine in Gel erfolgte in einem Vertical mini gel Elektrophorese System, das mit Laufpuffer gefüllt wurde. An das Gel wurde eine Stromstärke von 20 mA/Gel angelegt und erfolgte so lange, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Das Gel wurde nun vorsichtig von den Glasplatten abgenommen, Stop- und Sammelgel wurden abgetrennt und eine Nitrocellulosemembran in der Größe des Gels zugeschnitten. Es wurde ein „Sandwich“ hergestellt: ein Streifen Pappe, eine Nitrocellulosemembran, das Gel und ein weiterer Pappstreifen wurden zwischen zwei dünne Schwämme in einer gitterförmigen Kunststoffvorrichtung eingeklemmt und mit der Membranseite zur Anode in die mit Blotting Puffer gefüllte Blot-Kammer eingehängt. Der Transfer erfolgte bei 300 mA für ca. 1h.

2.2.4.7 Ponceau-S Färbung

Nach dem Transfer der Proteine von der Polyacrylamidmatrix auf die Nitrocellulosemembranen wurden die Membranen für 5 min in Ponceau S eingelegt. Die Proteinbanden wurden so reversibel angefärbt und konnten so nach mehrmaligem Waschen der

Membranen mit Aqua dest. zum Abgleich der aufgetragenen Proteinkonzentration herangezogen werden.

2.2.4.8 Silberfärbung

Die Silbernitratfärbung ist eine sensible Methode zur Detektion von Proteinen. Die Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Reste von Proteinen bilden Komplexe mit den positiv geladenen Silberionen, die im nächsten Schritt mittels Formaldehyd und Natriumcarbonat zu elementarem Silber reduziert werden. Dadurch entsteht die charakteristische Schwarz- bzw. Braunfärbung.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit Fixierer behandelt; die Inkubation über Nacht in 0,2% Na-Thiosulfatlösung schloss sich an. Die Gele wurden anschließend dreimal für jeweils 10 min mit Aqua bidest gewaschen und anschließend 25 min mit 0,1%iger Silbernitratlösung behandelt. Danach erfolgte nochmaliges Waschen mit Aqua bidest und zweimaliges Waschen mit 50ml Entwickler. Das elementare Siber wurde durch die Zugabe von 100ml Entwicklerlösung ausgefällt und die Reaktion bei der gewünschten Braunfärbung der Gele mit 10ml 10%iger Essigsäure gestoppt. Alle Lösungen wurden frisch angesetzt, die Trocknung der Gele erfolgte nach Behandlung mit Gelfixlösung in einem Bio-Rad Gel-Dryer Model 543 (BioRad, Hercules, USA) bei 60°C für 1,5h.

2.2.4.9 Blocken

Vor der Reaktion zwischen den fixierten Proteinen auf der Nitocellulosemembran und den spezifischen Antikörpern müssen unspezifische Proteinbindungsstellen der Blotmembran blockiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran 1h bei Raumtemperatur in 20ml Trockenmilch-Blockpuffer inkubiert.

2.2.4.10 Detektion

Die Detektion der Proteine beruht auf dem Prinzip der Epitop-Erkennung durch spezifische Antikörper. Diese Epitope sind auch nach der Denaturierung durch SDS bzw. DDT noch erhalten.

Der erste Antikörper bindet spezifisch an die Epitope der zu detektierenden Proteine und stammt selber aus der Maus oder dem Hasen. Der zweite Antiköper bindet an die Maus- oder Hasen-Antigene der Erstantikörper und ist HRP (Merettich-Peroxidase) gekoppelt. HRP katalysiert die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O. Dazu benötigt die HRP jedoch Elektronen, die sie aus dem im dritten Detektionsschritt zugegebenen Peroxida-

se-Substrat erhält. Eine Reaktionsabfoge wird in Gang gesetzt, bei der ein Produkt entsteht, das sofort wieder unter der Abstrahlung von Licht zerfällt.

Nach dem Blocken erfolgte dreimaliges Waschen mit 10ml TBST jeweils 10 min. Anschließend wurde der Erstantikörper (die Verdünnung mit Trockenmilch-Blockpuffer richtete sich nach den entsprechenden Herstellerangaben) zugegeben und bei Raumtemperatur 1 h auf dem Kippschüttler inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit TBST jeweils 10 min und die anschließende einstündige Inkubation mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in Trockenmilch-Blockpuffer auf dem Kippschüttler. Wieder wurden die Membranen dreimal mit TBST 10 min gewaschen und danach kurz trocknen gelassen. Als Substrat für die HRP kamen zwei unterschiedliche Systeme zur Anwendung. Je nach Stärke des Signals wurde der ECL Advance oder das ECL plus Western Blotting Detection Kit verwendet. Die Membranen wurden ca. 2 min mit der jeweiligen ECL Reagenz inkubiert. Die Membranen wurden zwischen 30 sec und 20 min mit Röntgenfilmen in einer Röntgenkassette aufbewahrt, so dass das entstandene Chemilumineszenzsignal auf dem Röntgenfilm aufgenommen und schließlich in einer automatischen Entwicklermaschine sichtbar gemacht wurde.

2.2.4.11 Stripping

Durch die Methode des Stripping können einfach geblottete Membranen mit einem anderen Erst- und dem sich anschließenden Zweitantikörper inkubiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran mit 10 ml Stripping-Lösung 20 min bei 65°C inkubiert.

2.2.5 Statistik

Die Proliferationsversuche wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel und Graph Pad Prism 4 ausgewertet. Es wurde der T-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Die Ergebnisse der FACS-Versuche wurden ebenfalls mit dem Programm Microsoft Excel aufbereitet. Die Auswertung und Bearbeitung der Western Blot Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Adobe Photoshop und Image J.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationsassay

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Zeit- und der Konzentrationsabhängigkeit zwischen Einwirkdauer des Medikaments bzw. Konzentration des Medikaments und der Extinktionsdichte beschrieben. Die Abhängigkeit der Extinktion von der Zelldichte wurde in einem Vorversuch nachgewiesen und ist im Material und Methodenteil unter 2.2.2.2 dargestellt.

Die Versuche wurden jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und aus den gemessenen Werten der Mittelwert gebildet. Die Zeitversuche dienten der Ermittlung der optimalen Inkubationszeit für die Konzentrationsversuche, aus deren Ergebnisse sich der IC30 und der IC50 errechnen ließ. Diese bildeten schließlich die Basis für die Kombinationsversuche.

3.1.1 Zeitabhängigkeit Celecoxib

3.1.1.1 BG1-Zellen

Die Zellen wurden nach der in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen Methode behandelt.

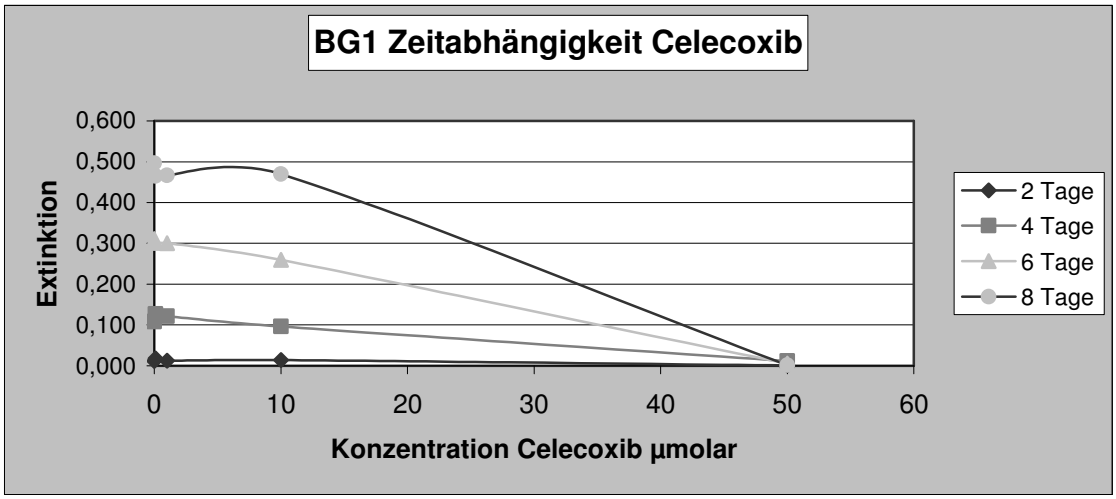


Abb. 3-1: BG1 Zeitabhängigkeit Celecoxib, dargestellt ist exemplarisch ein Versuch.

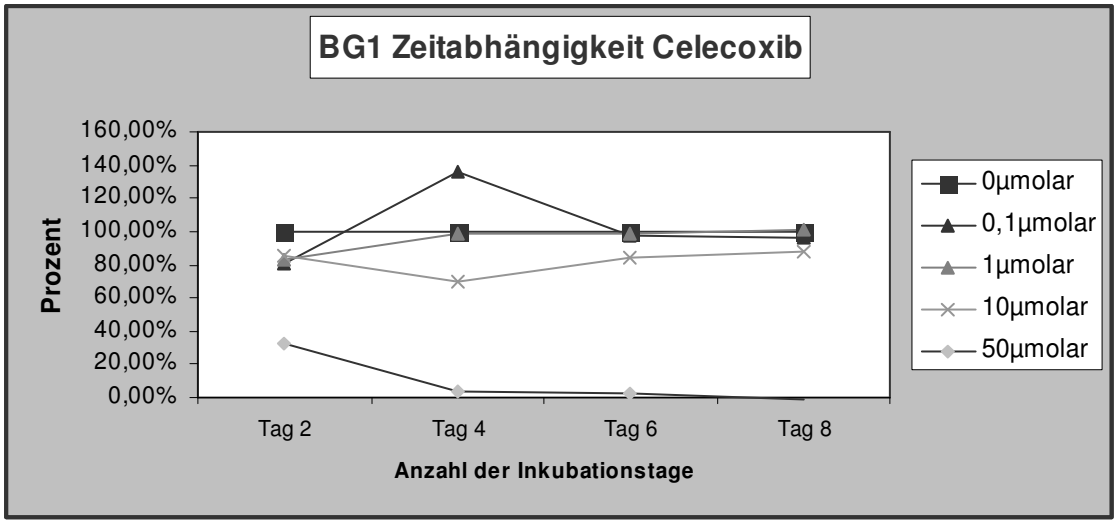


Abb. 3-2: **BG1 Zeitabhängigkeit Celecoxib,** die Kontrolle gilt an allen Tagen als 100% und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. Steigerung dar. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung liegt bei ≤ 15%.

Beide Graphiken zeigen den gleichen Versuch mit verschiedenen Schwerpunkten der Darstellung. In der Abb. 3-1, in der die gemessene Extinktion gegen die Celecoxib-Konzentration aufgetragen ist, wird deutlich, dass mit steigender Inkubationsdauer die Extinktion zunimmt. Dies trifft besonders für die geringen Celecoxib-Konzentrationen zu und für die Kontrolle mit 0,5% DMSO. Die Extinktion bei 0,5% DMSO liegt am achten Inkubationstag 41fach höher als am zweiten Inkubationstag.

In Abb. 3-2 ist die Inkubationszeit gegen die Wachstumsrate aufgetragen. Deutlich hebt sich der vierte Tag von den anderen Inkubationstagen ab: Hier stellen sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen am eindruckvollsten dar. Die Ergebnisse der Konzentration 0,1µmolar Celecoxib zeigen einen 35,7% höheren Wert als die der Kontrolle mit 0,35% DMSO, bei 1µmolarem Celecoxib liegt der Wert auf der Höhe der Kontrolle, die Werte der 10µmolaren Celecoxib-Konzentration zeigen nur noch 70% des Wachstum der Kontrolle, bis die Zellen bei einer Konzentration von 50µmolar Celecoxib schließlich mit vier Prozent kaum noch nachweisbar sind. Bei länger dauernder Inkubationszeit lassen sich diese deutlichen Unterschiede nicht mehr darstellen. Die drei niedrigen Celecoxib-Konzentrationen nähern sich mehr dem Kontrollwert an; nur der 50µmolar Wert setzt sich von den anderen deutlich ab.

Für den Tag vier ergibt sich bei einer Konzentrationen von 50µmolar Celecoxib gegenüber der Kontrolle ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert <0,0001.

3.1.1.2 SKOV-3-Zellen

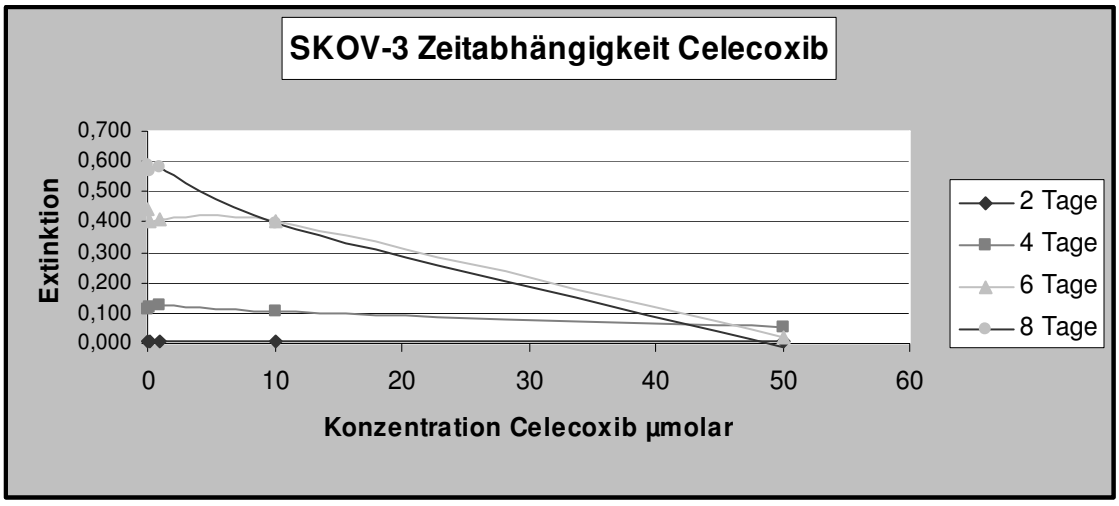


Abb. 3-3: **SKOV-3 Zeitabhängigkeit Celecoxib,** dargestellt ist exemplarisch ein Versuch.

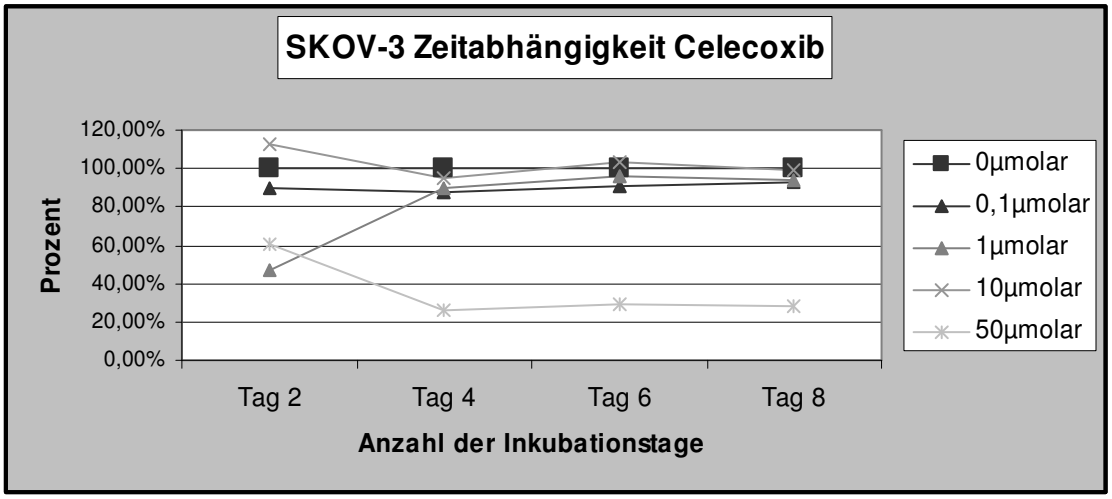


Abb. 3-4: **SKOV-3 Zeitabhängigkeit Celecoxib,** die Kontrolle gilt an allen Tagen als 100% und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. Steigerung dar. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist ≤ 15%.

Auch für die Zelllinie SKOV-3 sind beide Darstellungsarten aufgeführt. In der Abb. 3-3, in der die gemessene Extinktion gegen die Celecoxib-Konzentration aufgetragen ist, wird deutlich, dass auch bei SKOV-3-Zellen mit steigender Inkubationsdauer die Extinktion zunimmt. Die Extinktion der Kontrollreihe mit 0,5% DMSO liegt am achten Inkubationstag neunfach höher als am zweiten Inkubationstag. Mit steigender Celecoxib-Konzentration scheint sich dieser Effekt jedoch zu verringern, bei 50µmolarer Celecoxib-Konzentration wird mit Verlängerung der Inkubationszeit keine Steigerung der Extinktion erreicht.

Auch in anderer Darstellung wie in Abb. 3-4 lässt sich der Effekt der hohen hemmenden Konzentration deutlich zeigen. Ab dem vierten Tag liegt die Kurve bei rund 20% der Kontrolle und bleibt auch bei längerer Inkubationszeit auf diesem Wert. Die Werte der

anderen Konzentrationen liegen ab dem vierten Tag sehr nahe bei dem der Kontrolle und auch hier wird durch eine Verlängerung der Inkubationszeit keine Veränderung erzielt. Somit wurde der vierte Tag als optimaler Tag für die Konzentrationsversuche festgesetzt.

Für den Tag vier ergibt sich bei einer Konzentrationen von 50µmolar Celecoxib gegenüber der Kontrolle ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert <0.0001,

3.1.2 Zeitabhängigkeit Zoledronsäure

3.1.2.1 BG1-Zellen

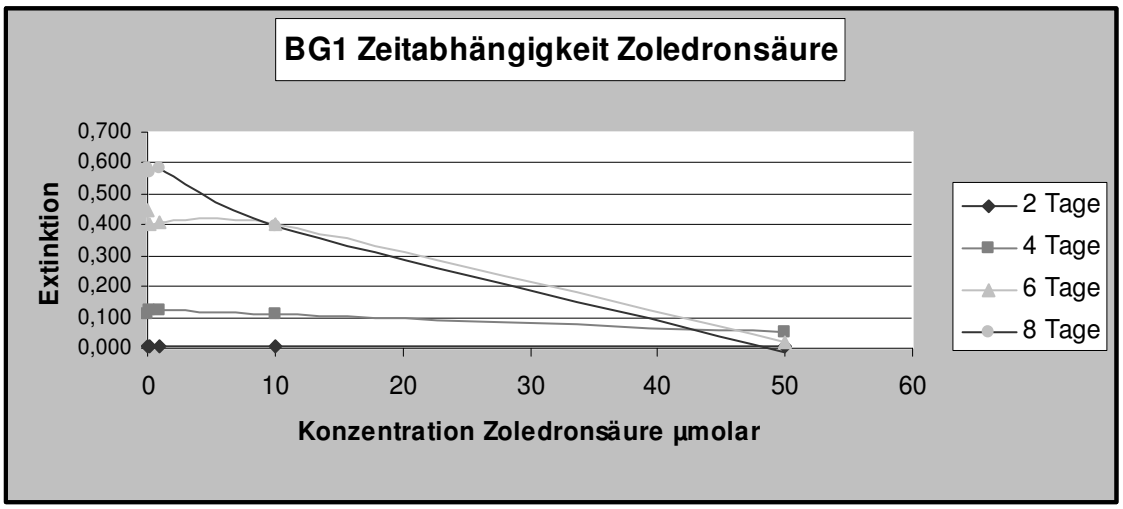


Abb. 3-5: **BG1 Zeitabhängigkeit Zoledronsäure,** dargestellt ist exemplarisch ein Versuch.

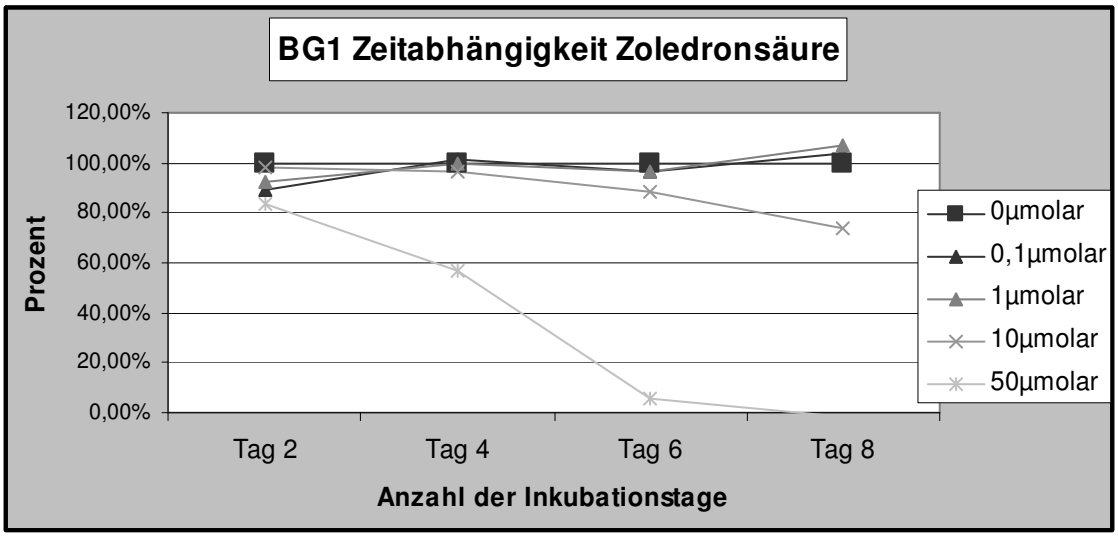


Abb. 3-6: **BG1 Zeitabhängigkeit Zoledronsäure,** die Kontrolle gilt an allen Tagen als 100% und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. Steigerung dar. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung beträgt $\leq 15\%$.

Das Diagramm 3-5 des exemplarisch ausgewählten Zeitversuches bestätigt die Aussage, dass sowohl die zunehmende Inkubationsdauer als auch die Verminderung der hohen Medikamentenkonzentration zu einer Extinktionszunahme führt.

Trägt man die Wachstumsrate der BG1-Zellen gegen die Zeit wie in Abb. 3-6 auf, zeigen sich in den geringen Konzentrationen 0,1µmolar und 1µmolar keine bis geringste Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle mit 0,5% H_2O. Bei 10µmolarer Zoledronsäure-Konzentration zeigt sich ein deutlicher Effekt erst bei achttägiger Inkubationszeit mit einer Abnahme um 26,5 Prozent gegenüber der Kontrolle mit 0,5% H_2O. Bei 50µmolarer Konzentration zeigt sich mit längerer Inkubationszeit auch eine deutliche Abnahme der Wachstumsrate. Sie beträgt am vierten Tag 54,5 Prozent und am sechsten Tag 94,5 Prozent weniger als die Kontrolle. Am achten Tag lässt sich kein Wachstum mehr nachweisen.

Für den Tag vier ergibt sich bei einer Konzentrationen von 50µmolar Celecoxib gegenüber der Kontrolle ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert <0,0001.

3.1.2.2 SKOV-3-Zellen

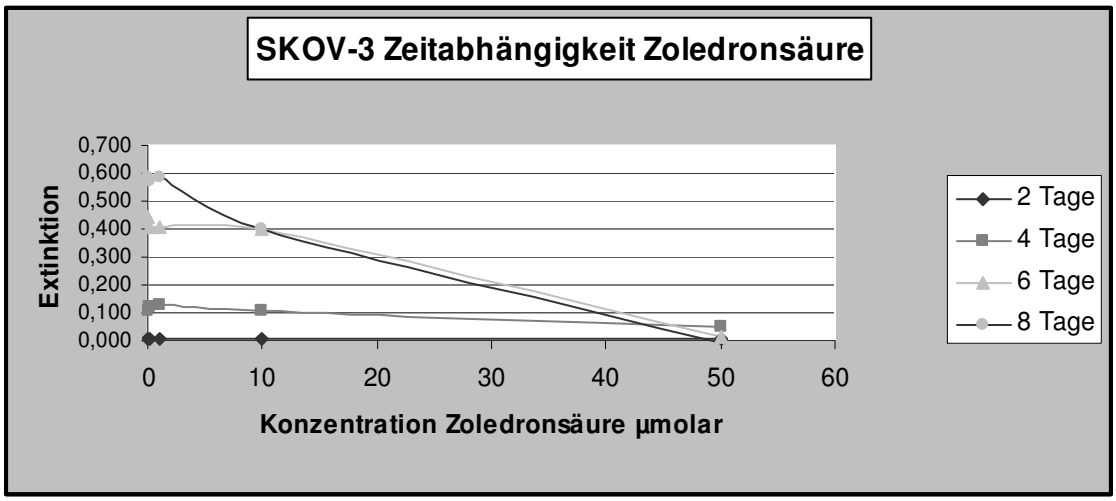


Abb. 3-7: SKOV-3 Zeitabhängigkeit Zoledronsäure, dargestellt ist exemplarisch ein Versuch.

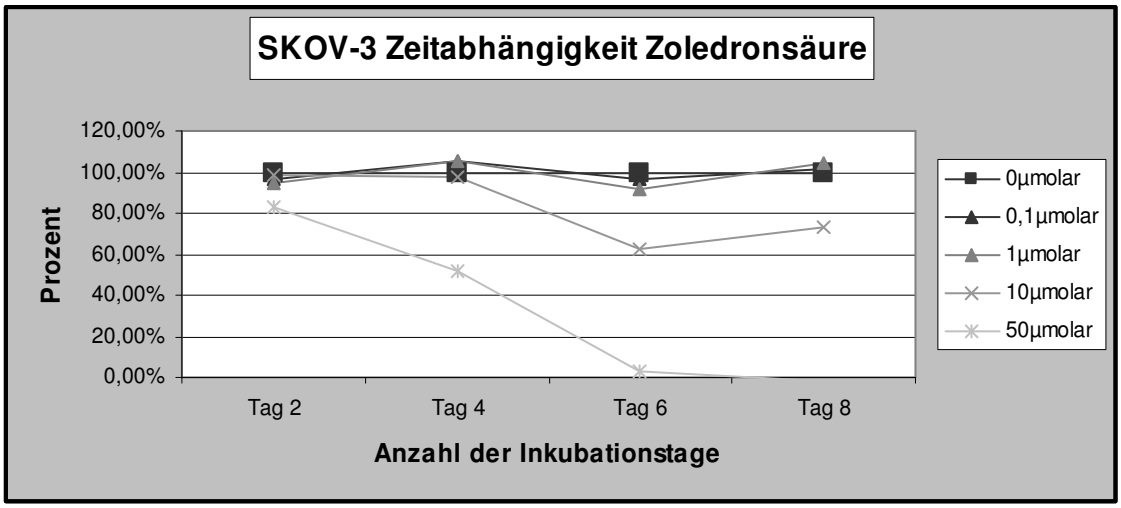


Abb. 3-8: **SKOV-3 Zeitabhängigkeit Zoledronsäure,** die Kontrolle gilt an allen Tagen als 100% und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. -steigerung dar. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung beträgt ≤ 15 %.

Abb. 3-8 zeigt Wachstumsraten der SKOV-3-Zellen aufgetragen gegen die Zeit. Die Wachstumsraten der geringen Konzentrationen 0,1µmolar und 1µmolar weisen keine bis geringste Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle mit 0,5% H_2O auf. Ab sechstägiger Inkubationszeit zeigt sich bei 10µmolarer Zoledronsäure-Konzentration ein deutlicher Effekt mit einer Abnahme um 27,8% der Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle mit 0,01% H_2O. Bei 50µmolarer Konzentration ergibt sich ebenfalls mit längerer Inkubationszeit auch eine deutliche Abnahme der Wachstumsrate. Sie beträgt am vierten Tag 49,5% am sechsten Tag 97% weniger als die Kontrolle. Am achten Tag lässt sich kein Zellwachstum mehr nachweisen.

Für den Tag vier ergibt sich bei einer Konzentrationen von 50µmolar Celecoxib gegenüber der Kontrolle ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert <0.0001.

3.1.3 Konzentrationsabhängigkeit Celecoxib

Die Inkubationszeit der Konzentrationsversuche betrug aufgrund der Zeitversuche vier Tage; die Zellen wurden nach der unter 2.2.2.4 beschriebenen Methode behandelt.

3.1.3.1 BG1-Zellen

Abb. 3-9 zeigt die deutliche Abhängigkeit der BG1 Zellwachstumsrate von der Celecoxib-Konzentration. Bei kleinen Celecoxib-Konzentrationen bis zu 10µmolar zeigt sich eine höhere Wachstumsrate von bis zu 28% gegenüber der Kontrolle mit 0,5% DMSO. In den hohen Celecoxib-Konzentrationen zeigt sich ein deutlicher Abfall der Wachstumsrate mit 85 Prozent Hemmung im Vergleich zur Kontrolle.

Berechnung des IC50 und IC30

Zur Berechnung der IC Werte wurden die Daten in einem Diagramm mit nicht logarithmischer x-Achse aufgetragen. Mit Hilfe einer Trendlinie ergab sich für die Wertepaare die Annäherungsgleichung: $y = -0{,}0216x + 1{,}2013$

Daraus ergibt sich für die Errechnung des IC30 eine Konzentration von 23,2µmolar Celecoxib und für den IC50 eine Konzentration von 32,5µmolar Celecoxib.

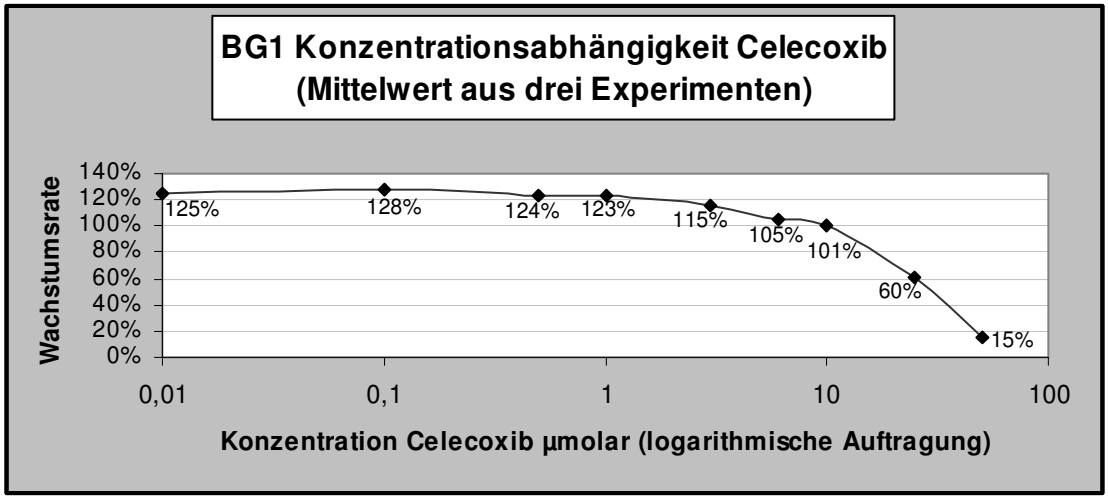


Abb. 3-9: **BG1 Konzentrationsabhängigkeit Celecoxib,** die Extinktion der Kontrolle wird gleich 100% gesetzt und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. -steigerung dar. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung der drei Mittelwerte ist kleiner gleich 12%.

3.1.3.2 SKOV-3-Zellen

Abb. 3-10 zeigt bei den SKOV-3-Zellen eine den BG1-Zellen sehr ähnliche Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Celecoxib-Konzentration.

Bei kleinen Celecoxib-Konzentrationen bis zu 10µmolar zeigt sich eine höhere Wachstumsrate, die allerdings mit maximal neun Prozent gegenüber der Kontrolle mit 0,5% DMSO nicht so stark wie bei den BG1-Zellen ausfällt. Auch die Hemmung der Wachstumsrate ist nicht so deutlich wie bei den BG1-Zellen: In den hohen Celecoxib-Konzentrationen zeigt sich ein Abfall der Wachstumsrate mit 67% Hemmung im Vergleich zur Kontrolle.

Berechnung des IC50 und IC30

Zur Berechnung der IC Werte wurden die Daten in einem Diagramm mit nicht logarithmischer x-Achse aufgetragen. Mit Hilfe einer Trendlinie ergab sich für die Wertepaare die Annäherungsgleichung: $y = -0{,}0136x + 1{,}0933$

Daraus ergibt sich für die Errechnung des IC30 eine Konzentration von 28,9µmolar Celecoxib und für den IC50 eine Konzentration von 43,6 µmolar Celecoxib.

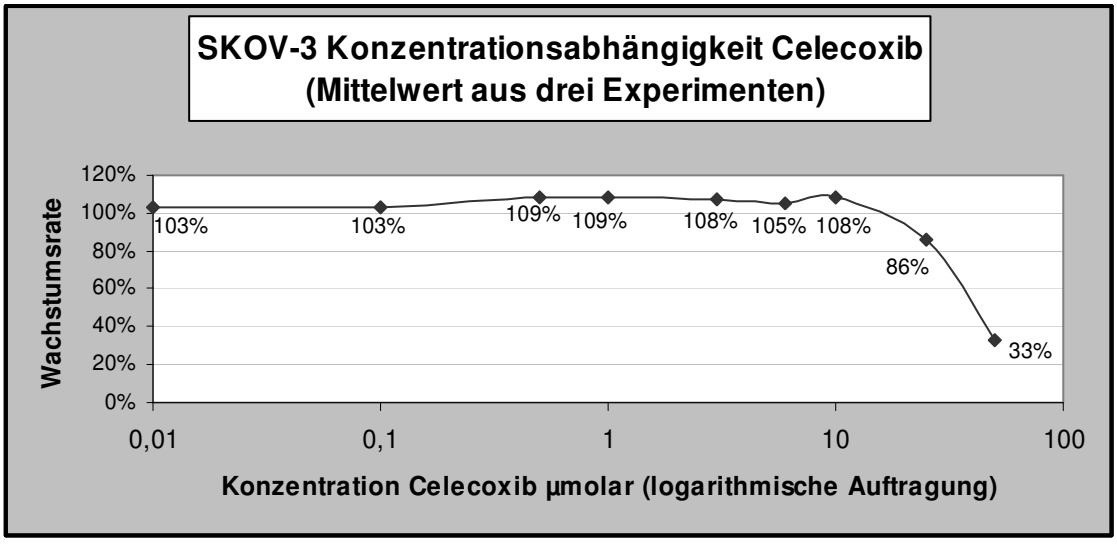


Abb.: 3-10 : SKOV-3 Konzentrationsabhängigkeit Celecoxib, die Extinktion der Kontrolle wird gleich 100% gesetzt und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. -steigerung dar. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung der drei Mittelwerte ist kleiner gleich 12%.

3.1.4 Konzentrationsabhängigkeit Zoledronsäure

3.1.4.1 BG1-Zellen

Die BG1-Zellen reagieren bei geringen Zoledronsäure-Konzentrationen mit einer Steigerung der Wachstumsrate, bei 0,01µmolar Zoledronsäure liegt das Wachstum 13% höher als die Kontrolle. Mit steigenden Konzentrationen bleibt der Wert sehr lange auf dem Niveau der Kontrolle, steigt bei 6µmolar Zoledronsäure noch mal um neun Prozent, um dann schließlich bei sehr hohen Konzentrationen von 25µmolar bzw. 50 µmolar ein um 16% bzw. 35% vermindertes Wachstum aufzuzeigen.

Berechnung des IC50 und IC30

Zur Berechnung der IC Werte wurden die Daten in einem Diagramm mit nicht logarithmischer x-Achse aufgetragen. Mit Hilfe einer Trendlinie ergab sich für die Wertepaare die Annäherungsgleichung: $y = 1{,}0666\, e^{-0{,}0094x}$

Daraus ergibt sich für die Errechnung des IC30 eine Konzentration von 44,8µmolar Celecoxib. Der IC50 wurde nicht berechnet, da keine 50%ige Hemmung durch alleinige Gabe von Zoledronsäure erreicht werden konnte.

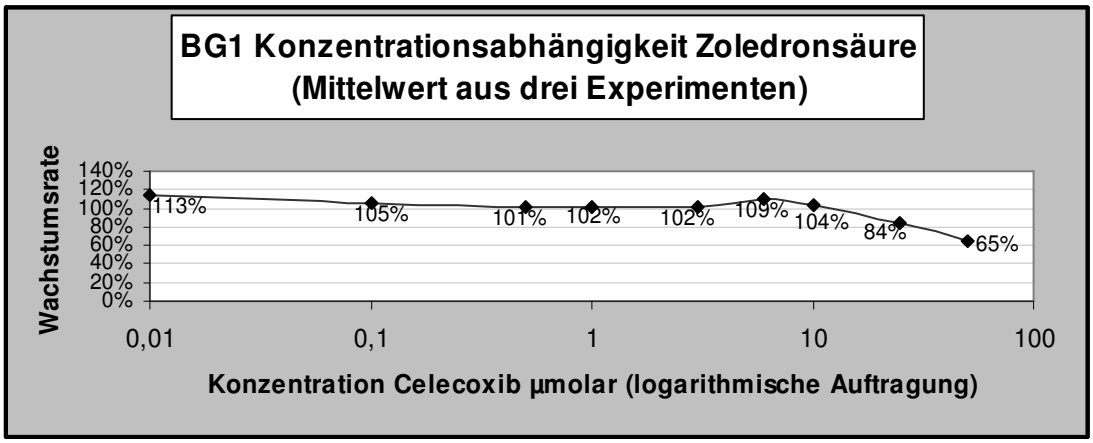


Abb. 3-11: **BG1 Konzentrationsabhängigkeit Zoledronsäure,** die Extinktion der Kontrolle wird gleich 100% gesetzt und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. -steigerung dar. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung der drei Mittelwerte ist kleiner gleich zwölf Prozent.

3.1.4.2 SKOV-3-Zellen

Die SKOV-3-Zellen zeigen eine deutliche Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle. Die schwächste getestete Konzentration von 0,01µmolarer Zoledronsäure führt noch zu einer minimalen Steigerung der Wachstumsrate. Bei Zunahme der Zoledronsäure-Konzentration kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall der Wachstumsrate, die besonders ab einer Konzentration von 10µmolar mit 47% Hemmung gegenüber der Kontrolle deutlich wird und schließlich bei den hohen Zoledronsäure-Konzentrationen auf 95% Hemmung gegenüber der Kontrolle ansteigt.

Berechnung des IC50 und IC30

Zur Berechnung der IC-Werte wurden die Daten in einem Diagramm mit nicht logarithmischer x-Achse aufgetragen. Mit Hilfe einer Trendlinie ergab sich für die Wertepaare die Annäherungsgleichung: $y = 0{,}9965e^{-0{,}0671x}$

Daraus ergibt sich für die Errechnung des IC30 eine Konzentration von 5,2 µmolar Celecoxib und für den IC50 eine Konzentration von 10,3µmolar Celecoxib.

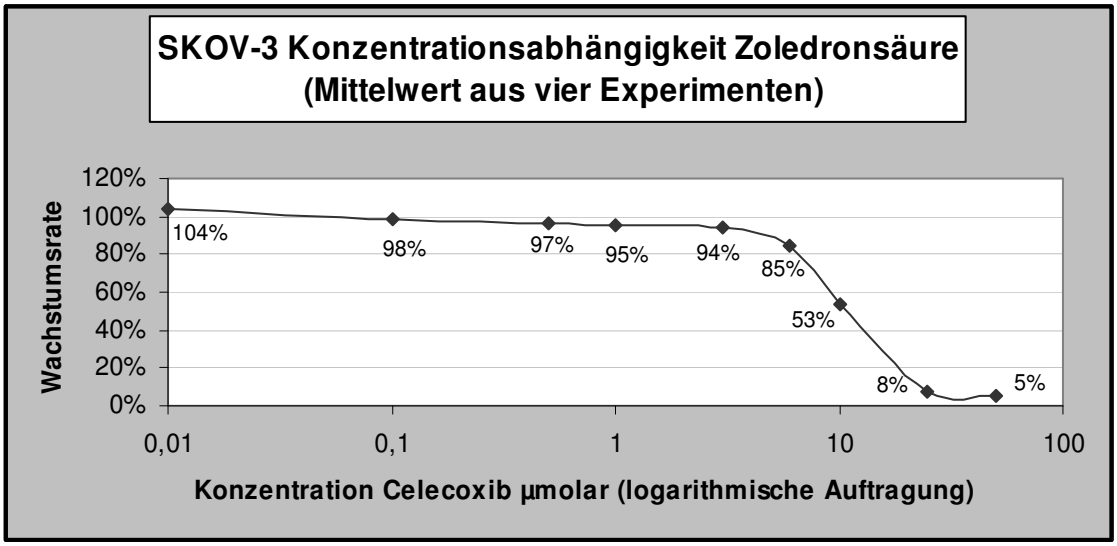


Abb. 3-12: **SKOV-3 Konzentrationsabhängigkeit Zoledronsäure,** die Extinktion der Kontrolle wird gleich 100% gesetzt und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. -steigerung dar. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung der drei Mittelwerte ist kleiner gleich zehn Prozent.

3.1.5 Zusammenfassung der IC-Werte

Tab. 3-1: **Zusammenfassung der IC-Werte;** die IC-Werte sind in µmolar angegeben, die Inkubationsdauer betrug vier Tage.

Zelllinie	Medikament	IC30	IC50
SKOV-3	Celecoxib	28,9	43,6
	Zoledronsäure	5,2	10,3
BG1	Celecoxib	23,2	32,5
	Zoledronsäure	44,8	Nicht angegeben

3.1.6 Kombination aus Celecoxib und Zoledronsäure

Die Kombinationsversuche hatten das Ziel, eine mögliche gegenseitige Beeinflussung von Zoledronsäure und Celecoxib zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit beiden Substanzen vier Tage inkubiert. Die Methode ist unter 2.2.2.5 genau beschrieben.

3.1.6.1 BG1-Zellen

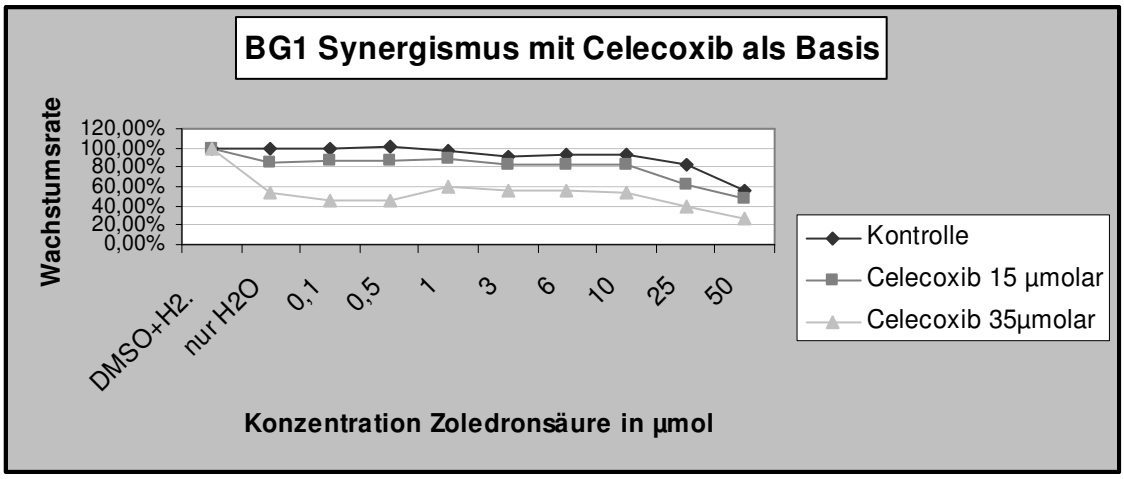


Abb. 3-13: **Synergismus BG1 mit Celecoxib als Basis;** die einzelnen Graphen entsprechen Verdünnungsreihen von Zoledronsäure, bei denen 0,35% DMSO in der Kontrolle oder 15µmolares bzw. 35µmolares Celecoxib zugesetzt wurde. Der erste y-Wert ist bei allen drei Verdünnungsreihen mit 0,35% DMSO und 0,5% H2O gleich; die Extinktion dieser Kontrolle wird gleich 100% gesetzt und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. -steigerung dar. Der zweite Y-Wert resultiert aus den Ergebnissen der reinen „Basis-Gabe", also nur 0,1% DMSO bzw. 15µmolar oder 35µmolar Celecoxib. Die weiteren Punkte der Graphen ergeben sich aus den Extinktionen der Kombinationen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung beträgt ≤ 18%.

Abb. 3-13 zeigt die Ergebnisse der Kombinationsversuche mit Celecoxib und Zoledronsäure bei BG1-Zellen. Bei der Beschreibung des Diagramms fällt zunächst die nahezu parallele Anordnung der Graphen untereinander auf.

Betrachtung der Einzelwerte der Celecoxib-Gabe

Anhand der Werte der reinen Celecoxib-Gabe zeigt sich die Konzentrationsabhängigkeit der BG1-Zellen von dieser Substanz. Bei 15µmolarem Celecoxib zeigt sich eine Verminderung der Wachstumsrate um 16%, bei 35µmolarem Celecoxib eine Verminderung um 42% gegenüber der Kontrolle, so dass die Annährung der IC Werte (s. Tab.3-5) hier nochmals bestätigt wird.

Betrachtung der Einzelwerte der Zoledronsäure-Gabe

Auch mit steigender Zoledronsäure-Gabe zeigt sich eine kontinuierliche Hemmung des Wachstums; bei 25µmolarer Zoledronsäure ergibt sich ein um 15% und in der höchsten Konzentrationen mit 50µmolarer Zoledronsäure sogar ein um 43% niedrigeres Wachstum als in der Kontrolle.

Betrachtung der Ergebnisse der Kombination

(Im folgenden Text wird in den Kombinationen nur noch der erste Buchstabe des Medikamentes (C für Celecoxib und Z für Zoledronsäure) zur Beschreibung mit angegeben. Die dahinter folgende Zahl gibt die Micromolarität an. Die Prozentangaben der ermittelten Ergebnisse beziehen sich jeweils auf die Kontrolle.)

In der Kombination der beiden Substanzen ergeben sich je nach Auswahl der Kombinationen verschiedene Ergebnisse. Um diese Ergebnisse auf einen eventuellen Synergismus hin zu untersuchen, ist die Mitbetrachtung der beiden Einzelsubstanzergebnisse unabdingbar:

Bei einem Vergleich der Kombination C15/ Z1 wird deutlich, dass kein additiver Effekt der Einzelsubstanzen zu verzeichnen ist. 1µmolare Zoledronsäure hemmt das Wachstum um 3%, 15 µmolares Celecoxib um 16%. In der Kombination C15/ Z1 ergibt sich nur eine Verminderung der Proliferationsrate um 11%.

An anderen Kombinationspunkten ist das Ergebnis völlig konträr: Die Kombination C15/ Z25 zeigt für das Celecoxib ein um 21%punkte niedrigere Wachstumsrate in der Kombination gegenüber der Alleingabe und für die Zoledronsäure eine um 20%punkte verminderte Proliferation. Ähnlich deutlich sind die Ergebnisse der Kombination C15 /Z50 mit 36%punkte geringerem Wachstum als dem Celecoxib alleine und 9%punkte geringerem Wachstum als der Zoledronsäure alleine. Auch in den Kombinationen C35/ Z25 und C35/ Z50 lassen sich vergleichbare Ergebnisse ableiten.

Da die Kurven somit sowohl mit steigender Zoledronsäure-Kozentration als auch mit steigender Celecoxib-Konzentration sowie in deren Kombination in ihrer Wachstumsrate fallen, ist die Möglichkeit eines synergistischen Effektes in besonderen Kombinationen der beiden durchaus gegeben.

In den Folgeversuchen (FACS-Analyse u. Western-Blot) wurde mit folgenden Kombinationen weitergearbeitet:

- 15µmolar Celecoxib und 25µmolar Zoledronsäure
- 15µmolar Celecoxib und 50µmolar Zoledronsäure

Zur statistischen Aufarbeitung wurden die Einzelextinktionen in Prozentwerte der jeweiligen Kontrolle umgerechnet. Es ergibt sich für jede Wertereihe eine Normalverteilung, so dass der T-Test für unverbundene Stichproben angewendet werden konnte.

Tab. 3-2: **Ergebnisse des T-Test für unverbundene Stichproben;** die beiden linken Spalten zeigen die gegeneinander gestellten Wertereihen, die Zahlen geben die Mycromolarität der Substanzen an.

Wertereihe 1	Wertereihe 2	p-Wert	Signifikant verschieden (p< 0,05)
Zoledronsäure 50	Zoledronsäure 50 Celecoxib 15	0,2424	nein
Zoledronsäure 25	Zoledronsäure 25 Celecoxib 15	0,0017	ja
Celecoxib 15	Zoledronsäure 25 Celecoxib 15	0,0006	ja
Celecoxib 15	Zoledronsäure 50 Celecoxib 15	<0.0001	ja

3.1.6.2 SKOV-3-Zellen

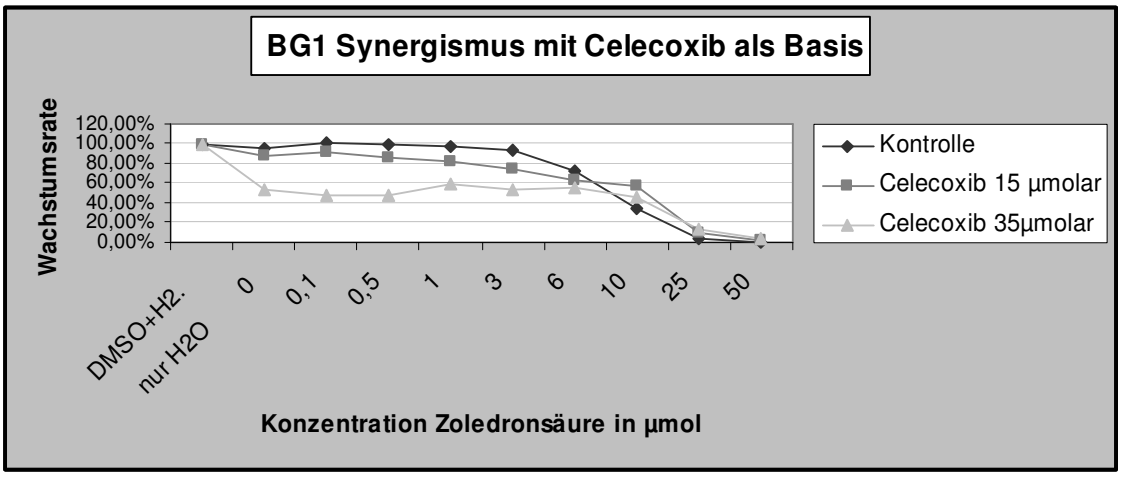


Abb. 3-14: **Synergismus SKOV-3 mit Celecoxib als Basis;** die einzelnen Graphen entsprechen Verdünnungsreihen von Zoledronsäure, bei denen 0,35% DMSO in der Kontrolle oder 15µmolares bzw. 35µmolares Celecoxib zugesetzt wurde. Der erste y-Wert ist bei allen drei Verdünnungsreihen mit 0,35% DMSO und 0,5% H_2O gleich; die Extinktion dieser Kontrolle wird gleich 100% gesetzt und stellt den Ausgangspunkt für die Berechnung der prozentualen Extinktionsminderung bzw. -steigerung dar. Der zweite Y-Wert resultiert aus den Ergebnissen der reinen „Basis-Gabe", also nur 035% DMSO bzw. 15µmolares oder 35µmolares Celecoxib. Die weiteren Punkte der Graphen ergeben sich aus den Extinktionen der Kombinationen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung beträgt ≤ 18%.

Abb. 3-14 zeigt die Ergebnisse der Kombinationsversuche mit Celecoxib und Zoledronsäure bei SKOV-3-Zellen. Auffällig bei der ersten Betrachtung des Diagramms ist die in den niedrigen Zoledronsäure-Konzentrationen parallele Anordnung der Graphen untereinander, die sich ab einer Zoledronsäure-Konzentration von 6µmolar mit steigender Konzentration umkehrt.

Betrachtung der Einzelwerte der Celecoxib-Gabe

Anhand der Werte der reinen Celecoxib-Gabe zeigt sich die Konzentrationsabhängigkeit der BG1-Zellen von dieser Substanz. Bei 15µmolarem Celecoxib zeigt sich eine Verminderung der Wachstumsrate um 16%, bei 35µmolarem Celecoxib eine Verminderung um 45% gegenüber der Kontrolle, so dass die Annährung der IC-Werte (s. Tab.3-5) hier nochmals bestätigt wird.

Betrachtung der Einzelwerte der Zoledronsäure-Gabe

Auch mit steigender Zoledronsäure-Gabe zeigt sich eine kontinuierliche Hemmung des Wachstums, ab einer Konzentration von 25µmolar liegt die Wachstumsrate bereits 95% niedriger als die Kontrolle, bei einer Konzentration von 50µmolar ist keine Proliferation mehr nachweisbar. Jedoch ist die Hemmung auch in geringen Konzentrationen bereits nachzuweisen; so zeigt sich bei 1µmolarer Zoledronsäure ein um 2% niedrigeres Wachstum und bei 3µmolarer Zoledronsäure ein um 7% gesunkenes Wachstum als in der Kontrolle. Die Konzentrationsabhängigkeit ist somit bereits in geringen Konzentrationen nachweisbar. Diese Ergebnisse bestätigen die IC-Wert-Annäherung durch die Konzentrationsversuche.

Betrachtung der Ergebnisse der Kombination

In der Kombination der beiden Substanzen ergeben sich je nach Auswahl verschiedene Ergebnisse. Um diese Ergebnisse auf einen eventuellen Synergismus hin zu untersuchen, ist die Mitbetrachtung der beiden Einzelsubstanzergebnisse unabdingbar:

(Im folgenden Text wird in den Kombinationen nur noch der erste Buchstabe des Medikamentes (C für Celecoxib und Z für Zoledronsäure) zur Beschreibung mit angegeben. Die dahinter folgende Zahl gibt die Micromolarität an. Die Prozentangaben der ermittelten Ergebnisse beziehen sich jeweils auf die Kontrolle.)

Auch in den Synergismusversuchen der SKOV-3-Zellen zeigen sich einzelne Punkte mit Kombinationen, die einen Synergismus der beiden Substanzen vermuten lassen und gegenteilig auch Kombinationen, in denen eher eine gegenseitige Hemmung der beiden Substanzen anzunehmen ist.

Bei einem Vergleich der Kombination C15/ Z10 wird deutlich, dass kein additiver Effekt der Einzelsubstanzen zu verzeichnen ist. 10µmolare Zoledronsäure hemmt das

Wachstum um 65%, 15µmolares Celecoxib um 12%. In der Kombination C15/ Z10 ergibt sich nur eine Verminderung der Proliferationsrate um 49%.

An anderen Kombinationspunkten ist das Ergebnis völlig konträr: Die Kombination C15/ Z1 zeigt für das Celecoxib ein um 6%punkte niedrigere Wachstumsrate in der Kombination gegenüber der Alleingabe und für die Zoledronsäure eine um 16%punkte verminderte Proliferation. Ähnlich deutlich sind die Ergebnisse der Kombination C15/ Z3 mit 12%punkte geringerem Wachstum als dem Celecoxib alleine und 19%punkte geringerem Wachstum als der Zoledronsäure alleine. Auch in den Kombinationen C35/ Z25 und C35/ Z50 lassen sich vergleichbare Ergebnisse ableiten.

Da die Kurven mit steigender Celecoxib- und mit steigender Zoledronsäure-Konzentration in einem Konzentrationsbereich bis zu 6µmolar in ihrer Wachstumsrate fallen, wurde die Möglichkeit eines synergistischen Effektes in besonders geringen Zoledronsäure-Konzentrationen untersucht.

In den Folgeversuchen (FACS-Analyse und Western-Blot) wurde mit folgenden Kombinationen weitergearbeitet:

- 15µmolar Celecoxib und 1µmolar Zoledronsäure
- 15µmolar Celecoxib und 3µmolar Zoledronsäure

Zur statistischen Aufarbeitung wurden die Einzelextinktionen in Prozentwerte der jeweiligen Kontrolle umgerechnet. Es ergibt sich für jede Wertereihe eine Normalverteilung, so dass der T-Test für unverbundene Stichproben angewendet werden konnte.

Tab. 3-3: **Ergebnisse des T-Test für unverbundene Stichproben;** die beiden linken Spalten zeigen die gegeneinander gestellten Wertereihen, die Zahlen geben die Mycromolarität der Substanzen an.

Wertereihe 1	Wertereihe 2	p-Wert	Signifikant verschieden (p<0,05)
Zoledronsäure 1	Zoledronsäure 1 Celecoxib 15	P<0.0001	ja
Zoledronsäure 3	Zoledronsäure 3 Celecoxib 15	P<0.0001	ja
Celecoxib 15	Zoledronsäure 1 Celecoxib 15	0,0029	ja
Celecoxib 15	Zoledronsäure 3 Celecoxib 15	P<0.0001	ja

3.1.6.3 Interaktionsindizes

Zur qualitativen Beurteilung des Synergismus eignet sich die Berechnung des Interaktionsindex (nach Tallarida):

$$\gamma = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

Für diese Synergismusberechnung soll gelten:

- a = Celecoxib-Konzentration in der Kombination mit Zoledronsäure
- b = Zoledronsäure-Konzentration in der Kombination mit Celecoxib
- A = Celecoxib einzeln in der Konzentrationen der Äquivalenzdosis zur Kombination
- B = Zoledronsäure einzeln in der Konzentration der Äquivalenzdosis zur Kombination
- γ = Interaktionsindex, Index zur Berechnung von Synergismus

Dabei gilt: y = 1 additiv, y > 1 subadditiv, y < 1 synergistisch

Die Berechnung der Interaktionsindizes zeigt für beide getesteten Zellreihen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Es zeigen sich synergistische, additive aber auch subadditive Kombinationen in den unterschiedlichen Konzentrationen.
Es wurde mit den Kombinationen C15 Z1 und C15 Z3 bei den SKOV-3-Zellen weitergearbeitet. Hier zeigt sich ein additiver Effekt für die Kombination C15 Z1 und ein subadditiver Effekt für die Kombination C15 Z3.
Bei den BG1-Zellen wurde für die weiterverwendeten Kombinationen C15 Z25 und C15 Z50 jeweils ein additiver Effekt gefunden. Herauszustellen ist jedoch die Beobachtung, dass der erreichte Hemmungseffekt allein durch Zoledronsäure nicht hervorzurufen ist. Dadurch bestätigt sich die Vermutung von Additivität bzw. Synergismus der beiden Substanzen bei dieser Zelllinie
Synergistisch im Sinne von Tallarida zeigen sich die Kombinationen C15 Z1 und C15 Z3 bei den BG1-Zellen und die Kombinationen C35 Z0,1 sowie C35 Z 0,5 bei den SKOV-3-Zellen.

Tab. 3-4: Interaktionsindizes zur Darstellung des Synergismus bei BG1-Zellen

Interaktionsindizes					
BG1					
Kombination		Wachstum der Kombination in Prozent gegenüber der Nullkontrolle y	Celecoxib als Monosubstanz (kalkuliert) (A) in µmol	Zoledronsäure als Monosubstanz (kalkuliert) (B) in µmol	Inter-aktions-index gamma γ= a/A+b/B
			Formel der Trendlinie:	Formel der Trendlinie	
			$y = -0,0216x + 1,2013$	$y = 1,0666e^{-0,0094x}$	
			⇔	⇔	
Celecoxib (a) in µmol	Zoledron-säure (b) in µmol		$x = (y-1,2013)/-0,0216$	$x = (\ln y – \ln 1,0666)/ -0,0094$	
15	0	84,08%	16,690	25,306	
15	0,1	86,66%	15,495	22,091	0,973
15	0,5	87,64%	15,042	20,895	1,021
15	1	88,68%	14,560	19,640	1,081
15	3	81,93%	17,685	28,062	0,955
15	6	82,46%	17,440	27,376	1,079
15	10	81,88%	17,708	28,127	1,203
15	25	62,74%	26,569	56,452 *	1,007
15	50	47,78%	33,495	85,430 *	1,033
35	0	54,57%	30,352	71,294 *	
35	0,1	44,86%	34,847	92,138 *	1,005
35	0,5	44,86%	34,847	92,138 *	1,010
35	1	59,05%	28,278	62,900 *	1,254
35	3	56,02%	29,681	68,504 *	1,223
35	6	56,55%	29,435	67,502 *	1,278
35	10	54,61%	30,333	71,216 *	1,294
35	25	38,47%	37,806	108,486 *	1,156
35	50	27,91%	42,694	142,624 *	1,170

* extrapolierte Werte

Tab. 3-5: Interaktionsindizes zur Darstellung des Synergismus bei SKOV Zellen

Interaktionsindizes

SKOV-3

Kombination		Wachstum der Kombination in Prozent gegenüber der Nullkontrolle y	Celecoxib als Monosubstanz (kalkuliert) (A) in µmol	Zoledronsäure als Monosubstanz (kalkuliert) (B) in µmol	Interaktionsindex $\gamma = a/A+b/B$
			Formel der Trendlinie:	Formel der Trendlinie	
			$y = -0,0136x + 1,0933$	$y = 0,9965e^{-0,0671x}$	
			⇔	⇔	
Celecoxib (a) in µmol	Zoledronsäure (b) in µmol		$x = (y-1,0933)/-0,0136$	$x = (\ln y - \ln 0,9965)/ -0,0671$	
15	0	88,18%	15,552	1,822	
15	0,1	90,71%	13,688	1,400	1,167
15	0,5	85,01%	17,882	2,368	1,050
15	1	81,92%	20,151	2,919	1,087
15	3	74,06%	25,936	4,424	1,257
15	6	63,43%	33,751	6,732	1,336
15	10	57,63%	38,013	8,161	1,620
15	25	9,95%	73,076 *	34,343	0,933
15	50	2,76%	78,363 *	53,469 *	1,127
35	0	54,25%	40,502	9,063	
35	0,1	48,12%	45,011	10,850	0,787
35	0,5	48,12%	45,011	10,850	0,824
35	1	58,35%	37,487	7,977	1,059
35	3	53,18%	41,287	9,359	1,168
35	6	54,66%	40,202	8,951	1,541
35	10	46,28%	46,359	11,430	1,630
35	25	13,86%	70,198 *	29,398	1,349
35	50	3,47%	77,839 *	50,044	1,449

* extrapolierte Werte

3.2 Zellzyklusanalyse

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Zuordnung von Zellen in einzelne Zellzyklusphasen. Dadurch ist es möglich, Störungen der Zellteilung zu registrieren.

Die Verteilung der einzelnen Zellphasen ist in den Säulendiagrammen dargestellt. Die Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil der einzelnen Phase von 100% gegateten Zellen. Die Anteile der drei Phasen müssen addiert nicht 100% erreichen, da nicht jede gegatete Zelle eindeutig einer Zellzyklusphase zugeordnet werden kann (z. B. Zellschrott).

3.2.1 Zellzyklusanalyse von BG1-Zellen

3.2.1.1 Applikation von Celecoxib

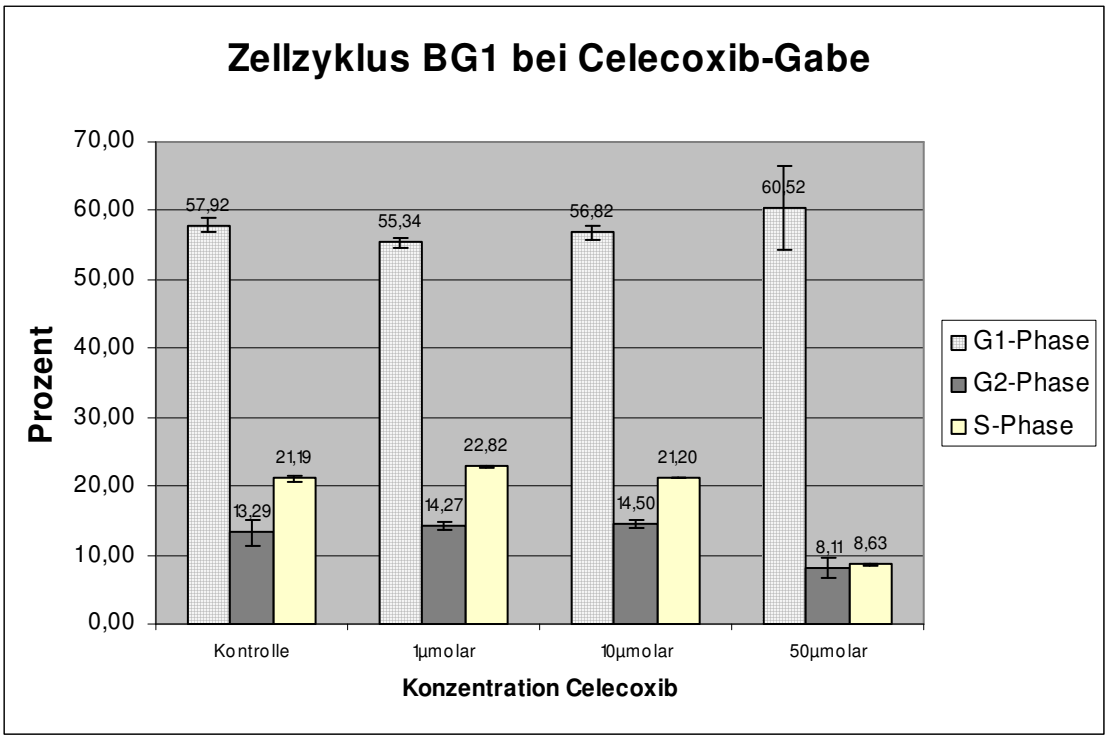


Abb. 3-15: **Zellzyklus BG1 bei Celecoxib-Gabe,** dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen. Errechnet wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ausgangswert ist die Anzahl gegateter Zellen, deren Wert gleich 100% gesetzt wird. Die Standardabweichung wird durch die schwarzen Balken im Diagramm angegeben. Die Zellen wurden für vier Tage inkubiert.

Ergebnisse der Celecoxib-Gabe

Die BG1-Zellen zeigen deutliche Veränderungen ihrer Zellphasenverteilung bei steigender Celecoxib-Konzentration:

- Die G1-Phase nimmt von der Kontrolle bis zur 50µmolaren Celecoxib-Konzentration zunächst ab, um schließlich um 4,5% des Kontrollmittelwertes zu steigen.
- Die G2-Phase zeigt eine ähnliche Entwicklung wie die G1 Phase. Es kommt, ausgehend von der Kontrolle zu einem Anstieg von bis zu 9% bei 10µmolarer Celecoxib-Konzentration. Bei weiter steigender Celecoxib-Konzentration von 50µmolar fällt der Anteil der G2-Phase sogar unter den Ausgangswert um 39%.
- Die S-Phase zeigt bei einer 1µmolarer Celecoxib-Konzentration eine Zunahme um 8%; mit steigender Celecoxib-Konzentration ist sie jedoch bei 50µmolarer Celecoxib um 59,3 Prozent des Kontrollmittelwertes verringert.

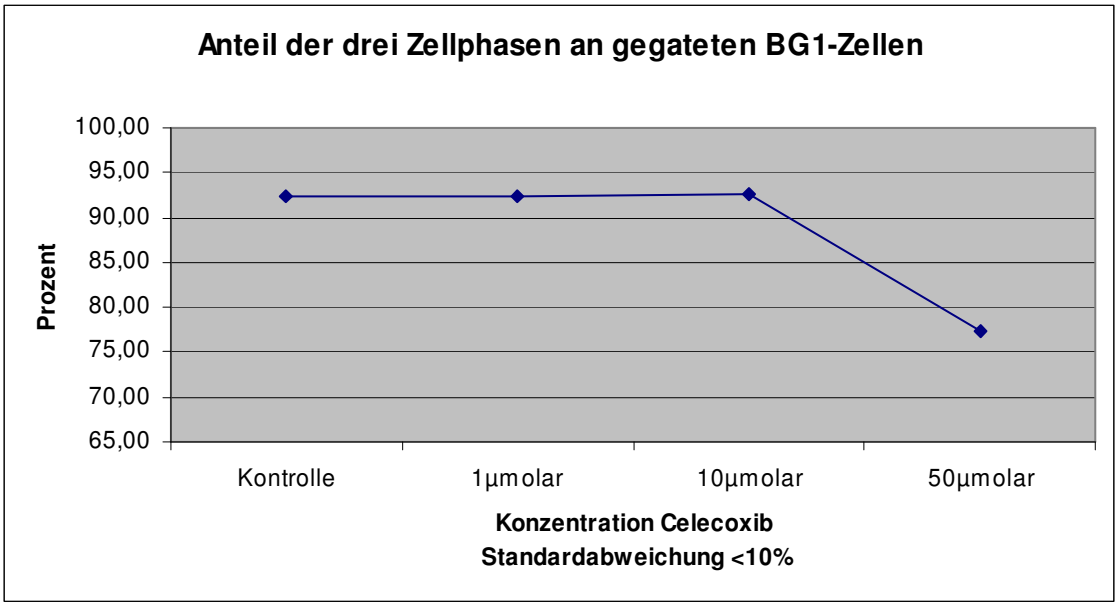


Abb. 3-16: **Anteil der drei Zellphasen an gegateten BG1-Zellen;** dargestellt ist der Anteil der Summe der Mittelwerte aller drei Zellzyklusphasen aufgetragen gegen die Medikamenten-konzentration.

Anteil der drei Zellphasen an gegateten Zellen

Ein wichtiger Aspekt für die Beurteilung der Ergebnisse stellt die Frage nach dem Anteil der drei Zellphasen an gegateten Zellen dar.

Bei der Applikation von Celecoxib zu den BG1-Zellen ist besonders herauszustellen, dass bei höchster Celecoxib-Konzentration der Anteil der verwertbaren Zellen nur bei 80%, also deutlich unter dem sonstigen Anteil von 90 Prozent, liegt.

3.2.1.2 Applikation von Zoledronsäure

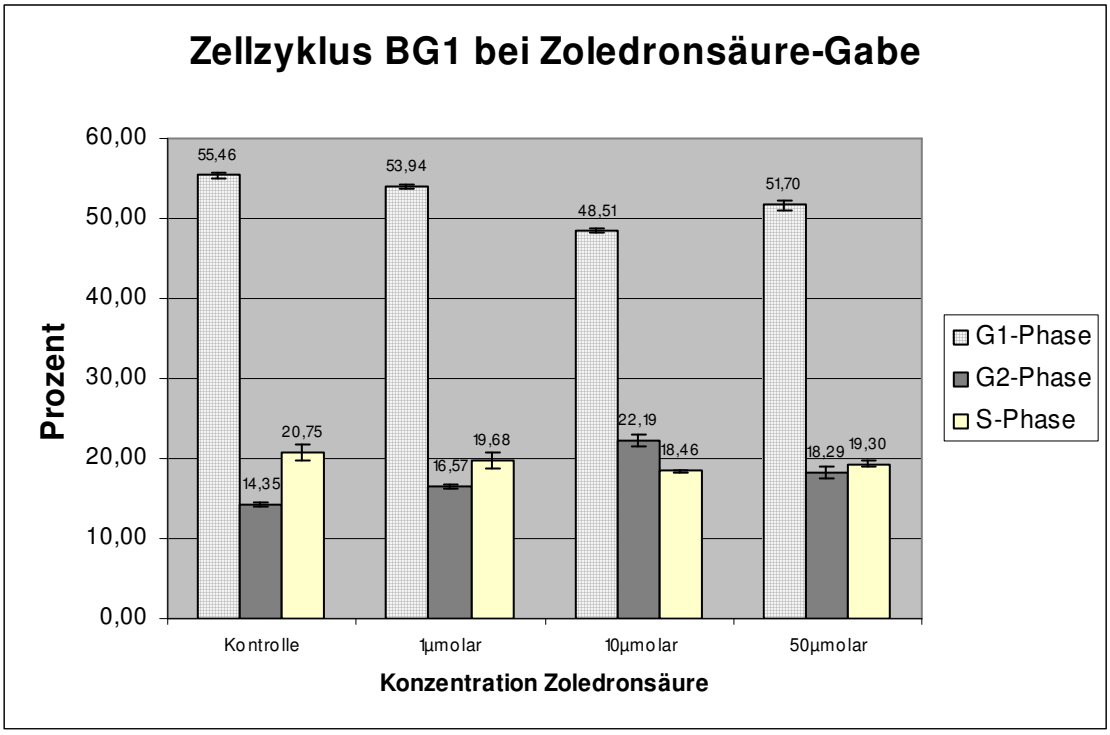


Abb. 3-17: **BG1 Zellzyklus bei Zoledronsäure-Gabe;** dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen. Errechnet wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ausgangswert ist die Anzahl gegateter Zellen, deren Wert gleich 100% gesetzt wird. Die Standardabweichung wird durch die schwarzen Balken im Diagramm angegeben. Die Zellen wurden für vier Tage inkubiert**.**

Ergebnisse der Zoledronsäure-Gabe

Die BG1-Zellen zeigen deutliche Veränderungen ihrer Zellphasenverteilung bei steigender Zoledronsäure-Konzentration:

- Die G1-Phase nimmt ausgehend von der Kontrolle bis zur 10µmolaren Zoledronsäure-Konzentration bis zu 13% kontinuierlich ab; bei weiter steigender Zoledronsäure-Konzentration nimmt der Anteil der G1-Phase jedoch wieder zu, erreicht allerdings nicht den Ausgangswert.
- Die G2-Phase verhält sich gegenläufig zur G1-Phase. Es kommt erst zu einem kontinuierlichen Anstieg um 55% bis zu einer Konzentration von 10µmolarer Zoledronsäure. Bei weiter steigender Zoledronsäure-Konzentration nimmt der Anteil der G2-Phase ab, um bei einer Konzentration von 50µmolarer Zoledronsäure schließlich nur noch 28% über dem Ausgangswert zu liegen.
- Die S-Phase zeigt eine unterschiedlich stark ausgeprägte Abnahme mit steigender Zoledronsäure- Konzentration.

Anteil der drei Zellphasen an gegateten Zellen

Die BG1-Zellen zeigten bei Zoledronsäure Applikation keine deutliche Veränderung bezüglich des Anteils der aufsummierten Zellzyklusphasen.

3.2.1.3 Applikation der Kombination

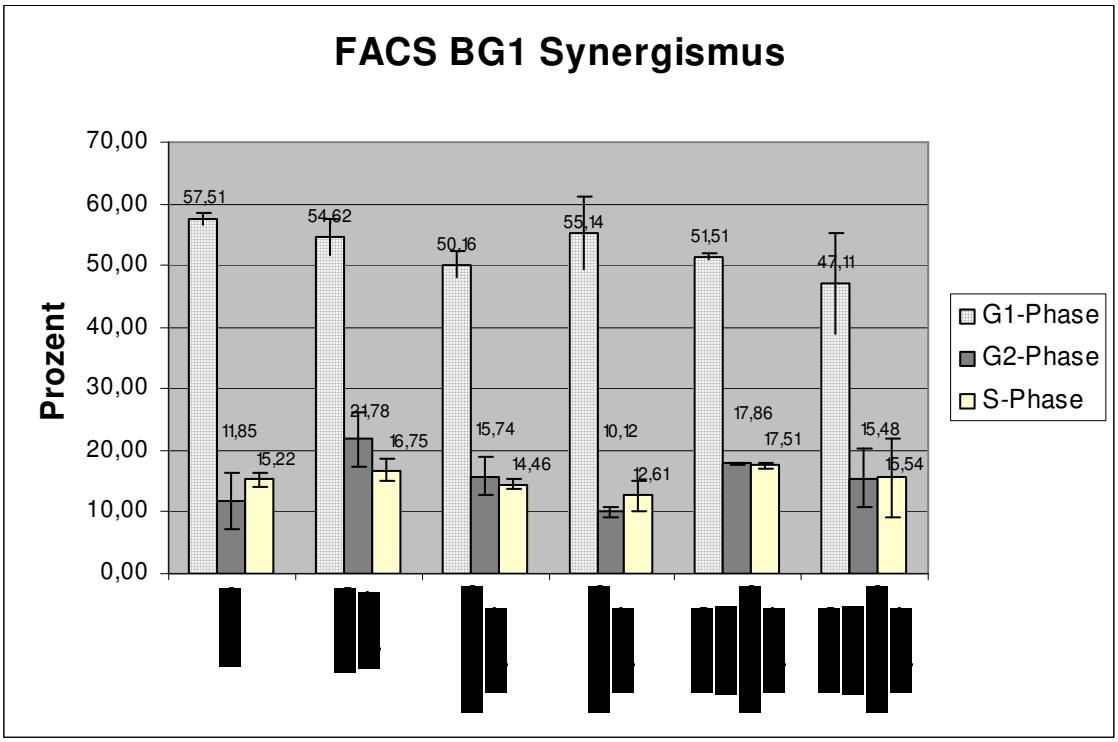


Abb.: 3-18: Zellzyklus BG-1 bei Kombinationsgabe, dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen. Ausgangswert ist die Anzahl gegateter Zellen, deren Wert gleich 100% gesetzt wird. Die Standardabweichung wird durch die schwarzen Balken im Diagramm angegeben.

Ergebnisse der Kombination von Zoledronsäure und Celecoxib im Vergleich zu den singulären Celecoxib-Applikationen

Es wurden die Einzelkonzentrationen von Celecoxib (15µmolar) mit den Kombinationen (gleiche Celecoxib-Konzentration plus Zoledronsäure (25µmolar und 50µmolar) verglichen:

- Es ergibt sich in der ersten Vergleichsgruppe mit 25µmolarer Zoledronsäure eine Abnahme der G1-Phase um 8% gegenüber dem Kontrollmittelwert. Der Wert der G2-Phase sinkt in der Kombination gegenüber der Einzelgabe um 9%. Allein in der S-Phase ist eine Zunahme von 10% zu verzeichnen.

- Die zweite Vergleichsgruppe mit 50µmolarer Zoledronsäure zeigt in allen drei Phasen eine Abnahme. Im Einzelnen ergibt sich für die G1-Phase eine Senkung um 9%, bei der G2-Phase um 34% und in der S-Phase um 17%.

Ergebnisse der Kombination von Zoledronsäure und Celecoxib im Vergleich zu den singulären Zoledronsäure-Applikationen

Es wurden die Einzelkonzentrationen von Zoledronsäure (25µmolar und 50µmolar) mit den Kombinationen (gleiche Zoledronsäure-Konzentrationen plus Celecoxib 15µmolar) verglichen:

- In der ersten Vergleichsgruppe mit 25µmolarer Zoledronsäure ergibt sich in allen drei Phasen eine Zunahme; bei der G1-Phase um 5%, bei der G2-Phase um 28% und in der S-Phase um 19%.
- Die zweite Vergleichsgruppe mit 50µmolar zeigt in der G1-Phase eine Abnahme um 11%, während sich bei der G2-Phase eine Zunahme von 27% und in der S-Phase eine Zunahme von 18% ergibt.

Anteil der drei Zellphasen an gegateten Zellen

Der Anteil an einteilbaren Zellen nimmt mit Erhöhung der Wirkstoffkonzentrationen von 95% (verwertbar in der Kontrolle) um 17% auf 78% (bei der höchsten Kombinations-Konzentration) ab.

3.2.2 Zellzyklusanalyse von SKOV-3-Zellen

3.2.2.1 Applikation von Celecoxib

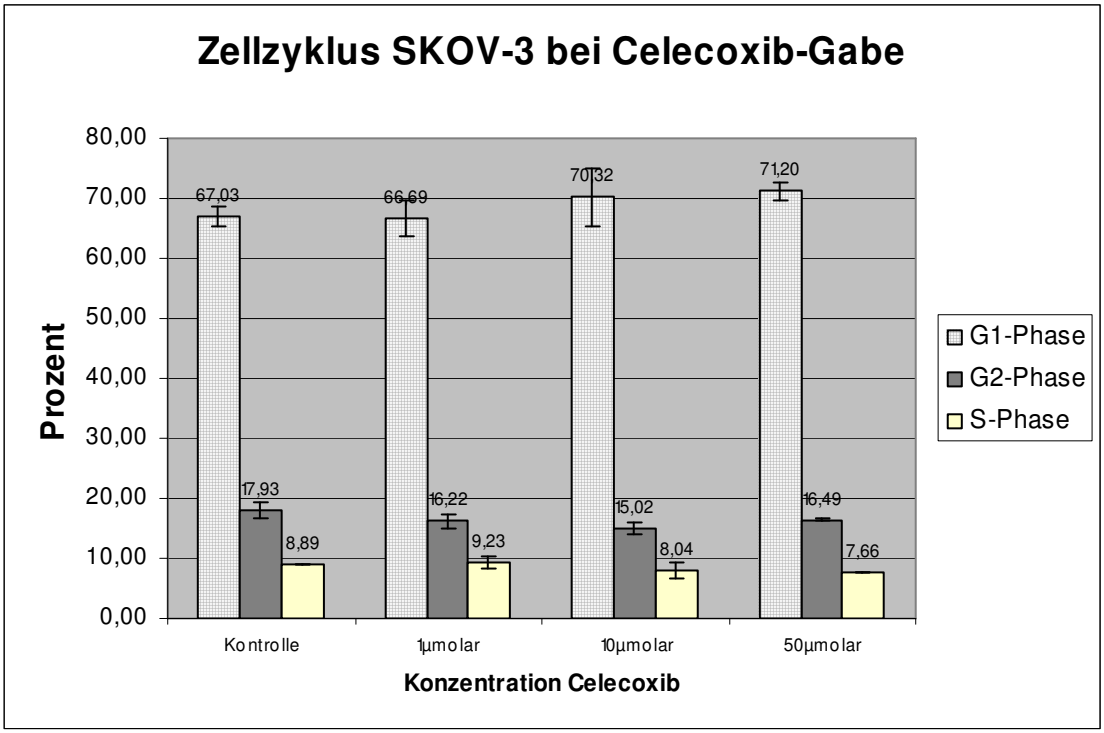


Abb. 3-19: **Zellzyklus SKOV-3 bei Celecoxib-Gabe,** dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen. Ausgangswert ist die Anzahl gegateter Zellen, deren Wert gleich 100% gesetzt wird. Die Standardabweichung wird durch die schwarzen Balken im Diagramm angegeben. Die Zellen wurden für vier Tage inkubiert.

Ergebnisse der Celecoxib-Gabe

Die SKOV-3-Zellen zeigen deutliche Veränderungen ihrer Zellphasenverteilung bei steigender Celecoxib-Konzentration:

- Die G1-Phase verzeichnet ausgehend von der Kontrolle bis zur 50µmolaren Celecoxib-Konzentration einen kontinuierlichen Anstieg auf schließlich 6%.
- Die G2-Phase zeigt ausgehend von der Kontrolle eine Abnahme um 16% bis zur 10µmolaren Celecoxib-Konzentration. Bei weiter steigender Celecoxib-Konzentration von 50µmolar erhöht sich der Anteil der G2-Phase wieder, liegt jedoch noch 8% unter dem Ausgangswert der Kontrolle.
- Die S-Phase zeigt insgesamt eine deutliche Abnahme auf bis 14% bei 50µmolarer Celecoxib-Konzentration.

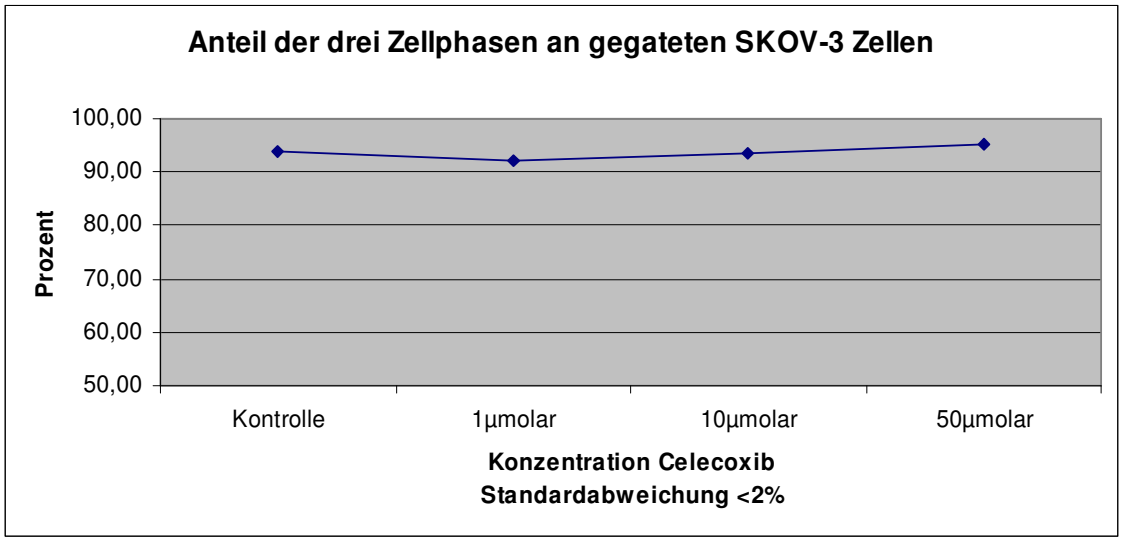


Abb.: 3-20: Anteil der drei Zellphasen an gegateten SKOV-3-Zellen, dargestellt ist der Anteil der Summe der Mittelwerte aller drei Zellzyklusphasen aufgetragen gegen die Medikamentenkonzentration.

Anteil der drei Zellphasen an gegateten Zellen

Die SKOV-3-Zellen zeigten bei Celecoxib Applikation keine deutliche Veränderung bezüglich des Anteils der aufsummierten Zellzyklusphasen.

3.2.2.2 Applikation von Zoledronsäure

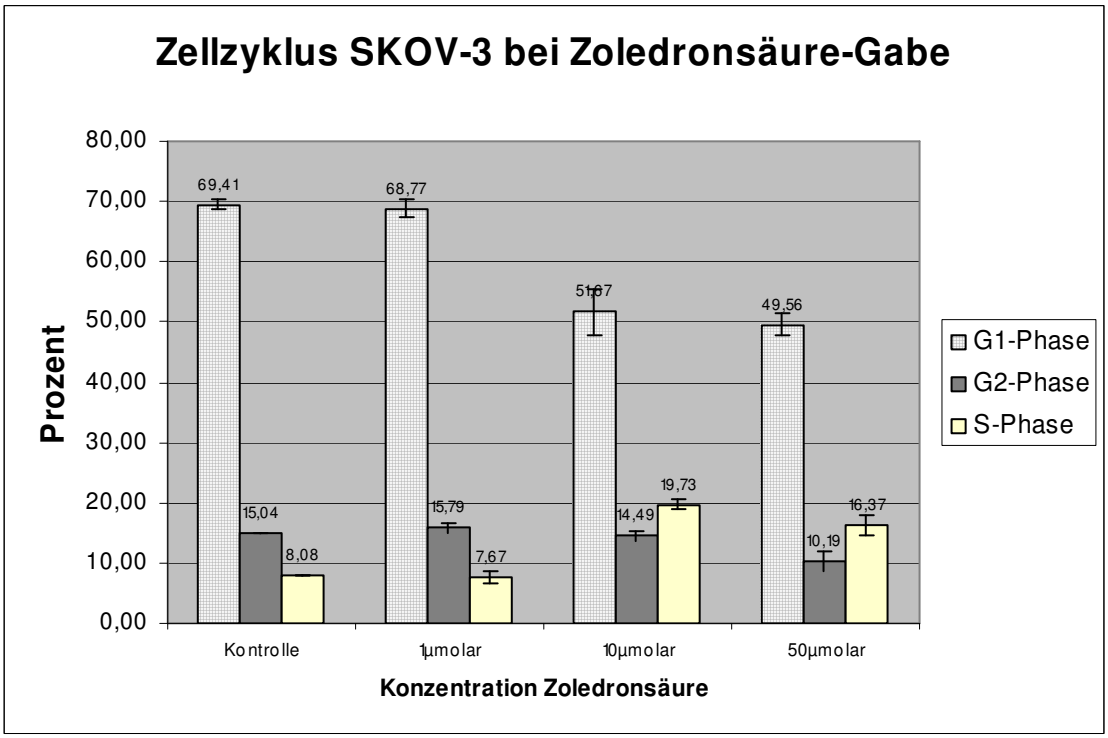


Abb. 3-21: Zellzyklus SKOV-3 bei Zoledronsäure-Gabe; dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen. Ausgangswert ist die Anzahl gegateter Zellen, deren Wert gleich 100% gesetzt wird. Die Standardabweichung wird durch die schwarzen Balken im Diagramm angegeben. Die Zellen wurden für vier Tage inkubiert**.**

Ergebnisse der Zoledronsäure-Gabe

Die SKOV-3-Zellen zeigen deutliche Veränderungen ihrer Zellphasenverteilung bei steigender Zoledronsäure-Konzentration:

- Die G1-Phase nimmt von der Kontrolle bis zur 50µmolaren Zoledronsäure-Konzentration kontinuierlich um 29% ab.
- Die G2-Phase zeigt ebenfalls eine deutliche Abnahme. Nach einem kurzen Anstieg um 5% bei 1µmolarer Zoledronsäure-Konzentration fällt der Anteil gegenüber dem Ausgangsniveau schließlich um 32% bei 50µmolarer Konzentration.
- Die S-Phase zeigt eine bei 10µmolarer Zoledronsäure-Konzentration eine Zunahme um 144 relative Prozent. Schließlich sinkt der Anteil der S-Phase bei der höchsten Zoledronsäure-Konzentration erheblich ab, liegt jedoch mit 102% immer noch deutlich über dem Ausgangswert der Kontrolle.

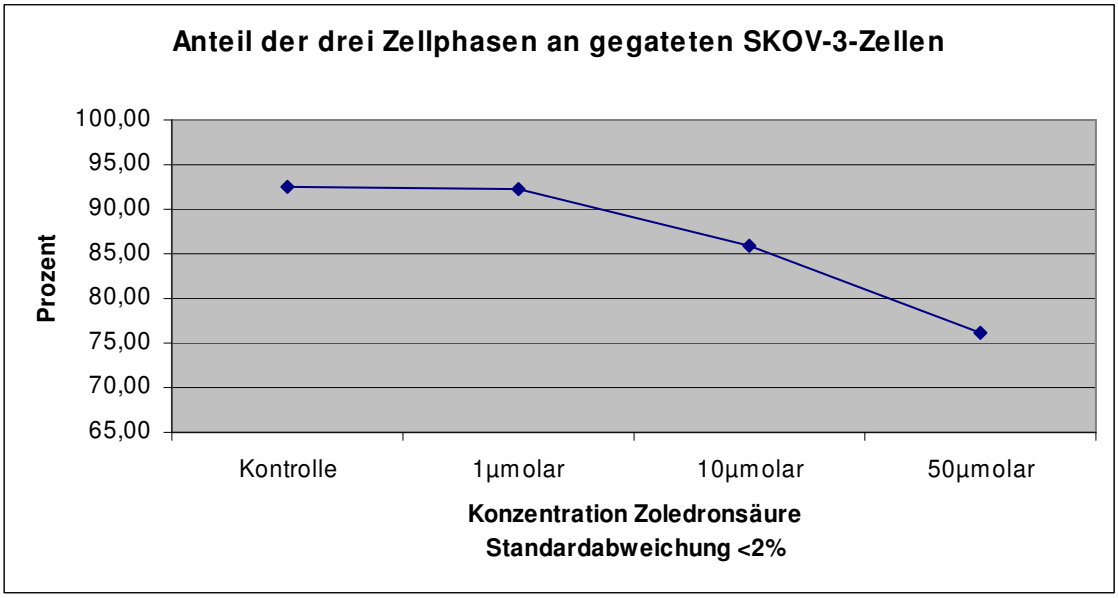


Abb. 3-22: **Anteil der drei Zellphasen an gegateten SKOV-3-Zellen;** dargestellt ist der Anteil der Summe der Mittelwerte aller drei Zellzyklusphasen, aufgetragen gegen die Medikamentenkonzentration.

Anteil der drei Zellphasen an gegateten Zellen

Die SKOV-3-Zellen liegen in ihrer Summe der Zellzyklusphasen relativ konstant bei 90%. Deutlich abgehoben davon ist der Wert der 50µmolaren Zoledronsäure-Konzentration, der nur 76% aufweist.

3.2.2.3 Applikation der Kombination

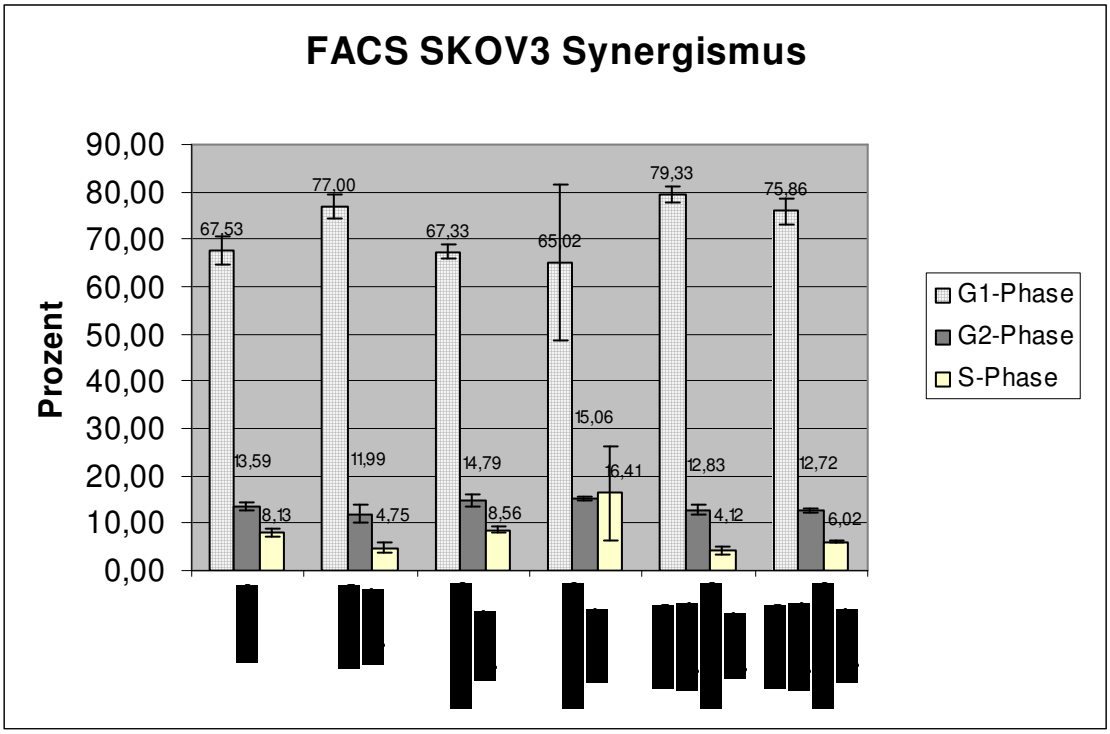


Abb. 3-23: **Zellzyklus SKOV-3 bei Kombiantions-Gabe,** dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen. Ausgangswert ist die Anzahl gegateter Zellen, deren Wert gleich 100% gesetzt wird. Die Standardabweichung wird durch die schwarzen Balken im Diagramm angegeben. Die Zellen wurden für vier Tage inkubiert**.**

Ergebnisse der Kombination von Zoledronsäure und Celecoxib im Vergleich zu den singulären Zoledronsäure-Applikationen

Es wurden die Einzelkonzentrationen von Celecoxib (15µmolar) mit den Kombinationen (gleiche Celecoxib-Konzentration plus Zoledronsäure 1µmolar und 3µmolar) verglichen:

- Es ergibt sich in der ersten Vergleichsgruppe mit 1µmolarer Zoledronsäure keine Veränderung der G1-Phase, eine Zunahme um 7% der G2-Phase und eine Abnahme der S-Phase um 13%.
- Die zweite Vergleichsgruppe mit 3µmolarer Zoledronsäure zeigt allenfalls geringfügige Veränderung gegenüber der Einzelgabe. Während die G1-Phase um 5% sinkt, erhöht sich die G2-Phase um 6%. Eine deutlichere Steigerung des Anteils zeigt sich in der S-Phase mit einer Zunahme um 27%. Die Trends aus der ersten Vergleichgruppe setzten sich hier nicht weiter fort.

Ergebnisse der Kombination von Zoledronsäure und Celecoxib im Vergleich zu den singulären Zoledronsäure-Applikationen

Es wurden die Einzelkonzentrationen von Zoledronsäure (1µmolar und 3µmolar) mit den Kombinationen (gleiche Zoledronsäure-Konzentrationen plus Celecoxib 15µmolar) verglichen:

- In der ersten Vergleichsgruppe mit 1µmolarer Zoledronsäure ergibt sich eine Zunahme der G1-Phase um 16%, während die G2-Phase um 13% und die S-Phase um 52% abnimmt.
- Die zweite Vergleichsgruppe mit 3µmolarer Zoledronsäure zeigt die gleichen Tendenzen. Auch hier kommt es zu einer Zunahme der G1-Phase um 34%, wohingegen sich die G2-Phase nicht verändert und die S-Phase um 63% abnimmt.

3.3 Western Blot

3.3.1 Darstellung der Ladekontrolle als Basis der Beurteilung der Blot-Ergebnisse

Um die Ergebnisse des Western Blots beurteilen zu können, muss sichergestellt sein, dass in allen Kammern die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Dieser Nachweis erfolgte hier mit Hilfe der Silberfärbung, der Ponceau-S-Rot-Färbung und der Anfärbung der Aktin-Banden. Bei der Beschriftung der Blots wurde folgendes Schema verwendet: C steht für Celecoxib, Z für Zoledronsäure, die Zahlen hinter den Buchstaben C bzw. Z geben die Mycromolarität an. Insgesamt wurden drei Versuche durchgeführt, wobei für jeden Antikörper ein repräsentativer Blot dargestellt wird.

3.3.1.1 Silberfärbung

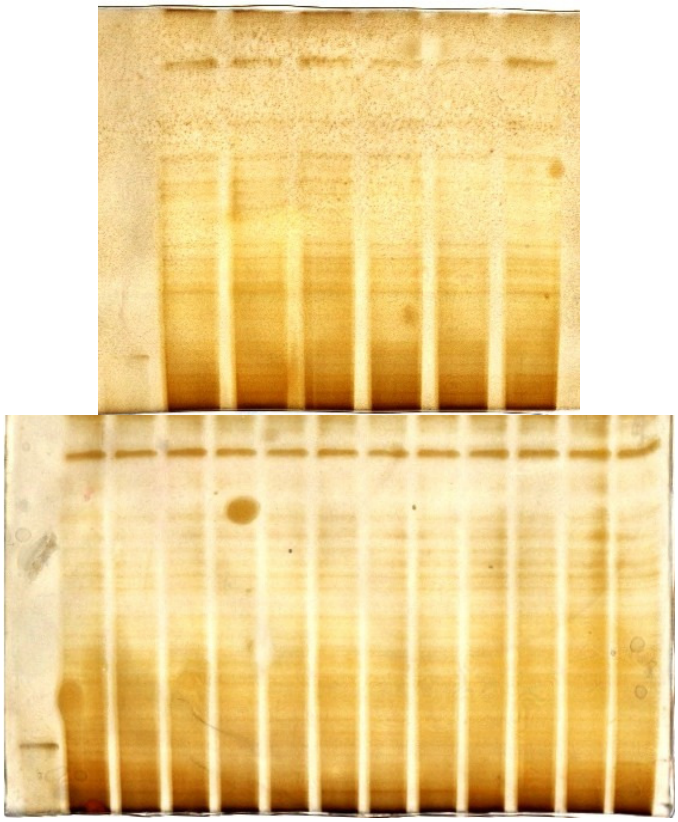


Abb. 3-24: Lade- und Laufkontrolle mit Silberfärbung; dargestellt sind beide BG1-Gele.

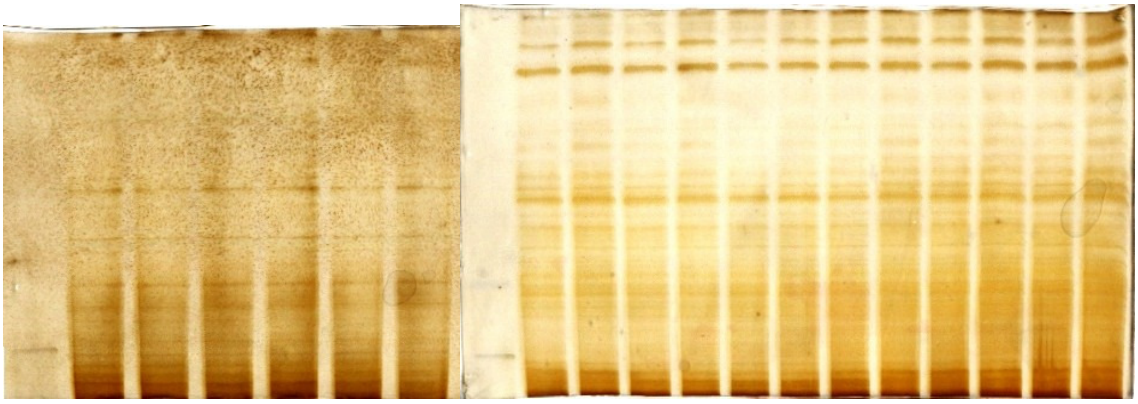


Abb. 3-25: Lade- und Laufkontrolle mit Silberfärbung; dargestellt sind beide SKOV-3 Gele.

Deutlich zeigt sich, dass in allen Kammern die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde.

3.3.1.2 Ponceau-S-Rot-Färbung

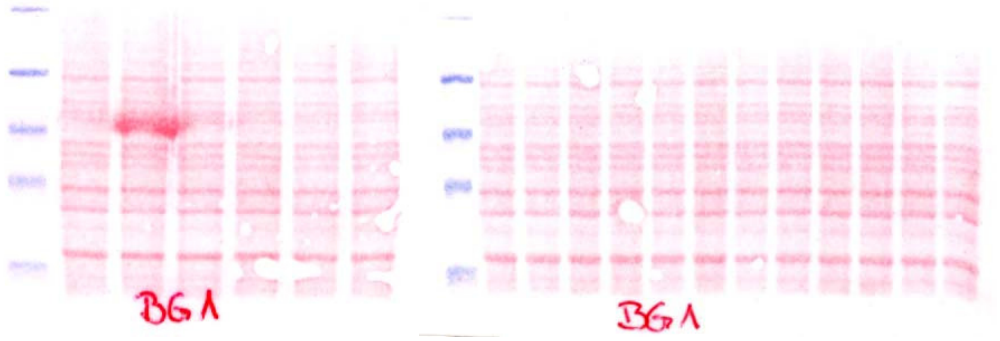


Abb. 3-26: **Lade- und Blottingkontrolle mit Ponceau-S;** dargestellt sind beide BG1-Blots.

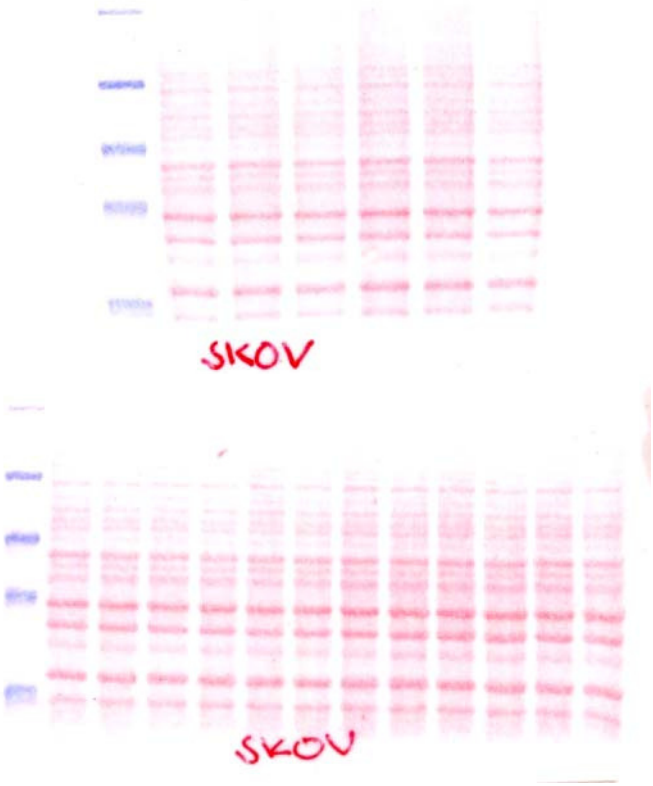


Abb. 3-27: **Lade- und Blottingkontrolle mit Ponceau-S;** dargestellt sind beide SKOV-3-Blots.

Die Ponceau-S-Rot-Färbung zeigt zusätzlich zur Silberkontrolle, dass auch das Blotten auf die Nitrocellulosemembran gleichmäßig erfolgte.

3.3.1.3 Aktin

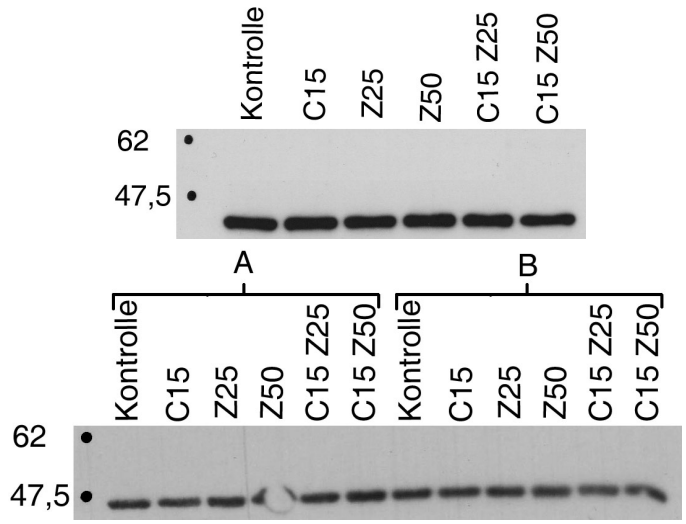


Abb.3-28 **Ladekontrolle mit Anti-β-Aktin-Antikörper bei BG1-Zellen**; oben Entwicklung mit ECL nach 30sec; unten Entwicklung mit ECL nach 5sec; links von den Graphiken ist die Proteingröße in kD angegeben.

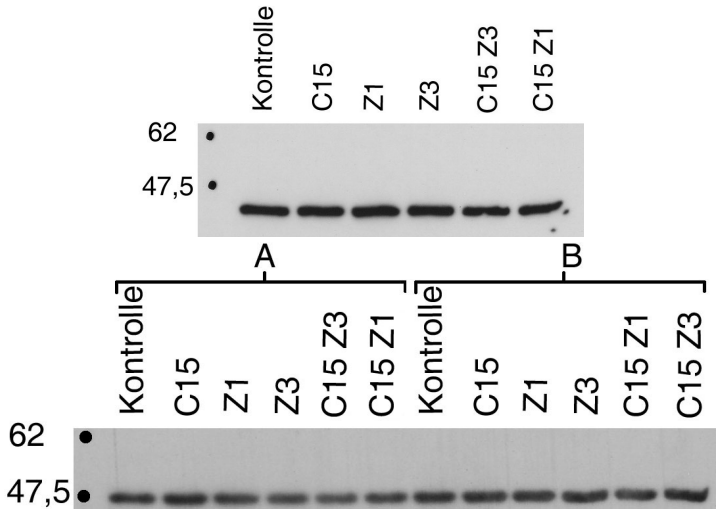


Abb. 3-29: **Ladekontrolle mit Anti-β-Aktin-Antikörper bei SKOV-3-Zellen,** oben Entwicklung mit ECL nach 30sec; unten Entwicklung mit ECL nach 5sec; links von den Graphiken ist die Proteingröße in kD angegeben.

Die Kontrolle mit Anti-β-Aktin-Antikörper zeigt eine gleiche Ladung der Kammern sowie einen gleichmäßigen Blot.

3.3.2 Darstellung der Ergebnisse der untersuchten Proteine

3.3.2.1 Akt

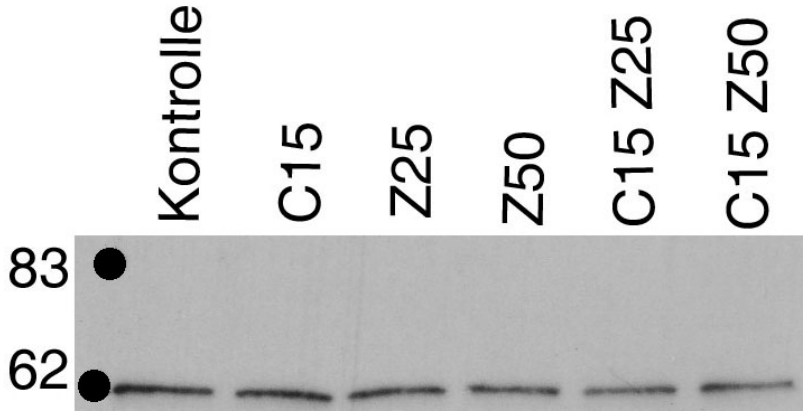


Abb. 3-30: Anti-Akt-Antikörper bei BG1-Zellen, Entwicklung mit ECL+ nach 30 sec; links von der Graphik ist die Proteingröße in kD angegeben.

Bei den BG1-Zellen zeigt die Kontrolle eine stärkere Bande als die behandelten Zellen. Beide Einzelsubstanzen führen zu einer Abschwächung der Bande, die Grauintensität der C15 Bande beträgt 97,5 Prozent der Kontrolle, die Zoledronsäure führt sogar in ihrer höchsten Konzentration mit 50µmolar zu einer Abschwächung um 17,5% der Kontrolle. In den Synergismusversuchen addiert sich diese Abschwächung, so dass die Bande der Konzentration Celecoxib 15µmolar kombiniert mit Zoledronsäure 50µmolar nur 69 Prozent der Grauintensität der Kontrolle beträgt.

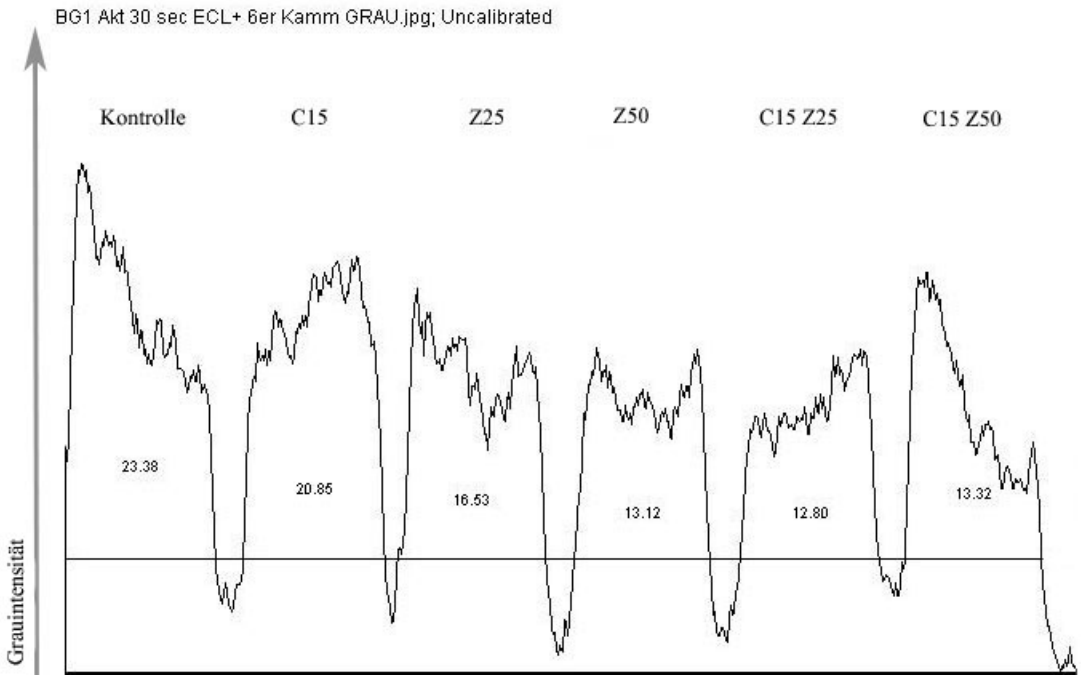


Abb: 3-31: **Akt bei BG1-Zellen;** Graphische Auftragung des Grey Value und der prozentualen Kurvenfläche, die Berechnung wurde an der Abbildung 3-29 durchgeführt; auf der Y-Achse ist die Grauintensität aufgetragen, die Zahlen unter den Kurven geben die prozentuale Verteilung der Flächen unter der Kurve in Relation zur Gesamtfläche in Prozent an.

Abb. 3-31 stellt besondere Aspekte des Akt-Blots der BG1-Zellen noch mal heraus: Deutlich ist der Abfall der Grauintensität mit steigender Celecoxib- und Zoledronsäure-Konzentration zu sehen. Als neuer Aspekt zeigt sich hier der Flächenanteil der einzelnen Banden. Dieser wird mit steigender Celecoxib- und Zoledronsäure-Konzentration immer geringer und liegt bei der Kombination Celecoxib 15µmolar mit Zoledronsäure 50µmolar nur bei 60 Prozent der Kontrollfläche.

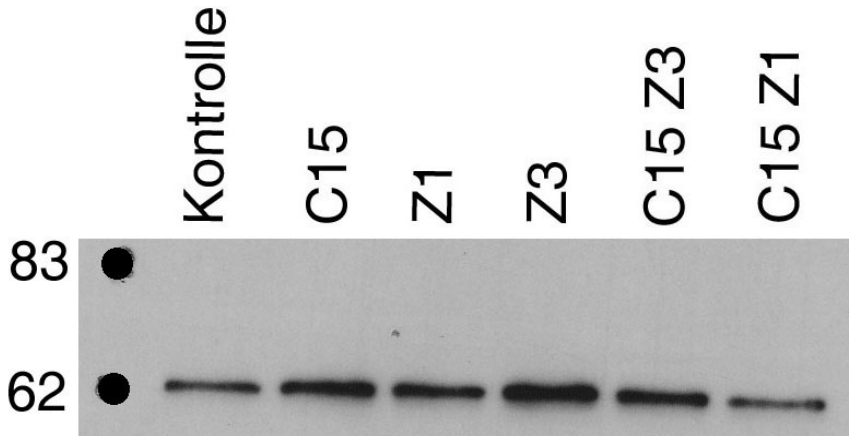


Abb: 3-32: **Anti-Akt-Antikörper bei SKOV-3-Zellen,** Entwicklung mit ECL+ nach 30sec; links von der Graphik ist die Proteingröße in kD angegeben.

Auch bei SKOV-3-Zellen zeigt sich eine deutliche Veränderung des Akt-Gehaltes von unbehandelten zu behandelten Zellen. Beide Einzelsubstanzen führen zu einer deutlichen Hervorhebung der Banden. Die Kombinationen reagieren gegensätzlich, die niedrigere konzentrierte Kombination hat eine schwächere Bande, die Kombination aus Celecoxib 15µmolar und Zoledronsäure 50µmolar eine stärkere Bande als die Kontrolle.

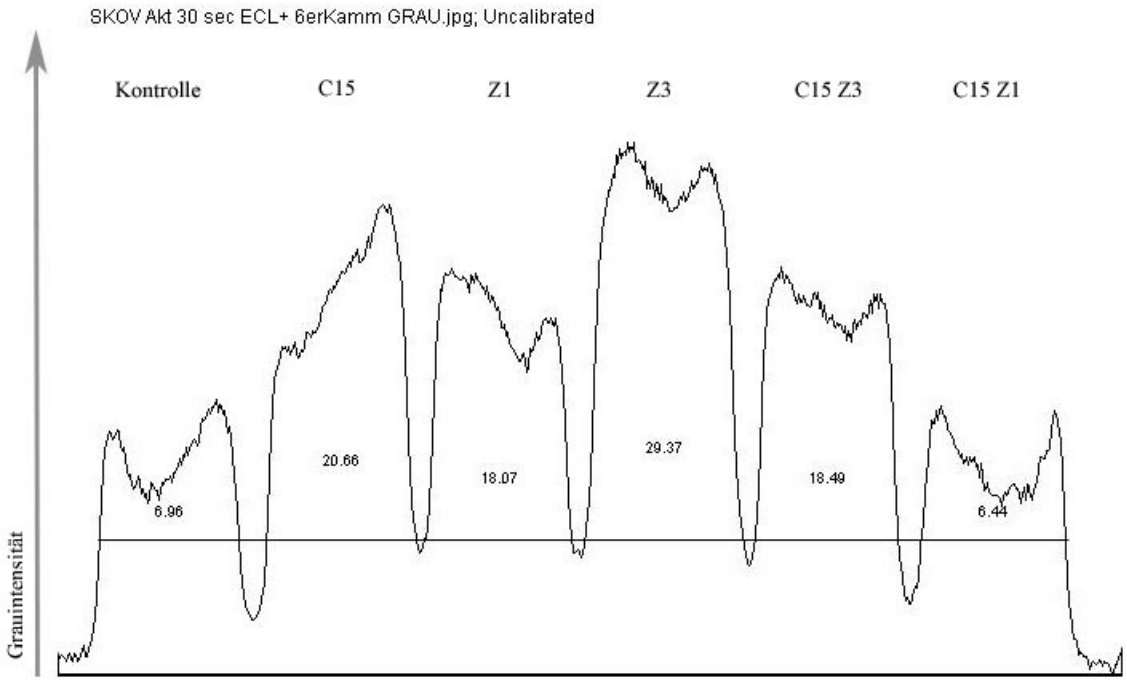


Abb. 3-33: **Akt bei SKOV-3-Zellen;** Graphische Auftragung des Grey Value und der prozentualen Kurvenfläche, die Berechnung wurde an der Abbildung 3XX durchgeführt; auf der Y-Achse ist die Grauintensität aufgetragen, die Zahlen unter den Kurven geben die prozentuale Verteilung der Flächen unter der Kurve in Relation zur Gesamtfläche in Prozent an.

Abb. 3-33 stellt besondere Aspekte des Akt-Blots der SKOV-3-Zellen noch mal heraus: Bei der Behandlung der Zellen mit den Einzelsubstanzen zeigt sich deutlich die Intensitätssteigerung der Grauintensität sowie deren Flächensteigerung. Es ergibt sich z.B. bei einer Konzentration von Zoledronsäure 50µmolar eine Steigerung der Fläche um das vierfache. Auch die Unregelmäßigkeiten bei den Kombinationen werden dargestellt.

3.3.2.2 p-Akt

Abb. 3-34: **Anti-p-Akt-Antikörper bei BG1-Zellen,** Entwicklung mit ECL+ nach 20min; links von der Graphik ist die Proteingröße in kD angegeben.

Abb. 3-34 zeigt schwache Banden, deren Unterschiede mit dem bloßen Auge nicht zu erkennen sind. Jedoch zeigen sich die Unterschiede der einzelnen Banden bei der Berechnung der Grauintensität. Die Kontrolle zeigt sich schwächer als die Einzelsubstanzen, da sie nicht über die gleiche Fläche die Intensität der Banden von 15 µmolarem Celecoxib und 25 µmolarer Zoledronsäure aufweist. Eine deutliche Zunahme ist mit neun Prozent gegenüber der Kontrolle in der Bande mit 50µmolarer Zoledronsäure zu sehen. In der Kombination der Substanzen ist die Bande der niedrigeren Konzentration mit 15µmolarem Celecoxib und 25µmolarer Zoledronsäure auch mit neun Prozent mehr Intensität deutlich abgehoben von der Kontrolle, wohingegen die Bande der höheren Konzentrations-Kombination wieder auf das Intensitätslevel der Kontrolle fällt.

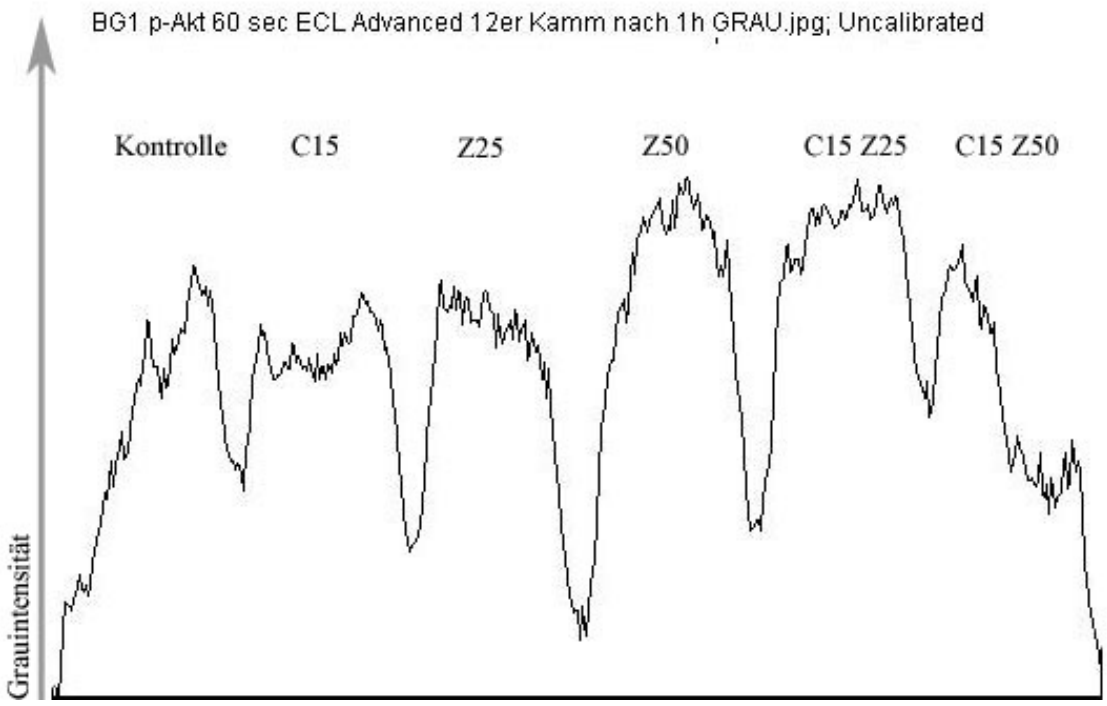


Abb: 3-35: **p-Akt bei BG1-Zellen,** Graphische Auftragung des Grey Value; die Berechnung wurde an der Abbildung 3-33 durchgeführt; auf der Y-Achse ist die Grauintensität aufgetragen, die Berechnung der prozentualen Fläche unter der Kurve war nicht möglich.

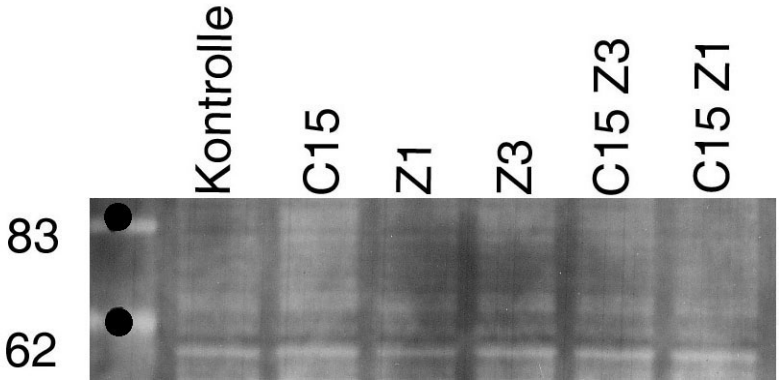


Abb. 3-36: **Anti-p-Akt-Antikörper bei SKOV-3-Zellen,** Entwicklung mit ECL+ nach 20 min; links von der Graphik ist die Proteingröße in kD angegeben.

Die Darstellung der Banden von SKOV-3-Zellen nach der Detektierung mit Anti-p-Akt-Antikörper ist nicht eindeutig und lässt sich nur begrenzt beurteilen. Man erkennt eine gleichbleibende Grauintensität in allen Banden. Auf eine graphische Darstellung des Grey Value wurde verzichtet.

3.3.2.3 Vergleich Akt/p-Akt

In der Zusammenfassung der beiden Western-Blot Ergebnisse zeigt sich für BG1-Zellen ein gegenteiliges Verhalten der Akt und der p-Akt Bandenintensität. Die Banden für Akt zeigen bei den BG1-Zellen mit steigender Medikamentenkonzentration der Einzelsubstanzen eine Abnahme der Intensität, wohingegen die Banden für p-Akt bei den gleichen Substanzkonzentrationen eher eine Zunahme der Intensität aufweisen. Daraus ergibt sich eine absolute und relative Zunahme des p-Akt Anteils. Die Antiparallelität der beiden Bandenverläufe ist in Abb. 3-37 mit Hilfe der Übereinanderauftragung des Grey Value dargestellt.

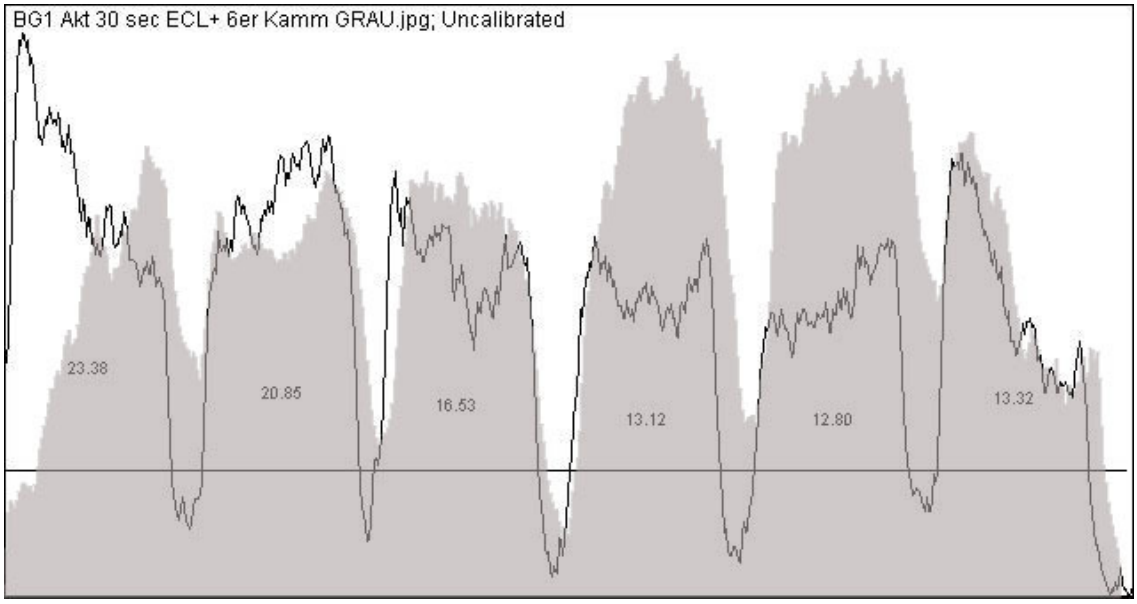


Abb. 3-37: Darstellung der beiden Grey Value bei Akt und p-Akt bei BG1-Zellen, die Kurve für Akt ist in schwarz, die Kurve für p-Akt in grau dargestellt.

Bei dem Vergleich von SKOV-3-Zellen von Akt zu p-Akt lässt sich eine stetige Zunahme von Akt bei gleich bleibender p-Akt Konzentration erkennen. Daraus ergibt sich eine Verminderung des relativen p-Akt Anteils.

3.3.2.4 COX-2

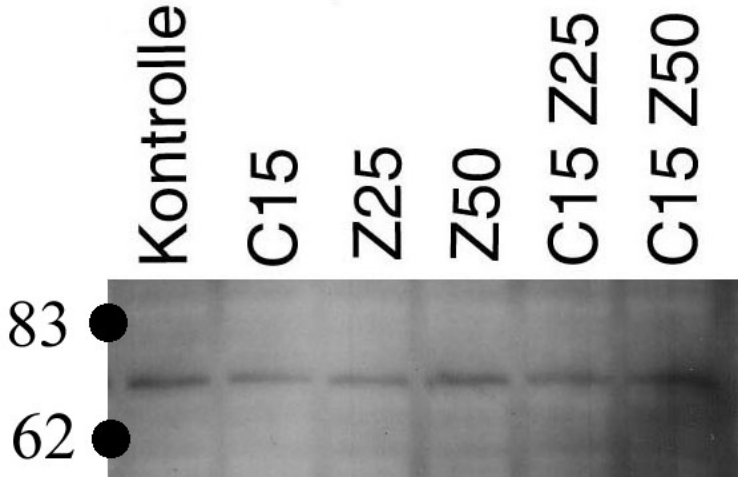


Abb. 3-38: **Anti-COX-2-Antikörper bei BG1-Zellen,** Entwicklung mit ECL+ nach 9min; links von der Graphik ist die Proteingröße in kD angegeben.

Bei der Detektierung von COX-2 mittels Western Blot zeigen sich Bandenintensitätsunterschiede bei den BG1-Zellen. Die Bande der Kontrolle tritt am deutlichsten hervor, die beiden Einzelsubstanzen führen ihrerseits zu einer Abschwächung der Bandenintensität. Bei der Behandlung mit 15µmolarem Celecoxib zeigt sich eine Abschwächung um 26 Prozent im Vergleich zur Kontrolle; in der höchsten Zoledronsäure-Konzentration mit 50µmolar ergibt sich keine Veränderung. Die Kombination aus 15µmolarem Celecoxib und 50µmolarer Zoledronsäure führt zu einer stärkeren Cox-2 Detektierung mit 28 Prozent mehr als die Kontrolle.

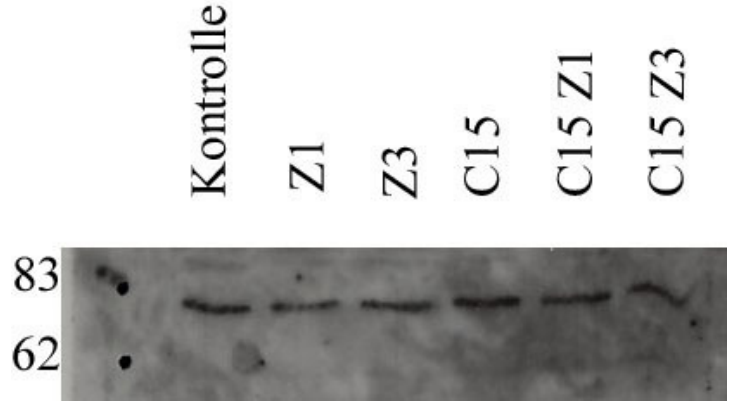


Abb. 3-39: **Anti-COX-2-Antikörper bei SKOV-3-Zellen,** Entwicklung mit ECL+ nach 5min; links von der Graphik ist die Proteingröße in kD angegeben.

Bei der Detektierung von COX-2 mittels Western Blot zeigen sich kaum Intensitätsunterschiede bei den SKOV-3-Zellen.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Das Ovarialkarzinom ist das gynäkologische Karzinom mit der höchsten Mortalität. Die Erfolgsquoten der Therapie, deren zwei wichtigsten Säulen die Chirurgie und die Chemotherapie sind, haben sich in den letzten Jahren zwar wesentlich verbessert, insgesamt führen sie aber immer noch zu unbefriedigenden Ergebnissen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, weiter nach neuen Therapieoptionen zu suchen, die effizienter und besser verträglich sind, als die ungezielte Chemotherapie.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Medikamente untersucht, die neben gezielten antitumorösen Wirkungen ein erheblich günstigeres Nebenwirkungsprofil als die Standardchemotherapeutika zeigen. Weiterhin wurde die Frage nach einem möglichen Synergismus untersucht, durch den die Dosis der Einzelsubstanzen minimiert werden könnte und damit auf eine bessere Verträglichkeit der Therapie hoffen lässt.

4.1.1 Proliferationshemmung

4.1.1.1 Celecoxib

Zur Diskussion der eigenen Ergebnisse wurden die erzielten Werte mit Werten aus publizierten Studien verglichen. Dabei ergibt sich für Celecoxib:

Insgesamt bestätigt sich die proliferationshemmende Wirkung von Celecoxib an Ovarialkarzinomzelllinien. Die erzielten IC 50 Werte für die Zelllinie SKOV-3 fügen sich ergänzend in die Reihe der bereits publizierten Werte ein (s. Tabelle 4-1). Für BG1 konnte erstmalig eine effiziente Wachstumshemmung durch Celecoxib gezeigt werden. Die antitumorösen Wirkungen von Celecoxib begründen sich auf der Hemmung von COX-2, deren Überexpression mit aggressivem Tumorverhalten, Antiapoptose, VEGF-, MMP-, und BCl2 Überexpression assoziiert ist [21]. Weiterhin führt Celecoxib im Gegensatz zu z. B. NS-398 zu COX-2 unabhängigen Wirkmechanismen. Es kommt u.a. zu Apoptose und Zell-Zyklus-Arrest, auf die die proliferatioshemmende Wirkung von Celecoxib auf Ovarialkarzinomzelllinien zurückzuführen ist [40].

Tab. 4-1: **Proliferationshemmung,** Vergleich der bisher publizierten Studien von Celecoxib an Ovarialkarzinomzellen zur Proliferationshemmung mit den eigenen experimentell erzielten Daten (* kalkuliert aus dem Graphen).

Autor	Zelllinie	Substanz in µmolar	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Denkert et al. 2003 [24]	SKOV-3	NS-398 400	-50% *
	OVAR-3	NS-398 70	-50% *
Wang et al. 2007 [108]	SKOV-3	Celecoxib 50	-50%
Song et al 2007 [96]	SKOV-3	Celecoxib 40	-40% *
	PA-1	Celecoxib 40	-95% *
Eigene Daten	SKOV-3	Celecoxib 43,6	-50%
Eigene Daten	BG1	Celecoxib 32,5	-50%

4.1.1.2 Zoledronsäure

Zur Diskussion der eigenen Ergebnisse wurden die erzielten Werte mit Werten aus publizierten Studien verglichen. Da hier erstmalig Versuche an Ovarialkarzinomzellen bei der Behandlung mit Zoledronsäure durchgeführt wurden, musste bei der Diskussion der eigenen Daten auf Studien mit anderen Bisphosphonaten oder anderen Karzinomzelllinien zurückgegriffen werden. Dabei ergibt sich:

Wie auch in den anderen Tumorarten zeigt sich eine deutliche Proliferationshemmung durch Zoledronsäure und die hier erzielten Ergebnisse fügen sich nahtlos in die bisher publizierten Daten ein. Je nach Tumorart konnte eine Hemmung der Proliferation in unterschiedlichen Konzentrationen gezeigt werden, wobei die einzelnen IC-Werte in ihrer Konzentration bezogen auf die Tumorzelllinien deutlich schwanken. Die Zoledronsäure wirkt u.a. über den Mechanismus der Hemmung der Farnesyldiphosphatsynthetase [38] und verursacht eine Proliferationshemmung, die im vorliegenden Versuch auch für Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden konnte.

Tab. 4-2: **Proliferationshemmung;** Vergleich der bisher publizierten Studien von Bisphosphonaten an Ovarialkarzinomzellen zur Proliferationshemmung mit den eigenen experimentell erzielten Daten(* kalkuliert aus dem Graphen).

Autor	Zelllinie	Substanz in µmolar	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Sawada et al. 2002 [91]	Ovarialkarzinom Caov-3	Alendronsäure 100	 -20% *
Caraglia et al. 2007 [13]	Prostatakarzinom PC3 DU145 LNCaP	Zolderonsäure 13 34 18	 -50% -50% -50%
Ozturk et al. 2007 [82]	NSCLC A549	Zoledronsäure 100	 -50%
Pandha et al. 2006 [83]	Nierenzellkarzinom 769-P Caki-2 D69581	Zoledronsäure 50	 -80% * -20% * -90% *
Ural et al. 2006 [102]	Mammakarzinom MCF7	Zoledronsäure 48	 -50%
Eigene Daten	Ovarialkarzinom SKOV-3	Zoledronsäure 50	- 67%
Eigene Daten	Ovarialkarzinom BG1	Zoledronsäure 50	 -35%

4.1.2 FACS Analyse

4.1.2.1 Celecoxib

Der Vergleich der Flowcytometry-Analyse mit den bisher publizierten Studien zu Celecoxib ist nicht eindeutig. Die Wirkung von Celecoxib auf den Zellzyklus von Ovarialkarzinomzellen wurde bisher nur von Song et al. untersucht und publiziert. Hier zeigt sich bei SKOV-3-Zellen in geringer Celecoxib-Konzentration ein G1-Arrest, bei weiter steigender Konzentration auf 40µmol kommt es jedoch zu einem Rückgang der G1-Phase um 45 Prozent bezogen auf den Ausgangswert. Die eigenen Experimente an

SKOV-3-Zellen zeigen die Tendenz eines G1-Arrestes mit steigender Celecoxib-Konzentration. Die Ergebnisse der BG1-Zellen lassen keine Rückschlüsse auf einen G1-Arrest zu, bei dieser Zelllinie konnte lediglich ein sprunghaft abnehmender Anteil der drei Zellphasen an gegateten Zellen im Bereich zwischen 10µmolarer und 50µmolarer Lösung (s. Abb. 3-16) beobachetet werden. Neben dem Zellzyklusarrest verursacht Celecoxib bei den BG1-Zellen einen verstärkten Anteil an Zelltod, der sich in der Zellzyklusanalyse in Form von Zellschrott und fragmentierter DNA zeigt. Dies wurde ebenfalls von Song et al. 2007 [96] beschrieben.
Der G1-Arrest wurde bislang nur von Denkert et al. [24] beschrieben, hier wurde mit einer anderen Ovarialkarzinomzelllinie und einem anderen COX-2-Hemmer experimentiert.

Tab. 4-3: **FACS-Analyse;** Vergleich der bisher publizierten Studien von Celecoxib bzw. NS398 an Ovarialkarzinomzellen zur FACS-Analyse mit den eigenen experimentell erzielten Daten.

Autor	Zelllinie	Substanz in µmolar	Untersuchtes Merkmal	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Wang et al. 2007 [108]	SKOV-3	Celecoxib 50	Apoptose (FACS)	47,1% Apoptoserate
Song et al. 2007 [96]	SKOV-3	Celecoxib 0/20/40	Zellzyklus G1-Phase	100%/ +10,8%/ -45,9%
Denkert et al. 2003 [24]	OVCAR 3	NS-398 0/200	Zellzyklus G1-Phase	100%/ + 31,8%
Eigene Daten	SKOV-3	Celecoxib 0/10/50	Zellzyklus G1-Phase	100%/ +4,9/+6,2%
Eigene Daten	BG1	Celecoxib 0/15/50	Zellzyklus G1-Phase	100%/-1,9%/+4,5%%

4.1.2.2 Zoledronsäure

Bezüglich der Ergebnisse der Flow-Cytometry sind sowohl bei Celecoxib als auch bei dem Wirkstoff Zoledronsäure die Ergebnisse nicht eindeutig [60]. Lee et al. berichtet über einen G1-Arrest in der Zellzyklusverteilung durch Applikation von Zoledronsäure. Im Gegensatz dazu lässt sich in dem Großteil der Untersuchungen des Zellzyklus ein Arrest in der S-Phase nachweisen. Diese Veränderung konnte für die SKOV-3-Zellen ebenfalls beobachtet werden.
Auffällig ist weiterhin der abnehmende Anteil der drei Zellphasen an gegateten Zellen im Bereich von 10µmolaren bis 50 µmolaren Lösungen (s. Abb. 2-23). Neben dem

Zellzyklusarrest verursacht Zoledronsäure bei den SKOV-3-Zellen einen verstärkten Anteil an Zelltod.

Die Zellzyklusveränderung der BG1-Zellen, die auch eine wesentlich schwächere Proliferationshemmung nach Zoledronsäure-Applikation zeigen, manifestiert sich in einem erheblichen Zuwachs in der G2-Phase.

Tab. 4-4: **FACS-Analyse;** Vergleich der bisher publizierten Studien von Zoledronsäure an Karzinomzellen zur FACS-Analyse mit den eigenen experimentell erzielten Daten (teilweise war die Erhebung von konkreten Zahlenwerten nicht möglich).

Autor	**Zelllinie**	**Substanz in µmolar**	**Veränderung des Zellzyklus gegenüber der Kontrolle**		
			G1	S	G2
Lee et al. 2001 [60]	Prostatakarzinom DU145 PC3	Zoledron-säure 100	Anstieg Anstieg	Anstieg Anstieg	Abfall Abfall
Pandha et al. 2006 [83]	Nierenzellkarzinom 769-P D69581	Zoledron-säure 100	Abfall Abfall	Anstieg Anstieg	Anstieg Anstieg
Dickson et al. 2006 [27]	Neuroblastom NB-1691 CHLA-255 SK-N-AS	Zoledron-säure 100	Abfall Abfall Abfall	Anstieg Anstieg Anstieg	Abfall Abfall Abfall
Neville-Webbe et al. 2006 [79]	Mammakarzinom MCF 7 MDA-MB-436	Zoledron-säure100	-10,4% -21,9%	+ 44,4% +414%	-43,6% +19,8%
Eigene Daten	Ovarialkarzinom SKOV-3	Zoledron-säure 10	-25,6%	+44,2%	-3,7%
Eigene Daten	Ovarialkarzinom BG-1	Zoledron-säure 50	-6,8%	-7,00%	+27,5%

4.1.3 Western Blot

4.1.3.1 Akt/ PKB

Die höhere Detektion von p-Akt in einer Tumorzelle ist verbunden mit aggressiverem Tumorverhalten und Resistenz gegen Chemotherapie und Anti-Apoptopse. Celecoxib zeigte in vorangegangenen Studien eine deutliche Hemmung der Phosphorylierung von Akt zu p-Akt und der damit verbundenen Antiapoptose. Dies konnte unter anderem in Endothelzellen, Prostatakarzinomzellen und humanen Cholangiokarzinomzellen nachgewiesen werden (s.Tabelle 4-5).

Zum Ovarialkarzinom existieren noch keine Daten bezüglich dieser Fragestellung. In den vorliegenden Experimenten weisen die Daten auf eine Verminderung der Phosphorylierung für SKOV-3-Zellen hin, im Gegensatz zu den BG1-Zellen, die keine Veränderung des Phosphorylierungsanteils von Akt zeigen.

Tab. 4-5: **Western Blot;** Vergleich der bisher publizierten Studien von Celecoxib an Ovarialkarzinomzellen zum Western Blot mit den eigenen experimentell erzielten Daten.

Autor	Zelllinie	Substanz in µmolar	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Colleselli et al. 2006 [19]	endothelial progenitor cells EPC	0-50	Signifikante Abnahme der Phosphorylierung
Hsu et al. 2000 [47]	Prostatakarzinom LN-CaP PC-3/Bcl-2 PC-3	 0-50 0-50 0-50	Signifikante Abnahme der Phosphorylierung
Wu et al. 2004 [116]	humanes Cholangiokarzinom HuCCT1	0-50	Signifikante Abnahme der Phosphorylierung
Eigene Daten	Ovarialkarzinom SKOV.3	0-15	Abnahme des phosphorylierten Anteils
Eigene Daten	Ovarialkarzinom BG-1	0-50	keine wesentliche Veränderung des phosphorylierten Anteils

Die Datenlage bezüglich der Fragestellung der Veränderung der Phosphorylierung von Akt durch Zoledronsäure ist nicht umfangreich. Bezzi et al. [4] zeigen einen Abfall der Phosphorylierung von Akt- jedoch nicht an Tumorzellen. Die restlichen veröffentlichten Studien stellen nicht die Phosphorylierung von Akt zu p-Akt in den Mittelpunkt ihres Interesses, sondern vielmehr die Aktivität von Akt, die durch die Detektion eines durch die aktivierte Akt phosphorylierten Substrates gemessen wird. Deutlich wird jedoch in beiden Studien, dass die Zoledronsäure die Effektivität des Akt/ Signalweges einschränkt und u.a. somit seine antikanzerogene Wirkung entfalten kann. Die eigenen Daten für SKOV-3-Zellen fügen sich in die Reihe dieser Beobachtungen ein, für die BG1-Zellen konnte dies nicht bestätigt werden.

Tab. 4-6: **Western Blot;** Vergleich der bisher publizierten Studien von Zoledronsäure an Karzinomzellen zum Western Blot mit den eigenen experimentell erzielten Daten.

Autor	Zelllinie	Zoledronsäure in µmolar	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Caraglia et al. 2007 [13]	Prostatakarzinom PC3	0,75	Akt Detektion und Aktivität unverändert
Caraglia et al. 2004 [12]	Epidermoidkarzinom KB	10	Akt Detektion unverändert, Akt Aktivität vermindert
Tassone et al. 2003 [99]	Prostatakarzinom Panc-1 Bx-PC3 CF-Pac	50 50 50	Akt Detektion unverändert, Akt Aktivität vermindert
Bezzi et al. 2003 [4]	Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)	100	Leichter Abfall der Phosphorylierung von Akt
Eigene Daten	Ovarialkarzinom SKOV-3	50	Zunahme von Akt, gleichbleiben von p-Akt → Senkung des phosphorylierten Anteils
Eigene Daten	Ovarialkarzinom BG-1	50	Abnahme von Akt, Zunahme von p-Akt

Es bleibt die Frage zu diskutieren, wie sich die hier gewonnenen Ergebnisse in die Reihe der vorangegangenen Studien reihen. Die SKOV-3-Zellen zeigen als Reaktion sowohl auf Celecoxib als auch auf Zoledronsäure eine Reduktion des phosphorylierten Akt-Anteils. Für Celecoxib ist diese Wirkung in der Literatur beschrieben. Celecoxib führt in einem COX-2 unabhängigen Wirkmechanismus zur Inhibition von Proteinkinase B oder ihrer vorgeschalteteten Phosphoinositol abhängigen Kinase [55]. Wieso zeigen jedoch die BG1-Zellen keine Reduktion des phosphorylierten Akt Anteils? Der IC 50 von Celecoxib liegt bei den BG1-Zellen bei 32,5µmolar, bei den SKOV-3-Zellen bei 43,6 µmolar. Damit scheidet eine mögliche geringere Empfindlichkeit auf Celecoxib als Grund für die manglende Reduktion des phophorylierten Anteils aus. Celecoxib hat wie unter 1.3.1 beschrieben eine große Anzahl an Wirkmechanismen. Möglicherweise sind die BG1-Zellen so empfindlich gegenüber Celecoxib, dass diese Mechanismen (wie z.B. Erhöhung des Ceramidspiegels und Caspasenaktivierung) in deutlich geringerer Zeit schon zum Zelltod führen, als dass sich Celecoxib auf der Proteinebene von Akt und p-Akt hätte auswirken können. Wie unter 3.2.1 beschrieben zeigen die BG1-Zellen in der FACS Analyse einen deutlich erhöhten Zellschrottanteil, der bei den SKOV-3-Zellen nicht nachzuweisen war.

Bei der Betrachtung der Reaktion der Zellen auf die Zoledronsäure ergibt sich bei den Zelllinien ein gegensätzliches Bild. Auch hier zeigen die SKOV-3-Zellen eine Reduktion des phosphorylierten Akt-Anteils, wohingegen die BG1-Zellen sogar mit einer Erhöhung ihres phosphorylierten Anteils reagieren. Von den in der Tabelle 4-6 zitierten Studien beschreibt lediglich Bezzi et al. 2003 [4] einen leichten Abfall der Phosphorylierung von Akt durch Zoledronsäure. In weiteren Studien zeigt sich keine Aktivitätsänderung von Akt nach Applikation von Zoledronsäure. Die SKOV-3-Zellen zeigen nach der Applikation von Zoledronsäure eine deutliche Proliferationshemmung. Ein möglicher Wirkungsmechanismus dieser Hemmung könnte in der Reduktion von phosphoryliertem Akt und der damit verbundenen Hemmung der Anti-Apoptose liegen. Hasmin et al. [44] konnte eine Beeinträchtigung der PKB durch die verminderte Prenylation von GTP bindenden Proteinen zeigen.

Wie aber lässt sich die Steigerung des p-Akt-Anteils durch die Zoledronsäure bei den BG1-Zellen erklären? Die BG1-Zellen reagieren deutlich unempfindlicher als die SKOV-3-Zellen. Die Aktivierung von Akt und seine Phosphorylierung könnte ein Mechanismus sein, den die Tumorzelle den Wirkmechanismen der Zoledronsäure entgegensetzt. Möglicherweise wirkt die Zoledronsäure in den BG1-Zellen vorrangig

als ATP-Analogon und weniger über die Hemmung der Farnesyldiphosphatsynthetase. Der Wirkmechanismus der Zoledronsäure an Ovarialkarzinomzellen wird weiter zu untersuchen sein.

4.1.3.2 COX

Die Cox-2-Expression ist bei Tumorzellen mit aggressiverem Verhalten assoziiert. Celecoxib kann in einigen Zellen nicht nur die Wirkung der COX-2 beeinträchtigen, sondern auch zu einer Verringerung der Expression führen. Dies bestätigt sich in den Studien von Wang et al. [107] und Zhang et al. Für SKOV-3-Zellen konnte die Verringerung der COX-2-Expression in den vorliegenden Experimenten nicht nachgewiesen werden, wobei die in diesen Experimenten verwendeten Celecoxib Konzentrationen deutlich unter der von Zhang verwendeten Konzentration liegt. Die BG1-Zellen zeigen eine Verminderung der COX-2-Expression auch schon bei dieser geringen Celecoxib-Konzentration. Die BG1-Zellen reagiern in der Proliferationshemmung empfindlicher auf Celecoxib als die SKOV-3-Zellen. Möglicherweise liegt in diesem Zusammenhang auch ein Grund für die unterschiedliche Hemmung der COX-2 Expression. Im Gegensatz dazu steht jedoch eine weitere Studie, die die Unabhängigkeit der Proliferationshemmung von der COX-2 Expression [15] an NPC Zellen zeigen konnte.

Tab. 4-7: **Western Blot;** Vergleich der bisher publizierten Studien von Celecoxib an Karzinomzellen zum Western Blot mit den eigenen experimentell erzielten Daten.

Autor	Zelllinie	Celecoxib in µmolar	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Wang et al. 2006 [107]	Ovarialkarzinom SKOV-3	Unbekannt	Downregulation der COX-2 Expression
Zhang 2006 [119]	CML K 562	80-160µmolar	Downregulation von COX-2 mRNA und Protein
Eigene Daten	Ovarialkarzinom SKOV-3	15µmolar	unverändert
Eigene Daten	Ovarialkarzinom BG1	15µmolar	vermindert

Die Zoledronsäure führt bislang in nur einer Studie von Denoyelle zu einer verringerten COX-2-Expression. In den eigenen Ergebnissen konnte dieser Zusammenhang nicht gefunden werden, auch Melisi [74] konnte in seiner Studie diese Verbindung nicht

bestätigen. Denoyelle zeigt jedoch auch, dass die Zoledronsäure bei der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 in Rho unabhängiger Wirkungsweise zur Verminderung der COX-2 Expression führt. Möglicherweise funktioniert dieser Mechanismus bei anderen Zelllinien nicht.

Tab. 4-8: **Western Blot;** Vergleich der bisher publizierten Studien von Zoledronsäure an Karzinomzellen zum Western Blot mit den eigenen experimentell erzielten Daten.

Autor	Zelllinie	Zoledronsäure in µmolar	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Denoyelle et al. 2003 [25]	Mammakarzinom MDA-MB-231	1	vermindert
Melisi 2005 [74]	Mammakarzinom ZR-75-1	5	unverändert
Eigene Daten	Ovarialkarzinom SKOV-3	3	unverändert
Eigene Daten	Ovarialkarzinom BG1	50	unverändert

4.1.4 Synergismus

Synergismus bedeutet im medizinischen Sinne das Zusammenwirken mehrerer Therapeutika, die eine gesteigerte oder neuartige Wirkung hervorrufen sollen. In dem vorliegenden Fall ergibt sich also damit die konkrete Fragestellung: Wie wirken Zoledronsäure und Celecoxib in Kombination auf Ovarialkarzinomzellen? Wie in 1.4.3 unter Theorie des Synergismus dargestellt, kann die Kombination zweier Stoffe im Wesentlichen drei verschiedene Wirkungen entfalten. Darunter fallen die subadditive (= antagonistische) Wirkung, die additive Wirkung und die supraadditive (= synergistische) Wirkung. Dabei ist die Kombination von Medikamenten in verschiedenen Einzeldosierungen nicht auf eine Wirkungsspezifität beschränkt. Die unterschiedlichen Einzeldosierungen können sich unterschiedlich auf die beeinflussten Mechanismen auswirken, so dass es z.B. in niedrigen Kombinationskonzentrationen zu antagonistischen und in hohen Kombinationskonzentrationen zu synergistischen Wirkungen kommt.

Die vorliegenden Daten spiegeln ebenso unterschiedliche Ergebnisse wieder: Es lassen sich sowohl bei den BG1-Zellen als auch bei den SKOV-3-Zellen die drei unterschiedlichen Wirkungsmöglichkeiten einer Medikamentenkombination beobachten. Dieses Ergebnis ist nicht unüblich für Synergismusuntersuchungen. In den unterschiedlichen Einzelkonzentrationen kommt es zwischen den beiden Substanzen zu verschiedenen Interaktionen [81]. Die Verbindung der Wirkmechanismen beider Medikamente liegt möglicherweise in der von Zoledronsäure beeinflussten COX-2-Expression [25]. Hier könnte ein Grund für die so unterschiedliche Interaktion der beiden Medikamente in den verschiedenen Einzeldosen begründet sein.
Im Mittelpunkt des Interesses stehen bei der pharmakologischen Therapie neben den synergistischen auch die additiven Effekte. In beiden Zellreihen konnten im Hinblick auf die Proliferationsexperimente solche Kombinationen nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Interaktionsindizes der verschiedenen Kombinationen zeigt sich auch eine große Anzahl von Kombinationen, die nach der Definition von Tallarida nicht synergistisch, sondern oftmals sogar subadditiv sind. Es fällt jedoch auf, dass die extrapolierten Einzeldosen, die den gleichen Effekt wie die Kombination bewirken, so hoch sind, dass sie in Experimenten keine praktische Anwendung findet. Somit sind viele der berechneten Kombinationen nicht im Sinne von Tallarida synergistisch, es kommt jedoch durch ihre Kombination zu einer nicht durch eine Einzelsubstanz erreichbaren Wirkung. Bezeichnet man diese Kombinationen ebenfalls als synergistisch, bewirkt die Kombination aus Zoledronsäure und Celecoxib insbesondere bei den BG1-Zellen, aber auch bei den SKOV-3-Zellen, eine deutliche Verbesserung der Proliferationshemmung gegenüber den Einzelsubstanzen.

Wie interessant diese Kombination für die Tumorforschung ist und wie aktuell dieses Thema ist, zeigt sich in den Studien zu diesen Medikamenten:
In humanen Brustzellkarzinomzelllinien konnte ein additiver Effekt aus der Kombination von Zoledronsäure und SC 236 (einem Celecoxib- Analogon) bei der Proliferationshemmung gezeigt werden [113]. Eine weitere Studie untersuchte diese Kombination an humanen Mamma- und humanen Prostatakarzinomzelllinien. Hierbei lag der Schwerpunkt allerdings auf einer Kombination der beiden Substanzen mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor Gefitinib. Es zeigt sich in den Wachstumskurven in der Kombination von Celecoxib und Zoledronsäure eine stärkere Hemmung der Proliferation als bei einer Alleingabe von Zoledronsäure [74]. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Studie in vivo

Versuche durchgeführt. Es konnte dabei in der Prostatakarzinom tragenden Maus durch die Kombination aus COX-2 Hemmer und Zoledronsäure eine Verzögerung des Tumorwachstums beobachtet werden.

Neben der Beeinflussung der Proliferation ist die FACS Analyse der Kombinationsgabe zu diskutieren. Die beiden Substanzen bewirken an den getesteten Zelllinien völlig unterschiedliche Effekte im Zellzyklus, die sich teilweise in der Kombination nachweisen lassen.

Die SKOV-3-Zellen reagien auf Celecoxib mit der Tendenz eines G1-Arrestes und auf Zoledronsäure mit einer Erhöhung des S-Phase-Anteils. Diese Einzelwirkungen der Substanzen lassen sich in der Kombination nachvollziehen. Es kommt durch die Zugabe von Celecoxib zu Zoledronsäure zu einem Anstieg der G1 Phase und durch steigende Zoledronsäurekonzentrationen in der Kombination zu einer Zunahme der S-Phase.

Die Hauptwirkung der Kombination bei den BG1-Zellen ist an dem Anteil der gegateten Zellen gegenüber der Einzelgabe nachzuweisen.

Die Western Blot Ergebnisse zeigen die verstärkte Wirkung der Kombination.

Bei den BG-1 Zellen ist die Expression von Akt in der Kombination schwächer als bei der Einzelgabe der Substanzen, die Detektion von p-Akt ist in der höchsten Konzentrationskombination jedoch auch vermindert. In der Kombination kann also auf ein insgesamt niedrigeres Vorhandensein von p-Akt gegenüber der Kontrolle geschlossen werden.

Die SKOV-3-Zellen, die in der Einzelgabe eine Verringerung der Phosphorylierung von Akt gegenüber der Kontrolle zeigen, sind in der Kombination in ihrer Wirkung gegenüber der Einzelgabe eher abgeschwächt.

4.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Nachstehende Aussagen können aus den vorliegenden Daten gefolgert werden:

- Die zeit- und dosisabhängige Proliferationshemmung der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 durch den COX-2-Hemmer Celecoxib konnte in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden.
- Erstmalig wurde die zeit- und dosisabhängige Proliferationshemmung der Ovarialkarzinomzelllinie BG1 durch den COX-2-Hemmer Celecoxib nachgewiesen.
- Erstmalig wurde die zeit- und dosisabhängige Proliferationshemmung der Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und BG1 durch das Bisphosphonat Zoledronsäure nachgewiesen.
- Der COX-2-Hemmer Celecoxib verursacht in Ovarialkarzinomzellen Zelltod bei BG1-Zellen. Für die SKOV-3-Zellen konnte kein G1-Arrest nachgewiesen werden.
- Für das Bisphosphonat Zoledronsäure konnte für die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 eine verstärkte S-Phase und für die Ovarialkarzinomzelllinie BG1 eine verstärkte G2-Phase in der Zellzyklusanalyse gezeigt werden.
- Die vorliegenden Daten deuten auf eine Hemmung der Phosphorylierung von Akt zu p-Akt durch den COX-2 Hemmer Celecoxib und durch Zoledronsäure an SKOV-3-Zellen hin.
- Die BG1-Zellen reagieren auf die applizierten Substanzen nicht oder mit einer Steigerung des Anteils an phosphoryliertem Akt.
- Die Expression von COX-2 wird in SKOV-3-Zellen weder durch Celecoxib noch durch Zoledronsäure moduliert. Die BG1-Zellen reagieren nur bei Celecoxib-Applikation mit einer Reduktion der COX-2-Expression.
- Für die Kombination der beiden Substanzen Celecoxib und Zoledronsäure konnte an den Ovarialkarzinomzelllinien für bestimmte Konzentrationen ein Synergismus nach Tallarida nachgewiesen werden.

Das Ovarialkarzinom ist der gynäkologische Tumor mit der höchsten Mortalität. Die Therapie gestaltet sich bis jetzt immer noch unbefriedigend. Es bedarf somit neuer und besser wirkender Substanzen, die insbesondere auch für eine Erhaltungstherapie im Anschluss an eine Chemotherapie geeignet sind. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen effiziente Wirkungen von Celecoxib und Zoledronsäure an humanen Ovarialkarzinom-

zelllinien in vitro, sowohl als Einzelsubstanz als auch in der Kombination. Die nächsten zu untersuchenden Schritte sind nun die Wirkungen dieser Substanzen in vivo. Es existieren Studien von Celecoxib und Ovarialkarzinom allerdings nur zur Chemoprevention und nicht zur Therapie des Ovarialkarzinoms. Hier besteht noch ein erheblicher Forschungsbedarf. Die Zoledronsäure wurde bislang nur als effektives Mittel gegen Knochenmetastasen und bei Osteoporose eingesetzt. Erst in den letzten Jahren wurde man auf ihre eigene antitumoröse Wirkkomponente aufmerksam. Klinische Studien zu diesem Thema sollten folgen. Weiterer Forschungsbedarf besteht an der Klärung der molekularen Wirkmechanismen und in vivo Studien von Celecoxib und Zoledronsäure in synergistischen Kombinationen.

5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom zeigt in den letzten Jahren zwar eine gleich bleibende Inzidenz und eine abnehmende Sterblichkeit, trotz dieser Erfolge ist es weiterhin das gynäkologische Karzinom mit der höchsten Mortalität. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung des Ovariakarzinoms von entscheidender Bedeutung. Eine dieser neuen Therapiemöglichkeiten könnte die Kombination von COX-2-Hemmern und Bisphosphonaten sein. Die COX-2-Hemmer umfassen eine Gruppe von Medikamenten, die ursprünglich zur nebenwirkungsärmeren Analgesie entwickelt wurde. In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass Celecoxib über COX-abhängige und COX-unabhängige Mechanismen nicht nur analgetische, sondern ebenfalls antiproliferative Effekte besitzen. Die Bisphosphonate werden klassischerweise zur Behandlung von Osteoporose und Knochenmetastasen eingesetzt. Auch diese Gruppe rückte durch Studien über ihre antiproliferativen Eigenschaften in den Mittelpunkt onkologischen Interesses.

Eine mögliche antiproliferative Wirkung von Celecoxib und Zoledronsäure auf die Ovarialkarzinomzelllinien BG1 und SKOV-3 wurde mit Hilfe des Kristallviolettassays untersucht. Die Inkubation der Zellen mit Celecoxib bzw. Zoledronsäure führte in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion des Zellwachstums unter dieser Behandlung. Dieser antiproliferative Effekt konnte zeitabhängig und dosisabhängig nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen für diese Reaktion sollten mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt werden. Celecoxib führt zu einem großen sub-G1-Anteil bei den BG1-Zellen, bei SKOV-3-Zellen zeigt sich die Tendenz eines G1-Arrestes. Die Zoledronsäure verursacht bei SKOV-3-Zellen einen hohen Anteil in der S-Phase und von Trümmern untergegangener Zellen, die BG1-Zellen reagieren auf die Medikamentenapplikation mit einer verstärkten G2-Phase. Weiterhin zeigt sich die Wirkung der Medikamente auch auf Proteinebene. Es kommt zu Modulationen im Verhältnis Akt/pAkt und der COX-2-Expression.

Neben den Einzelwirkungen sollte in den vorliegenden Experimenten die Möglichkeit eines evetuellen Synergismus untersucht werden. In den Proliferationsversuchen zeigen sich bestimmte Dosiskombinationen synergistisch im Sinne von Tallarida.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum Teil erstmalig gezeigt werden, dass Celecoxib und Zoledronsäure wachstumshemmende Effekte an BG1-Zellen und SKOV-3-Zellen verursachen. Insbesondere wurden erstmalig Daten bezüglich eines Synergismus dieser

beiden Substanzen an den untersuchten Zelllinien gewonnen und für bestimmte Dosiskombinationen der beiden Substanzen konnte ein Synergismus in der Definition nach Tallarida nachgewiesen werden. Als mögliche Ursachen der Proliferationshemmung wurden eine verringerte COX-2-Expression, Zelltodinduktion oder die Modulation des Akt-Phosphorylierungsverhältnisses gefunden.

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Strategien für die Behandlung von Ovarialkarzinomen stellen somit Celecoxib und Zoledronsäure sowohl als Monosubstanz als auch in der Kombination eine Erfolg versprechende Therapieoption dar.

6 Literaturliste

(1) Aletti, G.D., Gallenberg, M.M., Cliby, W.A., Jatoi, A. & Hartmann, L.C. Current management strategies for ovarian cancer. Mayo Clin. Proc. 82, 751-770 (2007).

(2) Barnes, A.P., Miller, B.E. & Kucera, G.L. Cyclooxygenase inhibition and hyperthermia for the potentiation of the cytotoxic response in ovarian cancer cells. Gynecol. Oncol. 104, 443-450 (2007).

(3) Bellahcene, A., Chaplet, M., Bonjean, K. & Castronovo, V. Zoledronate inhibits alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin cell surface expression in endothelial cells. Endothelium 14, 123-130 (2007).

(4) Bezzi, M., Hasmim, M., Bieler, G., Dormond, O. & Ruegg, C. Zoledronate sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death: evidence for the suppression of sustained activation of focal adhesion kinase and protein kinase B/Akt. J. Biol Chem. 278, 43603-43614 (2003).

(5) Body, J.J. Bisphosphonates for malignancy-related bone disease: current status, future developments. Support. Care Cancer 14, 408-418 (2006).

(6) Boissier, S. et al. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. Cancer Res. 60, 2949-2954 (2000).

(7) Boissier, S. et al. Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. Cancer Res. 57, 3890-3894 (1997).

(8) Brazil, D.P. & Hemmings, B.A. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. Trends Biochem Sci. 26, 657-664 (2001).

(9) Brognard, J., Clark, A.S., Ni, Y. & Dennis, P.A. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. Cancer Res. 61, 3986-3997 (2001).

(10) Budman, D.R. & Calabro, A. Zoledronic acid (Zometa) enhances the cytotoxic effect of gemcitabine and fluvastatin: in vitro isobologram studies with conventional and nonconventional cytotoxic agents. Oncology 70, 147-153 (2006).

(11) Burghardt, E., Girardi, F., Lahousen, M., Tamussino, K. & Stettner, H. Patterns of pelvic and paraaortic lymph node involvement in ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 40, 103-106 (1991).

(12) Caraglia, M. et al. The farnesyl transferase inhibitor R115777 (Zarnestra) synergistically enhances growth inhibition and apoptosis induced on epidermoid cancer cells by Zoledronic acid (Zometa) and Pamidronate. Oncogene 23, 6900-6913 (2004).

(13) Caraglia, M. et al. R115777 (Zarnestra)/Zoledronic acid (Zometa) cooperation on inhibition of prostate cancer proliferation is paralleled by Erk/Akt inactivation and reduced Bcl-2 and bad phosphorylation. J. Cell Physiol 211, 533-543 (2007).

(14) Cardone, M.H. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science 282, 1318-1321 (1998).

(15) Chan, C.M., Ma, B.B., Wong, S.C. & Chan, A.T. Celecoxib induces dose dependent growth inhibition in nasopharyngeal carcinoma cell lines independent of cyclooxygenase-2 expression. Biomed. Pharmacother. 59 Suppl 2, S268-S271 (2005).

(16) Clark, A.S., West, K., Streicher, S. & Dennis, P.A. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. Mol Cancer Ther. 1, 707-717 (2002).

(17) Clezardin, P., Ebetino, F.H. & Fournier, P.G. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. Cancer Res. 65, 4971-4974 (2005).

(18) Clezardin, P., Fournier, P., Boissier, S. & Peyruchaud, O. In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates. Curr. Med. Chem. 10, 173-180 (2003).

(19) Colleselli, D., Bijuklic, K., Mosheimer, B.A. & Kahler, C.M. Inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 affects endothelial progenitor cell proliferation. Exp. Cell Res. 312, 2933-2941 (2006).

(20) Coxon, J.P., Oades, G.M., Kirby, R.S. & Colston, K.W. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. BJU. Int. 94, 164-170 (2004).

(21) Dannenberg, A.J. & Subbaramaiah, K. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. Cancer Cell 4, 431-436 (2003).

(22) Del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. & Nunez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science 278, 687-689 (1997).

(23) Dempke, W., Rie, C., Grothey, A. & Schmoll, H.J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127, 411-417 (2001).

(24) Denkert, C. et al. Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. Oncogene 22, 8653-8661 (2003).

(25) Denoyelle, C., Hong, L., Vannier, J.P., Soria, J. & Soria, C. New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. Br. J. Cancer 88, 1631-1640 (2003).

(26) Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. Handlungsempfehlung zur Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. (2006).

(27) Dickson, P.V. et al. Efficacy of zoledronate against neuroblastoma. Surgery 140, 227-235 (2006).

(28) Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes Dev. 12, 3499-3511 (1998).

(29) Driessen, A. et al. Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas. Ann. Surg. 243, 334-340 (2006).

(30) Erdreich-Epstein, A. et al. Integrins alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 are expressed by endothelium of high-risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide. Cancer Res. 60, 712-721 (2000).

(31) Ferretti, G. et al. Zoledronic-acid-induced circulating level modifications of angiogenic factors, metalloproteinases and proinflammatory cytokines in metastatic breast cancer patients. Oncology 69, 35-43 (2005).

(32) Fitzgerald, G.A. Coxibs and cardiovascular disease. N. Engl. J. Med. 351, 1709-1711 (2004).

(33) Fournier, P. et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. Cancer Res. 62, 6538-6544 (2002).

(34) Fujimoto, J. et al. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in ovarian cancer. Oncol. Rep. 15, 21-25 (2006).

(35) Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.und das RKI. Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. (2006).

(36) Giraudo, E., Inoue, M. & Hanahan, D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. J. Clin. Invest 114, 623-633 (2004).

(37) Gouin, F., Ory, B., Redini, F. & Heymann, D. Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curretage and increases overall survival. Int. J. Cancer 119, 980-984 (2006).

(38) Green, J.R. Antitumor effects of bisphosphonates. Cancer 97, 840-847 (2003).

(39) Green, J.R. Bisphosphonates: preclinical review. Oncologist. 9 Suppl 4, 3-13 (2004).

(40) Grosch, S., Maier, T.J., Schiffmann, S. & Geisslinger, G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. J. Natl. Cancer Inst. 98, 736-747 (2006).

(41) Haag, Hanhart & Müller. Gynäkologie und Urologie. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach (2007).

(42) Hashimoto, K. et al. Alendronate inhibits intraperitoneal dissemination in in vivo ovarian cancer model. Cancer Res. 65, 540-545 (2005).

(43) Hashimoto, K. et al. Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. Biochem Biophys Res. Commun. 354, 478-484 (2007).

(44) Hasmim, M., Bieler, G. & Ruegg, C. Zoledronate inhibits endothelial cell adhesion, migration and survival through the suppression of multiple, prenylation-dependent signaling pathways. J. Thromb. Haemost. 5, 166-173 (2007).

(45) Hiraga, T., Williams, P.J., Ueda, A., Tamura, D. & Yoneda, T. Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. Clin. Cancer Res. 10, 4559-4567 (2004).

(46) Horie, N. et al. Combined effects of a third-generation bisphosphonate, zoledronic acid with other anticancer agents against murine osteosarcoma. Br. J. Cancer 96, 255-261 (2007).

(47) Hsu, A.L. et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. J. Biol Chem. 275, 11397-11403 (2000).

(48) Jagdev, S.P., Coleman, R.E., Shipman, C.M., Rostami, H. & Croucher, P.I. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. Br. J. Cancer 84, 1126-1134 (2001).

(49) Johnson, A.J., Hsu, A.L., Lin, H.P., Song, X. & Chen, C.S. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca2+-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. Biochem J. 366, 831-837 (2002).

(50) Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat. Rev. Cancer 3, 422-433 (2003).

(51) Kerbrat, P. et al. Ovarian cancer. Br. J. Cancer 84 Suppl 2, 18-23 (2001).

(52) Kim, S.J. et al. Modulation of bone microenvironment with zoledronate enhances the therapeutic effects of STI571 and paclitaxel against experimental bone metastasis of human prostate cancer. Cancer Res. 65, 3707-3715 (2005).

(53) Kirch, W. Klinische Pharmakologie. (Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2005).

(54) Koehne, C.H. & Dubois, R.N. COX-2 inhibition and colorectal cancer. Semin. Oncol. 31, 12-21 (2004).

(55) Kulp, S.K. et al. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. Cancer Res. 64, 1444-1451 (2004).

(56) Kundu, N., Smyth, M.J., Samsel, L. & Fulton, A.M. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. Breast Cancer Res. Treat. 76, 57-64 (2002).

(57) Kunzmann, V. et al. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. Blood 96, 384-392 (2000).

(58) Kuroda, J. et al. The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph+ leukemia activity of imatinib mesylate. Blood 102, 2229-2235 (2003).

(59) Lee, J.J., Kong, M., Ayers, G.D. & Lotan, R. Interaction index and different methods for determining drug interaction in combination therapy. J. Biopharm. Stat. 17, 461-480 (2007).

(60) Lee, M.V., Fong, E.M., Singer, F.R. & Guenette, R.S. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. Cancer Res. 61, 2602-2608 (2001).

(61) Li, Q. & Verma, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. Nat. Rev. Immunol. 2, 725-734 (2002).

(62) Liang, J. & Slingerland, J.M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. Cell Cycle 2, 339-345 (2003).

(63) Lin, C.F. et al. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramideand etoposide-induced apoptosis. J. Biol Chem. 279, 40755-40761 (2004).

(64) Liu, X., Yue, P., Zhou, Z., Khuri, F.R. & Sun, S.Y. Death receptor regulation and celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. J. Natl. Cancer Inst. 96, 1769-1780 (2004).

(65) Lopiccolo, J., Granville, C.A., Gills, J.J. & Dennis, P.A. Targeting Akt in cancer therapy. Anticancer Drugs 18, 861-874 (2007).

(66) Lukanova, A. & Kaaks, R. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14, 98-107 (2005).

(67) Maier, T.J., Schilling, K., Schmidt, R., Geisslinger, G. & Grosch, S. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. Biochem Pharmacol. 67, 1469-1478 (2004).

(68) Mariani, S. et al. Effector gammadelta T cells and tumor cells as immune targets of zoledronic acid in multiple myeloma. Leukemia 19, 664-670 (2005).

(69) Matsumoto, S. et al. Efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines. Lung Cancer 47, 31-39 (2005).

(70) Matsunaga, S., Iguchi, K., Usui,S. & Hirano, K. Incadronate induces cell detachment and apoptosis in prostatic PC-3 cells. Anticancer Res. 27, 927-932 (2007).

(71) Mattarollo, S.R., Kenna, T., Nieda, M. & Nicol, A.J. Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to Vgamma9Vdelta2 T cell cytotoxicity. Cancer Immunol. Immunother. 56, 1285-1297 (2007).

(72) Mazhar, D., Gillmore, R. & Waxman, J. COX and cancer. QJM. 98, 711-718 (2005).

(73) Meier, W. et al. Topotecan vs treosulfan in recurrent ovarian cancer (OC) after initial therapy with platinum and paclitaxel. A prospective randomized phase III study. 2003. Proc Am Soc Clin Oncol.

(74) Melisi, D. et al. Zoledronic acid cooperates with a cyclooxygenase-2 inhibitor and gefitinib in inhibiting breast and prostate cancer. Endocr. Relat Cancer 12, 1051-1058 (2005).

(75) Merrell, M.A., Wakchoure, S., Lehenkari, P.P., Harris, K.W. & Selander, K.S. Inhibition of the mevalonate pathway and activation of p38 MAP kinase are independently regulated by nitrogen-containing bisphosphonates in breast cancer cells. Eur. J. Pharmacol. (2007).

(76) Michigami, T. et al. The effect of the bisphosphonate ibandronate on breast cancer metastasis to visceral organs. Breast Cancer Res. Treat. 75, 249-258 (2002).

(77) Munkarah, A.R. et al. The effects of combining docetaxel and cyclooxygenase-2 inhibitors on proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer. Anticancer Drugs 18, 889-896 (2007).

(78) Narayanan, B.A., Condon, M.S., Bosland, M.C., Narayanan, N.K. & Reddy, B.S. Suppression of N-methyl-N-nitrosourea/testosterone-induced rat prostate cancer growth by celecoxib: effects on cyclooxygenase-2, cell cycle regulation, and apoptosis mechanism(s). Clin. Cancer Res. 9, 3503-3513 (2003).

(79) Neville-Webbe, H.L., Evans, C.A., Coleman, R.E. & Holen, I. Mechanisms of the synergistic interaction between the bisphosphonate zoledronic acid and the chemotherapy agent paclitaxel in breast cancer cells in vitro. Tumour. Biol 27, 92-103 (2006).

(80) Neville-Webbe, H.L., Rostami-Hodjegan, A., Evans, C.A., Coleman, R.E. & Holen, I. Sequence- and schedule-dependent enhancement of zoledronic acid

induced apoptosis by doxorubicin in breast and prostate cancer cells. Int. J. Cancer 113, 364-371 (2005).

(81) Oberdisse, E. Pharmakologie und Toxikologie. (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Marburg,2001).

(82) Ozturk, O.H. et al. Cisplatin cytotoxicity is enhanced with zoledronic acid in A549 lung cancer cell line: preliminary results of an in vitro study. Cell Biol Int. 31, 1069-1071 (2007).

(83) Pandha, H. et al. Antitumor effects of aminobisphosphonates on renal cell carcinoma cell lines. J. Urol. 176, 2255-2261 (2006).

(84) Parmar, M.K. et al. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. Lancet 361, 2099-2106 (2003).

(85) Pfleiderer, A. Tumour reduction and chemotherapy in ovarian cancer. Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol. 3, 119-128 (1989).

(86) Riman, T. et al. Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer: results from a Swedish case-control study. Am. J. Epidemiol. 156, 363-373 (2002).

(87) Rogers, M.J. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Curr. Pharm. Des 9, 2643-2658 (2003).

(88) Santini, D. et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. Clin. Cancer Res. 9, 2893-2897 (2003).

(89) Santini, D. et al. Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic Acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. Clin. Cancer Res. 13, 4482-4486 (2007).

(90) Saucier, J.M. et al. Determination of the optimal combination chemotherapy regimen for treatment of platinum-resistant ovarian cancer in nude mouse model. J. Oncol. Pharm. Pract. 13, 39-45 (2007).

(91) Sawada, K. et al. Alendronate inhibits lysophosphatidic acid-induced migration of human ovarian cancer cells by attenuating the activation of rho. Cancer Res. 62, 6015-6020 (2002).

(92) Shao, J., Lee, S.B., Guo, H., Evers, B.M. & Sheng, H. Prostaglandin E2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin. Cancer Res. 63, 5218-5223 (2003).

(93) Shipman, C.M., Rogers, M.J., Apperley, J.F., Russell, R.G. & Croucher, P.I. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. Br. J. Haematol. 98, 665-672 (1997).

(94) Solomon, S.D. et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. N. Engl. J. Med. 352, 1071-1080 (2005).

(95) Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J. Cell Mol Med. 9, 59-71 (2005).

(96) Song, Y.C., Kim, S.H., Juhnn, Y.S. & Song, Y.S. Apoptotic effect of celecoxib dependent upon p53 status in human ovarian cancer cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1095, 26-34 (2007).

(97) Tallarida, R.J. Drug synergism: its detection and applications. J. Pharmacol. Exp. Ther. 298, 865-872 (2001).

(98) Tallarida, R.J. The interaction index: a measure of drug synergism. Pain 98, 163-168 (2002).

(99) Tassone, P. et al. Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. Br. J. Cancer 88, 1971-1978 (2003).

(100) Trimbos, J.B. et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 95, 105-112 (2003).

(101) Ullen, A. et al. Additive/synergistic antitumoral effects on prostate cancer cells in vitro following treatment with a combination of docetaxel and zoledronic acid. Acta Oncol. 44, 644-650 (2005).

(102) Ural, A.U., Avcu, F., Candir, M., Guden, M. & Ozcan, M.A. In vitro synergistic cytoreductive effects of zoledronic acid and radiation on breast cancer cells. Breast Cancer Res. 8, R52 (2006).

(103) Verma, R.P. & Hansch, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. Bioorg. Med. Chem. 15, 2223-2268 (2007).

(104) Virtanen, S.S., Vaananen, H.K., Harkonen, P.L. & Lakkakorpi, P.T. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. Cancer Res. 62, 2708-2714 (2002).

(105) Vital-Reyes, V. et al. Celecoxib inhibits cellular growth, decreases Ki-67 expression and modifies apoptosis in ovarian cancer cell lines. Arch. Med. Res. 37, 689-695 (2006).

(106) Wakchoure, S. et al. Bisphosphonates inhibit the growth of mesothelioma cells in vitro and in vivo. Clin. Cancer Res. 12, 2862-2868 (2006).

(107) Wang, H.J. et al. [Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib on expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in ovarian carcinoma cell]. Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban. 37, 757-760 (2006).

(108) Wang, H.J. et al. [The growth inhibitory effect of non-steroid anti-inflammatory drugs on ovarian cancer]. Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban. 38, 428-432 (2007).

(109) Wang, S. & El Deiry, W.S. Cytochrome c: a crosslink between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in calcium-dependent apoptosis. Cancer Biol Ther. 3, 44-46 (2004).

(110) Weber, A. et al. Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. J. Med. Chem. 47, 550-557 (2004).

(111) Wei, D. et al. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. Cancer Res. 64, 2030-2038 (2004).

(112) Whittemore, A.S., Harris, R. & Itnyre, J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group. Am. J. Epidemiol. 136, 1212-1220 (1992).

(113) Witters, L.M., 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. 26, S92-S97 (2003).

(114) Wood, J. et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 302, 1055-1061 (2002).

(115) Woodward, J.K., Neville-Webbe, H.L., Coleman, R.E. & Holen, I. Combined effects of zoledronic acid and doxorubicin on breast cancer cell invasion in vitro. Anticancer Drugs 16, 845-854 (2005).

(116) Wu, T., Leng, J., Han, C. & Demetris, A.J. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. Mol Cancer Ther. 3, 299-307 (2004).

(117) Yamagishi, S. et al. Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling. Am. J. Pathol. 165, 1865-1874 (2004).

(118) Yoneda, T. et al. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. Cancer 88, 2979-2988 (2000).

(119) Zhang, G.S., Liu, D.S., Dai, C.W. & Li, R.J. Antitumor effects of celecoxib on K562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and downregulation of Cox-2 expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib. Am. J. Hematol. 81, 242-255 (2006).

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
COX-2	Cyclooxygenase
CXCR-4	CXC Chemokin Receptor
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HNPCC	hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
min	Minute
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatika
PKB	Proteinkinase B
SCLC	Small cell lung cancer Kleinzelliges Bronchialkarzinom
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Synergistische Effekte von Celecoxib und Zoledronsäure beim humanen Ovarialkarzinom in vitro“ im Zellkulturlabor der Frauenklinik unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Wagner mit Unterstützung durch Herrn Dr. Baumann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Köln, im Februar 2009 Isabel Eggemann

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, bei denen ich mich herzlich bedanken möchte.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Uwe Wagner und meinem Betreuer Herrn Dr. Klaus Baumann für die Vergabe des Themas, die stets zuverlässige Zusammenarbeit und das stets offene Ohr bei fachlichen Problemen.

Zudem bedanke ich mich ganz herzlich beim gesamten Team des Zellkulturlabors der Frauenklinik Marburg. Frau Dr. Silke Reinhartz, Frau Traute Plaum und Herr Achim Almeroth haben durch ihr technisches Know-How einen wesentlichen Teil zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Durch ihre gute Stimmung wurde das Abwarten von Inkubationszeiten zu einer gerne willkommenen Abwechslung im Laboralltag.

Weiterhin möchte ich mich bei Elmar bedanken, der in unserem gemeinsamen Projekt die Rolle des Zugpferdes übernommen hat. Harry, ob ich wohl jemals noch mit Eiweiß ohne deine Anleitung kochen kann, wage ich zu bezweifeln. Auch an den Rest meiner „Lieben Vier“ Steffi und Keil ein herzliches Dankeschön für ein offenes Ohr an frustgeplagten Abenden und für eine großartige Studienzeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglichten, jederzeit hinter mir gestanden und meine Sorgen immer ernst genommen haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Familienname:	Eggemann
Vornamen:	Anna Helena Theresa Barbara Isabel
Geburtsdatum:	08.01.1980
Geburtsort:	Aachen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

08/1986 - 07/1990	Katholische Grundschule Jülich, Jülich
08/1990 - 05/1999	Gymnasium Haus Overbach, Jülich-Barmen
05/1999	Abitur

Studium

10/2000 - 09/2007	Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg

Praktisches Jahr

04/2006 - 08/2006	Abteilung für Chirurgie Uniklinikum Marburg und Gießen, Standort Marburg Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
08/2006 - 12/2006	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Spital Walenstadt, Lehrkrankenhaus der Universität Zürich Dr. med. Jürg Lymann
12/2006 - 03/2007	Abteilung für Innere Medizin Spital Walenstadt, Lehrkrankenhaus der Universität Zürich Dr. med. Dieter Schmidt

Assistenzärztin	seit November 2007 Weiterbildung zur Fachärztin für Anästhesie und operative Intensivmedizin an der Uniklinik Köln, Prof. Dr. med. Bernd W. Böttiger
Dissertation	
01/2004 - 04/2005	Experimenteller Teil der Promotion Thema: „Synergistische Effekte biologischer Therapien beim Ovarialkarzinom in vitro“ unter Aufsicht von Prof. Dr. med. Uwe Wagner, Abteilung für Gynäkologie
07/2007 – 2/2009	Zusammenfassung der experimentell gewonnenen Ergebnisse
Diverses	
09/1999 - 07/2000	Pflegepraktikum Abteilung für Innere Medizin, Abteilung für Chirurgie, Marienhospital Aachen
10/2003 - 07/2004	Tätigkeit als studentische Hilfskraft, Philipps-Universität Marburg WS 03/04, SS 04, Kurs der klinischen Chemie
seit 02/2004	Dozent bei der Firma Medi-Learn GbR Kurse zur Examensvorbereitung für Medizinstudenten
2007	Autor eines Fachbandes im Rahmen einer von Medi-Learn GbR herausgegebenen Skriptenreihe zur Vorbereitung auf den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Titel: Biochemie 1, Energiestoffwechsel, erschienen 2007 2.Auflage 2008
Sprachkentnisse	Englisch in Wort und Schrift, Französisch, Latein

Köln, im Februar 2009

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Aziz, Bacher, Barth, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Bien, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Effendy, Eisele, Elsässer, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fuhrmann, Geks, Gemsa, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Graul, Gress, Grimm, Griss, Grundner, Gudermann, Hackenberg, Hamer, Happle, Hadewig, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Heidenreich, Hellwig, Hemmer, Hering, Herrler, Hess, Herzum, Hilgermann, Hochban, Hörsch, Hofmann, Huffmann, Jacob, Jungclas, Kälble, Kaffarnik, Kann, Kern, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Klaus, Knoll, Koch, Köhler, Koolman, Kowalski, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhn, Kuni, Lammel, Lang, Lange, Lehmann, Legrum, Lengsfeld, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Löffler, Lohoff, Lorenz, Ludwig, Lürs, Lütcke, Maier, Maisch, Mann, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Noll, Nüsing, Oertel, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Radsak, Rehder, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupp, Schachtschabel, Schäfer, Schepelmann, Schiff, Schlegel, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schreiber, Schuermann, Schumacher, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Stachniss, Steiniger, Stiletto, Stinner, Strempel, Sturm, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weber, Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, Wichert v., Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Zielke.