

Aus dem Institut für Anatomie II:
Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher)

des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

**Der Einfluss von neuronalem Induktionsmedium auf die
Proliferation humaner kleinzelliger
Bronchialkarzinome *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Annika Lange
aus Minden

Hamburg, 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 29.06.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Laack

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. S. Klutmann

Abkürzungsverzeichnis

α -UE	alpha-Untereinheit
β -UE	beta-Untereinheit
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
ABC	<i>avidin-biotinylated enzyme complex</i>
AC	Adenylatcyclase
ACE	Doxorubicin, Cyclophosphamid, Etoposid
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammonium-Persulfat
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>albumin bovine serum</i>
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
CaCl_2	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAV	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cl^-	Chlorid
cNBD	cyclische Nukleotide bindende Domäne
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAG	<i>ether-à-go-go</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGP-2	epitheliales Glycoprotein 2

EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELK	<i>eag-like</i>
ERG	<i>eag-related-gene</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
ETS	<i>environmental tobacco smoke</i> , Passivrauch
FasL	Fas Ligand
G _i	inhibitorisches G-Protein
G _s	stimulatorisches G-Protein
GvHD	<i>graft vs. host disease</i>
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
i.v.	intravenös
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> : Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
IP	Irinotecan, Cisplatin
k.E.	kein Effekt
k.U.	keine Untersuchung
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute

ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRP1	<i>multi drug resistant protein 1</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mV	Millivolt
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natiumhydroxid
Naphthol-AS	Naphtholanilidsäure
NCAM	<i>neuronal cell adhesion molecule</i>
NID	neuronales Induktionsmedium
nm	Nanometer
NRSF	<i>neurone restrictive silencer factor</i>
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i> , nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
NSE	neuronenspezifische Enolase
OD	optische Dichte
P	Porenregion
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PE	Cisplatin, Etoposid
PET	Positronen Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKA	Proteinkinase A
pM	picomolar
POX	Peroxidase
RT	Raumtemperatur

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Tab.	Tabelle
TBS	saliner Tris/HCL Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
Tx	Thromboxan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
XTT	<i>tetrazolium salt</i>
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung	4
2 Einleitung	5
2.1 Das Bronchialkarzinom	5
2.2 Ätiologie des Bronchialkarzinoms	5
2.3 Das kleinzellige Bronchialkarzinom	7
2.3.1 Diagnostik	8
2.3.2 Therapie	8
2.3.3 Neuronale Eigenschaften	10
2.4 Neuronales Induktionsmedium	11
2.5 IBMX, Indometacin und Insulin als Therapeutika	12
2.5.1 Eigenschaften von IBMX, Indometacin und Insulin	12
2.5.2 IBMX, Indometacin und Insulin in der Krebstherapie	15
2.6 Ionenkanäle	16
2.6.1 Kaliumkanäle der EAG-Familie	17
2.6.1.1 Elektrophysiologische Eigenschaften des erg-K ⁺ -Kanals	18
2.6.1.2 erg-K ⁺ -Kanäle in Karzinomzellen	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Chemikalien	21
3.1.2 Lösungen und Puffer	22
3.1.3 Verbrauchsmaterial	24
3.1.4 Geräte	24
3.1.5 Software	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Zellkultur	26
3.2.2 Zellzählung	28
3.2.3 Erstellen von Eichkurven	28
3.2.4 Vergleich des Proliferationsverhaltens in Kulturmedium und NID	29
3.2.5 Einfluss der einzelnen Bestandteile des NID auf die Proliferation	30
3.2.6 Behandlung mit Indometacin und IBMX (modifiziertes NID)	31
3.2.7 Statistische Analyse	32
3.2.8 Elektronenmikroskopische Analyse	32

3.2.9	Immunhistochemische Analyse.....	33
3.2.9.1	Herstellung der Zytospins.....	33
3.2.9.2	Färbung der Cyclooxygenase.....	33
3.2.10	Proteinbiochemie.....	34
3.2.10.1	Isolierung der Proteine aus den Zellen.....	34
3.2.10.2	Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen.....	35
3.2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	36
3.2.10.4	Western-Blot.....	37
3.2.10.5	Färbeverfahren.....	37
3.2.11	Elektrophysiologische Analyse.....	38
3.2.11.1	Beschichtung der Kulturschälchen.....	38
3.2.11.2	Elektrophysiologische Messungen.....	38
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Zellproliferationsversuche.....	40
4.1.1	Vergleich des Proliferationsverhaltens in Kulturmedium und NID.....	40
4.1.2	Einfluss der einzelnen Bestandteile des NID auf die Proliferation.....	41
4.1.2.1	OH1-Zellen.....	41
4.1.2.2	OH3-Zellen.....	47
4.1.2.3	H69-Zellen.....	53
4.1.2.4	SW2-Zellen.....	59
4.1.2.5	H82-Zellen.....	65
4.1.3	Behandlung mit Indometacin und IBMX.....	71
4.1.3.1	OH1-Zellen.....	71
4.1.3.2	OH3-Zellen.....	75
4.1.3.3	H69-Zellen.....	79
4.1.3.4	SW2-Zellen.....	83
4.1.3.5	H82-Zellen.....	87
4.2	Elektronenmikroskopische Analyse.....	91
4.2.1	OH1-Zellen.....	91
4.2.2	OH3-Zellen.....	92
4.2.3	H69-Zellen.....	93
4.2.4	SW2-Zellen.....	94
4.2.5	H82-Zellen.....	95

4.3	Immunhistochemische Analyse.....	96
4.3.1	Untersuchung von COX-1 bei SW2-Zellen und H82-Zellen.....	97
4.3.2	Untersuchung von COX-2 bei SW2-Zellen und H82-Zellen.....	98
4.4	Western-Blot Analyse.....	99
4.4.1	Untersuchung von COX-2 bei H82-Zellen und SW2-Zellen.....	99
4.5	Elektrophysiologie.....	100
4.5.1	Nachweis des erg-K ⁺ -Stroms bei SW2-Zellen.....	100
4.5.2	Einfluss von NID auf den erg-K ⁺ -Kanal bei SW2-Zellen.....	101
4.5.3	Ableitung von Aktionspotentialen bei SW2-Zellen.....	103
5	Diskussion.....	105
6	Zusammenfassung.....	120
7	Literaturverzeichnis.....	121
8	Danksagung.....	134
9	Lebenslauf.....	135
10	Selbstständigkeitserklärung.....	136

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist der Lungentumor mit dem aggressivsten klinischen Verlauf. 60-70 % der Patienten leiden bei Diagnosestellung bereits an einem kleinzelligen Bronchialkarzinom im *extensive disease* Stadium. In diesem Stadium liegt das mittlere Überleben bei 8-13 Monaten [Lally *et al.*, 2007]. Aufgrund dieser trotz Chemotherapie infausten Prognose besteht eine große Notwendigkeit, mehr über die Eigenschaften des kleinzelligen Bronchialkarzinoms zu erfahren, um neue Therapieansätze zu finden.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine Reihe von Markern und Eigenschaften aufweisen, die für Neuronen charakteristisch sind, deswegen wird vermutet, dass sich der Tumor aus einer neuronal differenzierten Stammzelle entwickelt hat. Menschliche Fettzellen, die ebenfalls neuronenspezifische Marker exprimieren, konnten bereits anhand eines neuronalen Induktionsmediums (NID) zu frühen neuronalen Vorläuferzellen differenziert werden [Ashjian *et al.*, 2003].

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass das kleinzellige Bronchialkarzinom durch Behandlung mit NID in Richtung Nervenzellen re-differenziert werden kann, so an Malignität abnimmt und somit das extrem schnelle Wachstum des kleinzelligen Bronchialkarzinoms gehemmt werden kann.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind:

- Werden die Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms durch Inkubation mit NID im Wachstum gehemmt? Kann der antiproliferative Effekt einer bestimmten Substanz im NID zugeschrieben werden? Lässt sich für diese Substanz molekularbiologisch ein möglicher Wirkort nachweisen?
- Ist eine Differenzierung in Richtung Nervenzelle als Ursache für die Wachstumshemmung wahrscheinlich?
 - Lassen sich unter Behandlung mit NID morphologische Hinweise für eine neuronale Differenzierung der Zellen finden?
 - Wird der für die Karzinogenese wichtige $erg-K^+$ -Kanal durch Behandlung mit NID beeinflusst?
 - Hat die Behandlung mit NID Einfluss auf die für Neuronen typischen Ionenströme im kleinzelligen Bronchialkarzinom und lassen sich nach Behandlung Aktionspotentiale generieren?

2 Einleitung

2.1 Das Bronchialkarzinom

Das Bronchialkarzinom stellt die weltweit häufigste Krebserkrankung bei Männern dar und ist mit mehr als einer Million Toten im Jahr die führende Krebstodesursache [Ferlay *et al.*, 2001]. In Deutschland ist Lungenkrebs sowohl bei Männern als auch bei Frauen die dritthäufigste Krebserkrankung [Krebs in Deutschland, 2006]. Die Inzidenz liegt bei Männern bei 32.500 und bei Frauen bei 12.450 Neuerkrankungen pro Jahr [Krebs in Deutschland, 2006]. Die Überlebensprognose für Patienten mit Lungenkrebs ist äußerst schlecht. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland liegt bei etwa 12 % für Männer und 14 % für Frauen [Krebs in Deutschland, 2006] und ist stark davon abhängig, in welchem Stadium der Krebs diagnostiziert wird und um welchen histologischen Typ es sich handelt.

Die Lungentumore werden nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in vier histologische Haupttypen unterteilt: das Plattenepithel- und Adenokarzinom sowie das großzellige Bronchialkarzinom (zusammengefasst zu den nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen) und das kleinzellige Bronchialkarzinom.

2.2 Ätiologie des Bronchialkarzinoms

Heute werden 85-90 % der Fälle von Lungenkrebs auf das Rauchen zurückgeführt, damit ist der Konsum von Tabak die mit Abstand wichtigste Ursache für Lungenkrebs. Es ist bekannt, dass das Lungenkrebsrisiko von der Anzahl der konsumierten Zigaretten pro Tag, dem Inhalationsgrad und dem Alter abhängig ist, in dem zu rauchen begonnen wird [Agudo *et al.*, 2000]. Rauchen steigert das Risiko für alle histologischen Typen, allerdings ist das relative Risiko größer an einem Plattenepithelkarzinom oder kleinzelligen Bronchialkarzinom zu erkranken, als an einem Adenokarzinom (Tab. 2.1) [Simonato *et al.*, 2001].

	Männer		Frauen	
	Plattenepithel-/ kleinzelliges Bronchialkarzinom	Adenokarzinom	Plattenepithel-/ kleinzelliges Bronchialkarzinom	Adenokarzinom
Nichtraucher	1,0	1,0	1,0	1,0
Ex-Raucher	16,2*	3,5*	3,8*	1,1
Raucher	57,9*	8,0*	18,2*	4,1*

Tab. 2.1: Relatives Risiko für Lungenkrebs für Männer und Frauen in Europa. Verändert nach [Simonato *et al.*, 2001], * $p < 0,05$.

Nicht nur aktives Rauchen, sondern auch Passivrauchen erhöht das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken. Passivrauch wird als *environmental tobacco smoke* (ETS) bezeichnet. So zeigten Zhong *et al.* [2000] für Frauen, die ihr Leben lang nicht geraucht haben, aber ETS durch den rauchenden Ehemann ausgesetzt waren, ein um 20 % erhöhtes Risiko an Lungenkrebs zu erkranken. Für männliche Nichtraucher ist das Risiko, Lungenkrebs zu bekommen sogar um 48 % erhöht, wenn Ihre Ehefrauen rauchen. Für Nichtraucher, die ETS bei der Arbeit ausgesetzt sind, ist das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken um 15 % (Frauen) bzw. um 29 % (Männer) erhöht.

Das Aufgeben der Rauchgewohnheit verringert immer das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass das Lungenkrebsrisiko mit der Dauer der Nikotin-Abstinenz abnimmt, allerdings erreicht es erst nach 30 Jahren die Größenordnung des Risikos von Nichtrauchern (Tab. 2.2).

Jahre seit Nikotin-Abstinenz	Relatives Risiko	
	Männer	Frauen
Aktive Raucher	1,0	1,0
2-9 Jahre	0,66*	0,41*
10-19 Jahre	0,27*	0,19*
20-29 Jahre	0,17*	0,08*
> 30 Jahre	0,08*	0,13*
Nichtraucher	0,04*	0,11*

Tab. 2.2: Einfluss der Abstinenz vom Rauchen auf das Lungenkrebsrisiko. Verändert nach [Simonato *et al.*, 2001], * $p < 0,05$.

Andere weniger potente Ursachen für Lungenkrebs sind die Exposition gegenüber Asbest, Metallen wie Nickel, Arsen und Cadmium, Radon, sowie ionisierende Strahlung [Saracci und Boffetta, 1994]. Die Kombination von Zigarettenrauchen mit Asbest-Exposition potenziert das Lungenkrebsrisiko [Erren *et al.*, 1999].

2.3 Das kleinzellige Bronchialkarzinom

Zur Häufigkeit des kleinzelligen Bronchialkarzinoms werden unterschiedliche Angaben gemacht. Die Werte rangieren zwischen 13 % [Govindan *et al.*, 2006] und etwa 25 % der primären Lungentumore [Le Pechoux *et al.*, 2004]. Das kleinzellige Bronchialkarzinom wird nach der *Veterans Affairs Research Service Lung Group* in zwei Stadien eingeteilt. Bei dem lokalen kleinzelligen Bronchialkarzinom (*limited stage disease*) ist der Tumor auf einen Hemithorax und die regionalen Lymphknoten (mediastinale, kontralaterale hiläre und ipsilaterale supraklavikuläre) begrenzt, wohingegen bei der fortgeschrittenen Erkrankung (*extensive stage disease*) diese Grenzen überschritten werden [Bradley *et al.*, 2004]. Bei Erstdiagnose liegt bei 60 - 70 % der Patienten bereits ein *extensive stage* vor [Murray und Turrisi, 2006]. Fernmetastasen findet man am häufigsten im Knochen (19-38 %) und in der Leber (17-34 %), darauf folgen die Nebennieren (10-17 %) und das Gehirn (0-14 %) [Abrams *et al.*, 1988].

2.3.1 Diagnostik

Eine histologische Diagnosesicherung und eine eindeutige Abgrenzung eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms von den nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen sind für das therapeutische Vorgehen und die Prognose von entscheidender Bedeutung. Tumorgewebe kann im Rahmen einer Bronchoskopie oder einer Mediastinoskopie gewonnen werden. Andere Möglichkeiten bestehen in der perkutanen Biopsie eines vergrößerten Lymphknotens, eines verdächtigen Weichteilbefundes, einer Osteolyse, des Knochenmarks oder einer pleuralen Veränderung. Zur Primärdiagnostik gehört eine Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen, die Computertomographie (CT) vom Thorax und Abdomen (einschließlich Nebennieren) und die flexible Bronchoskopie mit Lavage und Biopsien zur Feststellung der Tumorausdehnung vor Therapiebeginn [Serke und Schönfeld, 2007]. Zur weiteren Diagnostik gehören die Knochen-Szintigraphie, eine Knochenmarksbiopsie, Magnetresonanztomographie (MRT) vom Kopf, sowie Positronen Emissions-Tomographie (PET).

2.3.2 Therapie

Ohne Behandlung ist das kleinzellige Bronchialkarzinom der Lungentumor mit dem aggressivsten klinischen Verlauf und das durchschnittliche Überleben nach Diagnosestellung liegt ohne Behandlung bei zwei (*extensive stage disease*) bis drei (*limited stage disease*) Monaten [Green *et al.*, 1969]. Die rasche Proliferation und die frühe Metastasierung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms haben zur Folge, dass die Ergebnisse rein lokaler Maßnahmen in Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit schlecht sind. Deshalb ist immer die Indikation zur systemischen Chemotherapie gestellt, die in Abhängigkeit vom Stadium durch Bestrahlung ergänzt wird. Das Ansprechen auf Chemotherapie ist trotz dieser Aggressivität gut und das kleinzellige Bronchialkarzinom im *limited stage* ist potenziell heilbar (15-25 % 5-Jahres-Überlebensrate), während fast alle Patienten im *extensive stage* innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung versterben [Spira und Ettinger, 2004].

Die Standardtherapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist seit den 80er Jahren die Kombinations-Chemotherapie mit Etoposid und einem platinhaltigen Stoff, Cisplatin oder Carboplatin (PE) [Chua *et al.*, 2004]. Andere weit verbreitete Schemata sind z.B.: Cyclophosphamid, Adriamycin (Doxorubicin) und Vincristin

(CAV) und Adriamycin, Cyclophosphamid und Etoposide (ACE) [Sambrook und Girling, 2001].

Für Patienten mit *limited stage disease* ist die multimodale Therapie mit Kombinations-Chemotherapie plus thorakaler Bestrahlung die Standardtherapie. Zwei Meta-Analysen konnten zeigen, dass die zusätzliche Bestrahlung das 2- und 3-Jahres-Überleben um 5,4% gesteigert hat [Pignon *et al.*, 1992; Warde und Payne, 1992].

Für Patienten mit *extensive-stage disease* konnte das Überleben durch Chemotherapie auf 8-11 Monate verlängert werden [Aisner, 1996].

Ein neues Medikament, das bei Patienten mit *extensive stage disease* getestet wurde, ist Irinotecan. Dieses hatte in Kombination mit Cisplatin (IP) im Vergleich mit PE eine signifikant höhere Ansprechrates (84,4 % versus 67,5 %) und auch die mittlere Überlebenszeit war in der Phase III Studie der *japanese clinical oncology group* für IP mit 21,8 Monaten deutlich länger als in der Gruppe, die mit PE behandelt wurde (9,2 Monate) [Noda *et al.*, 2002]. Die kombinierte Chemotherapie wird ambulant alle drei Wochen über vier bis sechs Zyklen gegeben. Essentiell ist auch eine geeignete Begleittherapie (antiemetische Therapie, Gabe von Flüssigkeit und Elektrolytlösungen zusammen mit Cisplatin, Überwachung des Blutbildes und der Serumchemie, klinischer Blutungs- und Infektionszeichen und die eventuelle Gabe von Erythropoetin und *granulocyte-colony-stimulating factor*).

Nach Beendigung der ersten vier bis sechs Therapiezyklen ist ein erneutes Staging erforderlich, um festzustellen, ob eine komplette Remission, eine partielle Remission, kein Ansprechen oder ein Tumorprogress vorliegt. Bei kompletter klinischer Remission, das heißt vollständigem Verschwinden aller klinisch evidenten Befunde und paraneoplastischen Syndromen, wird die Chemotherapie beendet. Bei Patienten, die nicht auf die Kombinations-Chemotherapie angesprochen haben, sollte auf eine *Second-Line-Therapie* umgestellt werden. Die Ansprechrates bei einer *Second-Line-Therapie* liegt bei insgesamt 20 % [Huisman *et al.*, 1999]. Das einzige neuere Medikament, das als Mono-Therapie wirksam ist, ist Topotecan. Dieses Präparat zeigte zwar gegenüber dem CAV-Schema keinen Unterschied in der Ansprechrates, dem Überleben oder der Zeit bis zur Progression, wohl aber eine Besserung der Begleitsymptome Atemnot, Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit und Heiserkeit [von Pawel *et al.*, 1999].

Die prophylaktische Schädelbestrahlung für Patienten mit kompletter Remission wird kontrovers diskutiert. Die Meta-Analyse von Auperin *et al.* [1999] zeigte eine Verbesserung des 3-Jahres-Überlebens um 5,4 % durch die prophylaktische Schädelbestrahlung und auch Meert *et al.* [2001] zeigten ein verbessertes Überleben. Arrigada *et al.* [2002] dagegen fanden keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben durch prophylaktische Schädelbestrahlung.

Trotz initial gutem Ansprechen auf Chemotherapie und Bestrahlung sind Rezidive sehr häufig und die Therapieoptionen insgesamt frustan. Daher ist ein besseres Verständnis der molekularen Eigenschaften des kleinzelligen Bronchialkarzinoms unabdingbar, um neue Therapiemöglichkeiten zu finden.

2.3.3 Neuronale Eigenschaften

Weil die Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine Reihe von Markern und Eigenschaften aufweisen, die für Neuronen charakteristisch sind, wird vermutet, dass sich dieser Tumor aus einer neuronal differenzierten Stammzelle entwickelt hat. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Untergruppe der kleinzelligen Bronchialkarzinome den Glycin-Rezeptor alpha-1 exprimiert, welcher normalerweise in Zellen des Rückenmarks, der Retina und des Hirnstamms vorkommt. Die Ursache für diese aberrante Expression ist eine verminderte Expression von NRSF (*neurone restrictive silencer factor*) [Gurrola-Diaz *et al.*, 2003]. Dieser hat die Aufgabe, die Transkription von neuronalen Schlüsselgenen in nicht-neuronalen Zellen zu reprimieren. Zu dem wichtigen Schlüsselregulator NRSF existieren im kleinzelligen Bronchialkarzinom viele Splicevarianten, die möglicherweise die unterdrückende Funktion von NRSF antagonisieren und so zu einer neuroendokrinen Differenzierung beitragen [Onganer *et al.*, 2005].

Ein weiterer Hinweis für eine neuroendokrine Differenzierung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist, dass auf seiner Oberfläche NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*), ein neuronales Zell-Adhäsions-Molekül, exprimiert wird [Ledermann *et al.*, 1994]. Außerdem wurde Neuronen spezifische Enolase (NSE) im Blut von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom gefunden [Onganer *et al.*, 2005], welche als Tumormarker des kleinzelligen Bronchialkarzinoms klinisch etabliert ist.

Desweiteren sind stark ausgeprägte spannungsgesteuerte Natrium- und Calciumkanäle und deren elektrophysiologische Aktivität - wie sie typischerweise in Neuronen zu finden sind - im kleinzelligen Bronchialkarzinom nachgewiesen worden

[Pancrazio *et al.*, 1989]. Zahlreiche Daten sprechen dafür, dass die Hochregulation von spannungsgesteuerten Natriumkanälen das Metastasierungsverhalten begünstigt [Onganer *et al.*, 2005; Djamgoz *et al.*, 2001; Krasowska *et al.*, 2004; Mycielska *et al.*, 2004], was die hohe Metastasierungstendenz diese Tumors erklären könnte.

2.4 Neuronales Induktionsmedium

Mithilfe eines neuronalen Induktionsmediums (NID), bestehend aus Isobutylmethylxantin (IBMX), Indometacin und Insulin, ist es bereits gelungen, Fettgewebszellen zu neuronalen Vorläuferzellen zu differenzieren [Ashijan *et al.*, 2003].

Für alle drei verwendeten Medikamente konnte schon ein Effekt auf die neuronale Differenzierung verschiedener Zelltypen gezeigt werden.

So konnten unter IBMX-Behandlung menschliche Knochenmarkszellen zu frühen Vorläuferzellen von Neuronen differenziert werden [Deng *et al.*, 2001] und unter Erhöhung der intrazellulären Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphates (cAMP) in Prostatakarzinomen eine neuronale Differenzierung induziert werden [Bang *et al.*, 1994; Cox *et al.*, 1999].

Indometacin hat einen protektiven Effekt auf Nervenzellen, indem es NO-Radikale beseitigt [Asanuma *et al.*, 2001]. Ebenso konnte bereits für andere nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) wie Aspirin ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden [Grilli *et al.*, 1996].

Für Insulin konnte gezeigt werden, dass es die Expression von GABA(A)-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran erhöht [Wan *et al.*, 1997] und die Differenzierung von unreifen neokortikalen Zellen bei Ratten fördert [Plitzko *et al.*, 2001].

2.5 IBMX, Indometacin und Insulin als Therapeutika

2.5.1 Eigenschaften von IBMX, Indometacin und Insulin

Abbildung 2.3 zeigt die vereinfachten Strukturformeln von IBMX und Indometacin sowie eine schematische Darstellung von humanem Insulin.

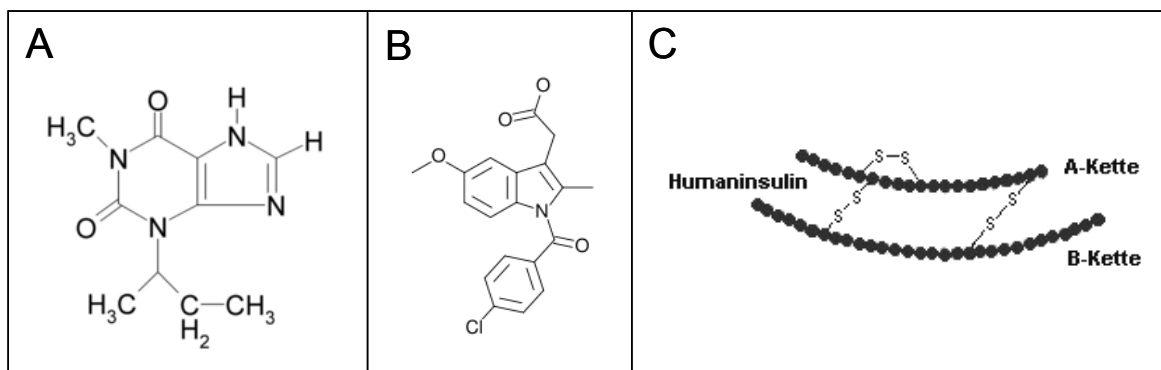


Abb. 2.3: vereinfachte Strukturformel von IBMX (A) und Indometacin (B) sowie schematische Darstellung des Insulin- Polypeptids (C).

IBMX ist eine heterocyclische Verbindung und gehört wie Koffein und Theophyllin zu den Methylxanthinen. Die Methylxanthine erhöhen die intrazelluläre Konzentration von cAMP durch Hemmung der Phosphodiesterase (PDE). Die PDE katalysiert den Abbau von cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) [Firmino *et al.*, 2002] und Koffein und IBMX sind Inhibitoren dieses Enzyms (Abb. 2.4).

Ein weiterer Weg, über den IBMX die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht, liegt in der direkten Stimulierung der Adenylatcyclase (AC), welche zelluläres Adenosintriphosphat (ATP) zu cAMP umwandelt. Dies geschieht durch Blockierung des inhibitorischen G-Proteins (G_i) durch IBMX [Parson *et al.*, 1988].

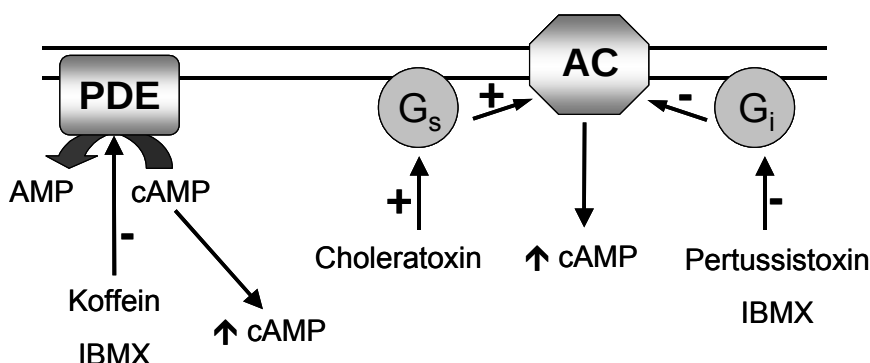


Abb. 2.4: Einfluss von IBMX auf die intrazelluläre Konzentration von cAMP. Modifiziert nach [Firmino *et al.*, 2002].

cAMP ist bei der zellulären Signaltransduktion ein wichtiger *second messenger* und führt insbesondere zur Aktivierung von Proteinkinasen vom Typ A (PKA). Diese führen über eine Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine zu vielfältigen Effekten, z. B. Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase, was eine Kontraktion der glatten Muskulatur bewirkt. Außerdem werden durch Aktivierung von Proteinkinasen zahlreiche Stoffwechselfunktionen reguliert, z. B. der Glycogen-Abbau zu Glukose, die Lipolyse und die Ausschüttung von Gewebshormonen wie Somatostatin.

Da IBMX einen Einfluss auf dieses wichtige Molekül hat, könnte es ein aussichtsreiches Medikament für alle die Prozesse sein, bei denen die cAMP-Konzentration eine funktionelle Rolle spielt. So zeigen Forschungsergebnisse, dass die Behandlung mit IBMX bei Ratten den Abbau der Skelettmuskulatur während einer akuten Sepsis hemmt [Lira *et al.*, 2007]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch die Behandlung mit IBMX bei alloreaktiven CD4-positiven T-Zellen eine Toleranz gegenüber fremden Antigenen induziert, die vor der lebensgefährlichen „Transplantat gegen Empfänger Reaktion“ (*Graft versus Host disease*, GvHD) schützen kann [O' Shaughnessy *et al.*, 2007].

Indometacin gehört zu den NSAR, welche die Cyclooxygenase (COX) hemmen und so zu einer reduzierten Prostaglandinsynthese führen. Es wird bei der Behandlung von Schmerzen und Entzündungen bei rheumatischen Erkrankungen wie rheumatischer Arthritis, aktivierten Arthrosen und Morbus Bechterew sowie im akuten Gichtanfall angewendet.

Indometacin ist ein unselektiver COX-Hemmer, das heißt, es hemmt beide Isoenzyme COX-1 und COX-2. Das Enzym COX ist ein im Körper ubiquitär vorkommendes, membranständiges Protein, das die aus Membranphospholipiden freigesetzte Arachidonsäure in Prostaglandin (PG) G_2 und H_2 umwandelt. Die weitere Modifikation von PGH_2 führt dann zu den funktionellen Prostaglandinen D_2 , E_2 , $F_{2\alpha}$, I_2 , und Thromboxan A_2 (TxA_2). Bislang wurden drei COX-Isoenzyme – COX-1, -2 und -3 – nachgewiesen, die sich nach Vorkommen und Expressionsmuster unterscheiden. Die COX-3 ist primär im ZNS vorhanden [Chandrasekharan *et al.*, 2002], allerdings ist über ihre Funktion wenig bekannt, so dass hier nicht näher auf COX-3

eingegangen werden soll. Die COX-1 wurde erstmals 1976 nachgewiesen und wird in nahezu allen Organsystemen konstitutiv exprimiert, vor allem in Magen, Niere, Milz, Thrombozyten, Lunge und im Gefäßendothel [Miyamoto *et al.*, 1976; Crofford, 1997; Tegeder *et al.*, 2000]. Als *house keeping enzyme* induziert sie multiple physiologische Effekte im gesunden Gewebe.

Dagegen hat COX-2, welche Anfang der 90er Jahre entdeckt wurde, eine komplexe Funktion: einerseits wird sie durch physiologische Adaptationsvorgänge, wie z. B. bei der Weheninduktion, Nierendurchblutung oder Wundheilung exprimiert. Andererseits spielt sie bei der Entstehung und Unterhaltung von Schmerzen, Fieber und entzündlichen Reaktionen eine wesentliche Rolle [Xie *et al.*, 1991].

Beide Isoformen sind sich in Struktur und katalytischer Aktivität sehr ähnlich, allerdings haben sie unterschiedliche Molekulargewichte, COX-1 85 Kilodalton (kDa) und COX-2 72 kDa. Ihre Gene sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert – das größere COX-1-Gen auf Chromosom 9 und das kleinere Gen der COX-2 auf Chromosom 1 [Taketo, 1998]. Abbildung 2.5 fasst die unterschiedlichen Funktionen der COX-Isoenzyme zusammen.

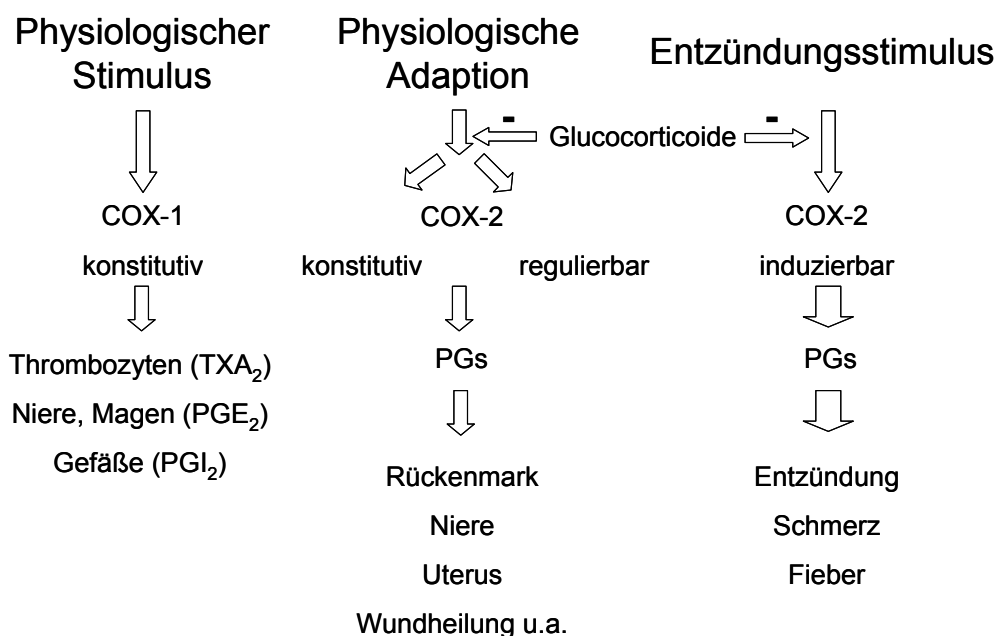


Abb. 2.5: Isoformen der COX und ihre Regulationsmechanismen. Modifiziert nach [Burian und Geisslinger, 2003].

Das Peptidhormon Insulin besteht aus zwei Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Es wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet und gespeichert. Insulin bindet an Insulinrezeptoren, die sich innerhalb der Zellmembran befinden. Über verschiedene Signalwege bewirkt Insulin ein Sinken des Blutglucosespiegels. Daher ist es das Medikament der Wahl bei Typ 1-Diabetes, einer Autoimmunerkrankung bei der die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln zerstört werden. Im Fall eines Typ 2-Diabetes ist es erst nach Versagen der oralen Antidiabetika und in Stresssituationen mit erhöhtem Insulinbedarf indiziert.

2.5.2 IBMX, Indometacin und Insulin in der Krebstherapie

In Kombination mit anderen Stoffen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, konnte für IBMX gezeigt werden, dass es das Wachstum des malignen Glioblastoms *in vitro* hemmt, seine Differenzierung induziert und zur Apoptose führt [Chen *et al.*, 1998]. Diese durch cAMP modulierte Wachstumsinhibition konnte ebenfalls bereits für das kleinzellige Bronchialkarzinom nach Behandlung mit IBMX und Forskolin (Aktivator der AC) *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden [Maruno *et al.*, 1998]. Ein weiterer Angriffspunkt für die Antitumorthherapie ist die gesteigerte Bildung von O_2 -Radikalen bei Brustkrebszellen nach *in vitro*-IBMX-Behandlung [Crompton *et al.*, 2001].

Für Indometacin konnte schon in zahlreichen Studien ein hemmender Effekt auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen gezeigt werden. So gibt es Belege auf der Grundlage von klinischer Beobachtung sowie *in vitro*-Experimenten, dass Indometacin einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von kolorektalen Krebszellen hat [Hull *et al.*, 2003]. Und auch für Brustkrebszellen konnte ein antiproliferativer Effekt von Indometacin gezeigt werden [Noguchi *et al.*, 1995]. So war das Überleben von Mäusen mit Mammakarzinom durch Indometacintherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht und die Inzidenz von Lungenmetastasen bei diesen Mäusen um die Hälfte reduziert [Lala *et al.*, 1997]. Auch für das kleinzellige Bronchialkarzinom konnte bereits ein Apoptose-induzierender Effekt *in vitro* von Indometacin gezeigt werden [de Groot *et al.*, 2005; de Groot *et al.*, 2007].

Es gibt keine Belege dafür, dass Insulin das Ansprechen auf Chemotherapie verbessert. Stattdessen ist bekannt, dass Insulin über den Insulinrezeptor und die

Tyrosinkinase- Wachstumsfaktor- Kaskade das Wachstum von Krebszellen stimuliert [Boyd, 2003] und dass Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factors*, IGF) die Proliferation, das Überleben und die Metastasierung von Krebszellen steigern [Haddad und Yee, 2006].

2.6 Ionenkanäle

Alle höheren Zellen sind von einer Zellmembran, einer ca. 7,5 nm dünnen Lipiddoppelschicht, umgeben. Für geladene Teilchen stellt die Lipiddoppelschicht der Zellmembran zunächst ein unüberwindbares Hindernis dar. Die Zelle muss daher über Mechanismen verfügen, Ionen gezielt über die Barriere der Membran zu transportieren. Spezifische Proteine – Ionenkanäle, Transporter und Pumpen - übernehmen diese Aufgabe.

Ionenkanäle sind Transmembranproteine mit Poren, die es Ionen ermöglichen, die Zellmembran zu durchqueren. Das Öffnen und Schließen wird bei vielen Ionenkanälen durch externe Stimuli reguliert, die eine Konformationsänderung im Protein bewirken.

Daraus ergibt sich neben der Einteilung der Ionenkanäle nach ihrer Ionenselektivität eine weitere nach ihrem Aktivierungsmechanismus. Die meisten Ionenkanäle können den beiden Hauptgruppen zugeordnet werden: den ligandengesteuerten Ionenkanälen und den spannungsabhängigen Ionenkanälen. Beispiele für ligandengesteuerte Ionenkanäle sind der nikotinische Acetylcholinrezeptor oder der ionotrope Glutamatrezeptor. Die extrazelluläre Bindung dieser Neurotransmitter aktiviert diese Kanäle [Klinke und Silbernagl, 2003].

Spannungsabhängige Ionenkanäle werden durch das Membranpotential gesteuert. Spannungsabhängige Na^+ -Kanäle kommen in hoher Dichte typischerweise nur in erregbaren Zellen wie Muskel- und Nervenzellen vor. So sind spannungsaktivierte Na^+ -Kanäle während des Ruhemembranpotentials nicht leitfähig. Sie leiten erst, wenn sie durch eine Depolarisation aktiviert werden, so dass ein Aktionspotential entstehen kann. K^+ -Kanäle kommen wahrscheinlich in allen Zelltypen vor. K^+ -Kanäle tragen zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials bei und sorgen für die Repolarisation nach einem Aktionspotential [Klinke und Silbernagl, 2003].

K^+ -Kanäle bilden die größte und mannigfaltigste Gruppe von Ionenkanälen. Über 80 verschiedene für K^+ -Kanäle kodierende Gene wurden inzwischen identifiziert. Etwa

die Hälfte davon (ca. 40 Gene) stehen für spannungsabhängige K^+ -Kanäle. Die große Superfamilie wird nach der Anzahl der Transmembranbereiche und der Porenregion (P) in verschiedene Strukturklassen unterteilt. Die Gene porenbildender α -Untereinheiten (α -UE) der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle kodieren für Proteine mit sechs Transmembrandomänen (S1 – S6) (Abb. 2.6 A). Die S4 Domäne fungiert als Spannungssensor. Die sogenannte EAG-Domäne befindet sich im N-Terminus und die cyclische Nukleotide bindende Domäne (cNBD) im C-Terminus. N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär. Funktionelle K^+ -Kanäle setzen sich aus vier α -UE zusammen, wobei die P-Domäne maßgeblich an der Porenbildung und dem Selektivitätsfilter beteiligt ist (Abb. 2.6 B). Die funktionelle Diversität resultiert zum einen aus der Vielfalt porenbildender α -UE und zum anderen aus der Fähigkeit verschiedener α -UE, Heteromultimere zu bilden. Zusätzlich können die porenbildenden α -UE von akzessorischen β -UE moduliert werden. Dies kann großen Einfluss auf die Expression und auf die biophysikalischen Eigenschaften haben.

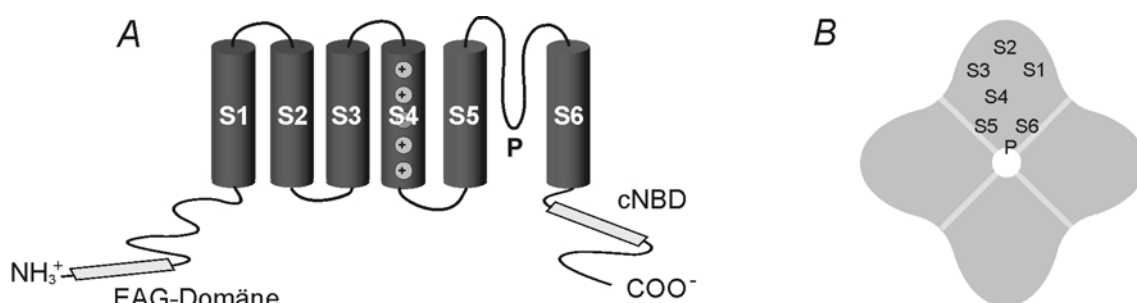


Abb. 2.6: Struktur von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen. Modifiziert nach [Bauer und Schwarz, 2001].

2.6.1 Kaliumkanäle der EAG-Familie

Die EAG-Kanäle gehören ebenfalls in die große Superfamilie der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle und haben wie sie sechs membrandurchspannende Untereinheiten. Der Ausfall des EAG-Kanals bei *Drosophila*-Mutanten führte dazu, dass sich die Fliegen unter Äther rhythmisch bewegten. Er wurde deshalb *éther-à-go-go* getauft, oder kurz EAG [Warmke *et al.*, 1991].

In der EAG-Familie werden drei verschiedene Subfamilien unterschieden: EAG, ELK (*eag-like*) und ERG (*eag-related gene*) [Warmke und Ganetzky, 1994]. Jede

Subfamilie hat zwei bis drei Mitglieder (Abb. 2.7). Über die erg-K^+ -Kanäle ist am meisten bekannt. Sie werden in vielen unterschiedlichen Gewebetypen exprimiert, u.a. auch im Herzmuskel. Bei funktionsuntüchtigem oder nicht vorhandenem Gen für den erg1 -Kanal ist die Repolarisationsphase des Herzaktionspotentials verzögert. Es besteht das Long-QT-Syndrom, welches mit einer Verlängerung der QT-Strecke im Elektrokardiogramm (EKG) einhergeht [Curran *et al.*, 1995]. Das Long-QT-Syndrom kann aber nicht nur durch eine Mutation im für erg1 kodierenden Gen verursacht werden, es kann auch pharmakologisch bedingt sein. Die Klasse III-Antiarrhythmika aus der Gruppe der Methansulfonanilide, wie E-4031, WAY-123,398 und Dofetilid sind spezifische Blocker des erg-K^+ -Stroms [Sanguinetti *et al.*, 1995; Spector *et al.*, 1996; Snyders und Chaudhary, 1996; Weinsberg *et al.*, 1997]. Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze, um in Geweben spezifisch den erg-K^+ -Kanal nachzuweisen. Neben den Herzmuskelzellen wird der erg1 -Kanal auch in vielen anderen erregbaren Zellen gefunden, wie Neuroblastomzellen, Neuroendokrinen Zellen und glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes. Dort sind erg-K^+ -Ströme für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials mit verantwortlich [Schwarz und Bauer, 2004].

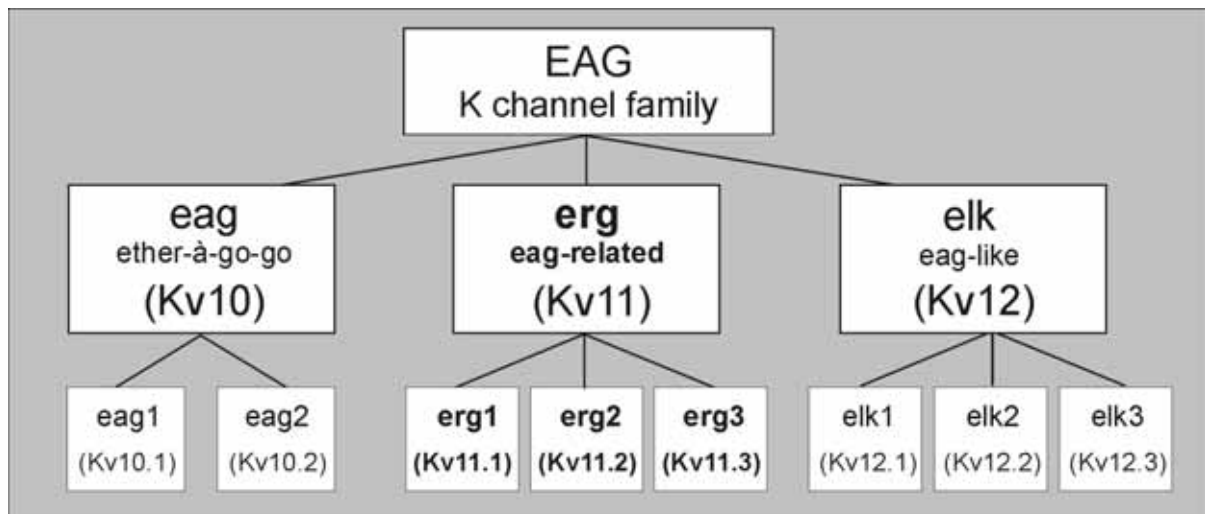


Abb 2.7: Die EAG (*éther-à-go-go*) K^+ -Kanal-Familie. Modifiziert nach [Bauer und Schwarz, 2001]. In der EAG-Familie werden drei verschiedene Subfamilien unterschieden: EAG, ELK (*eag-like*) und ERG (*eag-related gene*). Nach neuer Nomenklatur werden sie auch als Kv10, Kv11 und Kv12 bezeichnet.

2.6.1.1 Elektrophysiologische Eigenschaften des erg-K^+ -Kanals

Erg-Kanäle haben einen funktionellen einwärtsgleichrichtenden Charakter [Warmke und Ganetzky, 1994]. Allerdings haben sie eine ungewöhnliche Kinetik. Bei Depolarisation finden gleichzeitig eine Aktivierung und eine Inaktivierung des Kanals

statt, wobei die Inaktivierung schneller voranschreitet. So kann bei Depolarisation nur ein „gebremster“ Auswärtsstrom fließen. Bei einer Repolarisation auf -60 mV erholt sich der Kanal aus der Inaktivierung und dieses läuft sehr viel schneller ab, als die Deaktivierung des Kanals. Daher kommt es zu einem großen Auswärtsstrom (Abb. 2.8 A). Bei einer Hyperpolarisation auf Werte, welche negativer als das K^+ -Gleichgewichtspotential sind, kommt es aufgrund der schnellen Erholung aus der Inaktivierung zu einem großen Einwärtsstrom (Abb. 2.8 B).

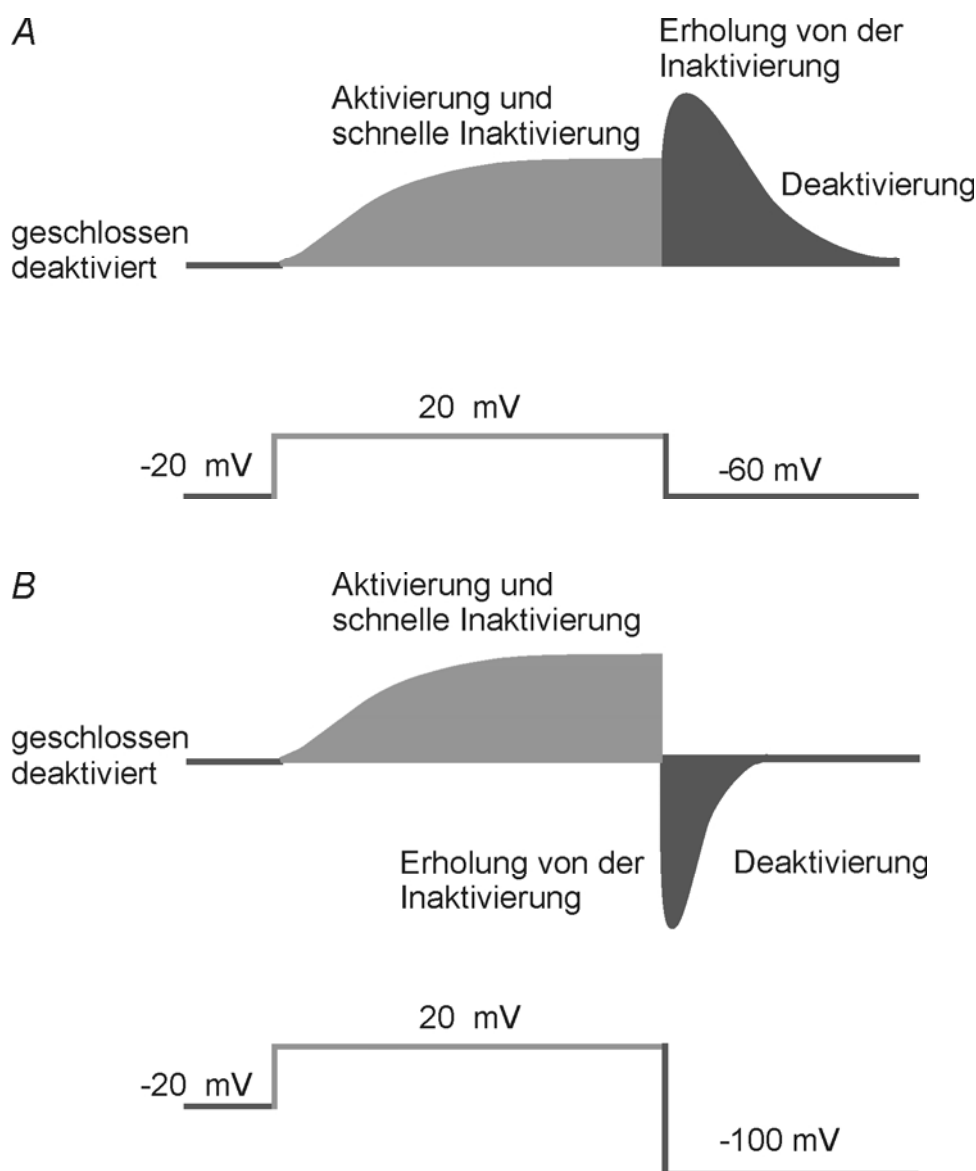


Abb. 2.8: Schaltverhalten der K^+ -Kanäle der erg-Familie. Modifiziert nach [Bauer und Schwarz, 2001]. Bei einer Depolarisation inaktivieren die Kanäle schneller als sie aktivieren. Daher ist die Stromamplitude relativ gering (hellgrau). Der große Strom einer anschließenden Repolarisation resultiert aus der Erholung der Kanäle aus der Inaktivierung (dunkelgrau). In Abb. A ist der Testpuls auf -60 mV positiv vom K^+ -Gleichgewichtspotential und es wird ein K^+ -Ausstrom registriert. In Abb. B ist der Testpuls auf -100 mV negativ vom K^+ -Gleichgewichtspotential und es kommt zu einem K^+ -Einstrom.

2.6.1.2 erg-K⁺-Kanäle in Karzinomzellen

Neben den vielen bekannten Aufgaben, an denen K⁺-Kanäle beteiligt sind, wie z.B. die Regulation der Herzfrequenz, die Muskelkontraktion, die Ausschüttung von Neurotransmittern und die Insulinsekretion, sind K⁺-Kanäle auch an der Proliferation vieler Zelltypen beteiligt. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass von Lymphozyten spannungsabhängige K⁺-Kanäle exprimiert werden müssen, um während der Immunantwort eine Mitose ausführen zu können [Chandy *et al.*, 1984; DeCoursey *et al.*, 1984]. Wonderlin und Strobl [1996] konnten erstmals zeigen, dass die pharmakologische Blockierung von K⁺-Kanälen die Proliferation sowohl von gesunden Zellen als auch von Tumorzellen hemmt, was mehrfach bestätigt wurde [Wickenden, 2002; Pardo, 2004; Conti, 2004].

Der menschliche erg-K⁺-Kanal ist einer der wichtigsten Ionenkanäle für die Entstehung und das Wachstum von Tumoren und wurde bereits in vielen unterschiedlichen Tumorzellen nachgewiesen. Unter anderem trägt seine Eigenschaft das Ruhemembranpotenzial aufrecht zu erhalten zu dem deregulierten Wachstum der Tumorzellen bei [Conti, 2004]. Erstmals gefunden wurde der erg-K⁺-Kanal in Neuroblastomzellen [Arcangeli *et al.*, 1995]. Cherubini *et al.* [2000] wiesen nach, dass die Expression des erg-K⁺-Kanals im Endometriumkarzinom im Vergleich mit gesunden Zellen und hyperplastischen Zellen des Endometriums stark gesteigert ist. Für neoplastische hämatopoetische Zellen konnte gezeigt werden, dass der erg-K⁺-Kanal in diesen Zellen hochreguliert ist und Anteil an der Zellproliferation hat, da das Wachstum der untersuchten Zellen durch den selektiven erg-K⁺-Kanal-Blocker E-4031 reduziert werden konnte [Smith *et al.*, 2002; Pillozzi *et al.*, 2002]. Ebenso wurde eine Überexpression des erg-K⁺-Kanals im kolorektalen Karzinom [Lastraioli *et al.*, 2004] und im Glioblastom [Masi *et al.*, 2005] nachgewiesen. Dem erg-K⁺-Kanal können drei Funktionen zugeschrieben werden: 1. Kontrolle der Zellproliferation. 2. Regulation der Invasivität des Tumors und 3. Kontrolle der Neoangiogenese von Tumoren [Arcangeli, 2005].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma
Indometacin	Sigma
Insulin	Sigma
Ethanol pro Analysis	Merck
XTT labeling mixture	Roche
Glutardialdehydlösung (25 %)	Merck
RPMI-1640 Medium (+ L-Glutamin)	Gibco
Fetal Bovine Serum	Gibco
100 U/ml Penicillin	Gibco
100 µg/ml Streptomycin	Gibco
DPBS (- CaCl ₂ , - MgCl ₂)	Gibco
Esel Normalserum	Santa Cruz
primärer COX-1 Antikörper (Ziege polyklonal)	Santa Cruz
primärer COX-2 Antikörper (Ziege polyklonal)	Santa Cruz
primärer COX-2 Antikörper (Maus monoklonal)	Cayman Chemicals
Ziegen IgG	Sigma
Antibody Diluent	DakoCytomation
sekundärer Antikörper Esel anti Ziege	Chemicon
sekundärer Antikörper Kaninchen anti Maus	DakoCytomation
Alkalische Phosphatase (AP) Standard ABC-Kit	Vectastain
Natriumnitrit	Sigma
Naphthol-AS	Sigma
Dimethylformamid	Sigma
Tween 20	Sigma
Tetramisolhydrochlorid	Sigma
Crystal Mount	Biomeda
Clarion Mounting Medium	Biomeda
Trizma Base	Sigma
Natrium Chlorid	J.T. Baker
Salzsäure (2N)	Merck

HEPES pH 7,9	Sigma
KCl	Merck
Glycerin	Merck
EGTA	Sigma
EDTA	Sigma
Nonidet P-40	Roche
Protease Inhibitor Cocktail Set I	Calbiochem
Serva Blue G	Serva
Albumin Standard	Pierce
Acrylamid	Biorad
Sodium dodecyl Sulfate (SDS)	Fluka
Ammonium-Persulfate	Serva
TEMED	Biorad
Bromphenol Blau	Biorad
Mercaptoethanol	Sigma
Rainbowmarker	Amersham
10x Tris/Tricine/SDS Buffer	Biorad
Methanol	J.T. Baker
Glycin	Roth
Albumin bovine Serum (BSA)	Sigma
POX Elite ABC-Kit	Vectastain
Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma
Wasserstoffperoxid 30%, (H ₂ O ₂)	Merck
Tetrodotoxin (TTX)	Biotrend
E-4031	Eisai
Calcium (Ca ²⁺)	EQCAL, Biosoft

3.1.2 Lösungen und Puffer

Kulturmedium	500 ml RPMI-1640
	10 % Fetal Bovine Serum
	1 % Penicillin/ Streptomycin
3 %ige Glutaraldehydlösung	50 ml Phosphatpuffer

	12 ml Glutardialdehydlösung (25 %) auf 100 ml <i>aqua dest.</i>
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer
saliner Tris/HCL Puffer pH 7,6 (TBS)	Trizma Base, NaCl, HCl
Neufuchsin	5g/100 ml HCL (2N)
TBS pH 8,24	Trizma Base, NaCl, HCl
Hämalaun 1:1	Merck
<i>low salt Buffer</i>	20 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 1mM EGTA; 0,25 mM EDTA; 10% Glycerol; 0,2 % Nonidet P-40
<i>Bradford Stock Solution</i>	100 ml 95 % Ethanol, 200 ml 88 % Phosphorsäure, 350 mg Serva Blue G
<i>Bradford Working Buffer</i>	30 ml Bradford Stock Solution, 425 ml <i>aqua dest.</i> , 15 ml 95 % ethanol, 30 ml 88 % Phosphorsäure
<i>Tris-Buffer</i> 1,5 M; pH 8,8	1,5 M Tris-HCl
<i>Tris-Buffer</i> 0,5 M; pH 6,8	0,5 M Tris-HCl
10 % APS	10% APS in <i>aqua dest.</i>
<i>Sample Buffer</i>	3,55 ml <i>aqua dest.</i> ; 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 ; 2,5 ml Glycerol, 2,0 ml 10% SDS, 0,2 ml 0,5 % Bromphenol Blau
Ladepuffer	95 % <i>Sample Buffer</i> , 5 % Mercaptoethanol
<i>Running Buffer</i>	10 % 10x Tris/Tricine/SDS Buffer in <i>aqua dest.</i>
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 9,2
<i>Blocking Buffer</i>	0,4 % BSA in 10 ml TBS (pH 7,6)

Entwicklungslösung

10 % DAB; 0,1 % H₂O₂ in TBS

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen, blau, 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen, gelb, 200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen, farblos, 10 µl	Sarstedt
Tissue Culture Plate 96 well	Sarstedt
Zellkulturflaschen 250 ml, 650 ml	Sarstedt
Glaspipetten 10ml	Brand
50 ml Röhrchen	Sarstedt
30 ml Röhrchen	Greiner Bio-One
7 ml Röhrchen	Dunn Labortechnik
Cell-Strainer Cap	Falcon
Casycup	Schärfe Systems
Casyton	Schärfe Systems
Milipore	Milipore Corporation
Objektträger HistoBond	Paul Marienfeld
Poly-D-Lysin	Sigma
Petrischalen	Nunc
Gelloader Tips	Biozym
Nitrozellulosemembran Hybond-ECL	Amersham
Mini Trans-Blot Filter Papier	Biorad

3.1.4 Geräte

Heracell Wärmeschrank	Heraeus
Sterilbank SterilGARD	The Baker Company
Absaugpumpe	HLC
Analysewaage ALS 120-4	Kern
Autoklav Varioklav	H + P Labortechnik
Casy-Zellzählgerät	Schärfe Systems
Dynatech MR 3.13 Mikroelisa Reader	Dynex Technologies
Mehrfachpipette Research	Eppendorf

Finnpipetten

- grau: 0,5 – 10 µl

- gelb: 40 – 200 µl

- blau: 200 – 1000 µl

Laborfuge A

Pipetus Akku

Universal 32 R Zentrifuge

Cytobecher, Spannringe, Spannplatten

SmartSpec 3000 Spectrophotometer

Mini-Protean 3 Cell

Thermoblock

Elektrophoresis Power Supply E844

Mini Trans-Blot Cell

EPC-9 Patch-Clamp Verstärker

Labsystems

Heraeus Sepatech

Hirschmann Laborgeräte

Hettich Zentrifugen

Hettich

Biorad

Biorad

HLC

Biorad

Biorad

HEKA Elektronik

3.1.5 Software

GraphPad Prism 4.00

MS Word, Excel

GraphPad Software, Inc.

Microsoft

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms untersucht: H69, SW2, OH1, OH3 und H82. Diese Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Uwe Zangemeister-Wittke von der Universität Bern zur Verfügung gestellt. Die Eigenschaften der verwendeten Zellen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Die Zellen wurden unter *in vitro* Standardbedingungen (37° C, 100 % relative Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) in Kulturmedium kultiviert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte einmal die Woche. Dafür wurde zunächst der Boden der Zellkulturflasche gründlich abgespült, so dass sich möglichst alle Zellen in Suspension mit dem Kulturmedium befanden. Dann wurden aus der Zellkulturflasche ca. 10 ml Zellsuspension abpipettiert und in ein 30 ml Weißkappenröhrchen gegeben. Dieses wurde dann für 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen/Minute (U/Min) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche gegeben, in die bereits ca. 15 ml Kulturmedium vorgelegt worden waren. Je nach Wachstum der Zellen wurde an zwei weiteren Tagen der Woche eine gewisse Menge der Zellsuspension aus der Zellkulturflasche abgesaugt und frisches Kulturmedium in die Flasche nachgefüllt.

			Literatur
H69	klassisch	- erhöhte Recoverin (paraneoplastisches Antigen) Expression in Anwesenheit von Butyrat	Bazhin <i>et al.</i> , 2004
		- hohe Resistenz gegen den durch FasL und TRAIL induzierten death receptor Signalweg	Hopkins-Donaldson <i>et al.</i> , 2003
		- Verdopplungszeit zwischen 72 und 96 h	Luk <i>et al.</i> , 1982
		- exprimiert epitheliales Glykoprotein 2	Zimmermann <i>et al.</i> , 1997
H82	variant (mv)	- erhöhte Recoverin (paraneoplastisches Antigen) Expression in Anwesenheit von Butyrat	Bazhin <i>et al.</i> , 2004
		- erhöhte DNA-Konzentration und Expression von c-myc	Gazdar <i>et al.</i> , 1985
		- Verdopplungszeit etwa 48 h	Luk <i>et al.</i> , 1982
		- Gesteigertes Zellwachstumspotenzial	Mabry <i>et al.</i> , 1988
		- mRNA-Level der Ornithine Decarboxylase sind 100x niedriger, als in NSCLC	Casero <i>et al.</i> , 1986
OH1	klassisch	- hohe Resistenz gegen den durch FasL und TRAIL induzierten death receptor Signalweg	Hopkins-Donaldson <i>et al.</i> , 2003
		- hohe L-Dopa-Decarboxylase Aktivität	Mabry <i>et al.</i> , 1988
		- niedrige c-myc Genexpression	Mabry <i>et al.</i> , 1988
		- Zytotoxischer Antwort auf Inhibition der Polyamin Biosynthese durch 2-Difluormethylornithin (F ₂ MeOrn)	Mabry <i>et al.</i> , 1988
		- Verdopplungszeit zwischen 72 und 96 h	Luk <i>et al.</i> , 1982
OH3	klassisch	- hohe Resistenz gegen den durch FasL und TRAIL induzierten death receptor Signalweg	Hopkins-Donaldson <i>et al.</i> , 2003
		- hohe L-Dopa-Decarboxylase Aktivität	Mabry <i>et al.</i> , 1988
		- niedrige c-myc Genexpression	Mabry <i>et al.</i> , 1988
		- Zytotoxischer Antwort auf Inhibition der Polyamin Biosynthese durch 2-Difluormethylornithin (F ₂ MeOrn)	Mabry <i>et al.</i> , 1988
SW2	variant	- hohe Resistenz gegen den durch FasL und TRAIL induzierten death receptor Signalweg	Hopkins-Donaldson <i>et al.</i> , 2003
		- exprimiert epitheliales Glykoprotein 2 besonders stark	Zimmermann <i>et al.</i> , 1997

Tab. 3.1: Eigenschaften der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69, H82, OH1, OH3 und SW2.

3.2.2 Zellzählung

Die Anzahl der vitalen Zellen pro 1 ml wurden mit Hilfe des Casy Zellzählgerätes bestimmt. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass vitale Zellen mit intakter Membran elektrische Isolatoren sind, tote Zellen mit defekter Membran dagegen den Strom durch ihr Zytoplasma hindurch leiten. In einer Pulsflächenanalyse wird durch elektrischen Strom die Integrität der Zellmembran bestimmt und so können die toten von den vitalen Zellen unterschieden werden.

Für die Zellzahlbestimmung wurden jeweils ca. 10 ml Zellsuspension in ein 30 ml Weißkappenröhrchen pipettiert und dieses bei 1500 U/Min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb gegeben, um aggregierte Zellen voneinander zu trennen, da dies Voraussetzung für eine aussagekräftige Messung mittels Casy Zellzählgerät ist. 100 µl der gesiebten Lösung wurden in ein mit 10 ml Casyton gefülltes Casycup pipettiert. Nachdem das Casycup zweimal invertiert wurde, konnte nun die Zahl der vitalen Zellen bestimmt werden.

3.2.3 Erstellen von Eichkurven

Vor Beginn der Zellproliferationsversuche wurde zunächst für jede Zelllinie eine eigene Eichkurve erstellt, um die optimale Zellzahl pro ml für die Versuchsreihe zu ermitteln. Dafür wurde das Zellproliferationskit XTT verwendet. Hierbei wird durch ein in allen vitalen Zellen vorhandenes Enzym das gelbbraune Tetrazoliumsalz XTT zu dem orangefarbenen Salz Formazan reduziert. Dadurch stellt die Extinktion der jeweiligen Zellkulturprobe ein Maß für die Anzahl der vitalen Zellen dar.

Alle fünf Zelllinien wurden in sieben verschiedenen Konzentrationen zwischen 10^4 und 10^7 Zellen pro ml in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. In jede Vertiefung wurde zunächst 10 µl PBS (pH 7,4) vorgelegt und dann 90 µl der Zellsuspension mit der jeweiligen Zellzahl pro ml dazu pipettiert. Für jede Zelllinie wurden sechsfach Ansätze erstellt. Nach 72 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen wurden 50 µl XTT *labeling mixture* pro Vertiefung hinzugegeben. Nach sechs Stunden wurde die Absorption bei 450 nm in einem Dynatech MR 3.13 Mikroelisa Reader gemessen und anhand der erzielten Werte Eichkurven erstellt (Abb. 3.2). Die Zellzahlen wurden so gewählt, dass sich die Zellen bei ungehindertem Wachstum in der exponentiellen

Wachstumsphase befanden. So ergab sich eine Konzentration von 160.000 Zellen pro ml für die Zelllinien OH3 und SW2, 300.000 Zellen pro ml für OH1, 500.000 Zellen pro ml für H69 und 750.000 Zellen pro ml für H82.

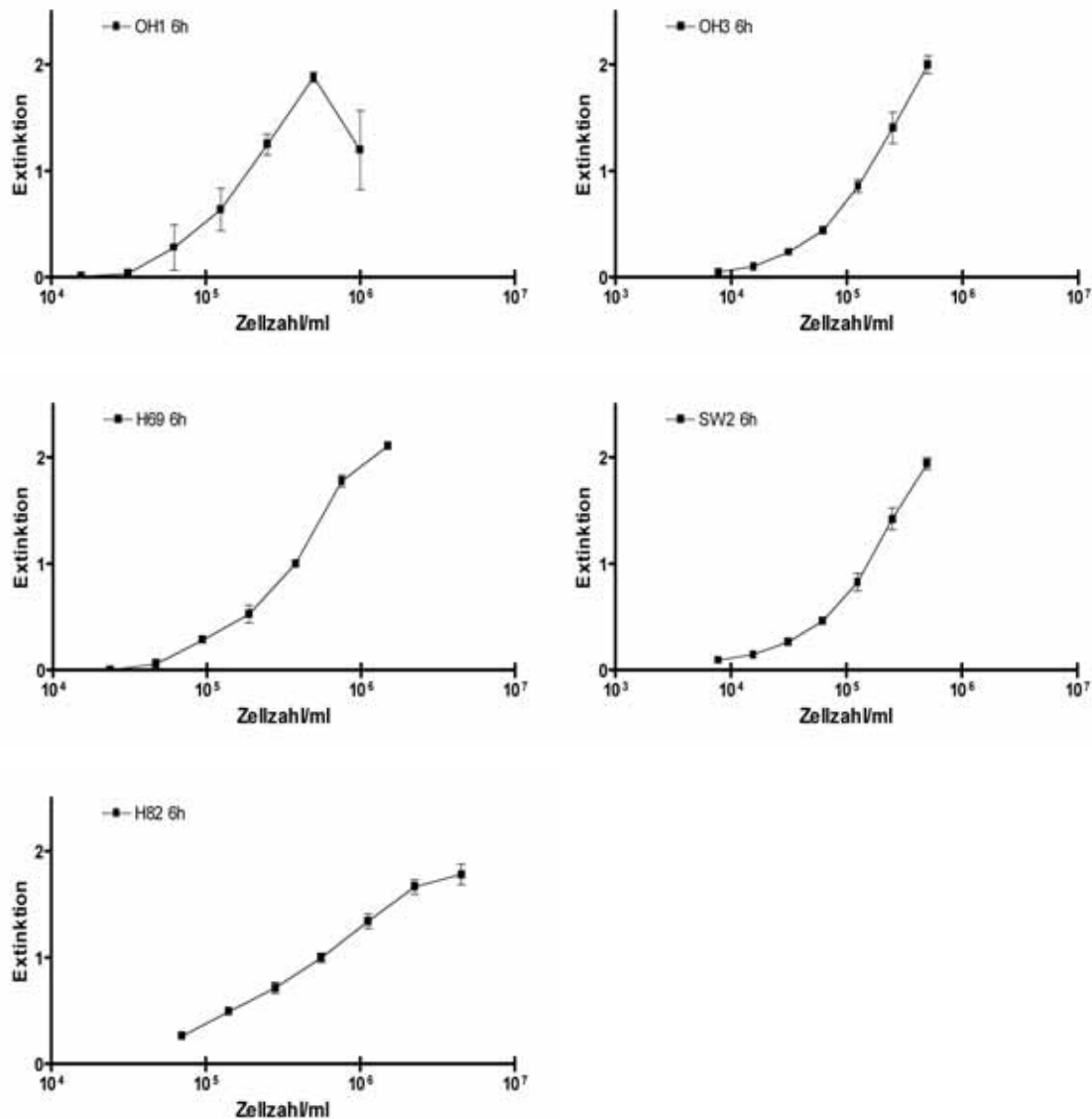


Abb.: 3.2 Eichkurven der Zelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82. Aufgeführt ist die Extinktion bei sieben verschiedenen Zellzahlen zwischen 10^4 und 10^7 Zellen pro ml.

3.2.4 Vergleich des Proliferationsverhaltens in Kulturmedium und NID

Für den Versuch wurde ein neuronales Induktionsmedium (NID) verwendet, welches bereits von Ashjian *et al.* [2003] für die neuronale *in vitro* Differenzierung Stammzellen im von menschlichen Fettgewebe verwendet wurde. Dafür wurde das oben beschriebene Kulturmedium durch 5 μ g/ml Insulin, 200 μ M Indometacin und 0,5 mM IBMX ergänzt und anschließend steril filtriert. Die Zellen wurden mit den oben

angegebenen Zellzahlen pro ml in 96-Loch-Mikrotiterplatten (100 µl pro Vertiefung) ausgesät. Um das Zellwachstum in den beiden Medien zu vergleichen, wurden pro Platte jeweils vier Ansätze einer Zelllinie in Kulturmedium ausgesät und vier Ansätze in NID. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurden 50 µl XTT-Lösung pro Vertiefung hinzupipettiert und nach weiteren sechs Stunden wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Der Kontrollwert jeder Mikrotiterplatte bestand aus 100 µl des jeweiligen Mediums, entweder Kulturmedium oder NID. Jede Zelllinie wurde pro Versuch vierfach getestet. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, so dass sich jeder Messpunkt aus 12 einzelnen Messwerten zusammensetzte.

3.2.5 Einfluss der einzelnen Bestandteile des NID auf die Proliferation

In diesem Versuch wurden die drei verschiedenen Inhaltsstoffe des NID, Indometacin, IBMX und Insulin einzeln zu den Zellen gegeben, um den ausschlaggebenden Faktor für die Reduktion der Zellproliferation identifizieren zu können. Dieser Versuch wurde mit allen oben genannten Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden zunächst Lösungen der einzelnen Medikamente hergestellt, welche im Vergleich mit dem unter 3.24 beschriebenen Versuch zehnfach konzentriert waren. Die Konzentrationen betrugen für Indometacin 2000 µM, für IBMX 5 mM und für Insulin 50 µg/ml. Diese wurden dann jeweils zweimal um die Hälfte verdünnt, so dass die Medikamente in Originalkonzentration, in 50 % der Originalkonzentration und in 25 % der Originalkonzentration zu den Zellen gegeben werden konnten. Von diesen Lösungen wurden jeweils 10 µl pro Vertiefung in 96-Loch-Mikrotiterplatten vorgelegt, so dass bei einem Verdünnungsfaktor von 1:10 wieder die Höchstkonzentrationen, wie bei Ashjian *et al.* [2003] beschrieben, erreicht wurden. In den Vertiefungen, in die nur ein oder zwei Medikamente vorgelegt wurden, wurde die fehlende Menge mit Kulturmedium ausgeglichen. Um auf ein Gesamtvolumen von 100 µl zu kommen, wurden pro Vertiefung 70 µl Zellsuspension in Kulturmedium in angepassten Zellzahlen hinzugefügt. Die Zellzahl für die Zelllinien betrug für SW2 205.700 Zellen pro ml, für H82 964.000 Zellen pro ml, für OH1 385.700 Zellen pro ml, für OH3 205.700 Zellen pro ml und für H69 643.000 Zellen pro ml. Da zum Lösen von Indometacin 5 % Ethanol und von IBMX 1 % Ethanol verwendet wurde, bestand die Kontrolle aus 70 µl Zellsuspension mit der jeweiligen Zellzahl pro ml, 20 µl Medium und 10 µl Alkoholkontrolle mit einer Konzentration von 6 % Ethanol. Im

Gesamtvolumen von 100 µl ergab sich somit eine Alkoholkonzentration von 0,6 %. Der Leerwert bestand aus 100 µl Medium. Jede gewählte Kombination der drei Medikamente in den unterschiedlichen Konzentrationen wurde pro Versuch sechsfach getestet.

3.2.6 Behandlung mit Indometacin und IBMX (modifiziertes NID)

In einem weiteren Versuch wurden die Zelllinien ausschließlich mit Indometacin und IBMX (modifiziertes NID) behandelt. Dafür wurden Indometacin-Lösungen in den Konzentrationen 8000 µM, 6000 µM, 5000 µM, 4000 µM, 3000 µM, 2000 µM, 1000 µM und 500 µM sowie IBMX-Lösungen in den Konzentrationen 20 mM, 15 mM, 12,5 mM, 10 mM, 7,5 mM, 5 mM, 2,5 mM und 1,25 mM hergestellt. Von diesen Lösungen wurden jeweils 10 µl pro Vertiefung in 96-Loch-Mikrotiterplatten vorgelegt, so dass die oben genannten Konzentrationen bei einem Gesamtvolumen von 100 µl um den Faktor 10 verdünnt wurden. Um auf ein Gesamtvolumen von 100 µl zu kommen, wurden pro Vertiefung 80 µl Zellsuspension in Medium in angepassten Zellzahlen hinzugefügt. Die Zellzahl der Zelllinien betrug für SW2 180.000 Zellen pro ml, für OH1 338.000 Zellen pro ml, für OH3 180.000 Zellen pro ml und für H69 563.000 Zellen pro ml. Da zum Lösen sowohl von Indometacin 20 % Ethanol als auch von IBMX 20 % Ethanol verwendet wurde, bestand die Kontrolle aus 80 µl Zellsuspension mit der jeweiligen Zellzahl pro ml und 20 µl Alkoholkontrolle mit einer Konzentration von 20 % Ethanol. Im Gesamtvolumen von 100 µl ergab sich so eine Alkoholkonzentration von 4 %. Eine weitere Kontrolle bestand aus 80 µl Zellsuspension mit der jeweiligen Zellzahl pro ml und 20 µl Kulturmedium, um den wachstumshemmenden Effekt vom Ethanol erkennen zu können. Der Leerwert bestand aus 100 µl Kulturmedium.

Die Zelllinie H82 wurde mit folgenden Konzentrationen behandelt: 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM und 6,25 µM Indometacin sowie 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM, 0,03125 mM und 0,015625 mM IBMX. Die Kontrolle bestand in diesem Fall aus 80 µl Zellsuspension mit 844.000 Zellen pro ml und 20 µl Alkoholkontrolle mit einer Konzentration von 5 % Ethanol. Im Gesamtvolumen von 100 µl ergab sich hier also eine Alkoholkonzentration von 1 %. Die weitere Kontrolle ohne Alkohol und der Leerwert wurden hier genauso wie bei den oben beschriebenen Zelllinien durchgeführt.

Jede Kombination der beiden Medikamente in den unterschiedlichen Konzentrationen wurde pro Versuch vierfach getestet ($n = 3$), so dass sich jeder Messpunkt aus 12 Einzelwerten zusammengesetzte.

3.2.7 Statistische Analyse

Für die Versuche „Vergleich des Proliferationsverhaltens in Kulturmedium und NID“ und die elektronenmikroskopische Analyse wurden die statistisch signifikanten Unterschiede der Mittelwerte durch einen ungepaarten t -Test nachgewiesen und als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war. Dafür wurde vorausgesetzt, dass die Daten normalverteilt waren und gleiche Varianzen hatten. Für die Versuche „Einfluss der einzelnen Bestandteile des NID auf die Proliferation“ und „Behandlung mit Indometacin und IBMX (mod. NID)“ wurde ein One-Way-ANOVA und anschließend ein Bonferroni's Multiple Comparison Test durchgeführt. Alle graphisch dargestellten Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM (Standardfehler des Mittelwertes) aufgeführt.

3.2.8 Elektronenmikroskopische Analyse

Um morphologische Veränderungen der Zellen nach der Einwirkung von NID darstellen zu können, wurden alle fünf Zelllinien jeweils für 72 h in Kulturmedium und in NID kultiviert und anschließend für die Elektronenmikroskopie fixiert. Dafür wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend mit 3%igem Glutaraldehyd aufgeschwemmt und drei Tage darin fixiert. Nach 72 h wurde das Glutaraldehyd abpipetiert, die Zellen in PBS gewaschen, anschließend wieder in PBS aufgeschwemmt und bis zur Einbettung in Kunststoff im Kühlschrank aufbewahrt. Die Entwicklung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde freundlicherweise von Frau Schäfer, Allgemeine Anatomie, durchgeführt.

Für die graphische Darstellung wurden pro Zelllinie mindestens 100 unbehandelte und 100 mit NID behandelte Zellen ausgezählt und bestimmt, ob diese tot oder lebendig waren. Als Kriterien für tote Zellen wurden eine beschädigte Zellmembran, Kondensation des Chromatins und Auflösung des Zellkerns in eine Vielzahl von Fragmenten herangezogen [Motyl *et al.*, 1998]. Die Anzahl der lebendigen bzw. toten Zellen wurde zur Gesamtzahl der ausgezählten Zellen pro Versuchsansatz ins Verhältnis gesetzt. Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

3.2.9 Immunhistochemische Analyse

3.2.9.1 Herstellung der Zytospins

Zur Herstellung der Zytospins wurden ca. 20 ml Zellsuspension je Zelllinie in ein 30 ml Weißkappenröhrchen pipettiert und anschließend für 10 Minuten bei 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 8 ml PBS resuspendiert. Es wurde ein Objektträger in eine Spannplatte eingelegt und darauf mit einem Spannring ein Cytobecher befestigt. Aus der Zellsuspension wurden je nach Zelllinie zwischen 100 und 200 µl in den Cytobecher auf dem Objektträger pipettiert. Anschließend wurden immer sechs Objektträger für drei Minuten bei 1500 U/Min in einer Universal 32 R Hettich Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. So wurde gewährleistet, dass sich die Zellen gleichmäßig und in einer Schicht auf dem Objektträger anhefteten. Die Objektträger wurden für 24 h bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und anschließend bei -80 °C tief gefroren.

3.2.9.2 Färbung der Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase 1 (COX-1) und COX-2 wurden an den kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien SW2 und H82 immunhistochemisch nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente die Kolonkarzinomzelllinie HT29, die bekanntermaßen COX-2 und COX-1 exprimiert [Strillacci *et al.*, 2006; Lev-Ari *et al.*, 2006]. Dafür wurden zunächst drei Zytospins der jeweiligen Zelllinie für 30 Minuten bei RT luftgetrocknet und dann 20 Minuten mit 4 % PFA unter dem Abzug fixiert. Anschließend wurden die Spins 3 mal 5 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Nachdem die unspezifischen Bindungen mit Esel Normalserum in einer Verdünnung von 1:10 für 30 Minuten bei RT blockiert wurden, wurden die Zellen ohne noch einmal zu waschen mit den primären Antikörpern COX-1 und COX-2 in einer Konzentration von 1:20 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaliger Spülung für jeweils fünf Minuten mit TBS (pH 7,6) folgte eine 30 minütige Inkubation bei RT mit dem biotinilierten sekundären Antikörper (Esel anti Ziege) in einer Verdünnung von 1:200. Für die Verdünnung des Normalserums, des primären und sekundären Antikörpers und des Ziegen IgG wurde jeweils *Antibody Diluent with background reducing components* verwendet. Nach erneuter dreimaliger Spülung mit TBS-Puffer (pH 7,6) für jeweils fünf Minuten wurden die Zellen für 30 Minuten bei RT mit dem *Alkaline Phosphatase Standard ABC-Kit* inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Spülung mit TBS-Puffer (pH 7,6) wurde die

Aktivität der Alkalischen Phosphatase mit Neufuchsin nachgewiesen. Dafür wurden 10 ml einer 4 % Natriumnitritlösung mit 400 µl Neufuchsin gemischt und 80 mg Tetramisolhydrochlorid in 200 µl TBS (pH 8,24) gelöst und zur Neufuchsinlösung hinzugefügt. Anschließend wurden sofort 40 mg Naphtol-AS-Biphosphat in 1000 µl Dimethylformamid gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Zuletzt wurden 260 µl Tween 20 dazugegeben und gründlich geschwenkt. Die Zytospins wurden in dieser Lösung für 20 Minuten bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Ende der Entwicklungszeit wurde die Reaktion unter fließendem Leitungswasser gestoppt (10 Minuten). Zuletzt wurden die Präparate mit Crystal Mount beschichtet und danach mit Clarion Mounting Medium mit einem Deckglas versehen. Um die Spezifität des immunhistochemischen Nachweises zu gewährleisten, wurde für jede der drei Zelllinien eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der jeweils der primäre Antikörper weggelassen wurde. Zusätzlich wurde eine Isotypen-Kontrolle durchgeführt, bei der die Zellen statt mit dem primären Antikörper mit Ziegen IgG inkubiert wurden. So wurde gewährleistet, dass der sekundäre Antikörper nur an COX-2 und nicht unspezifisch an Ziegen IgG gebunden hat. Bei keiner der Negativ- oder Isotypenkontrollen konnte eine unspezifische Bindung festgestellt werden. Die Präparate wurden unter einem Photomikroskop bei 40-facher Vergrößerung betrachtet, die Antikörperbindung beurteilt und Photographien angefertigt.

3.2.10 Proteinbiochemie

3.2.10.1 Isolierung der Proteine aus den Zellen

Zunächst wurden für die beiden kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien SW2 und H82 und für die Kolonkarzinomzelllinie HT29 eine Zellkulturflasche angelegt und diese so lange inkubiert, bis die Flaschen gut gefüllt waren. Anschließend wurden die Suspensionszellen in 30 ml Weißkappenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 1500 U/Min zentrifugiert, dann der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit eiskaltem PBS resuspendiert und das Röhrchen sofort auf Eis gestellt. Zu den adhären wachsenden HT29-Zellen wurde 1 ml eiskaltes PBS in die Flasche gegeben und anschließend die Zellen mit einem Zellschaber zusammen geschoben. Das Zellpellet wurde in ein Weißkappenröhrchen überführt und sofort auf Eis gelagert.

Die Proben wurden 2 Minuten bei 1000 x g bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 200 µl *low salt Buffer*, der vor Gebrauch mit 1 % Protease Inhibitor Cocktail Set I versetzt wurde, resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10 Minuten auf Eis, wurden die Proben für 30 Minuten bei 7000 x g und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die zytoplasmatischen Proteine.

3.2.10.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford [Bradford, 1976]. Dazu wurde zunächst mit 30 ml der *Bradford Stock Solution*, 425 ml Aqua destillata (*aqua dest.*), 15 ml 95 % Ethanol und 30 ml 88 % Phosphor Säure ein *Bradford Working Buffer* hergestellt. Zunächst wurde eine Standardkurve erstellt. Dazu wurde mit einem Albumin Standard eine Verdünnungsreihe von 20 µg/ml bis 180 µg/ml hergestellt. Für die Verdünnung diente *aqua dest.*. Die Verdünnungen wurden mit 1 ml Bradford Working Buffer versetzt, 10 Minuten inkubiert und anschließend die Optische Dichte (OD) bei 595 nm mit einem Photometer gemessen (Abb. 3.2). Als Leerwert diente *aqua dest.* Die zu messenden Proteinlösungen wurden in einem Volumen von 100 µl 1:10 verdünnt, mit 1 ml Bradford Working Buffer versetzt und für 10 Minuten inkubiert. Nach der Bestimmung der OD bei 595 nm konnte anhand der Standardkurve die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt werden.

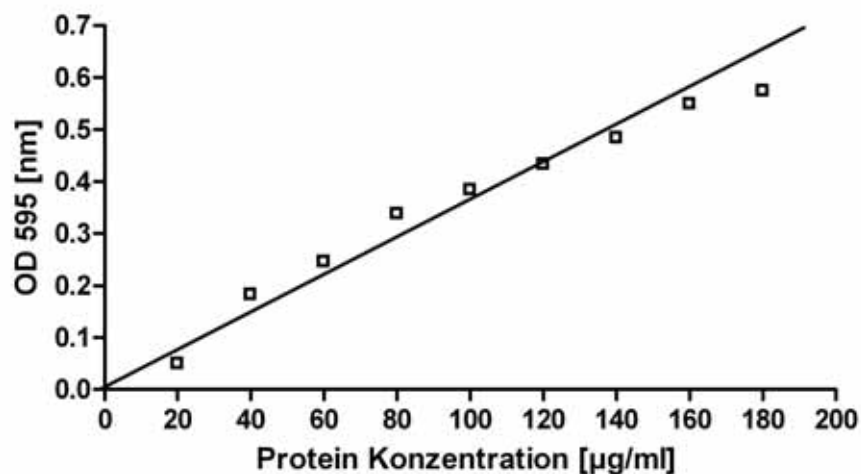


Abb.: 3.2 Bradford Standard Kurve. Aufgeführt ist die OD bei neun verschiedenen Proteinkonzentrationen. Der Regressionsquotient beträgt 0,9693.

3.2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinlösungen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese mit Hilfe des Mini-Protean 3 Cell. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel waren wie folgt:

Trenngel (7 %) mit einer Dicke von 1,00 mm:

5,1 ml *aqua dest.*
2,3 ml Acrylamid 30 %
2,5 ml Tris-Buffer 1,5 M ; pH 8,8
0,1 ml 10 % SDS
50 µl 10 % APS
5 µl TEMED

Sammelgel (4 %) mit einer Dicke von 1,00 mm

6,1 ml *aqua dest.*
1,3 ml Acrylamid 30 %
2,5 ml Tris-Buffer 0,5 M; pH 6,8
0,1 ml 10 % SDS
50 µl 10 % APS
10 µl TEMED

Die Proben Taschen wurden durch Einstecken eines Kammes in das noch flüssige Sammelgel geschaffen. Pro Tasche wurde eine Proteinmenge von 40 µg aufgetragen. Dazu wurden die Proteinlösungen mit reduzierendem Ladepuffer, der aus 95 % Sample Buffer und 5 % Mercaptoethanol hergestellt wurde, auf ein Gesamtvolumen von 40 µl verdünnt und für fünf Minuten bei 95 °C im Thermoblock erhitzt. Nach Zusammenbau der Elektrophoresekammer und Auffüllen mit Running Buffer wurden die Proben mit Hilfe von Gelloader Tips in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 60 V bei 400 mA für 15 Minuten, dann wurde die Spannung für weitere 50 Minuten auf 150 V erhöht. Als Proteinmarker wurden 10 µl des *full range rainbow molecular weight marker* verwendet.

3.2.10.4 Western-Blot

Für den Proteintransfer aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Mini Trans-Blot Cell verwendet. Nachdem die Fiberpads, das Filterpapier und die Nitrozellulosemembran für mindestens 15 Minuten in Transferpuffer getränkt worden waren, wurde das Blot-Sandwich (Fiber pad, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Fiber pad) luftblasenfrei zusammengesetzt, wobei die Nitrozellulosemembran zur Anode und das Gel zur Kathode gerichtet war. Nach Einsetzen des Blot-Sandwiches und des Kühlaggregates in die Mini-Trans-Blot-Apparatur wurde noch ein Rührfisch ergänzt und das Blotsystem mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte bei 60 V für 20 Minuten und anschließend bei 100 V für eine Stunde. Das Blotsystem befand sich während des Transfers auf einem Magnetrührer um ein zu starkes Erhitzen des Systems zu verhindern.

3.2.10.5 Färbeverfahren

Nachdem der elektrophoretische Transfer beendet war, wurde die proteintragende Nitrozellulosemembran für 30 Minuten bei RT mit Blocking Buffer geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in Blocking Buffer 1:500 verdünnten primären anti-COX-2 Antikörper (Maus-monoklonal) auf dem Rollboard über Nacht bei 4°C. Nach achtmaligem Waschen für drei Minuten mit TBS-Puffer wurde die Membran mit dem in Blocking Buffer 1:1000 verdünnten sekundären Antikörper (Kaninchen anti Maus) eine Stunde bei RT auf dem Rollboard inkubiert. Nach erneutem achtmaligem Waschen für jeweils drei Minuten mit TBS-Puffer wurde die Membran für 30 Minuten mit POX ABC-Komplex bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder achtmal für jeweils drei Minuten mit TBS gewaschen. Die Entwicklung erfolgte für 30 Sekunden im abgedunkelten Raum mit Hilfe der Entwicklungslösung. Danach wurde die Reaktion sofort mit *aqua dest.* gestoppt und die Membran eingeschweißt.

3.2.11 Elektrophysiologische Analyse

3.2.11.1 Beschichtung der Kulturschälchen

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden SW2-Zellen auf Poly-D-Lysin-beschichtete Petrischalen gesetzt. Dafür wurden die Petrischalen mit langkettigem Poly-D-Lysin (Mr. 70000-150000) für 20 Minuten inkubiert. Dann wurde das Poly-D-Lysin abgesaugt und die Petrischalen unter der Werkbank getrocknet. Die SW2-Zellen wurden entweder in Kulturmedium auf die Schalen ausgesät oder in NID und für ca. 72 h im Brutschrank inkubiert.

3.2.11.2 Elektrophysiologische Messungen

Zur Untersuchung des Einflusses von NID auf die Ausbildung von erg-K^+ -Strömen wurden die SW2-Zellen mit der Patch-Clamp-Technik [Hamill *et al.*, 1981] nach folgendem Protokoll gemessen:

Die Zellen wurden zunächst auf ein Haltepotenzial von -20 mV geklemmt. Danach wurde ein Puls für 2 Sekunden auf +20 mV appliziert, bei dem die erg-K^+ -Kanäle sowohl aktivieren, als auch inaktivieren. Anschließend wurde wieder auf -20 mV gesprungen, um andere Kanäle, welche die Ableitung behindern würden, zu inaktivieren. Im nächsten Pulsprotokollschritt wurden die Zellen auf 19 verschiedene Testpulse geklemmt (von 40 bis -140 mV, 10 mV Intervall) (Abb. 3.3). Der erg-K^+ -Einwärtsstrom zeigte sich bei diesem Protokoll durch seinen bekannten, rundlichen „Haken“. Der „Haken“ basiert darauf, dass bei der Erholung aus der Inaktivierung zunächst eine Zunahme des Stromes auftritt, gefolgt von einer langsamen Deaktivierung (siehe Abb. 4.48).

Die elektrophysiologischen Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Günter Glassmeier aus dem Institut für Physiologie vorgenommen.

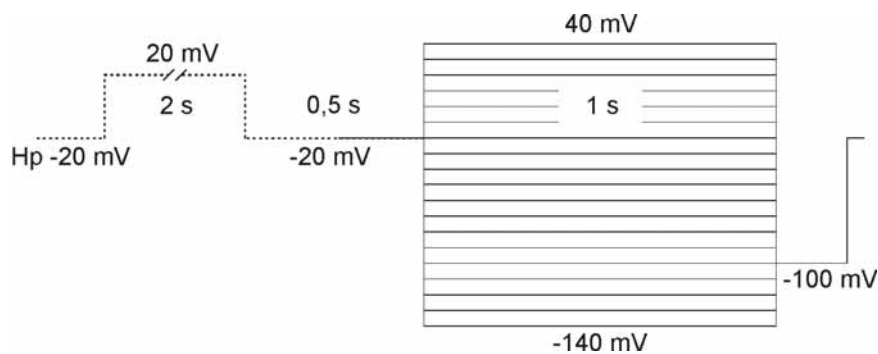


Abb.: 3.3 Schema des Pulsprotokolls für die Deaktivierungskinetik von erg K^+ -Kanälen. Die aktivierten Ströme bei den gestrichelten Testpulsen wurden nicht aufgezeichnet.

Für die Messungen wurde ein EPC-9 Patch-Clamp Verstärker (HEKA Elektronik) verwendet. Genauere Beschreibung siehe Glassmeier *et al.*, 1997. Die extrazelluläre Ringerlösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM): NaCl 140, KCl 5, MgCl_2 0,8, CaCl_2 1, HEPES 10, Glukose 5, pH 7,4 (NaOH).

Extrazelluläre 40 mM K^+ -Lösung (in mM): NaCl 100, KCl 40, MgCl_2 2, CaCl_2 1, HEPES 10, Glukose 5, pH 7,35 (NaOH). Tetrodotoxin (TTX) wurde von Biotrend und E-4031 von Eisai (Japan) besorgt.

Intrazelluläre Pipettenlösung (in mM): KCl 140, MgCl_2 2, CaCl_2 1, HEPES 10, EGTA 2,5, pH 7,3 (KOH). Die freie Ca^{2+} -Konzentration betrug 66 nM (EQCAL, Biosoft).

4 Ergebnisse

4.1 Zellproliferationsversuche

4.1.1 Vergleich des Proliferationsverhaltens in Kulturmedium und NID

Für die Untersuchungen wurden alle Zelllinien in Zellkultur für 72 h mit NID (Indometacin (200 μ M), IBMX (0,5 mM) und Insulin (5 μ g/ml)) behandelt und die proliferationshemmende Wirkung des NID auf die Zellen untersucht.

Das NID hatte auf alle untersuchten Zelllinien einen hochsignifikanten proliferationshemmenden Effekt ($p < 0,0001$) (Abb. 4.1). Die Proliferation der OH1-, OH3- und H69-Zellen wurde verglichen mit der Kontrolle um mehr als 50 % reduziert (Abb. 4.1 A-C). Bei den SW2- und H82-Zellen war der Effekt noch sehr viel größer. Es zeigte sich eine Verminderung der Proliferation um mehr als 80 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.1 D-E).

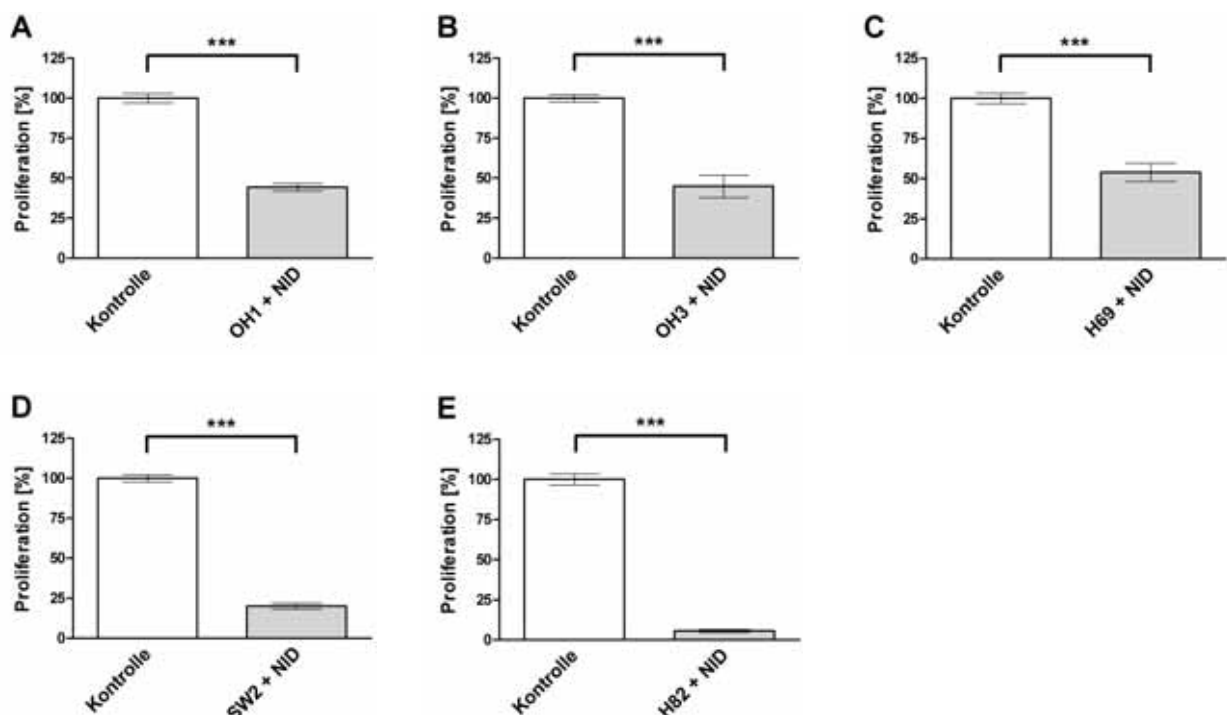


Abb. 4.1: Einfluss von NID auf das Proliferationsverhalten der kleinzelligen Bronchialkarzinome. Zu erkennen ist der hochsignifikante proliferationshemmende Effekt auf OH1 (A), OH3 (B), H69 (C), SW2 (D) und H82 (E). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 12$, t -Test: *** $p < 0,0001$.

4.1.2 Einfluss der einzelnen Bestandteile des NID auf die Proliferation

In der Untersuchung wurden alle untersuchten Zelllinien mit den einzelnen Bestandteilen des NID behandelt. Dabei wurden jeweils dieselben Konzentrationen wie in dem unter 4.1.1 beschriebenen Versuch verwendet. Zusätzlich wurden jeweils 50 % und 25 % der Ausgangskonzentration getestet.

4.1.2.1 OH1-Zellen

Die Einzelbehandlung der OH1-Zellen mit Indometacin (Abb. 4.2 A), IBMX (Abb. 4.2 B) und Insulin (Abb. 4.2 C) hatte nur im Fall von Indometacin einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt auf die OH1-Zellen. Hier zeigte sich bei einer Konzentration von 200 μ M eine hochsignifikante Hemmung der Proliferation auf 50 % der Kontrolle (Abb. 4.2 A).

Durch Kombination von Indometacin und IBMX wurde ebenfalls das Wachstum der OH1-Zellen gehemmt (Abb. 4.2 D-F). Bei Gabe von Indometacin in der Dosis 200 μ M plus IBMX wurde es in den Dosen 0,125 mM und 0,25 mM auf 50 % der Kontrolle (Abb. 4.2 D, E) und bei Gabe von 200 μ M Indometacin plus 0,5 mM IBMX auf 40 % der Kontrolle (Abb. 4.2 F) gesenkt.

Die kombinierte Behandlung mit allen drei Stoffen bei einer Insulinkonzentration von 1,25 μ g/ml (Abb. 4.3 A-D) zeigte eine dosisabhängige Inhibition des Wachstums. Die Hemmung der Proliferation lag bei der Indometacin Konzentration von 50 μ M etwa bei 75 %, bei 100 μ M etwa bei 70 % und bei 200 μ M etwa bei 50 % der Kontrolle. Dies war bei allen IBMX Konzentrationen der Fall.

Bei Zugabe von Insulin in der Konzentration 2,5 μ g/ml (Abb. 4.4 A-D) war ebenfalls ein dosisabhängiger wachstumshemmender Effekt zu beobachten. Die maximale Hemmung lag bei 50 % der Kontrolle durch Zugabe von 200 μ M Indometacin bei allen IBMX Konzentrationen. Im Vergleich zur Behandlung mit 1,25 μ g/ml Insulin hemmten hier auch IBMX und Insulin alleine (Abb. 4.4 D) die Proliferation der OH1-Zellen auf etwa 60 % der Kontrolle.

Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung mit Indometacin, IBMX und Insulin in der Dosis 5 μ g/ml (Abb. 4.5 A-D) ähneln denen der Zugabe von 2,5 μ g/ml Insulin.

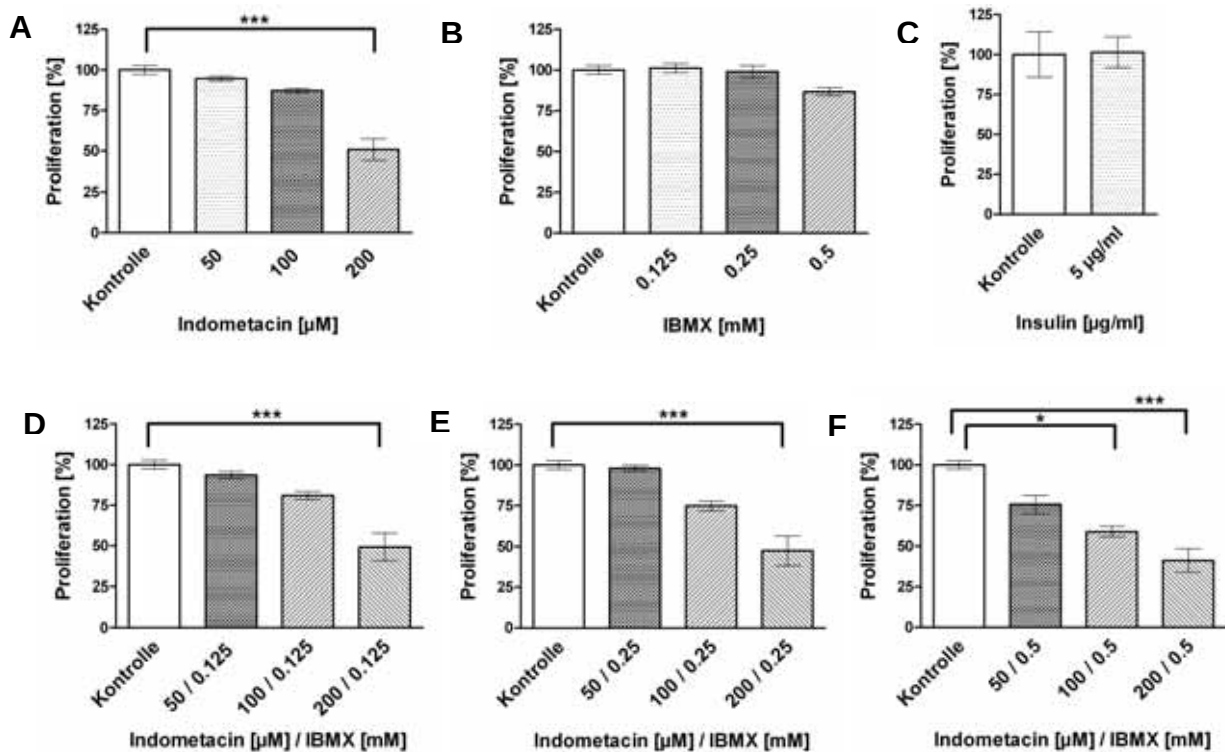


Abb. 4.2: Behandlung von OH1-Zellen mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 µg/ml). Aufgeführt ist das Zellwachstum unter Behandlung mit Indometacin (A), IBMX (B) und Insulin (C) und unter Kombination von Indometacin und IBMX (D-F). Zu erkennen ist der signifikante proliferationshemmende Effekt der Einzelbehandlung mit Indometacin (200 µM) (A). Die einzelne Behandlung mit IBMX (B) und Insulin (C) hatte keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der OH1-Zellen. Nach Kombinationsbehandlung mit Indometacin und IBMX (D-F) wurde der gleiche proliferationshemmende Effekt wie bei der Einzelbehandlung mit Indometacin beobachtet (A). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

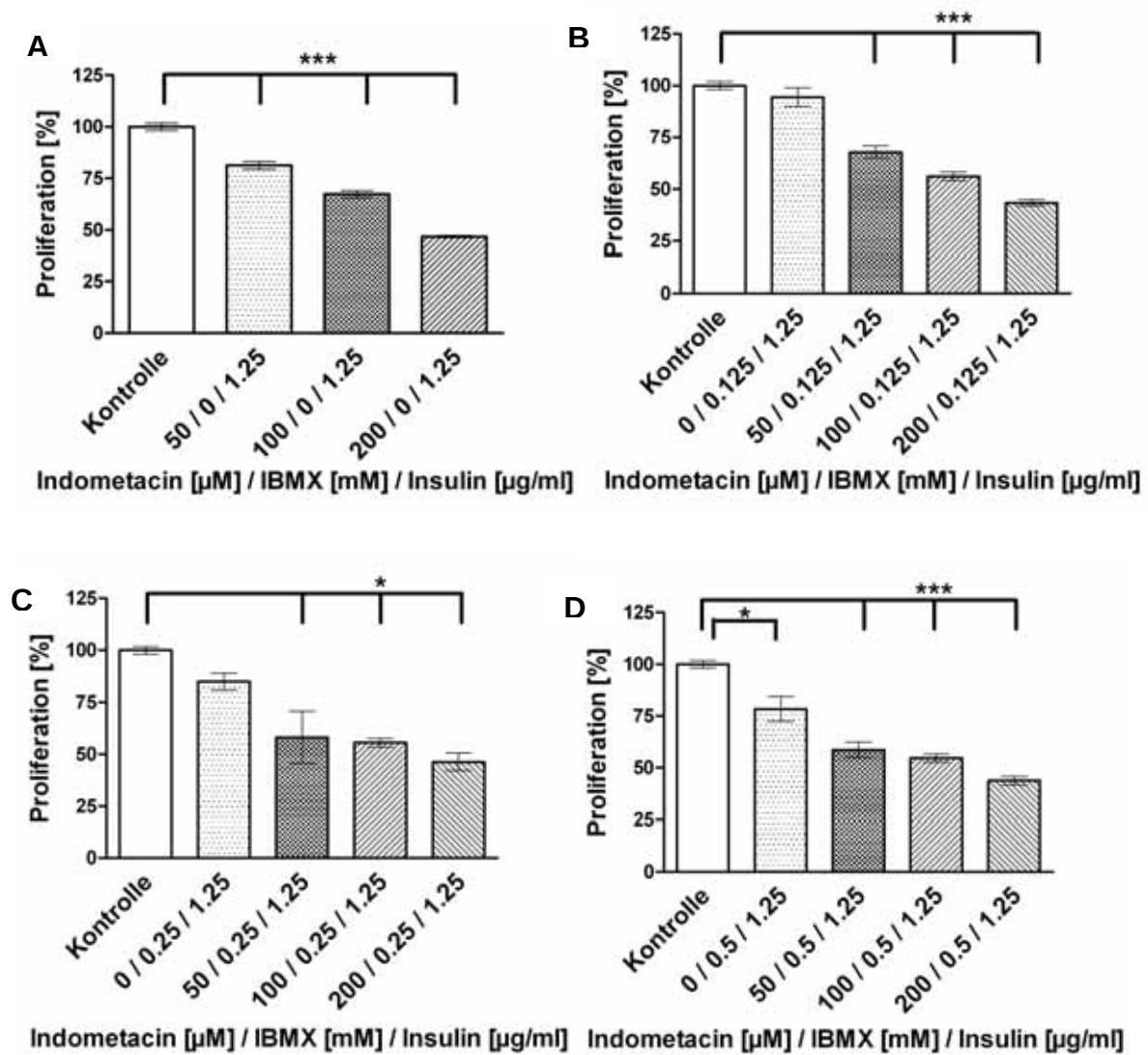


Abb. 4.3: Behandlung von OH1-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (1,25 μg/ml). Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM, n = 6, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

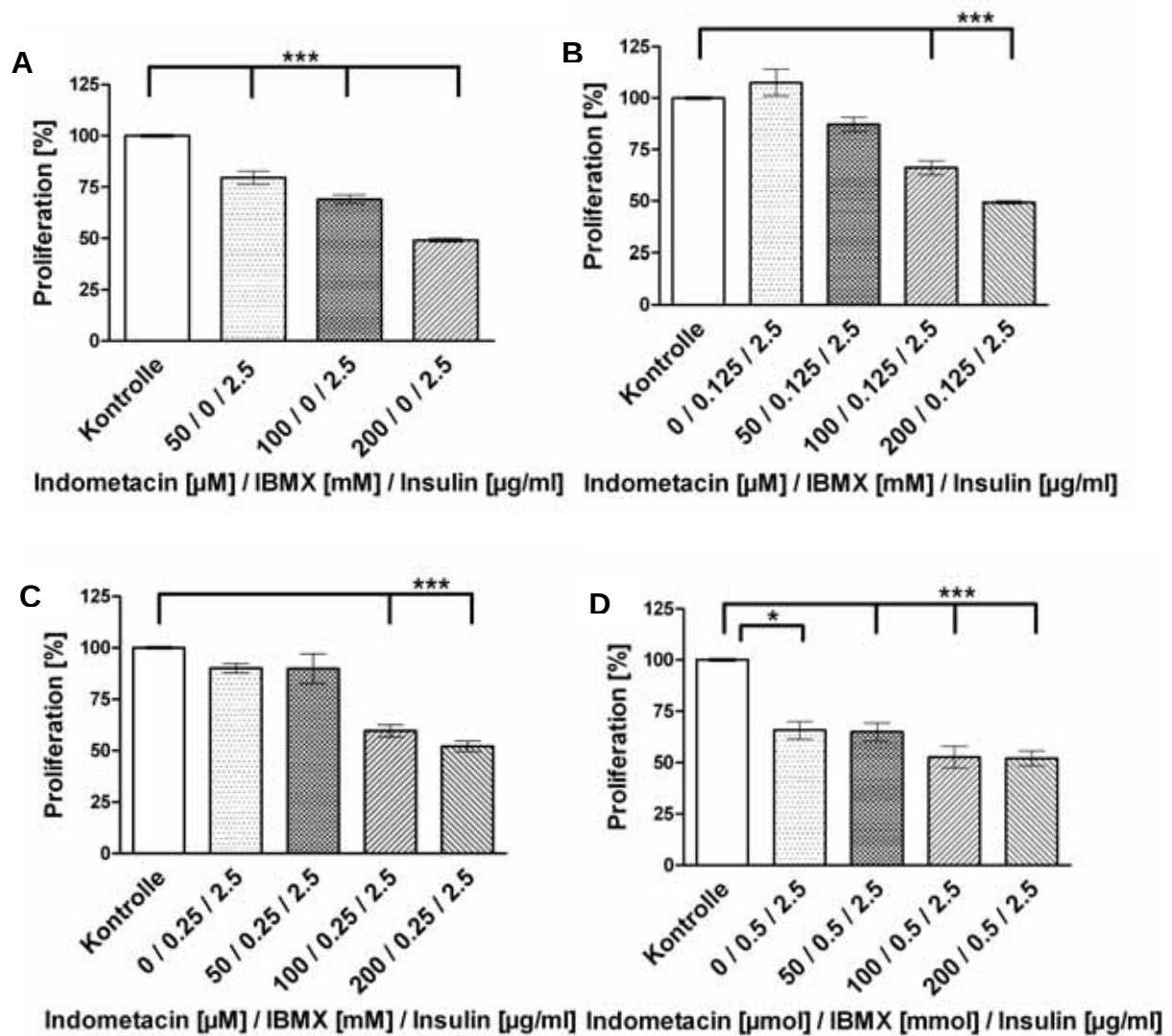


Abb. 4.4: Behandlung von OH1-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (2,5 $\mu\text{g/ml}$). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

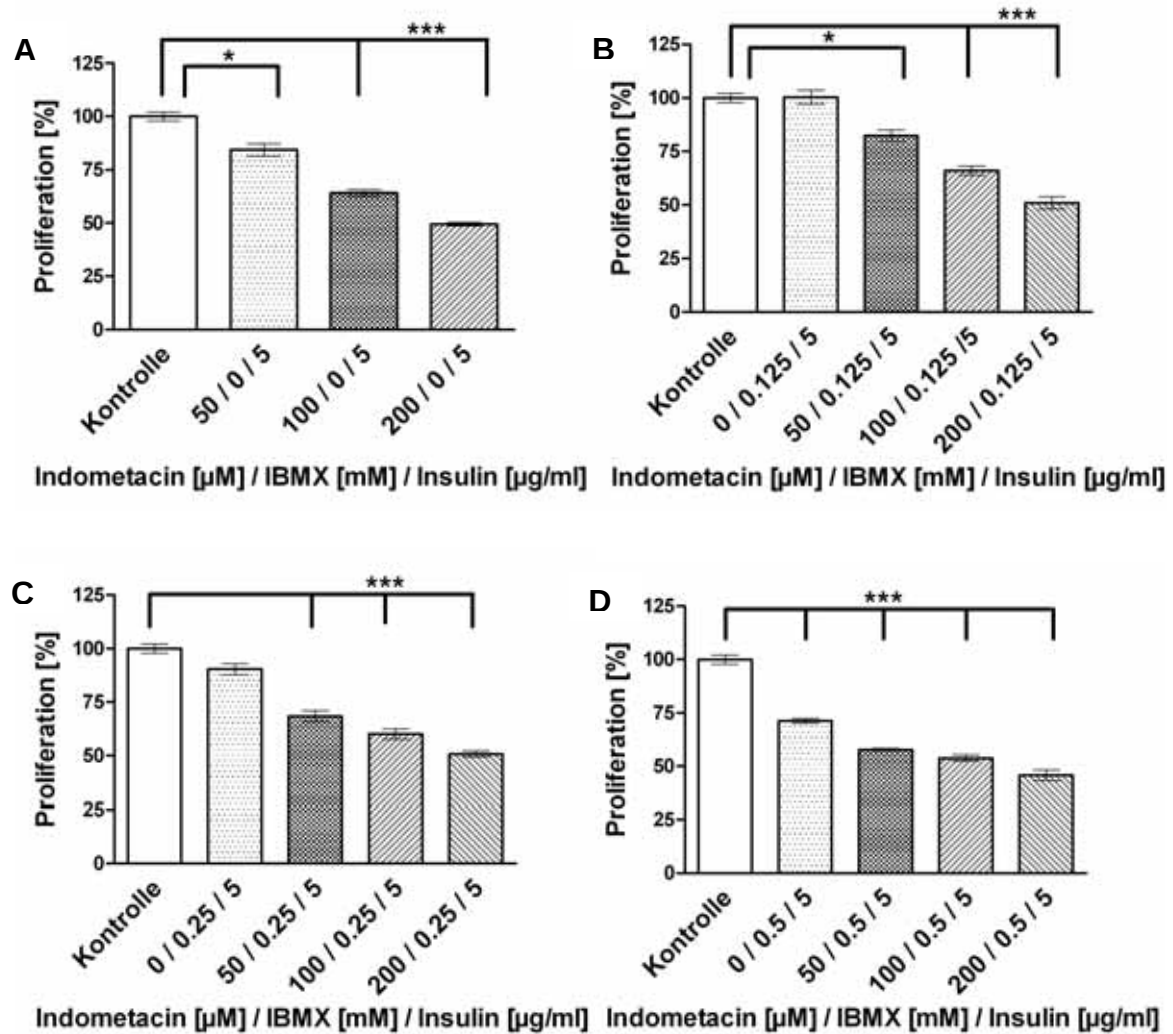


Abb. 4.5: Behandlung von OH1-Zellen mit Indometacin (50-200 μ M), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 μ g/ml). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

Zur besseren Übersicht wurden die oben beschriebenen Ergebnisse noch einmal in einer zusammenfassenden 3-D-Graphik dargestellt (Abb. 4.6). Die Abb. 4.6 A zeigt die Behandlung ohne Insulin, Abb. 4.6 B mit 1,25 µg/ml Insulin, Abb. 4.6 C mit 2,5 µg/ml Insulin und Abb. 4.6 D mit 5 µg/ml Insulin. Erkennbar ist, dass Indometacin in der höchsten Konzentration (Abb. 4.6 A) schon ohne Zugabe von IBMX eine Proliferationshemmung auf 50 % der Kontrolle verursachte. Die Kombination mit IBMX hat nur in Abb. 4.6 A einen geringen zusätzlichen Effekt, hier wird die Proliferation auf ca. 40 % der Kontrolle gehemmt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wachstumsinhibition hauptsächlich durch Indometacin und zu einem geringen Anteil auch von IBMX verursacht wurde. Insulin hat keinen Anteil an der Proliferationshemmung.

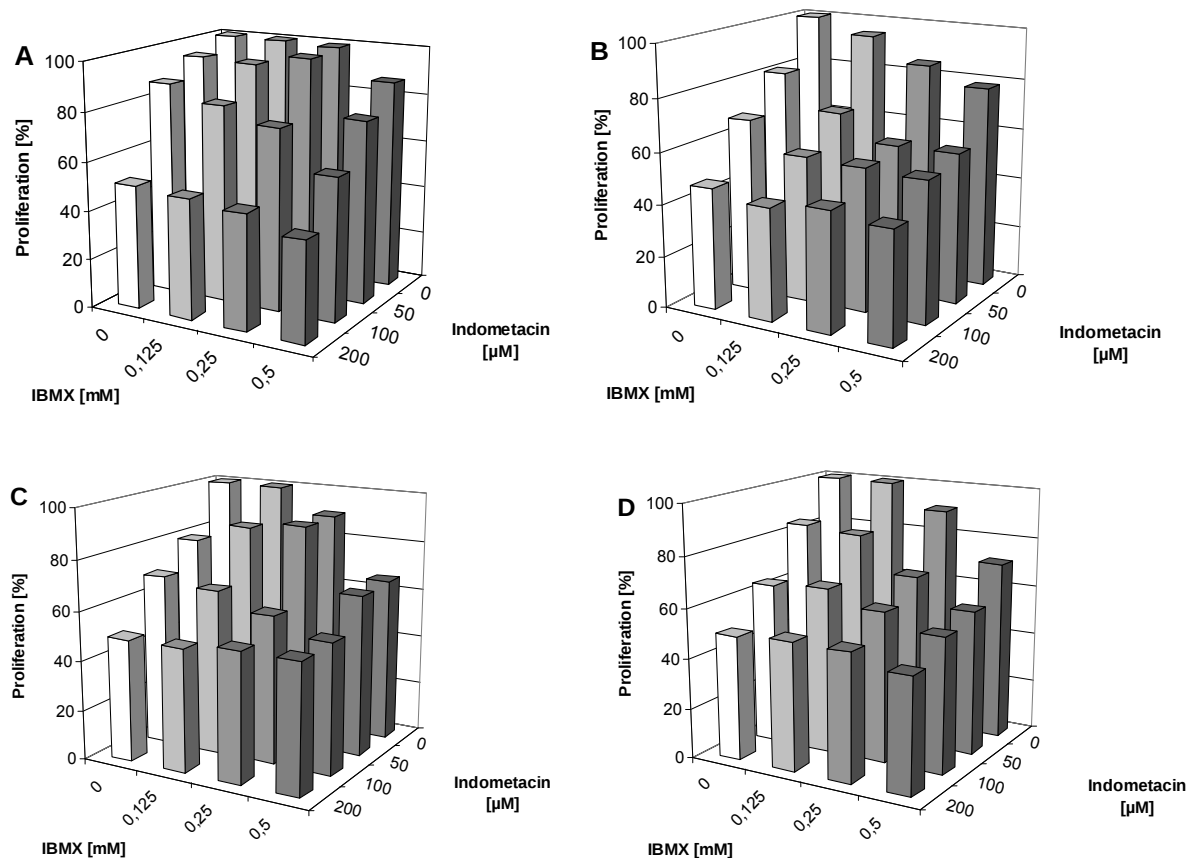


Abb. 4.6: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von OH1-Zellen mit Indometacin, IBMX und Insulin. Gezeigt ist jeweils die Behandlung mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und verschiedenen Insulinkonzentrationen (ohne Insulin (A), 1,25 µg/ml Insulin (B), 2,5 µg/ml Insulin (C) und 5 µg/ml Insulin (D)). Zu erkennen ist, dass die Proliferationshemmung ohne Insulin (A) bei kombinierter Gabe von Indometacin und IBMX am stärksten ist, wobei die Inhibition hauptsächlich durch Indometacin verursacht wurde. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

4.1.2.2 OH3-Zellen

Bei der Zelllinie OH3 ließ sich ein dosisabhängiger signifikanter proliferationshemmender Effekt von 200 μ M Indometacin auf ca. 50 % der Kontrolle feststellen (Abb. 4.7 A). Die einzelne Behandlung mit 0,5 mM IBMX bewirkte eine signifikante Hemmung der Proliferation auf 75 % der Kontrolle (Abb. 4.7 B). Die alleinige Zugabe von Insulin hatte keinen Einfluss auf die OH3-Zellen.

Durch die kombinierte Behandlung mit Indometacin und IBMX (Abb. 4.7 D-F) ließ sich die Wachstumsinhibition noch steigern. Bei der höchsten Dosis von IBMX (Abb. 4.7 F) reichte schon die Zugabe von 50 μ M Indometacin für eine hochsignifikante Proliferationshemmung auf 58 % der Kontrolle. Bei einer Indometacin-Konzentration von 100 μ M wurde eine Hemmung auf 56 % der Kontrolle erreicht und bei einer Dosis von 200 μ M konnte die Inhibition auf 35 % der Kontrolle gesteigert werden (Abb. 4.7 F).

Die kombinierte Behandlung mit allen drei Substanzen (Abb. 4.8 A-D) bewirkte eine Reduktion der Proliferation der OH3-Zellen. Allerdings war die Inhibition mit wenigen Ausnahmen ausschließlich bei der Zugabe von Indometacin in der höchsten Konzentration signifikant. Die maximale Hemmung lag bei der Insulinkonzentration von 1,25 μ g/ml bei ca. 50 % der Kontrolle (Abb. 4.8 A-D), bei einer Insulinkonzentration von 2,5 μ g/ml ebenfalls etwa bei 50 % der Kontrolle (Abb. 4.9 A-D) und bei der höchsten Insulinkonzentration lediglich bei 60-75 % der Kontrolle (Abb. 4.10 A-D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der antiproliferative Effekt bei der Zelllinie OH3 sowohl von Indometacin als auch von IBMX verursacht war und sich die beiden Stoffe in ihrer Wirkung addierten. So sorgte Indometacin alleine in der höchsten Dosis für eine Wachstumsinhibition auf ca. 60 % der Kontrolle (Abb. 4.7 A) und IBMX alleine in der höchsten Konzentration für eine Hemmung auf 70 % der Kontrolle (Abb. 4.7 B). In Kombination addierten sich diese Effekte auf eine Wachstumsinhibition von 35 % der Kontrolle (Abb. 4.7 F).

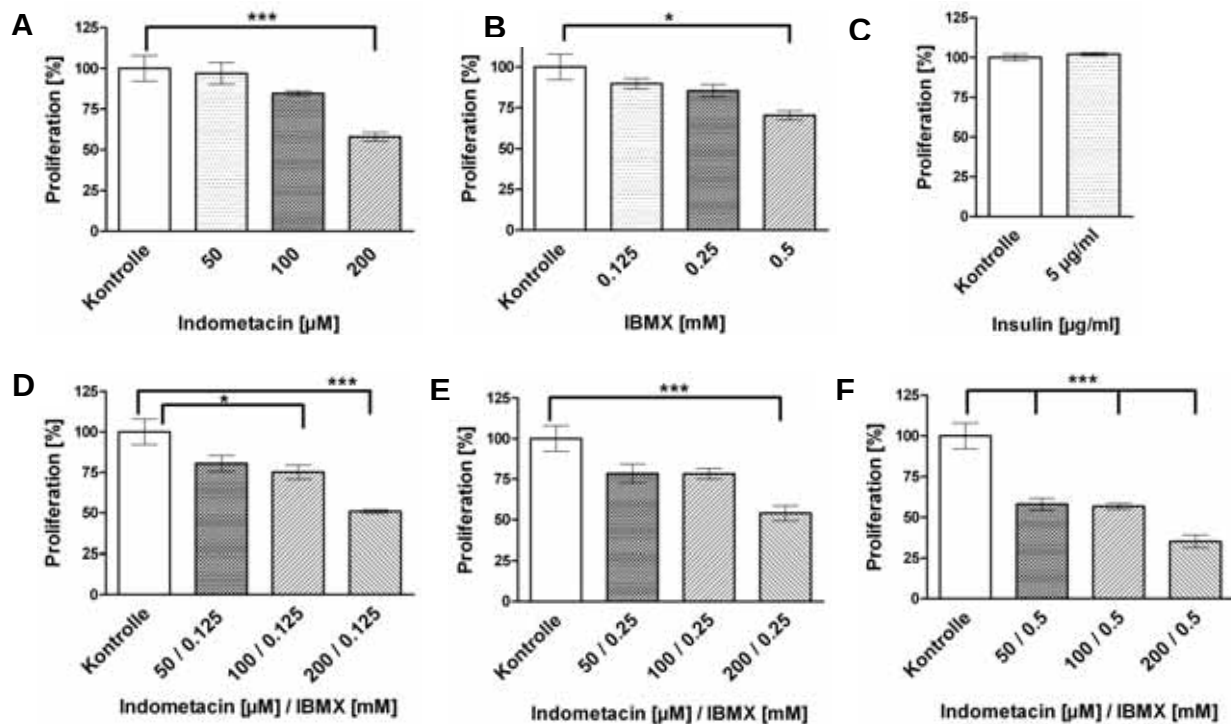


Abb. 4.7: Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 $\mu\text{g/ml}$). Aufgeführt ist das Zellwachstum unter Behandlung mit Indometacin (A), IBMX (B) und Insulin (C) und unter Kombination von Indometacin und IBMX (D-F). Zu erkennen ist der signifikante proliferationshemmende Effekt der Einzelbehandlung mit Indometacin (200 μM) (A) und mit IBMX (0,5 mM). Die einzelne Behandlung mit Insulin (C) hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der OH3-Zellen. Durch die Kombinationsbehandlung mit Indometacin und IBMX (D-F) ließ sich die Wachstumsinhibition im Vergleich mit der Einzelbehandlung (A+B) noch steigern. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

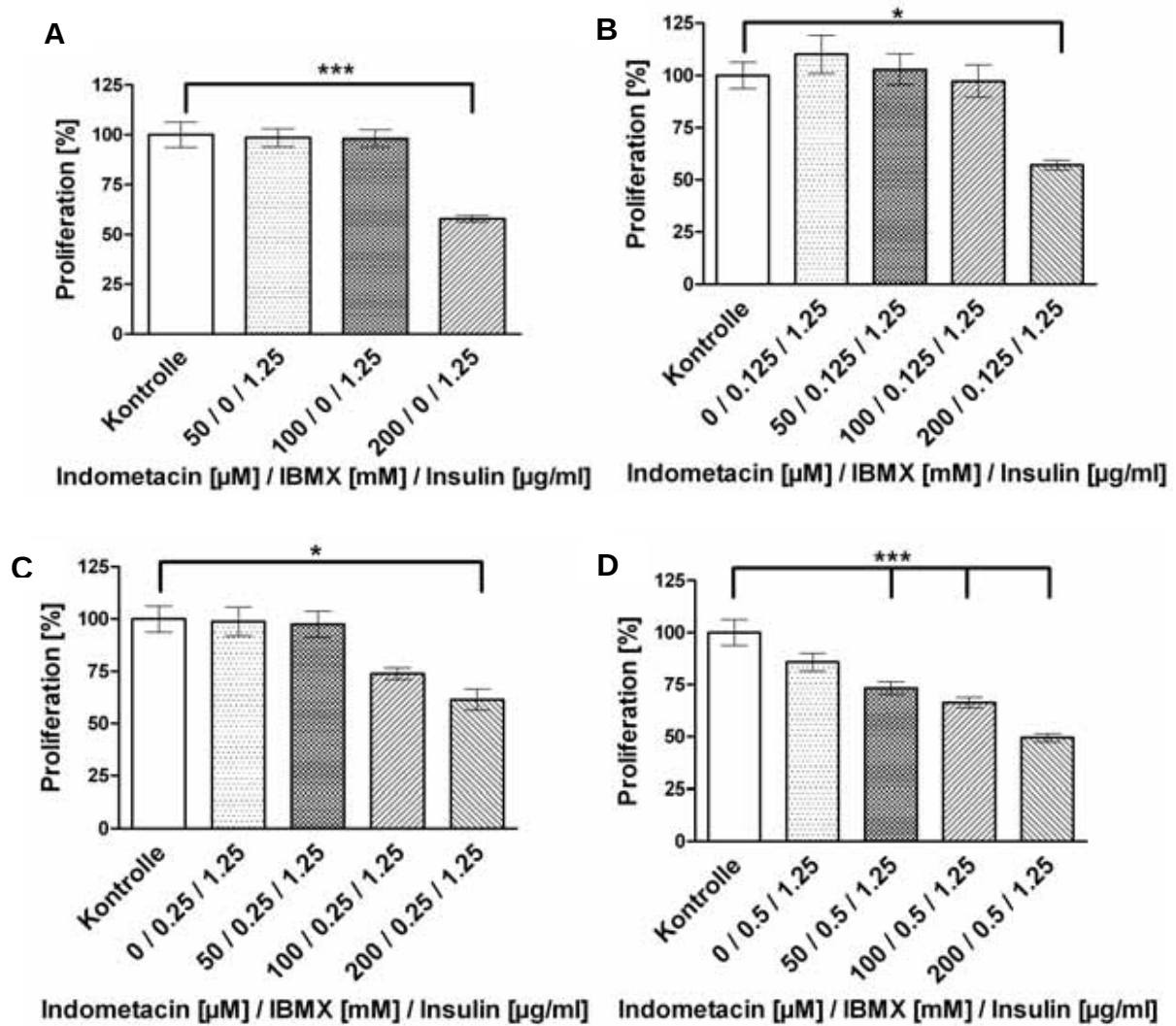


Abb. 4.8: Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin (50-200 μ M), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (1,25 μ g/ml). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

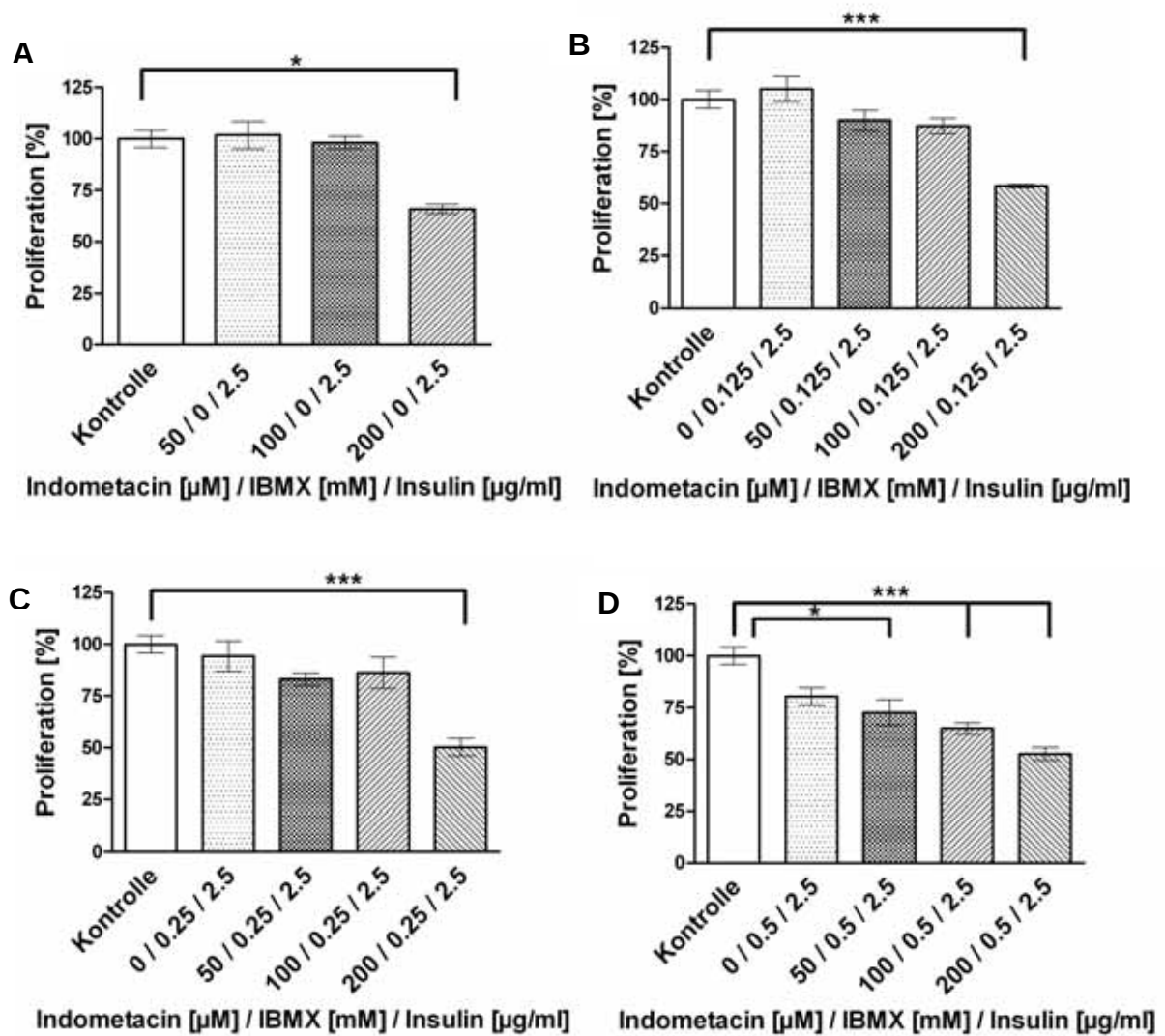


Abb. 4.9: Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin (50-200 μ M), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (2,5 μ g/ml). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

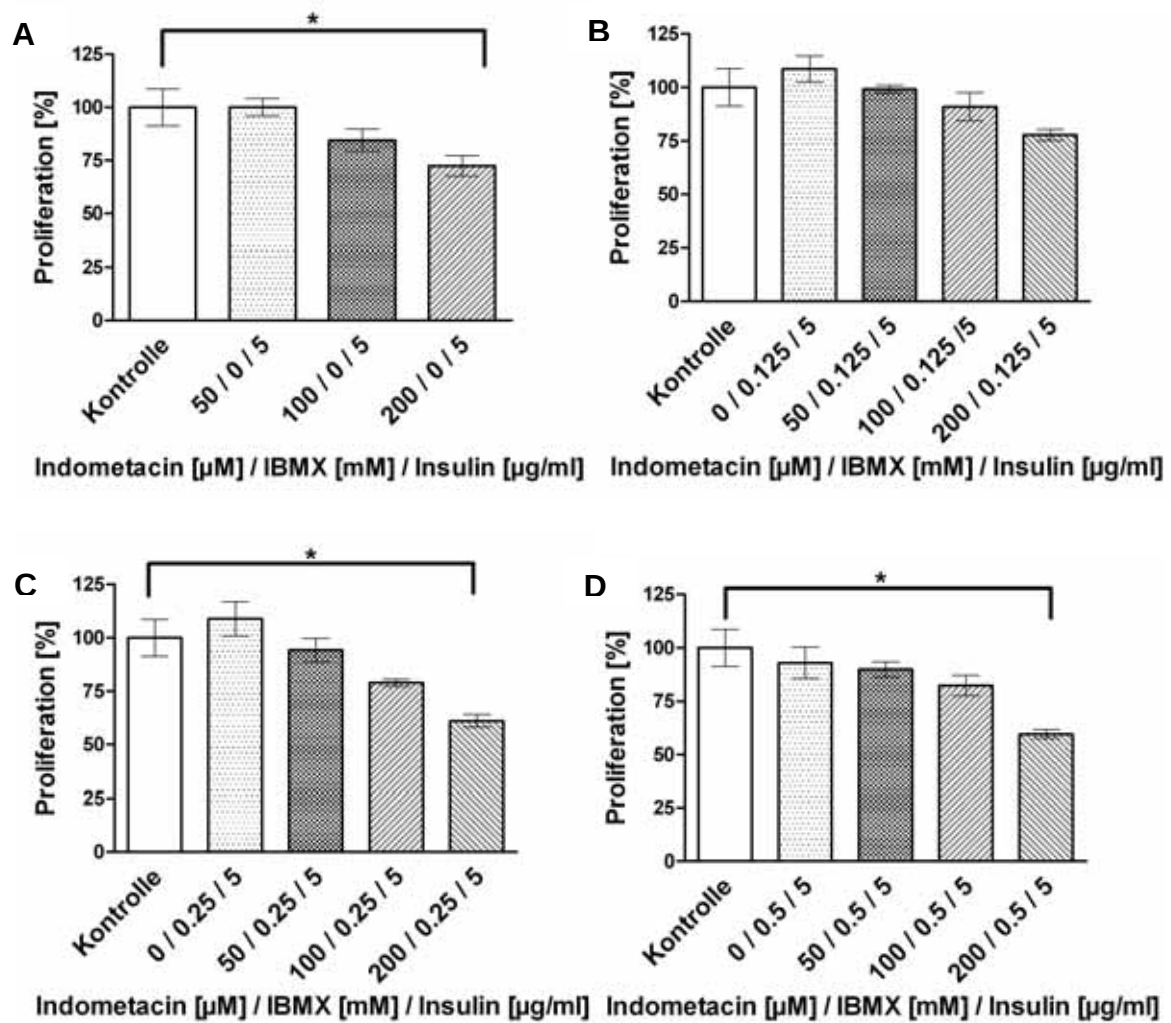


Abb. 4.10: Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin (50-200 μ M), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 μ g/ml). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

Anhand der zusammenfassenden 3-D Darstellung (Abb. 4.11) lässt sich der additive Effekt der beiden Substanzen Indometacin und IBMX verdeutlichen. Durch die alleinige Zugabe von Indometacin in der höchsten Konzentration wurde eine Wachstumsinhibition auf etwa 60 % der Kontrolle beobachtet (Abb. 4.11 A). Durch die einzelne Behandlung mit IBMX in der höchsten Konzentration wurde eine Hemmung der Proliferation auf 70 % der Kontrolle verursacht. Durch die Kombination der beiden Substanzen zeigte sich eine Gesamthemmung auf 35 % der Kontrolle. Das heißt, die IBMX-Hemmung von 30 % und die Indometacin-Hemmung von 40 % addierten sich zu 65 % Inhibition der Proliferation insgesamt.

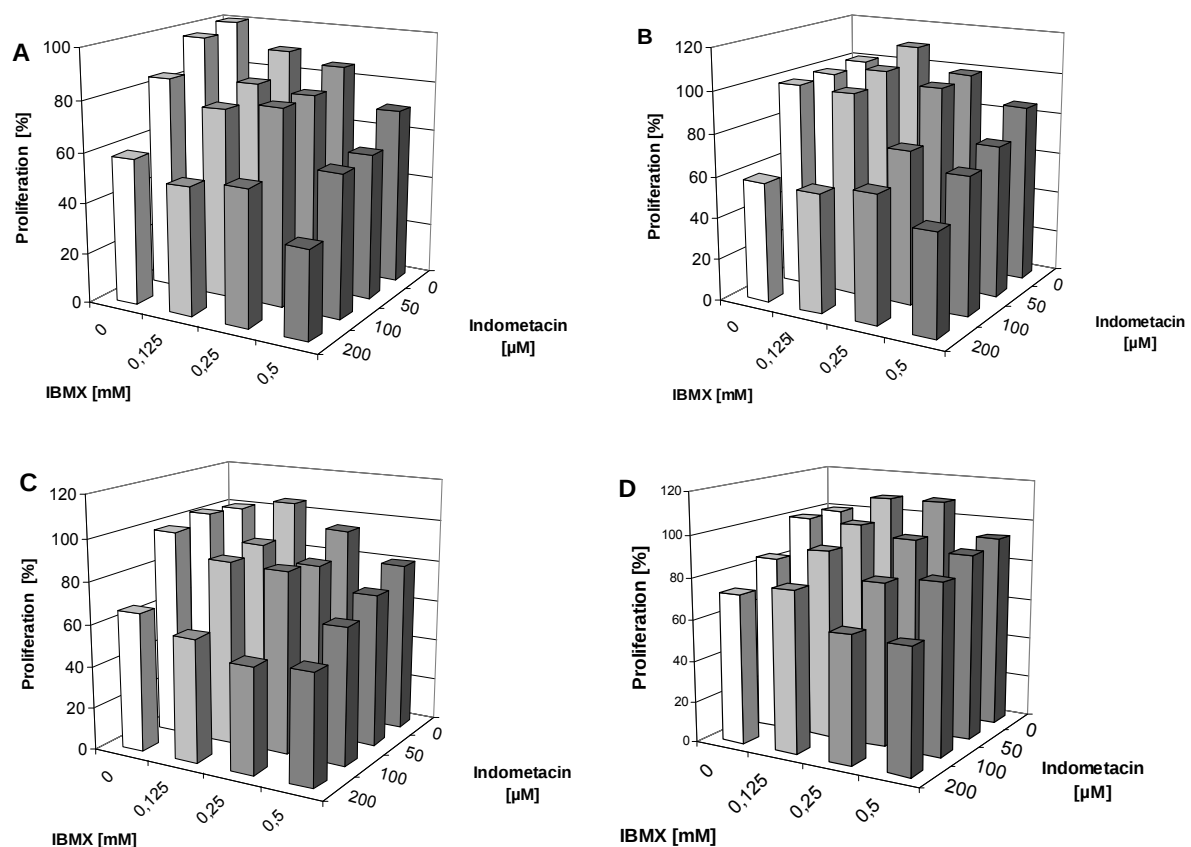


Abb. 4.11: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin, IBMX und Insulin. Gezeigt ist jeweils die Behandlung mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und verschiedenen Insulinkonzentrationen (ohne Insulin (A), 1,25 µg/ml Insulin (B), 2,5 µg/ml Insulin (C) und 5 µg/ml Insulin (D)). Zu erkennen ist, dass die Proliferationshemmung ohne Insulin (A) am stärksten ist und sich die proliferationshemmende Wirkung von Indometacin und IBMX addiert (A). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

4.1.2.3 H69-Zellen

Für die Behandlung der H69-Zellen mit Indometacin konnte eine signifikante dosisabhängige Inhibition des Wachstums festgestellt werden. Die Behandlung mit 100 μM erreichte eine Hemmung auf 86 % der Kontrolle und die höchste Dosis (200 μM) ergab eine Inhibition auf 75 % der Kontrolle (Abb. 4.12 A). Die Behandlung mit IBMX hemmte die Proliferation auf 80 % (0,25 mM) und ca. 70 % (0,5 mM) der Kontrolle (Abb. 4.12 B). Insulin zeigte auf die H69-Zellen weder einen proliferativen noch einen proliferationshemmenden Effekt (Abb. 4.12 C).

Der Effekt der kombinierten Behandlung mit Indometacin und IBMX (Abb. 4.12 D-F) war ähnlich wie bei den OH3-Zellen. Daneben ließ sich die Wachstumsinhibition noch steigern. Bei der höchsten IBMX-Dosis von (Abb. 4.12 F) reichte schon die Zugabe von 50 μM Indometacin für eine hochsignifikante Proliferationshemmung auf 60 % der Kontrolle. Bei einer Indometacin-Konzentration von 100 μM wurde eine Hemmung auf 63 % der Kontrolle erreicht und bei einer Dosis von 200 μM konnte die Inhibition auf 52 % der Kontrolle gesteigert werden (Abb. 4.12 F).

Die Kombinationsbehandlung mit allen drei Medikamenten (Abb. 4.13, 4.14, 4.15 jeweils A-D) erreichte unabhängig von der Insulinkonzentration bei jeweils höchster Dosis von Indometacin und IBMX immer eine Wachstumsinhibition auf etwa 50 % der Kontrolle (Abb. 4.13, 4.14, 4.15 jeweils D). Dies entspricht der Inhibition bei Behandlung allein mit Indometacin und IBMX ohne Insulin (Abb. 4.12 F). Da Indometacin alleine (Abb. 4.12 A) die Proliferation um 25 % gesenkt hatte und IBMX alleine um 30 % (Abb. 4.12 B), war dieser Effekt fast additiv.

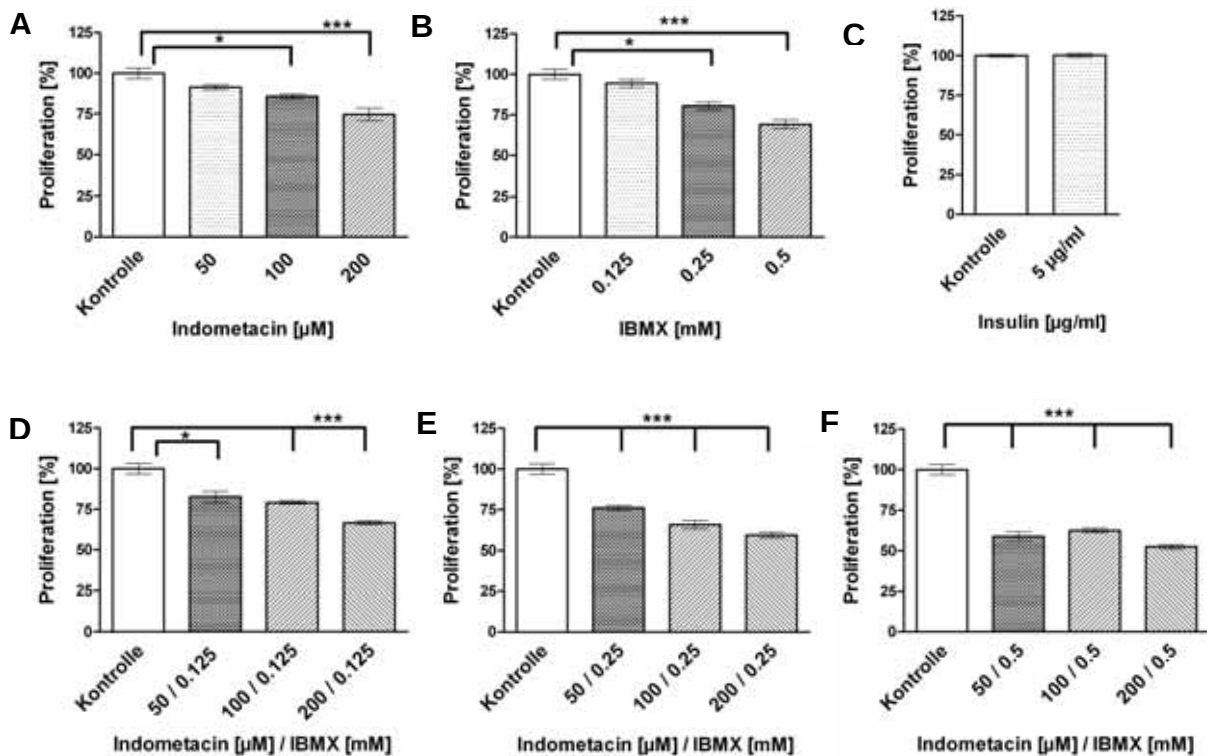


Abb. 4.12: Behandlung von H69-Zellen mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 µg/ml). Aufgeführt ist das Zellwachstum unter Behandlung mit Indometacin (A), IBMX (B) und Insulin (C) und unter Kombination von Indometacin und IBMX (D-F). Zu erkennen ist der signifikante proliferationshemmende Effekt der Einzelbehandlung mit Indometacin (200 µM) (A) und mit IBMX (0,5 mM). Die einzelne Behandlung mit Insulin (C) hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der H69-Zellen. Durch die Kombinationsbehandlung mit Indometacin und IBMX (D-F) ließ sich die Wachstumsinhibition im Vergleich mit der Einzelbehandlung (A+B) noch steigern. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

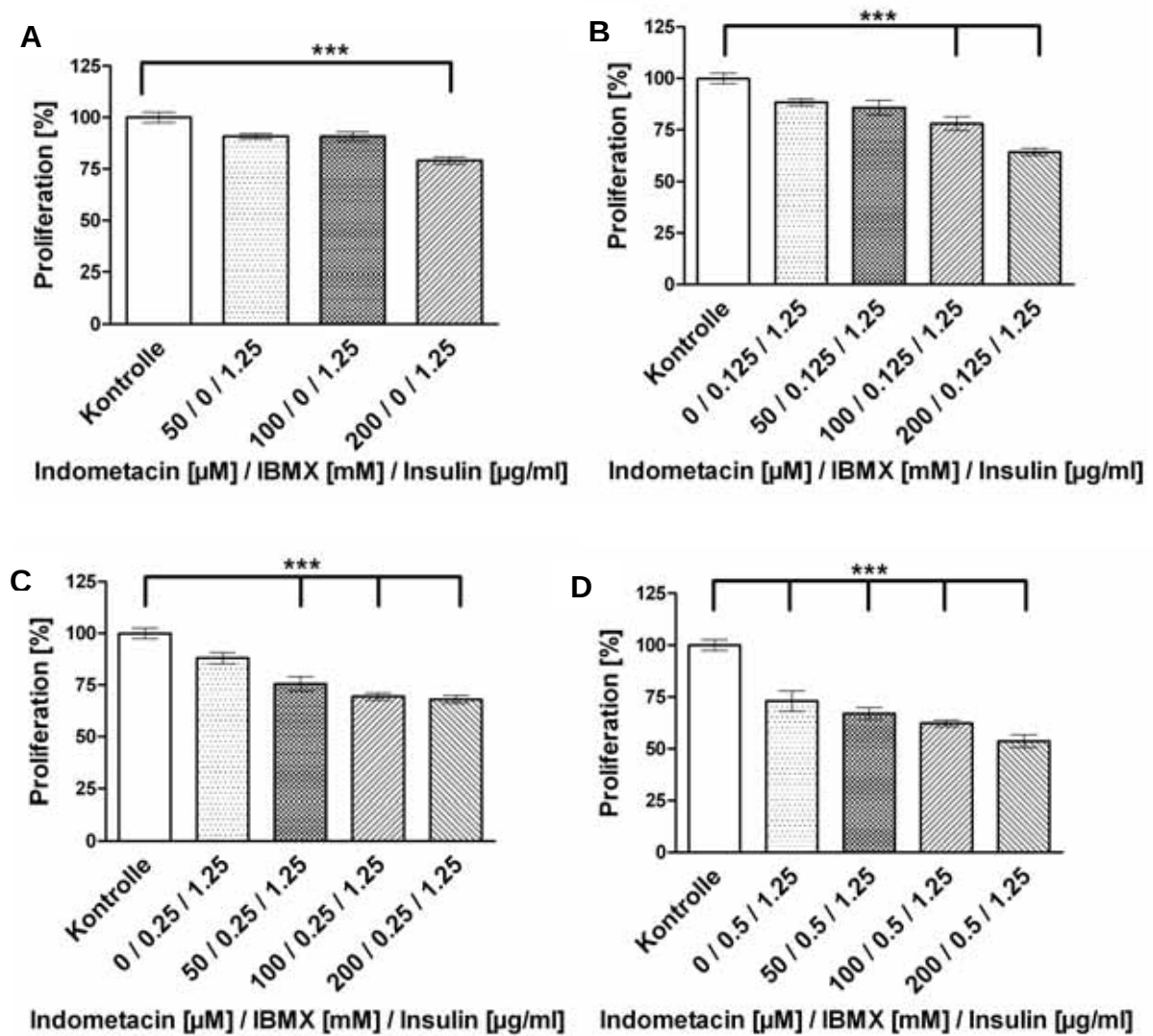


Abb. 4.13: Behandlung von H69-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (1,25 $\mu\text{g/ml}$). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

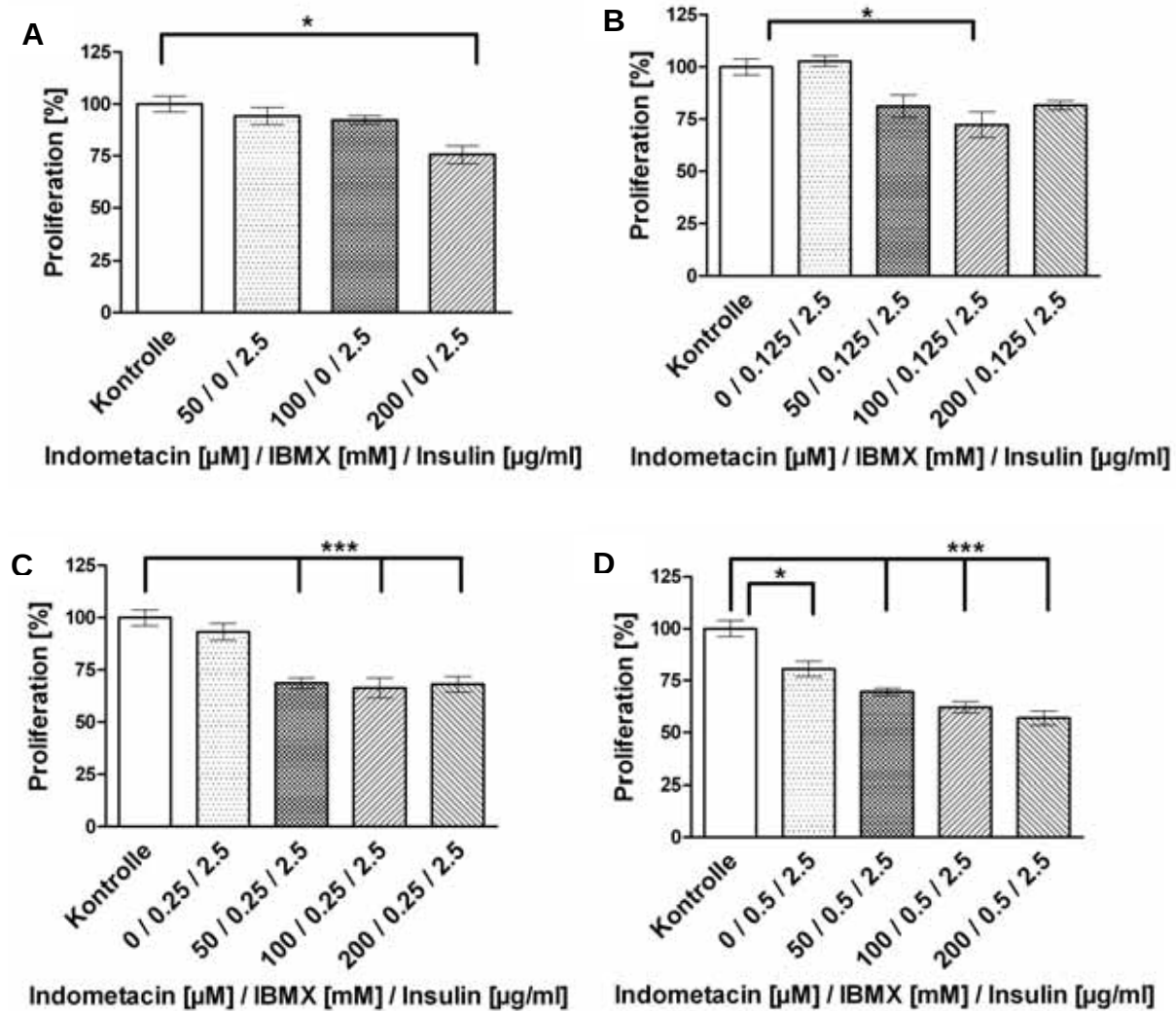


Abb. 4.14: Behandlung von H69-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (2,5 $\mu\text{g/ml}$). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

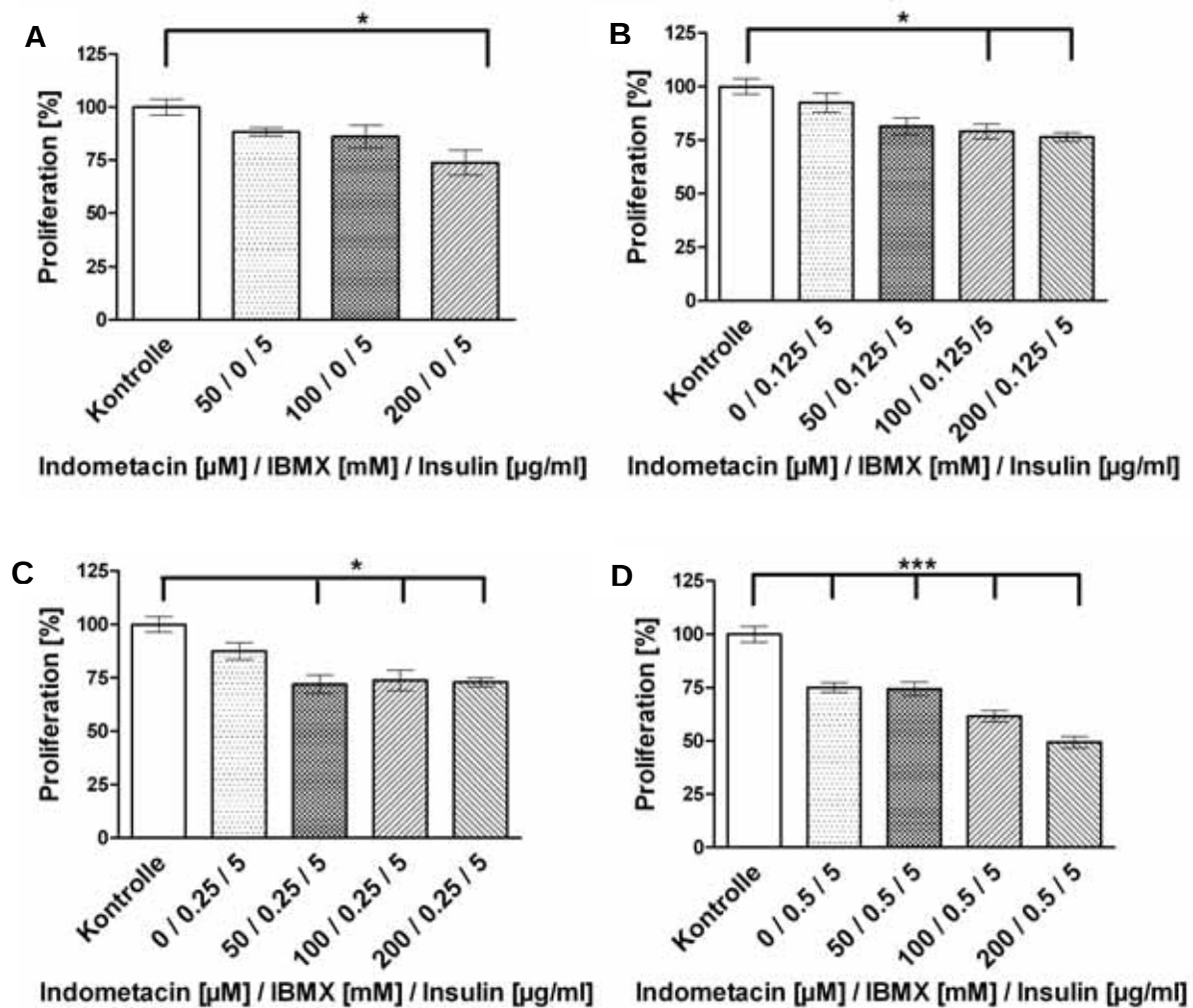


Abb. 4.15: Behandlung von H69-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 $\mu\text{g/ml}$). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Anhand der zusammenfassenden 3-D Darstellung (Abb. 4.16 A) wird deutlich, wie sich die beiden Substanzen Indometacin und IBMX in ihrer proliferationshemmenden Wirkung ergänzten. Indometacin allein inhibierte die Proliferation um 25% im Vergleich zu Kontrollzellen. IBMX allein bewirkte eine Hemmung um etwa 30 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombination beider Substanzen ergab eine Hemmung um 50 % im Vergleich zu Kontrollzellen.

Außerdem wird deutlich, dass die unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (Abb. 4.16 A ohne Insulin, Abb. 4.16 B 1,25 µg/ml Insulin, Abb. 4.16 C 2,5 µg/ml Insulin und Abb. 4.16 D 5 µg/ml Insulin) die Proliferationshemmung bei den niedrigeren Indometacin- und IBMX- Konzentrationen negativ beeinflussten, die maximale Hemmung allerdings unabhängig von der Insulinkonzentration immer etwa 50 % betrug.

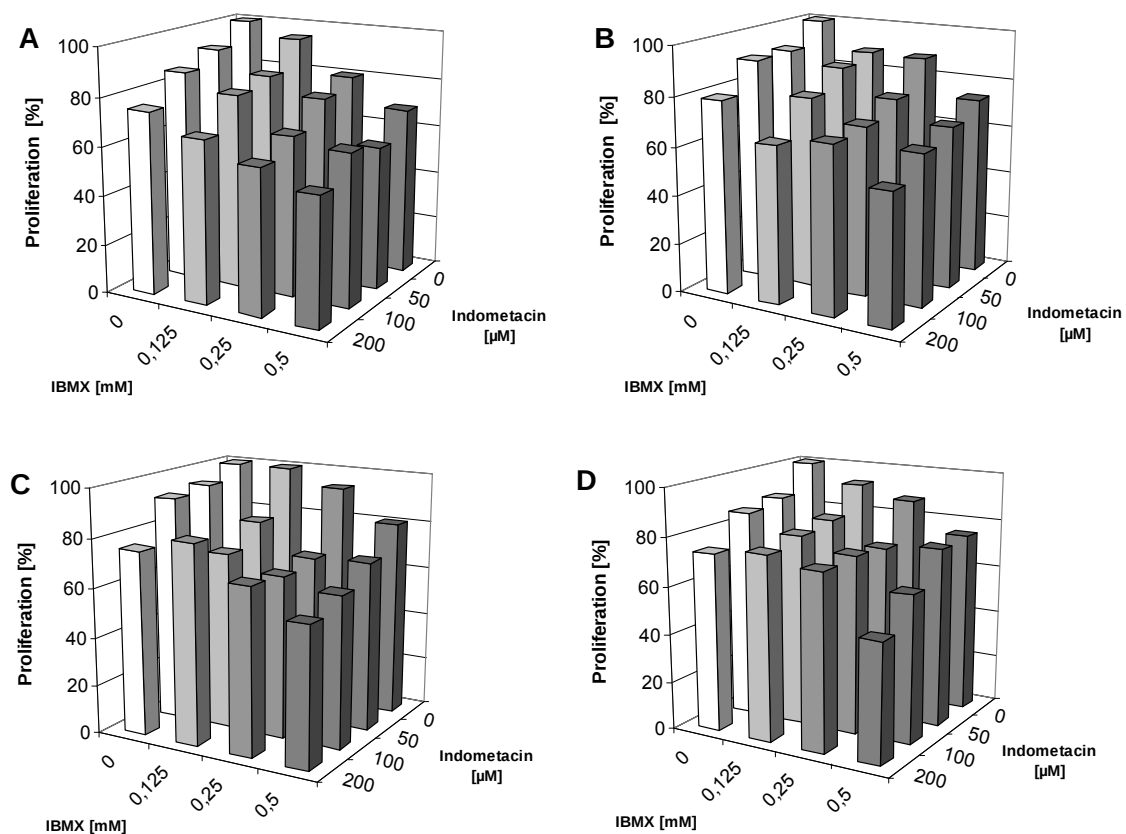


Abb. 4.16: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von H69-Zellen mit Indometacin, IBMX und Insulin. Gezeigt ist jeweils die Behandlung mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und verschiedenen Insulinkonzentrationen (ohne Insulin (A), 1,25 µg/ml Insulin (B), 2,5 µg/ml Insulin (C) und 5 µg/ml Insulin (D)). Zu erkennen ist, dass die Proliferationshemmung von Insulin unabhängig ist und sich die proliferationshemmende Wirkung von Indometacin und IBMX addiert. (A, B, C + D) Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

4.1.2.4 SW2-Zellen

Für die SW2-Zellen ergab sich ein signifikanter dosisabhängiger proliferationshemmender Effekt von Indometacin in den beiden höchsten Konzentrationen auf 85 % der Kontrolle (100 μ M) und auf 63 % der Kontrolle (200 μ M) (Abb. 4.17 A). IBMX hemmte die Proliferation signifikant in der höchsten Konzentration auf 66 % der Kontrolle (Abb. 4.17 B). Insulin hatte, einzeln zu den Zellen gegeben, in der Konzentration 5 μ g/ml (Abb. 4.17 C) einen signifikanten fördernden Effekt auf das Proliferationsverhalten der SW2-Zellen.

Durch die kombinierte Behandlung mit Indometacin und IBMX (Abb. 4.17 D-F) ließ sich die Wachstumsinhibition noch steigern. Bei der höchsten Dosis von IBMX (Abb. 4.17 F) reichte schon die Zugabe von 50 μ M Indometacin für eine hochsignifikante Proliferationshemmung auf 66 % der Kontrolle. Bei einer Indometacin-Konzentration von 100 μ M wurde eine Hemmung auf 50 % der Kontrolle erreicht und bei einer Dosis von 200 μ M konnte die Inhibition auf 36 % der Kontrolle gesteigert werden (Abb. 4.17 F).

Die Behandlung der SW2-Zellen mit allen drei Stoffen (Abb. 4.18, 4.19, 4.20 jeweils A-D) ergab für alle Insulinkonzentrationen eine dosisabhängige Inhibition des Wachstums. Statistisch signifikant in allen Indometacin Konzentrationen war die Hemmung jeweils bei der höchsten IBMX Dosierung (Abb. 4.18, 4.19, 4.20 jeweils D).

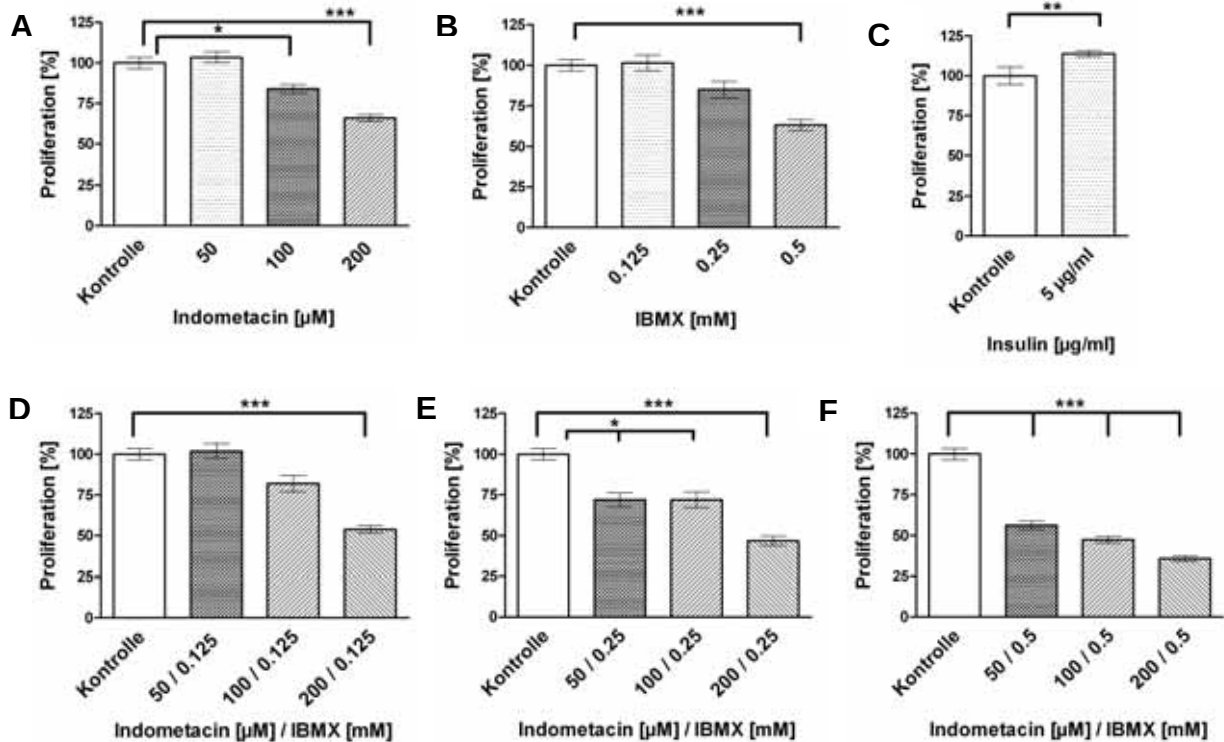


Abb. 4.17: Behandlung von SW2-Zellen mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 µg/ml). Aufgeführt ist das Zellwachstum unter Behandlung mit Indometacin (A), IBMX (B) und Insulin (C) und unter Kombination von Indometacin und IBMX (D-F). Zu erkennen ist der signifikante proliferationshemmende Effekt der Einzelbehandlung mit Indometacin (200 µM) (A) und mit IBMX (0,5 mM) (B). Die einzelne Behandlung mit Insulin (C) steigert das Proliferationsverhalten der SW2-Zellen. Durch die Kombinationsbehandlung mit Indometacin und IBMX (D-F) ließ sich die Wachstumsinhibition im Vergleich mit der Einzelbehandlung (A+B) noch steigern. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

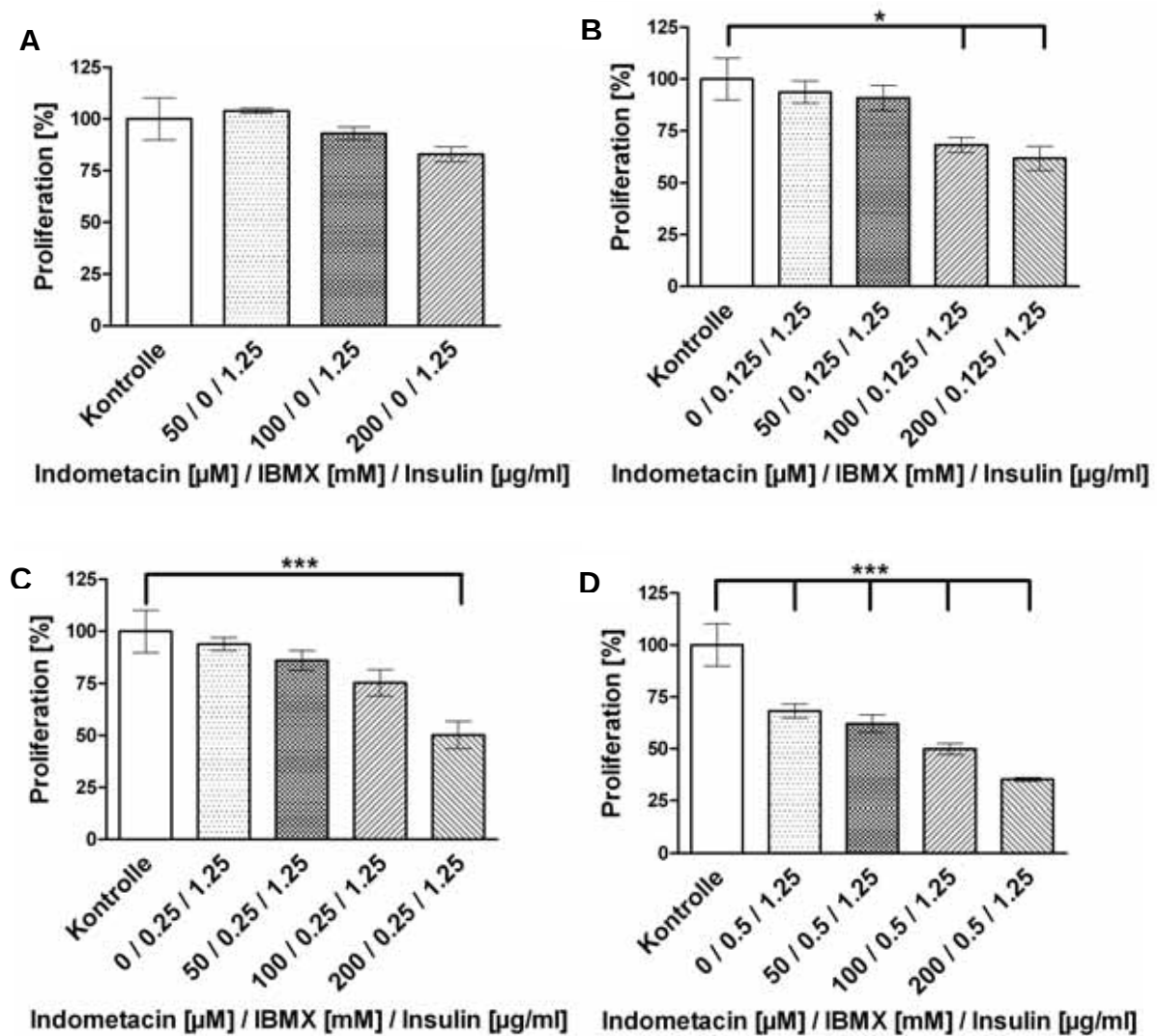


Abb. 4.18: Behandlung von SW2-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (1,25 $\mu\text{g/ml}$). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

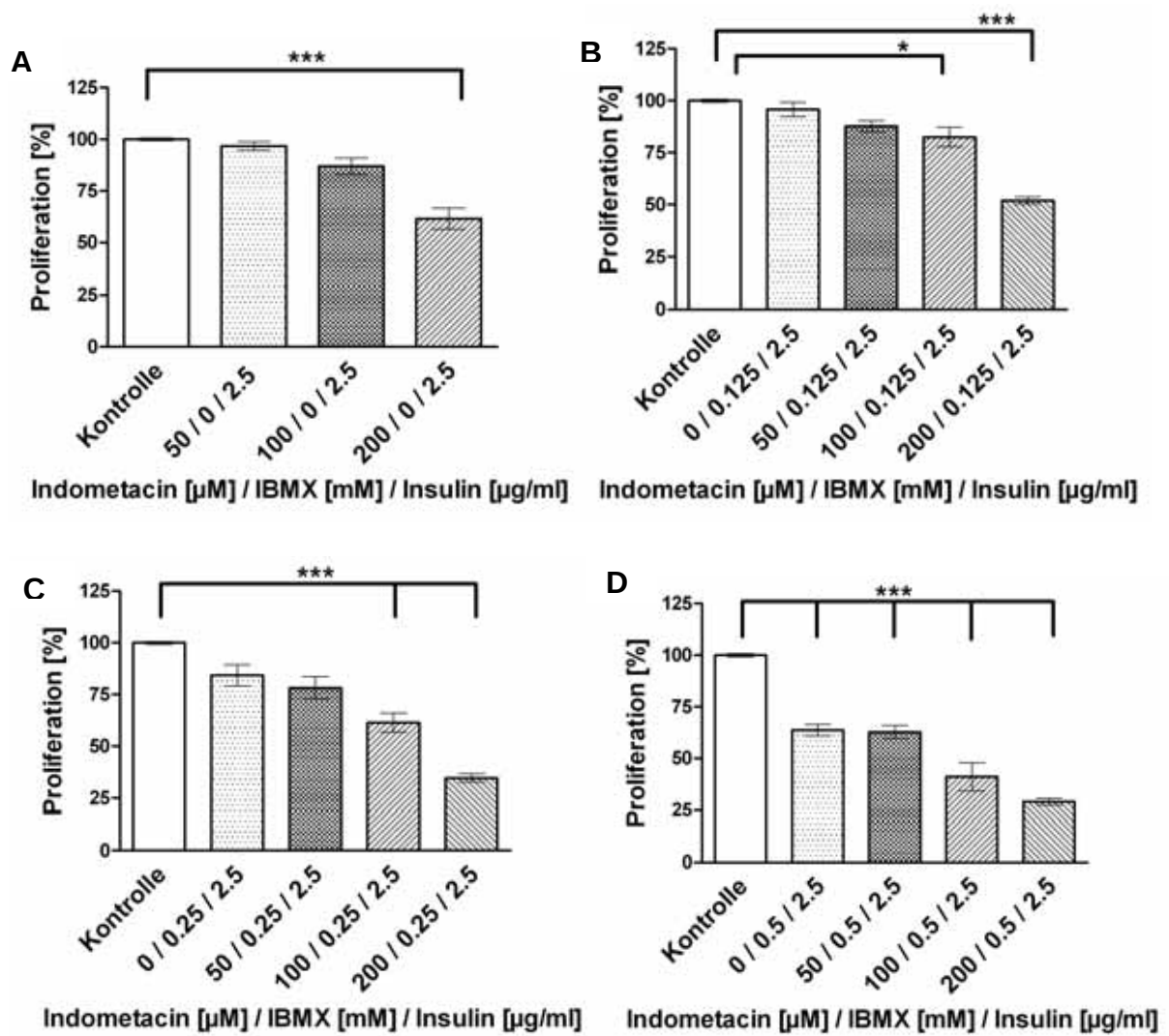


Abb. 4.19: Behandlung von SW2-Zellen mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (2,5 µg/ml). Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM, n = 6, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

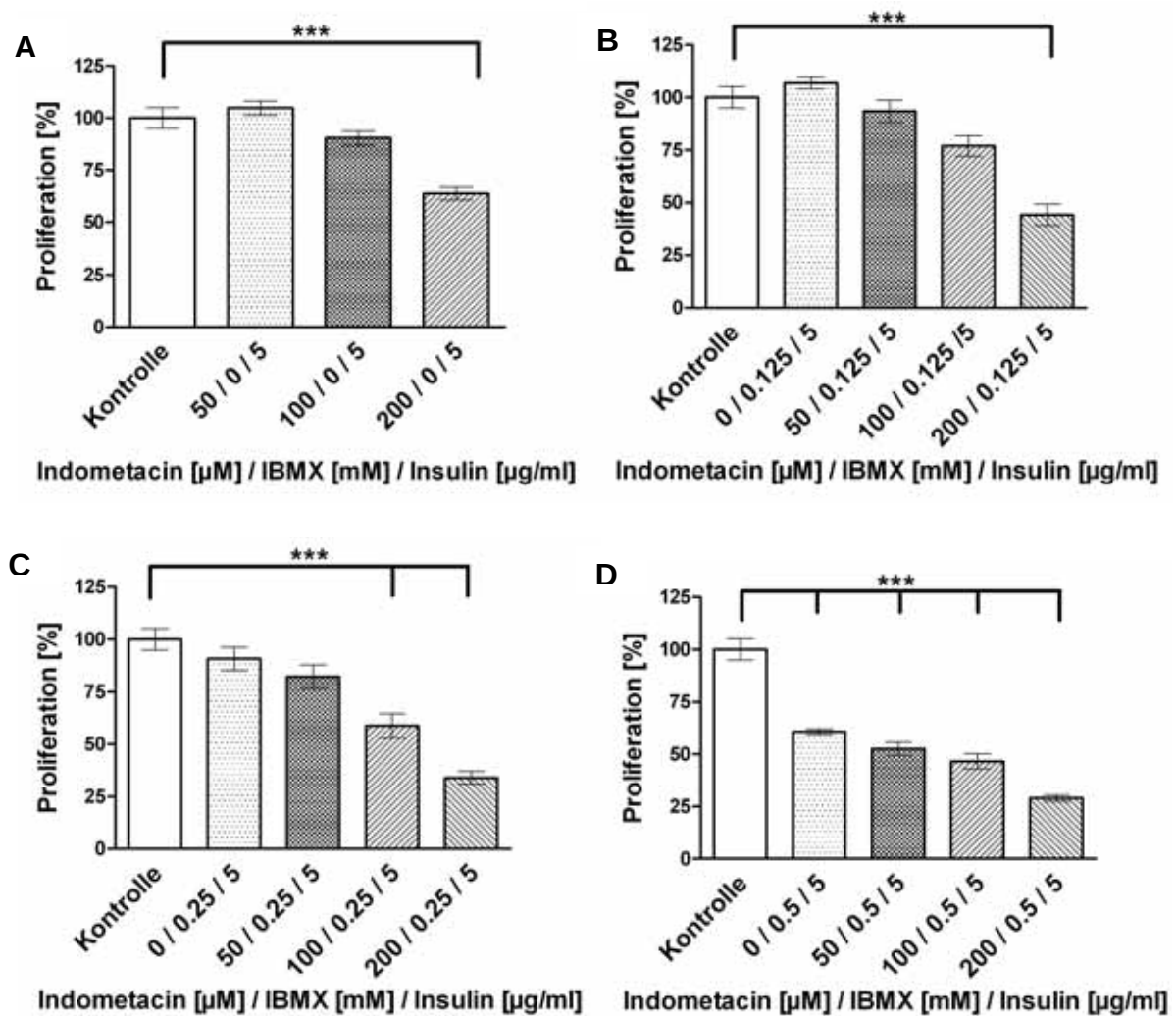


Abb. 4.20: Behandlung von SW2-Zellen mit Indometacin (50-200 μ M), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 μ g/ml). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

Anhand der zusammenfassenden 3-dimensionalen Darstellung (Abb. 4.21 A) lässt sich der additive Effekt der beiden Substanzen Indometacin und IBMX hervorheben. Durch die alleinige Zugabe von Indometacin in der höchsten Konzentration wurde eine Hemmung auf 63 % der Kontrolle beobachtet. Durch IBMX in seiner höchsten Konzentration alleine wurde eine Hemmung der Proliferation auf 66 % der Kontrolle verursacht. Durch die Kombination der beiden Substanzen zeigte sich eine Gesamthemmung auf 36 % der Kontrolle. Das heißt, die Indometacin-Hemmung von 37 % und die IBMX-Hemmung von 36 % addierten sich fast zu einer 64%igen Hemmung der Proliferation insgesamt. Die maximale Hemmung wurde bei den Insulinkonzentrationen 2,5 µg/ml (Abb. 4.21 C) und 5 µg/ml (Abb. 4.21 D) erreicht und betrug 30 % der Kontrolle.

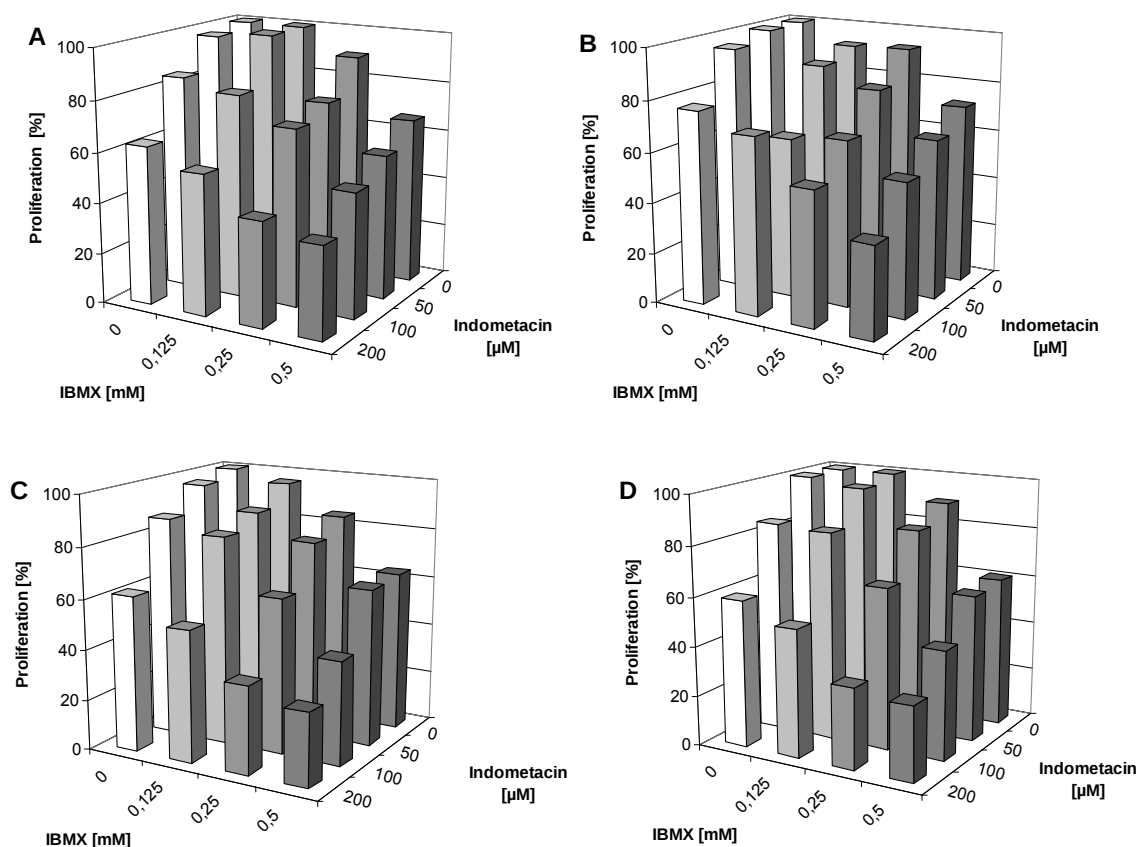


Abb. 4.21: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von SW2-Zellen mit Indometacin, IBMX und Insulin. Gezeigt ist jeweils die Behandlung mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und verschiedenen Insulinkonzentrationen (ohne Insulin (A), 1,25 µg/ml Insulin (B), 2,5 µg/ml Insulin (C) und 5 µg/ml Insulin (D)). Zu erkennen ist, dass die Proliferationshemmung mit steigenden Indometacin- und IBMX-Konzentrationen zunimmt, die Wirkung der beiden Stoffe sich addiert und von der Insulinwirkung unabhängig ist. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

4.1.2.5 H82-Zellen

Die H82-Zellen reagierten von allen getesteten Zelllinien am sensitivsten auf die Behandlung. Den stärksten proliferationshemmenden Effekt hatte bei den H82-Zellen eindeutig die Substanz Indometacin (Abb. 4.22 A). Ab einer Konzentration von 50 μM wurde die Proliferation der Zellen hochsignifikant auf 17 % der Kontrolle gehemmt. Ab 100 μM Indometacin Zugabe wurde eine hochsignifikante Reduktion auf 14 % der Kontrolle erreicht, die sich auch durch Verdopplung der Menge auf 200 μM nicht mehr steigern ließ. Die einzelne Behandlung mit IBMX (Abb. 4.22 B) bewirkte eine signifikante Inhibition auf 77 % der Kontrolle (0,125 mM), auf 90 % der Kontrolle (0,25 mM) und 68 % der Kontrolle (0,5 mM). Die einzelne Behandlung mit Insulin hatte einen hochsignifikanten steigernden Einfluss auf die Proliferation (Abb. 4.22 C). Bei der Kombinationsbehandlung, bestehend aus Indometacin und IBMX (Abb. 4.22 D-F), ergab sich kein zusätzlicher additiver Effekt von IBMX. Die maximale Hemmung betrug 16 % der Kontrolle, dieses entsprach der einzelnen Behandlung mit Indometacin.

Auch bei der Behandlung mit allen drei Stoffen (Abb. 4.23, 4.24, 4.25 jeweils A-D) war erkennbar, dass die Zugabe von Indometacin eine deutliche Proliferationsreduktion herbeiführte.

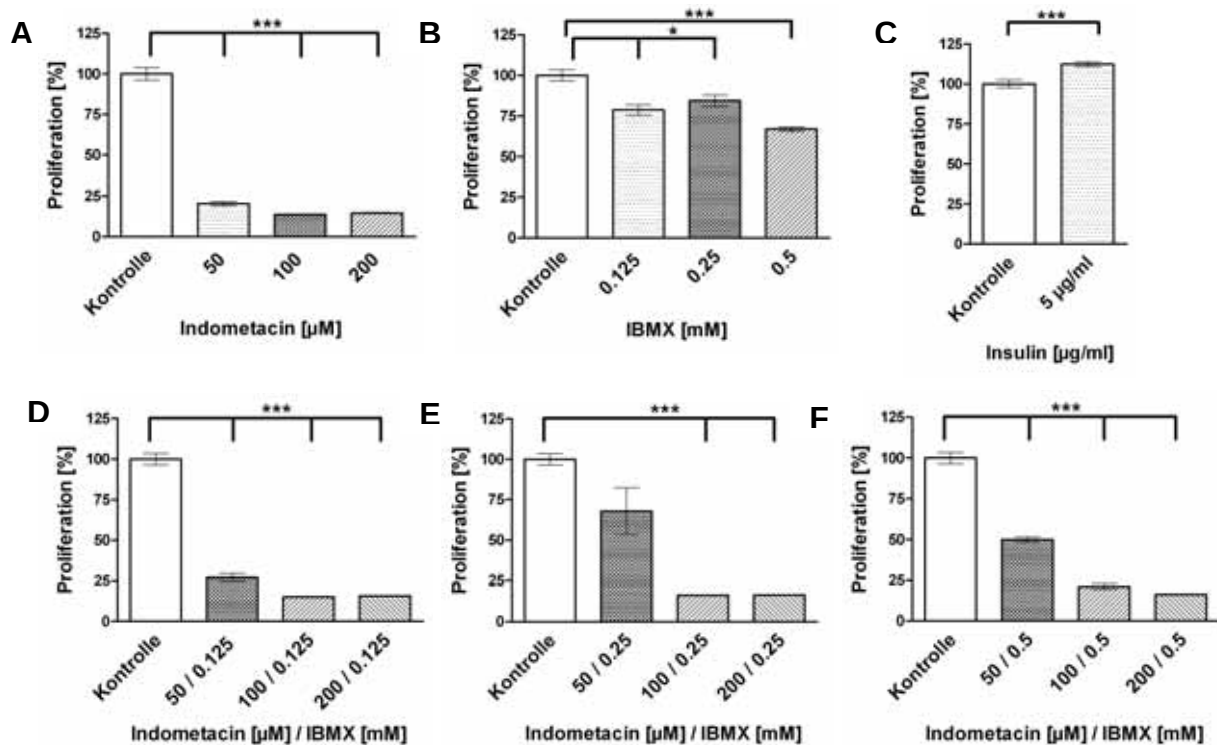


Abb. 4.22: Behandlung von H82-Zellen mit Indometacin (50-200 µM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 µg/ml). Aufgeführt ist das Zellwachstum unter Behandlung mit Indometacin (A), IBMX (B) und Insulin (C) und unter Kombination von Indometacin und IBMX (D-F). Zu erkennen ist der signifikante proliferationshemmende Effekt der Einzelbehandlung mit Indometacin (A) und mit IBMX. Die einzelne Behandlung mit Insulin (C) steigert das Proliferationsverhalten der H82-Zellen. Durch die Kombinationsbehandlung mit Indometacin und IBMX (D-F) zeigte sich kein zusätzlicher proliferationshemmender Effekt gegenüber der Einzelbehandlung mit Indometacin (A). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

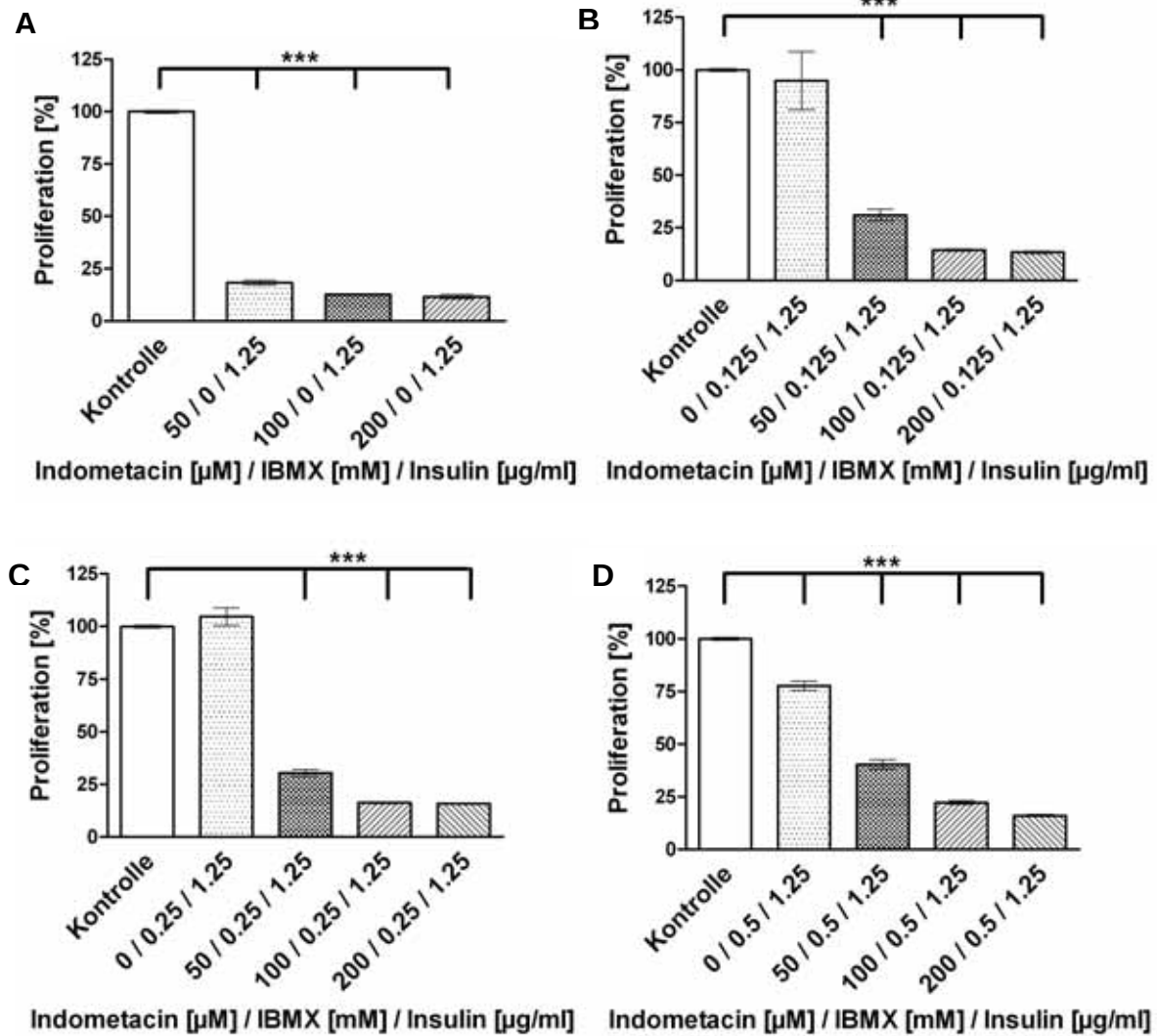


Abb. 4.23: Behandlung von H82-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (1,25 $\mu\text{g/ml}$). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

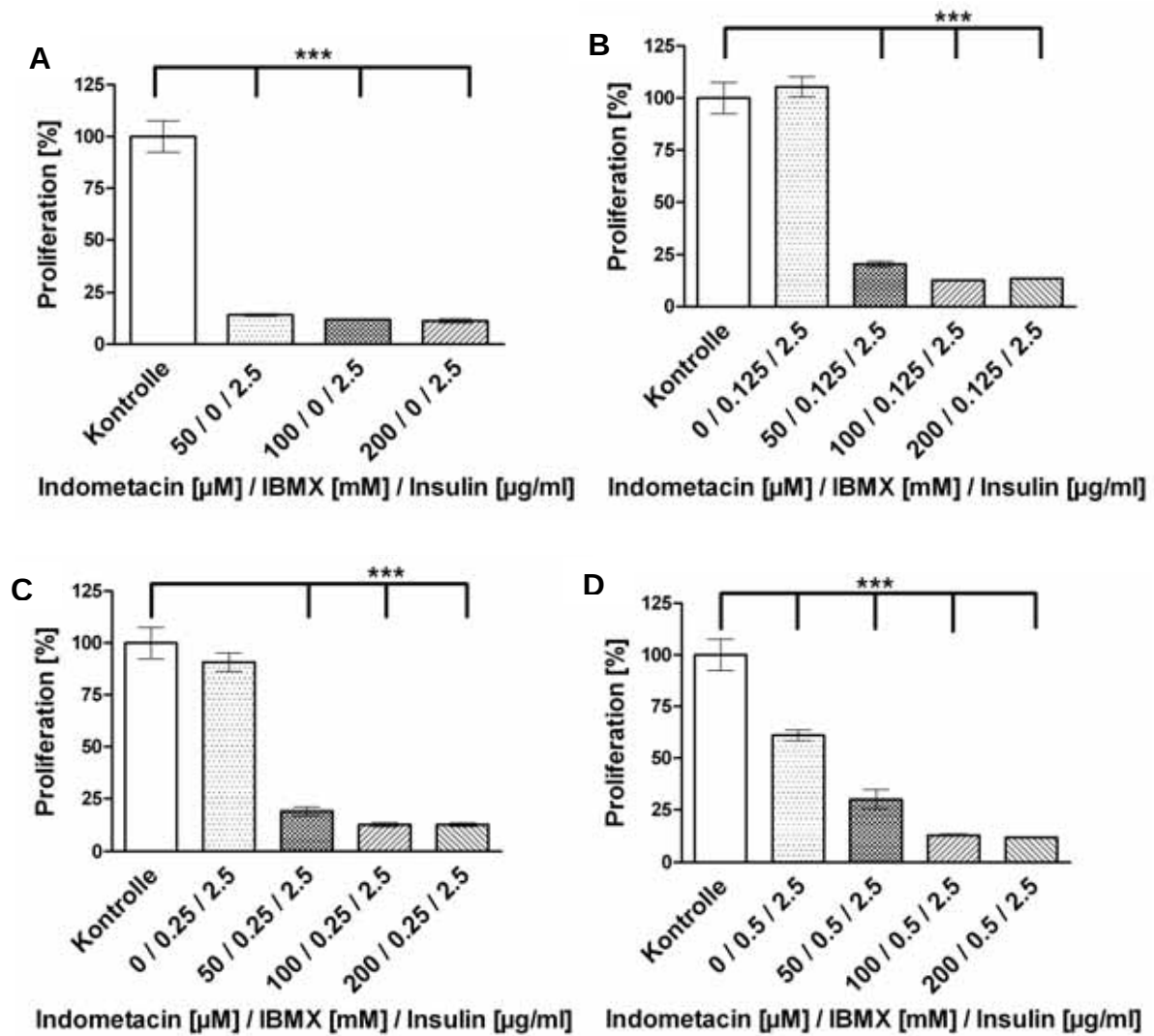


Abb. 4.24: Behandlung von H82-Zellen mit Indometacin (50-200 μ M), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (2,5 μ g/ml). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

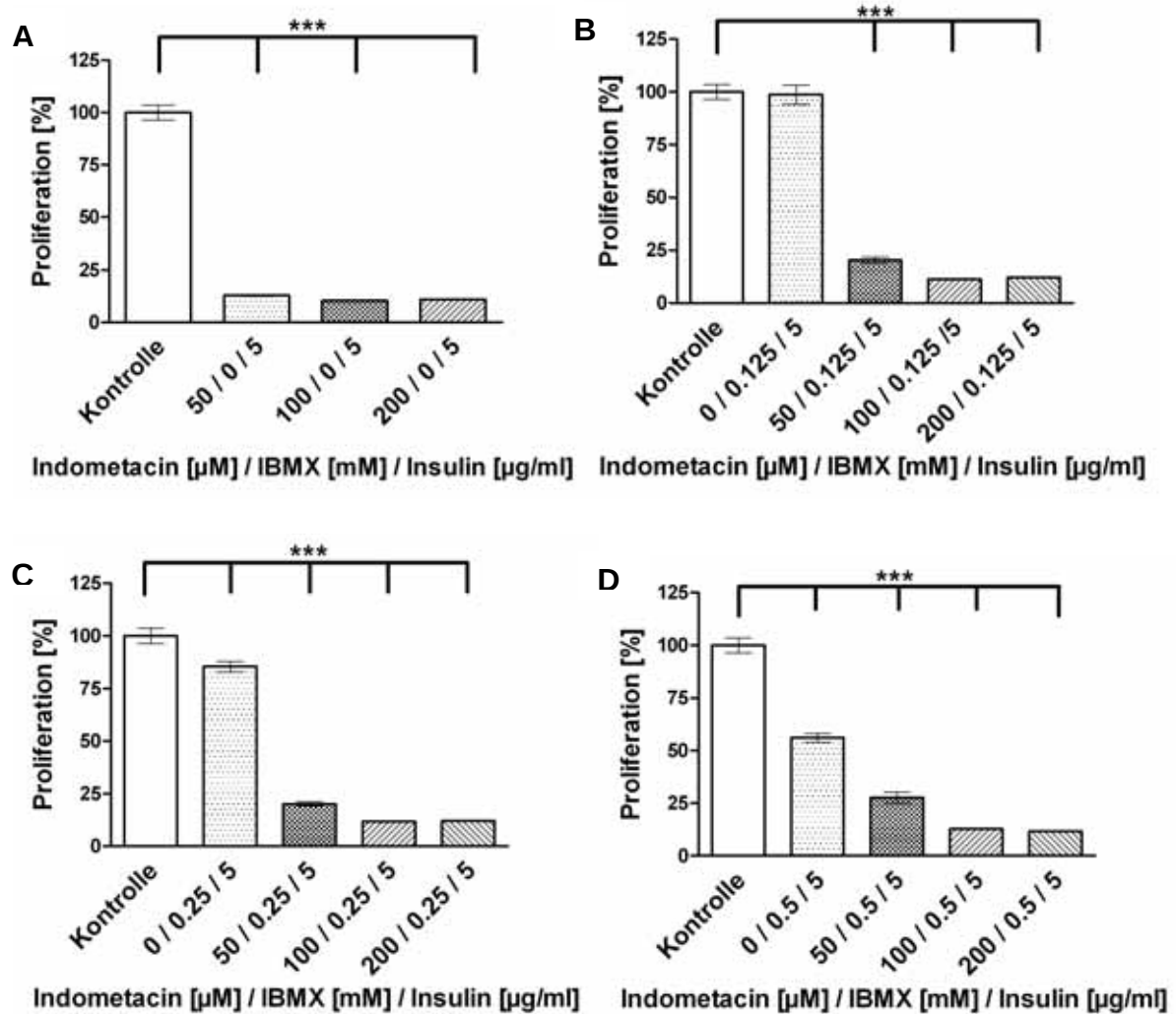


Abb. 4.25: Behandlung von H82-Zellen mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und Insulin (5 $\mu\text{g/ml}$). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

In der zusammenfassenden 3-D Darstellung (Abb. 4.26) ist erkennbar, dass die Proliferation von H82-Zellen unabhängig von der Insulinkonzentration durch alleinige Indometacingabe stärker inhibiert wurde als durch die kombinierte Gabe der beiden Substanzen Indometacin und IBMX. Für eine maximale Proliferationshemmung von H82-Zellen war die Gabe von Indometacin ausreichend.

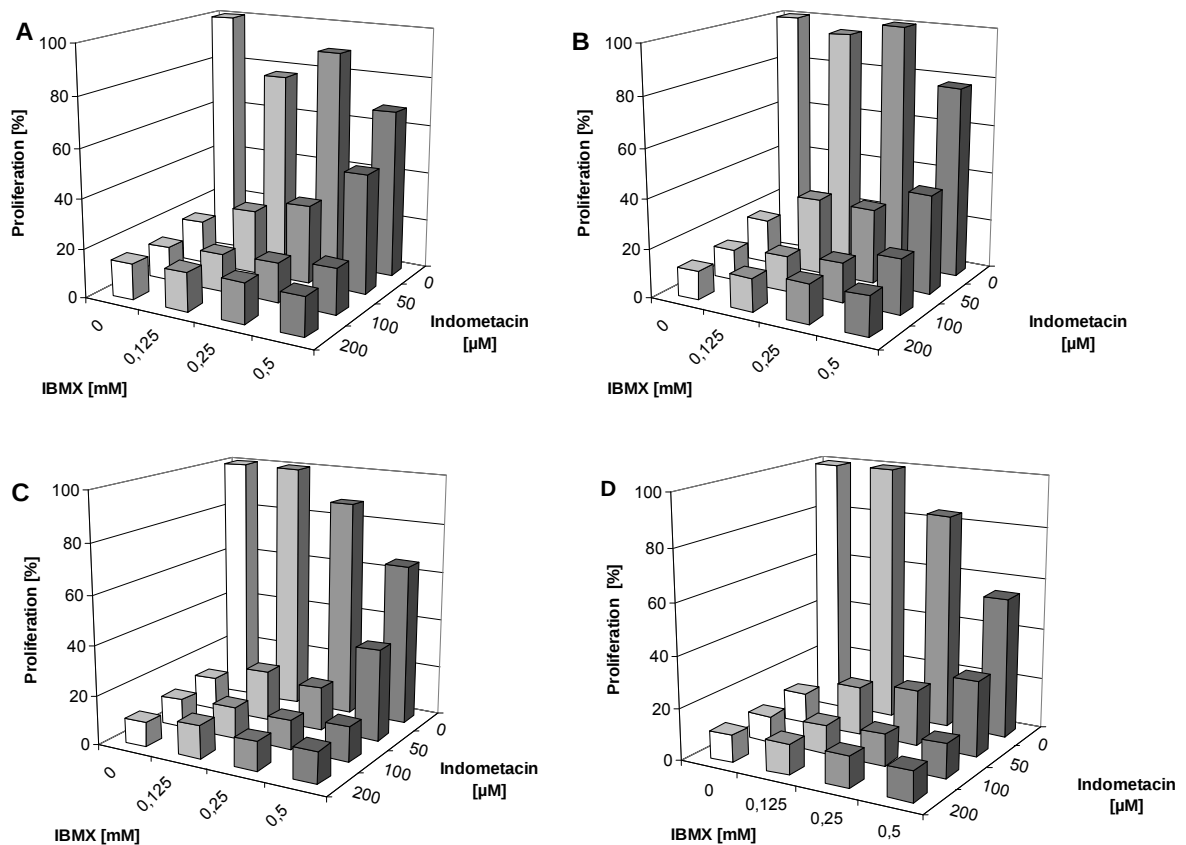


Abb. 4.26: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von H82-Zellen mit Indometacin, IBMX und Insulin. Gezeigt ist jeweils die Behandlung mit Indometacin (50-200 μM), IBMX (0,125-0,5 mM) und verschiedenen Insulinkonzentrationen (ohne Insulin (A), 1,25 μg/ml Insulin (B), 2,5 μg/ml Insulin (C) und 5 μg/ml Insulin (D)). Zu erkennen ist, dass die Proliferationshemmung fast ausschließlich durch Indometacin verursacht wird und die alleinige Gabe von IBMX nur eine geringe Proliferationshemmung verursacht. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

4.1.3 Behandlung mit Indometacin und IBMX

Da Insulin in dem vorangegangenen Versuch keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien OH1, OH3 und H69 zeigte (Abb. 4.2, 4.7, 4.12 jeweils C) und auf die Zelllinien SW2 und H82 (4.17, 4.22 beide C) lediglich einen geringen proliferationsfördernden Effekt, wurde es in den folgenden Versuchen weggelassen. Stattdessen wurde die Konzentration der Substanzen Indometacin und IBMX erhöht, um die maximale Hemmkonzentration zu ermitteln. Da zum Lösen sowohl von Indometacin als auch von IBMX 20 % Ethanol verwendet wurde, bestand die Kontrolle aus 80 μ l Zellsuspension mit der jeweiligen Zellzahl/ml und 20 μ l Alkoholkontrolle (20 % Ethanol). Im Gesamtvolumen von 100 μ l ergab sich so eine Alkoholkonzentration von 4 %. Um den proliferationshemmenden Effekt von Ethanol für die eigenen Proliferationsmessungen ausschließen zu können, wurde die jeweilige Proliferation zur Alkoholkontrolle in Bezug gesetzt.

4.1.3.1 OH1-Zellen

Um einen zytotoxischen Effekt des Alkohols, in dem die Medikamente gelöst waren, auszuschließen, wurde die Zellproliferation in der Alkoholkontrolle derjenigen im Kulturmedium gegenübergestellt (Abb. 4.27 A). Der Unterschied in der Proliferation war nicht signifikant.

Die Gabe von Indometacin in den geringen Konzentrationen von 50 μ M bis 300 μ M (Abb. 4.27 B) verursachte sowohl in der Dosis 200 μ M als auch bei 300 μ M eine hochsignifikante Inhibition auf etwa 60 % der Alkoholkontrolle. Die Hemmung durch IBMX (Abb. 4.27 C) war ab einer Konzentration von 1,25 mM hochsignifikant und betrug 52 % (1,25 mM), 51% (1,5 mM) und 45 % der Alkoholkontrolle (2,0 mM).

Die kombinierte Behandlung von IBMX und Indometacin in den niedrigen Konzentrationen (Abb. 4.27 D-K) bewirkte schon bei der geringsten IBMX Dosis (0,125 mM) (Abb. 4.27 D) eine von der Indometacin Dosis abhängige hochsignifikante Proliferationshemmung auf 54 % der Alkoholkontrolle (200 μ M) und 42 % der Alkoholkontrolle (300 μ M). Die Inhibition ließ sich mit steigenden IBMX-Konzentrationen (Abb. 4.27 E-K) weiter auf bis zu 25 % der Alkoholkontrolle steigern (IBMX: 2,0 mM) (Abb. 4.27 K).

Dieser inhibitorische Effekt konnte durch Dosierung von Indometacin auf 400 μ M bis 800 μ M noch gesteigert werden (Abb. 4.28 B).

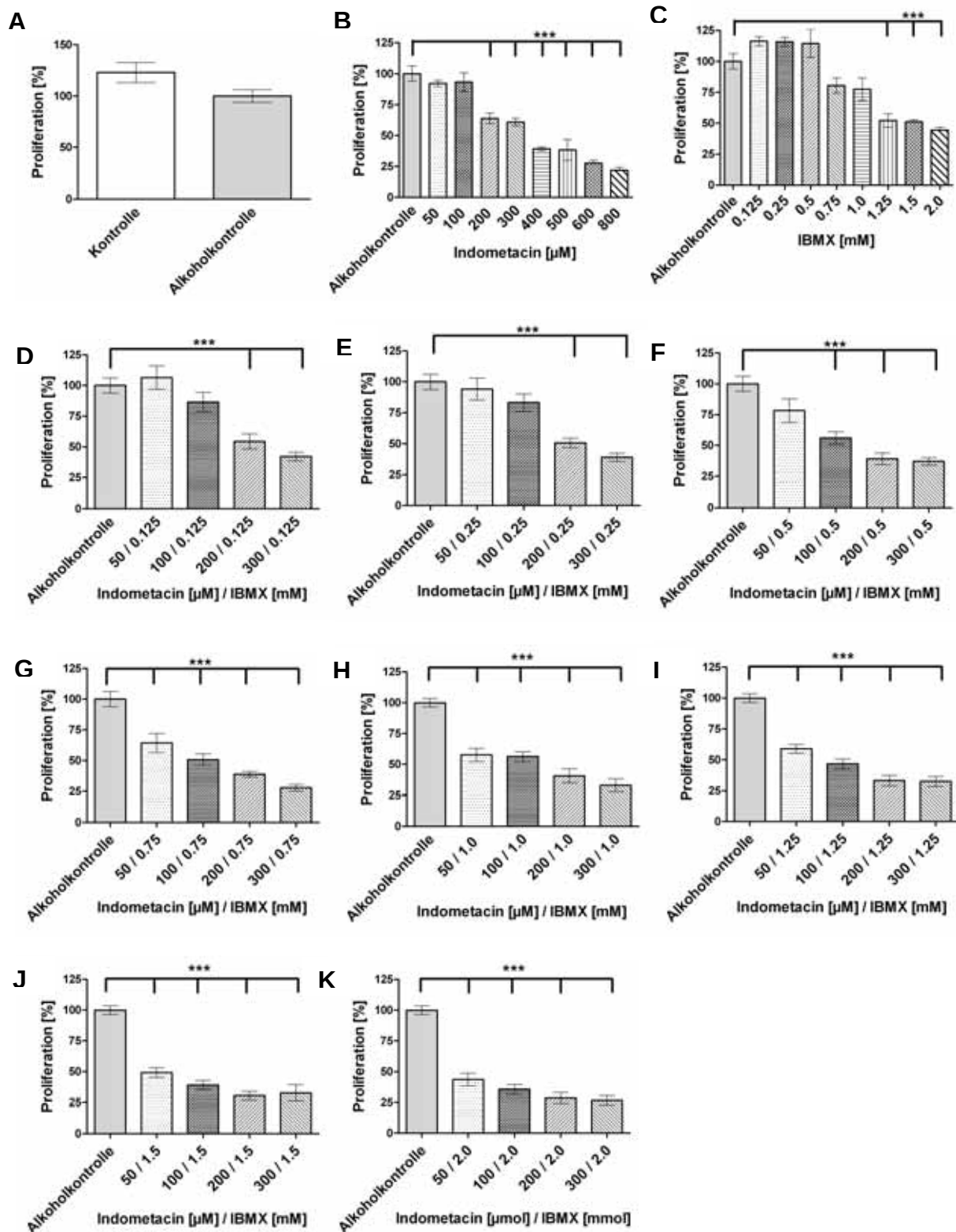


Abb. 4.27: Behandlung von OH1-Zellen mit Indometacin (50-300 μ M) und IBMX (0,125-2,0 mM). Aufgeführt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-K**). In jeder Abbildung wurde die IBMX-Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist, dass die einzelne Behandlung mit Indometacin (**B**) eine stärkere Wachstumshemmung verursacht als die einzelne Behandlung mit IBMX (**C**). Die Kombination beider Stoffe bewirkt schon in der geringsten IBMX Konzentrationen (0,125 mM) eine signifikante Proliferationshemmung. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 10$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

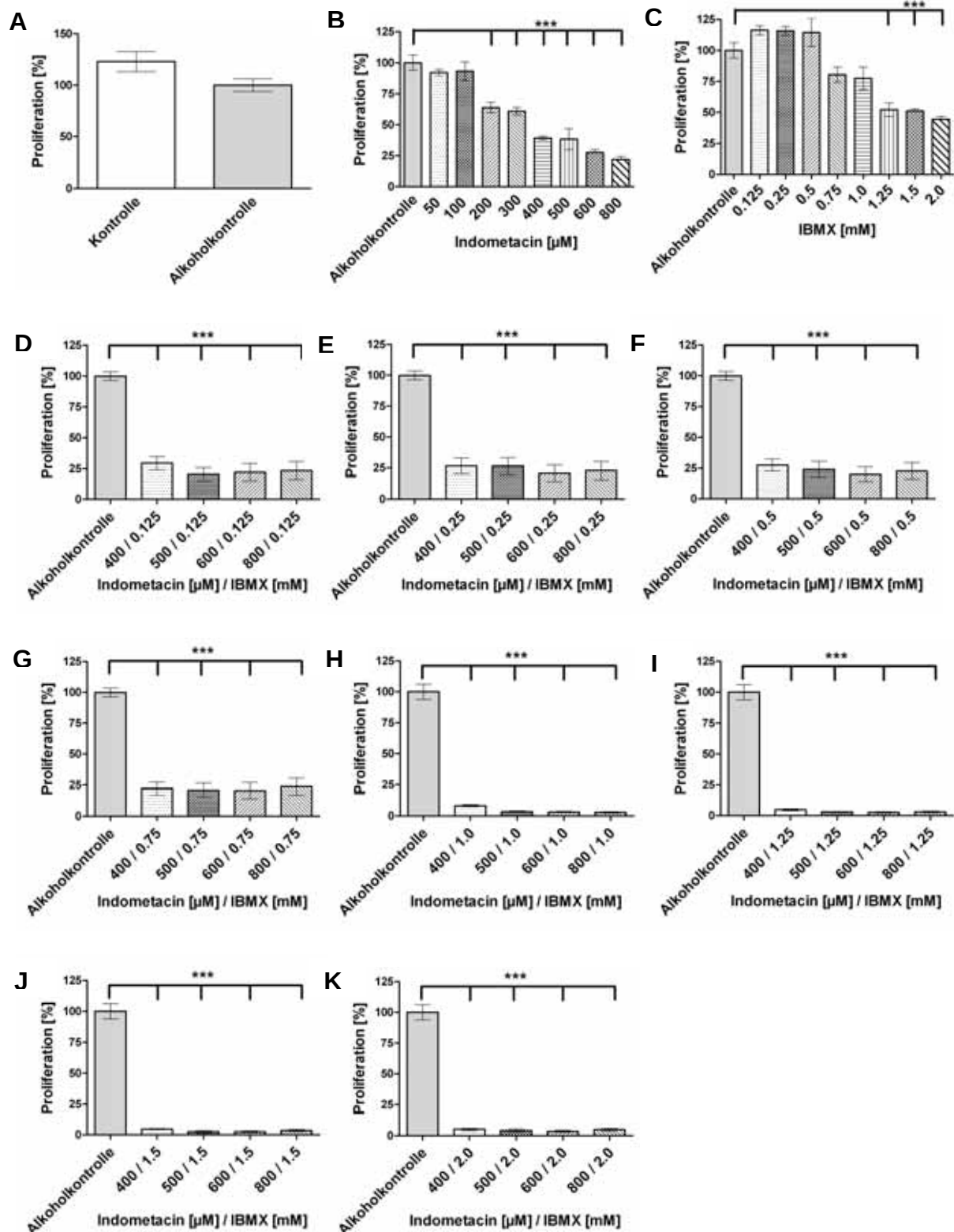


Abb. 4.28: Behandlung von OH1-Zellen mit Indometacin (400-800 μ M) und IBMX (0,125-2,0 mM). Dargestellt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-K**). In jeder Abbildung wurde die IBMX-Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist, dass die einzelne Behandlung mit Indometacin (**B**) eine stärkere signifikante Wachstumshemmung verursacht, als die einzelne Behandlung mit IBMX (**C**). Die Kombinationsbehandlung führt schon bei der geringsten IBMX Konzentration (0,125 mM) (**D**) zu einer starken hochsignifikanten Hemmung der Proliferation. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Bei Gabe von 0,125 mM IBMX und Indometacin in der höchsten Dosis (Abb. 4.28 D) wurde eine hochsignifikante Proliferationshemmung auf 35 % der Alkoholkontrolle erreicht. Bei Gabe von 0,75 mM IBMX und der höchsten Dosis Indometacin (Abb. 4.28 G) konnte die Inhibition auf 24 % der Alkoholkontrolle gesteigert werden und die maximale Hemmung wurde ab einer IBMX Dosis von 1,0 mM (Abb. 4.28 H) erreicht.

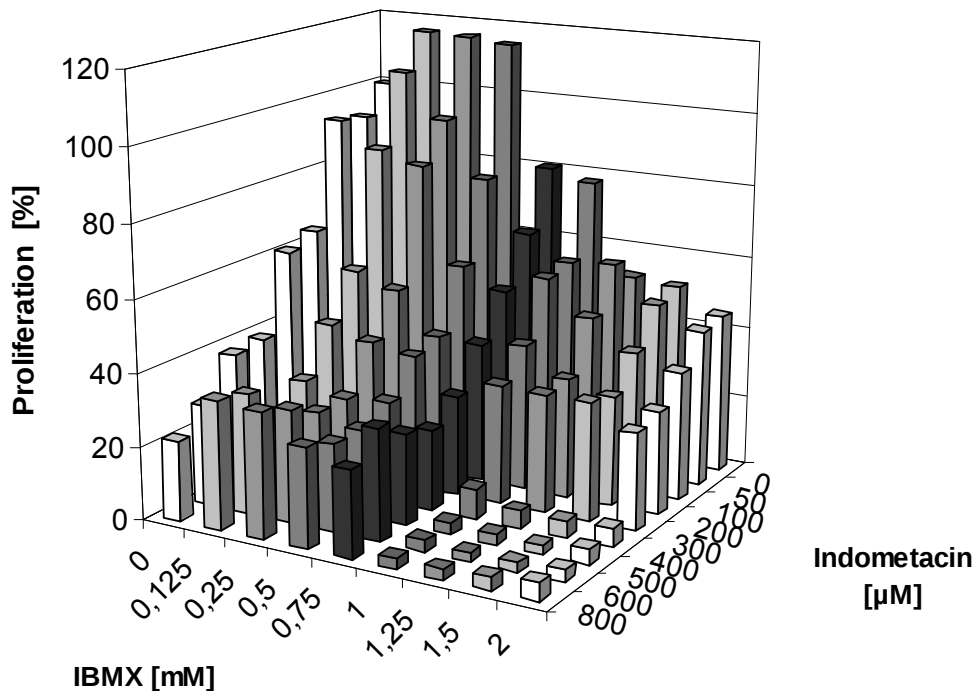


Abb. 4.29: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von OH1-Zellen mit Indometacin und IBMX. Gezeigt ist, dass die Proliferationshemmung bei der Kombination beider Stoffe in hohen Konzentrationen am stärksten ist. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert.

Eine Zusammenfassung der in Abb. 4.27 und 4.28 dargestellten Ergebnisse zeigt Abb. 4.29. Die alleinige Gabe von Indometacin führte in der höchsten Konzentration (800 µM) zu einer Hemmung der Proliferation der OH1-Zellen auf 22 % der Alkoholkontrolle. Die separate Gabe von IBMX führte in der höchsten Konzentration (2,0 mM) zu einer signifikanten Hemmung auf 45 % der Alkoholkontrolle. Gemeinsam zeigten die beiden Substanzen eine hochsignifikante Hemmung auf unter 5 % der Alkoholkontrolle ab den Konzentrationen von 500 µM Indometacin und 1,0 mM IBMX. Ab diesen Werten war keine stärkere Hemmung mehr zu beobachten.

4.1.3.2 OH3-Zellen

Um einen zytotoxischen Effekt des Alkohols, in dem die Medikamente gelöst waren, auszuschließen, wurde die Zellproliferation in der Alkoholkontrolle derjenigen im Kulturmedium gegenübergestellt (Abb. 4.30 A). Der Unterschied in der Proliferation war nicht signifikant.

Die einzelne Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin (Abb. 4.30 B) hatte schon in den geringen Konzentrationen einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt auf 71 % der Alkoholkontrolle (200 μ M) und auf 48 % der Alkoholkontrolle (300 μ M). Die einzelne Behandlung mit IBMX (Abb. 4.30 C) hatte ebenfalls eine dosisabhängige inhibitorische Wirkung auf die Proliferation, die ab einer Dosis von 0,5 mM hochsignifikant war. Die maximale Hemmung der Einzelgabe von IBMX lag bei 11 % der Alkoholkontrolle (2,0 mM).

Die kombinierte Behandlung mit IBMX und Indometacin in den kleinen Konzentrationen (Abb. 4.30 D-K) bewirkte eine hochsignifikante dosisabhängige Wachstumsinhibition auf bis zu 2 % der Alkoholkontrolle (Abb. 4.30 K). Diese maximale Hemmung der Proliferation ließ sich auch durch die Höherdosierung von Indometacin (Abb. 4.31 D-K) nicht mehr steigern.

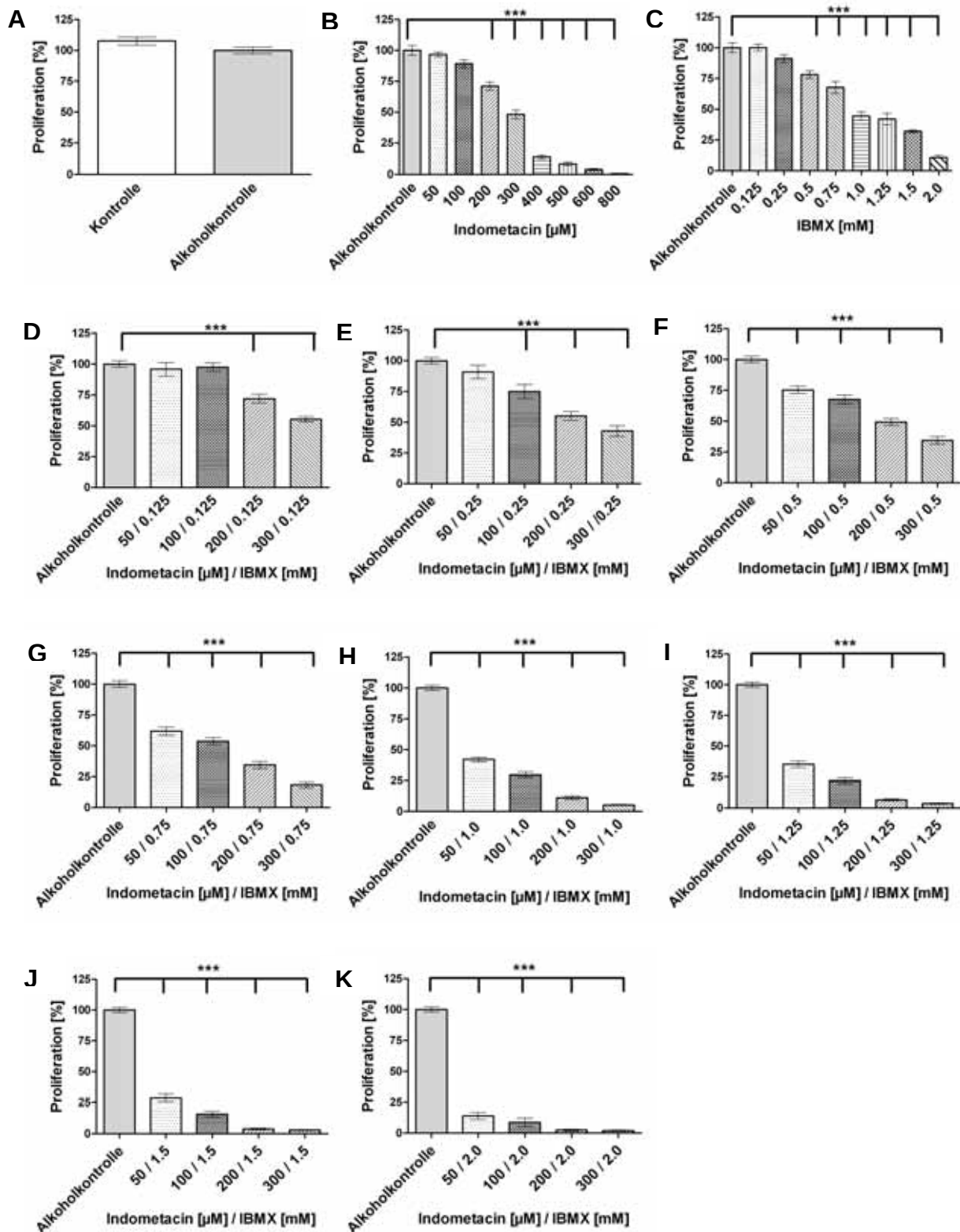


Abb. 4.30: Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin (50-300 μ M) und IBMX (0,125-2,0 mM). Abgebildet ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-K**). In jeder Abbildung wurde die IBMX Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist, dass die einzelne Behandlung mit Indometacin (**B**) eine stärkere signifikante Wachstumshemmung verursacht, als die einzelne Behandlung mit IBMX (**C**). In Kombination mit Indometacin verursacht IBMX dagegen schon in der geringsten Konzentration (0,125 mM) (**D**) eine signifikante Hemmung der Proliferation. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 10$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

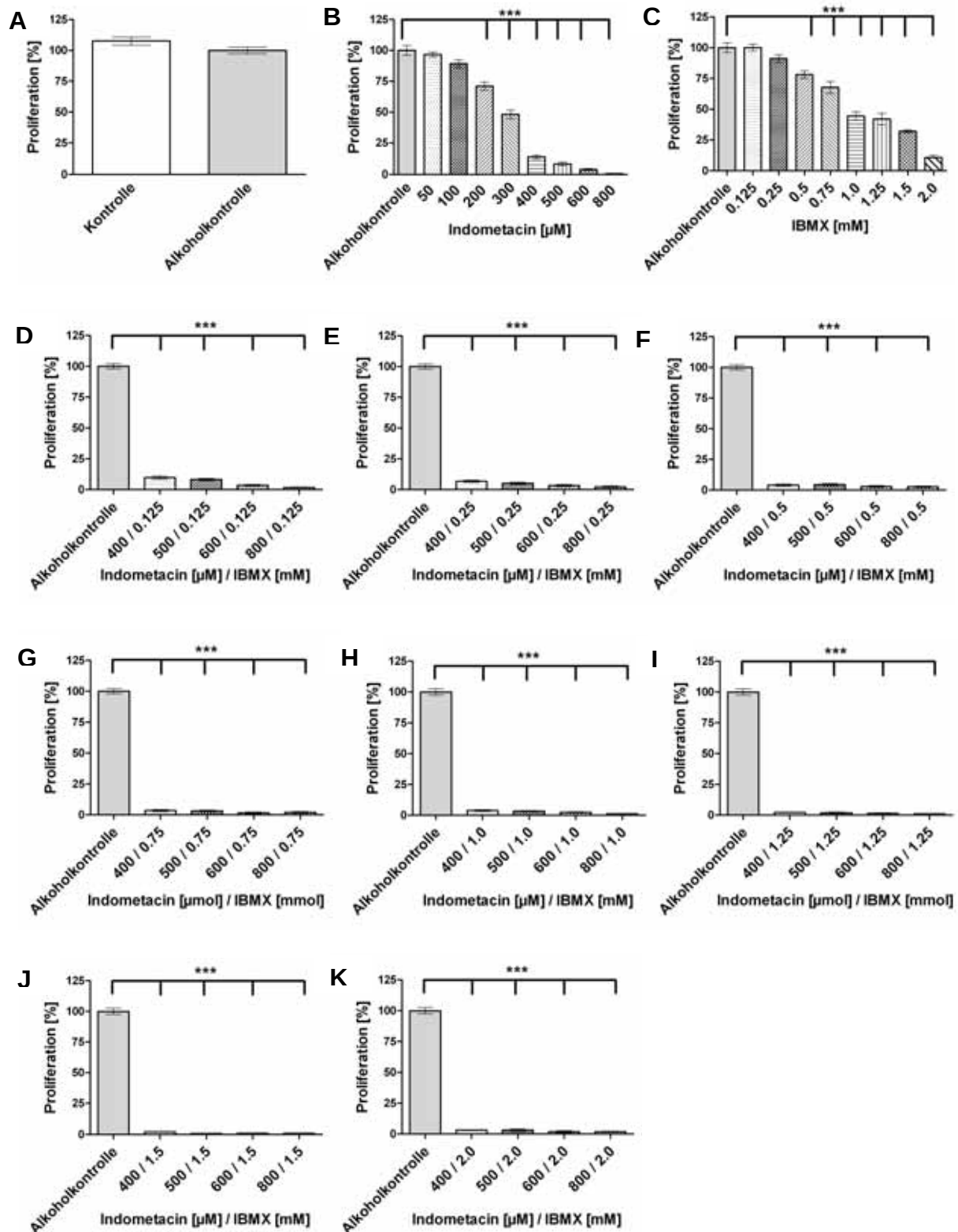


Abb. 4.31: Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin (400-800 µM) und IBMX (0,125-2,0 mM). Aufgeführt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-K**). In jeder Abbildung wurde die IBMX-Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist, dass die einzelne Behandlung mit Indometacin (**B**) eine stärkere signifikante Wachstumshemmung verursacht, als die einzelne Behandlung mit IBMX (**C**). Die Kombinationsbehandlung führt schon bei der geringsten IBMX-Konzentration (0,125 mM) (**D**) zu einer starken hochsignifikanten Hemmung der Proliferation. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

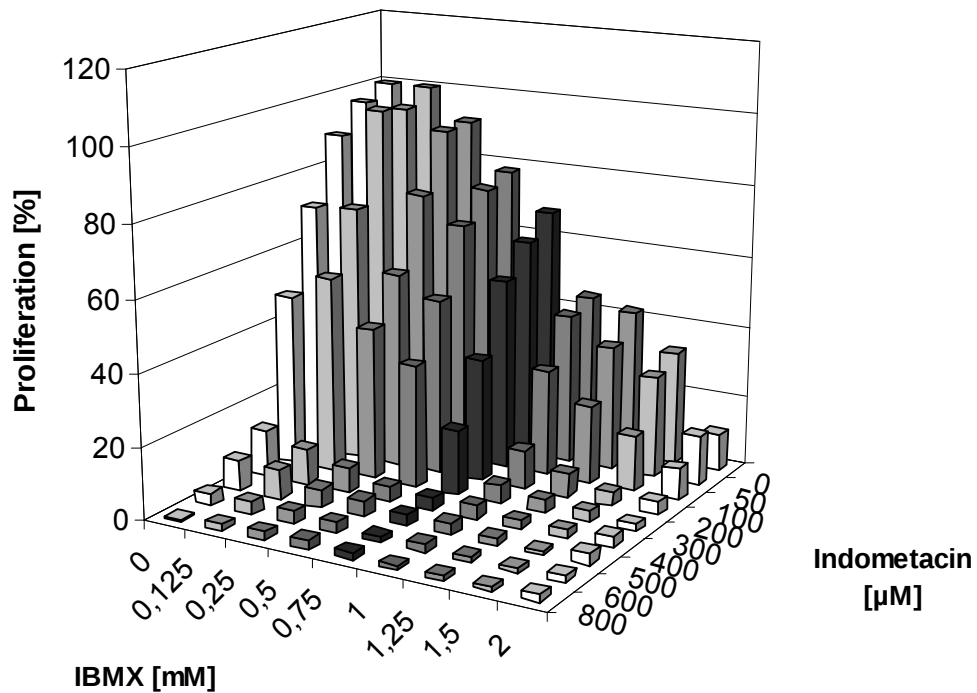


Abb. 4.32: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von OH3-Zellen mit Indometacin und IBMX. Zu erkennen ist, dass die hohen Konzentrationen Indometacin unabhängig von der IBMX Konzentration eine starke Proliferationshemmung verursachen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

Eine Zusammenfassung der in Abb. 4.30 und 4.31 dargestellten Ergebnisse zeigt Abb. 4.32. In der 3-D-Darstellung ist der starke proliferationshemmende Effekt von Indometacin in den hohen Konzentrationen ab 400 µM auf etwa 2 % der Alkoholkontrolle gut erkennbar. Diese Inhibition war unabhängig von der IBMX Konzentration. Allerdings erreichte auch IBMX in hohen Konzentrationen in Kombination schon mit 100 µM Indometacin eine Inhibition auf 21 % der Alkoholkontrolle (IBMX: 1,25 mM), auf 16 % der Alkoholkontrolle (IBMX: 1,5 mM) und auf 9 % der Alkoholkontrolle (IBMX: 2,0 mM). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die OH3-Zellen sehr sensibel auf eine Behandlung mit den beiden Stoffen reagierten. Die Hemmung durch Indometacin war noch stärker ausgeprägt, als durch IBMX, deshalb reichte schon die geringe Dosis Indometacin (300 µM) in Kombination mit IBMX (2,0 mM) für eine maximale Hemmung aus.

4.1.3.3 H69-Zellen

Um einen zytotoxischen Effekt des Alkohols, in dem die Medikamente gelöst waren, auszuschließen, wurde die Zellproliferation in der Alkoholkontrolle derjenigen im Kulturmedium gegenübergestellt (Abb. 4.33 A). Der Unterschied in der Proliferation war nicht signifikant.

Die einzelne Behandlung mit Indometacin (Abb. 4.33 B) erreichte schon in geringen Konzentrationen eine Inhibition des Wachstums auf 91 % der Alkoholkontrolle (50 μ M) und eine hochsignifikante Inhibition auf 82 % (100 μ M), auf 65 % (200 μ M) und auf 45 % der Alkoholkontrolle (300 μ M). Die einzelne Behandlung mit IBMX (Abb. 4.33 C) bewirkte eine signifikante Hemmung der Proliferation ab einer Dosis von 0,5 mM. Dieser Effekt steigerte sich dosisabhängig bis zu einer Inhibition auf 8 % der Alkoholkontrolle bei der maximalen Dosis von 2,0 mM.

Die kombinierte Behandlung mit IBMX und Indometacin in geringen Konzentrationen (Abb. 4.33 D-K) hemmte das Wachstum der H69-Zellen ab einer IBMX Dosis von 0,75 mM bei allen Indometacin Konzentrationen hochsignifikant (Abb. 4.33 G-K). Schon die Kombinationsgabe von 1,0 mM IBMX und 300 μ M Indometacin reichte für eine Proliferationshemmung auf 5 % der Alkoholkontrolle aus. Diese maximale Hemmung bei einer Behandlung mit 300 μ M Indometacin konnte durch Erhöhung der IBMX Dosis nicht mehr gesteigert werden (Abb. 4.33 I-K).

Die einzelne Behandlung mit Indometacin in den hohen Konzentrationen (Abb. 4.34 B) hemmte die Proliferation der H69-Zellen hochsignifikant auf 4 % (400 μ M), auf 3 % (500 μ M), auf 1,3 % (600 μ M) und auf 1 % der Alkoholkontrolle bei der höchsten Dosis von 800 μ M. Die Kombinationsbehandlung mit IBMX bei diesen Indometacin Konzentrationen ergab schon bei der geringsten IBMX Dosis eine Hemmung auf etwa 2 % der Alkoholkontrolle (Abb. 4.34 D), die auch durch höhere IBMX Dosen nicht mehr gesteigert wurde.

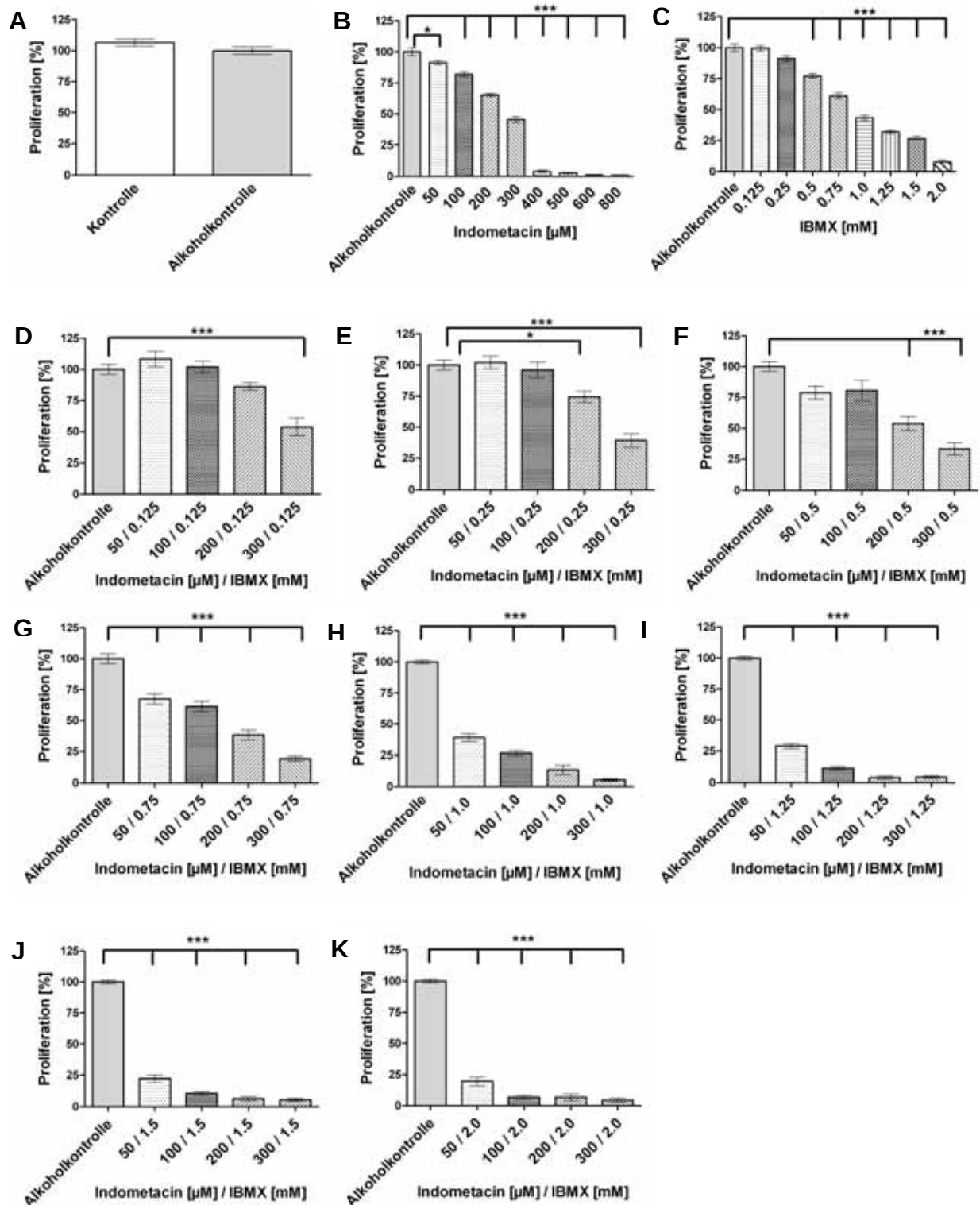


Abb. 4.33: Behandlung von H69-Zellen mit Indometacin (50-300 µM) und IBMX (0,125-2,0 mM). Gezeigt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-K**). In jeder Abbildung wurde die IBMX Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist, dass die einzelne Behandlung mit Indometacin (**B**) eine stärkere signifikante Wachstumshemmung verursacht, als die einzelne Behandlung mit IBMX (**C**). In Kombination mit Indometacin verursacht IBMX dagegen schon in der geringsten Konzentration (0,125 mM) (**D**) eine signifikante Hemmung der Proliferation. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 9$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

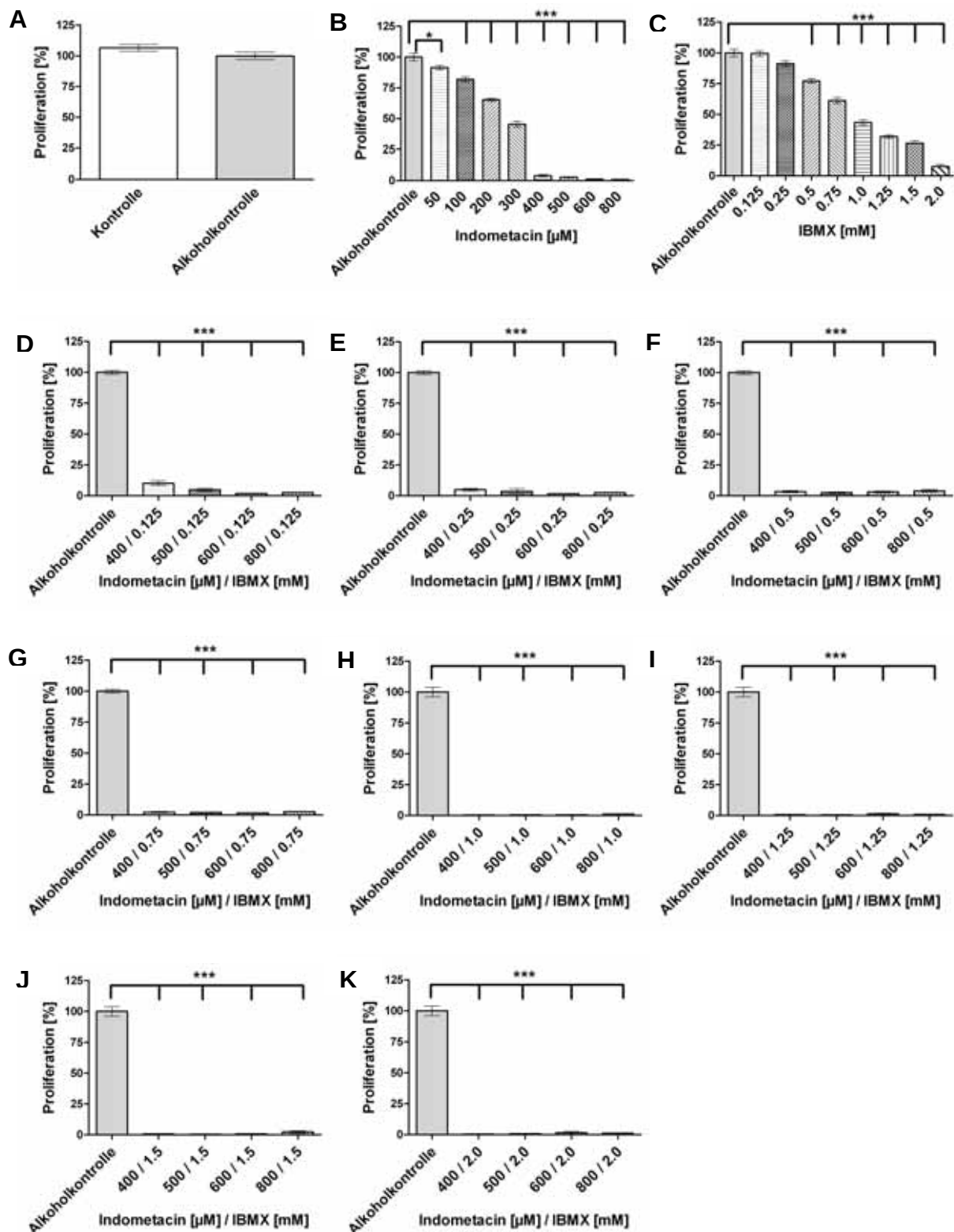


Abb. 4.34: Behandlung von H69-Zellen mit Indometacin (400-800 μM) und IBMX (0,125-2,0 mM). Aufgeführt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-K**). In jeder Abbildung wurde die IBMX-Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist, dass die einzelne Behandlung mit Indometacin (**B**) eine stärkere signifikante Wachstumshemmung verursacht, als die einzelne Behandlung mit IBMX (**C**). Die Kombinationsbehandlung führt schon bei der geringsten IBMX-Konzentration (0,125 mM) (**D**) zu einer starken hochsignifikanten Hemmung der Proliferation. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

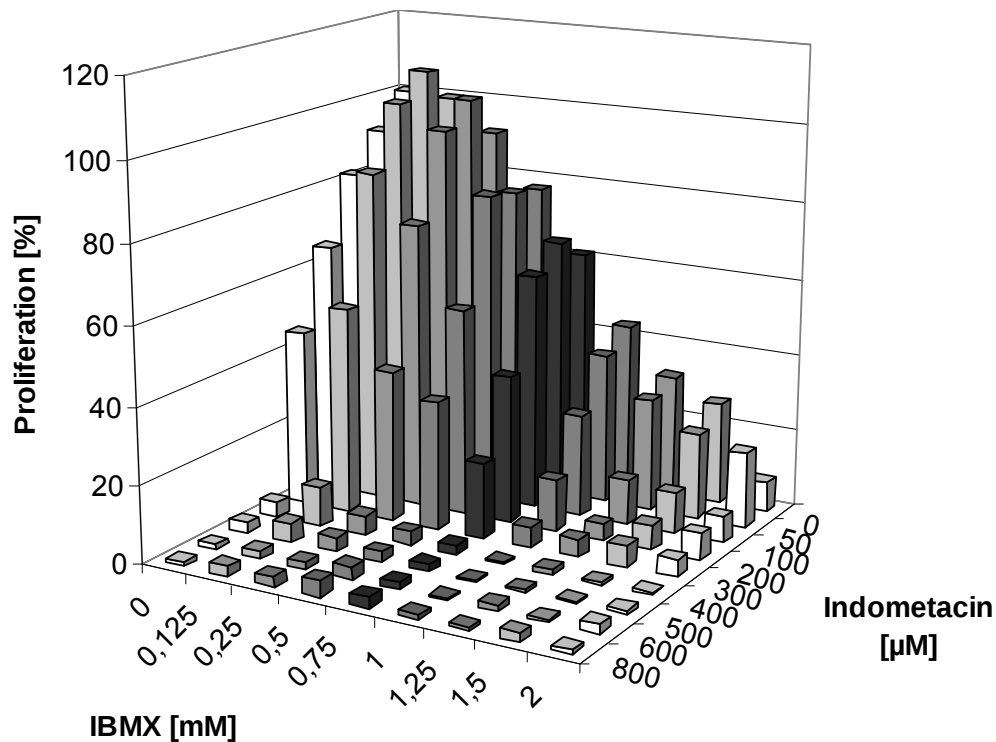


Abb. 4.35: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von H69-Zellen mit Indometacin und IBMX. Zu erkennen ist, dass die Proliferation durch die hohen Konzentrationen von Indometacin am stärksten gehemmt wird. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

Eine Zusammenfassung der in Abb. 4.33 und Abb. 4.34 dargestellten Ergebnisse zeigt Abb. 4.35. In der 3-D-Darstellung ist zu erkennen, dass die Proliferationshemmung der H69-Zellen ab der Indometacin Konzentration von 400 μM unabhängig von der IBMX Dosis sehr ausgeprägt war. Aber auch schon bei geringeren Indometacin Konzentrationen konnte eine deutliche Proliferationshemmung durch Kombination mit IBMX erreicht werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Indometacin und IBMX in ihrer proliferationshemmenden Wirkung auf die H69-Zellen addieren. Die einzelne Behandlung mit Indometacin (300 μM) bewirkte beispielsweise eine Hemmung auf 45 % der Alkoholkontrolle und IBMX (1,25 mM) eine Hemmung auf 32 % der Alkoholkontrolle. In Kombination addierte sich die Wirkung fast auf eine Gesamteinhibition des Wachstums auf etwa 6 % (Abb. 4.35).

4.1.3.4 SW2-Zellen

Um einen zytotoxischen Effekt des Alkohols, in dem die Medikamente gelöst waren, auszuschließen, wurde die Zellproliferation in der Alkoholkontrolle derjenigen im Kulturmedium gegenübergestellt (Abb. 4.36 A). Der Unterschied in der Proliferation war nicht signifikant.

Die Einzelgabe von Indometacin (Abb. 4.36 B) hatte auf die Zelllinie SW2 einen in allen Konzentrationen hochsignifikanten proliferationshemmenden Effekt. Die geringen Dosen erreichten eine Inhibition der Proliferation auf 87 % (50 µM), auf 74 % (100 µM), auf 55 % (200 µM) und auf 33 % der Alkoholkontrolle (300 µM). Die Hemmung durch die Einzelbehandlung mit IBMX (Abb. 4.36 C) war ab einer Dosis von 0,25 mM hochsignifikant und steigerte sich dosisabhängig auf bis zu 20 % der Alkoholkontrolle bei der maximalen Konzentration von 2,0 mM.

Die kombinierte Gabe von Indometacin und IBMX (Abb. 4.36 D-K) hatte in allen Konzentrationen bis auf die Kombination der geringsten IBMX Konzentration mit den beiden geringsten Indometacin Dosen (Abb. 4.36 D) einen hochsignifikanten proliferationshemmenden Effekt. Die Hemmung war auch hier dosisabhängig und erreichte ihr Maximum bei Kombination der niedrigen Indometacin-Konzentrationen mit der höchsten IBMX-Konzentration (Abb. 4.36 K).

Die Einzelhemmung durch Indometacin in den hohen Konzentrationen (Abb. 4.37 B) konnte auf 10 % (400 µM), auf 12 % (500 µM), auf 5 % (600 µM) und auf 1,4 % der Alkoholkontrolle (800 µM) gesteigert werden. In Kombination mit IBMX (Abb. 4.37 D-K) war allerdings kein Unterschied in der Wachstumsinhibition zur Behandlung mit den geringen Indometacin-Konzentrationen und der IBMX-Konzentration von 2,0 mM (Abb. 4.36 K) zu erkennen. Hier war die maximale Hemmung bei 3 % der Alkoholkontrolle erreicht.

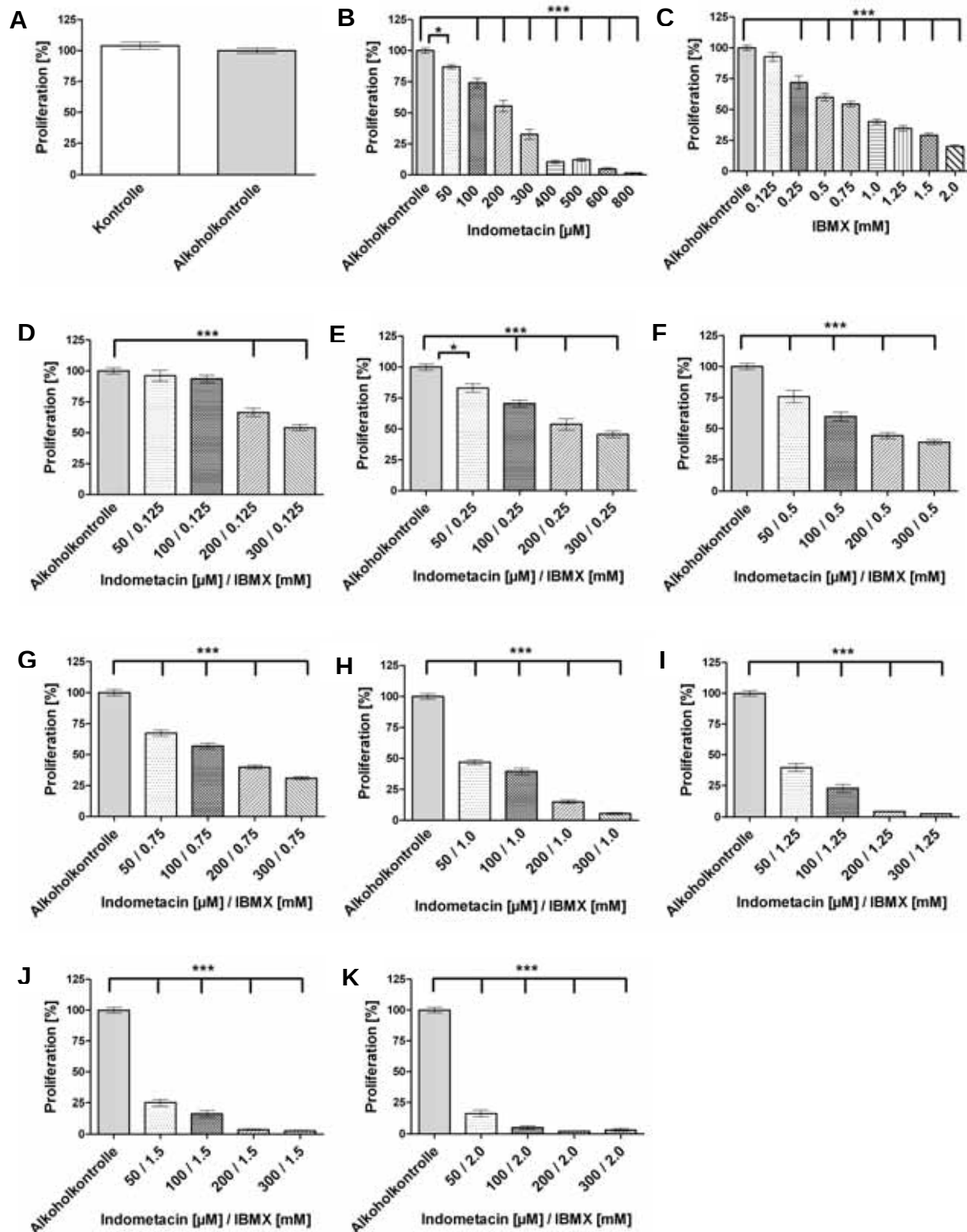


Abb. 4.36: Behandlung von SW2-Zellen mit Indometacin (50-300 μ M) und IBMX (0,125-2,0 mM). Aufgeführt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-K**). In jeder Abbildung wurde die IBMX-Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist in allen Konzentrationen ein hochsignifikanter dosisabhängiger proliferationshemmender Effekt sowohl bei Einzel- als auch bei Kombinationsbehandlung. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 9$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

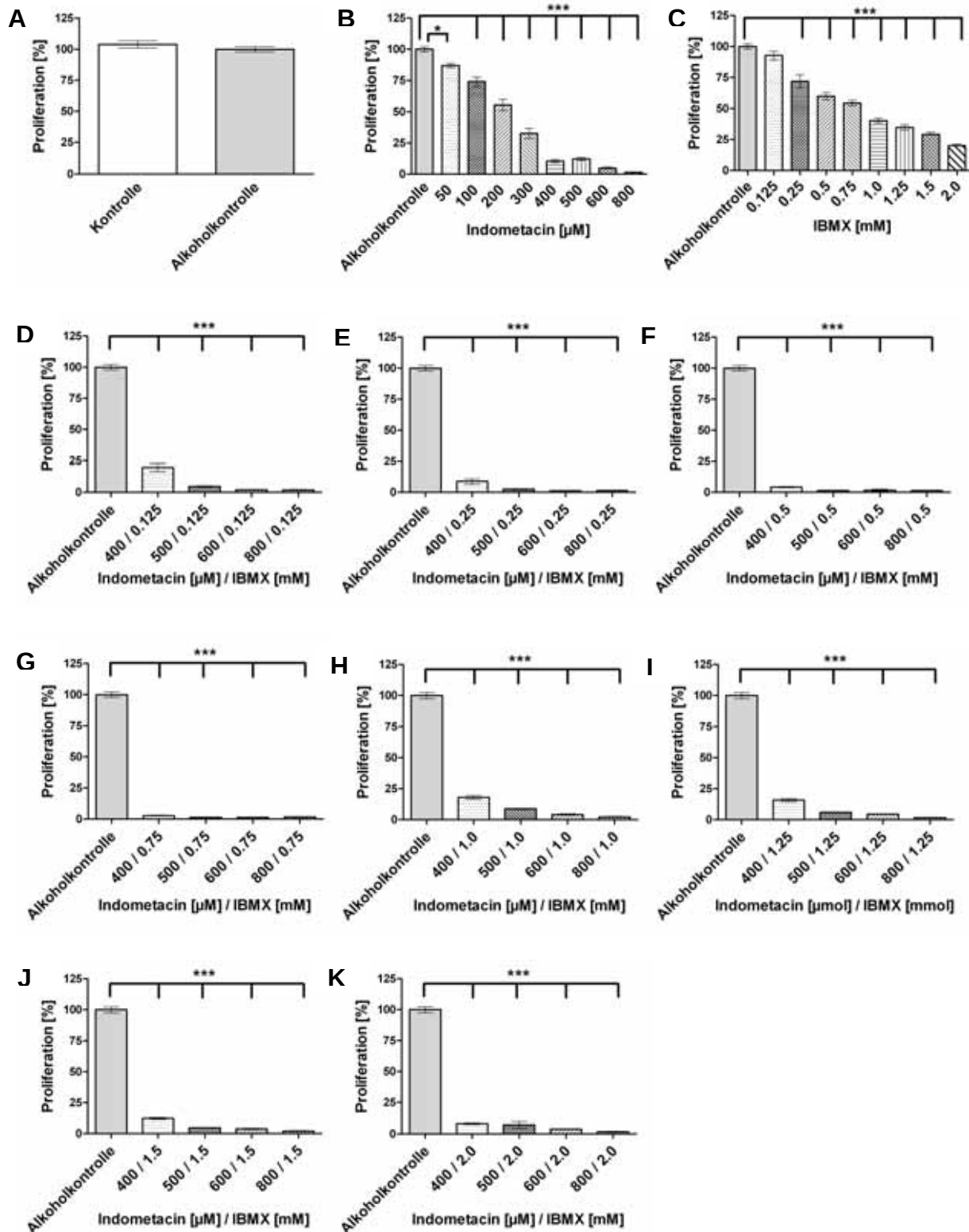


Abb. 4.37: Behandlung von SW2-Zellen mit Indometacin (400-800 μ M) und IBMX (0,125-2,0 mM). Dargestellt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-K**). In jeder Abbildung wurde die IBMX-Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist in allen Konzentrationen ein hochsignifikanter dosisabhängiger proliferationshemmender Effekt sowohl bei Einzel- als auch bei Kombinationsbehandlung. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 6$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

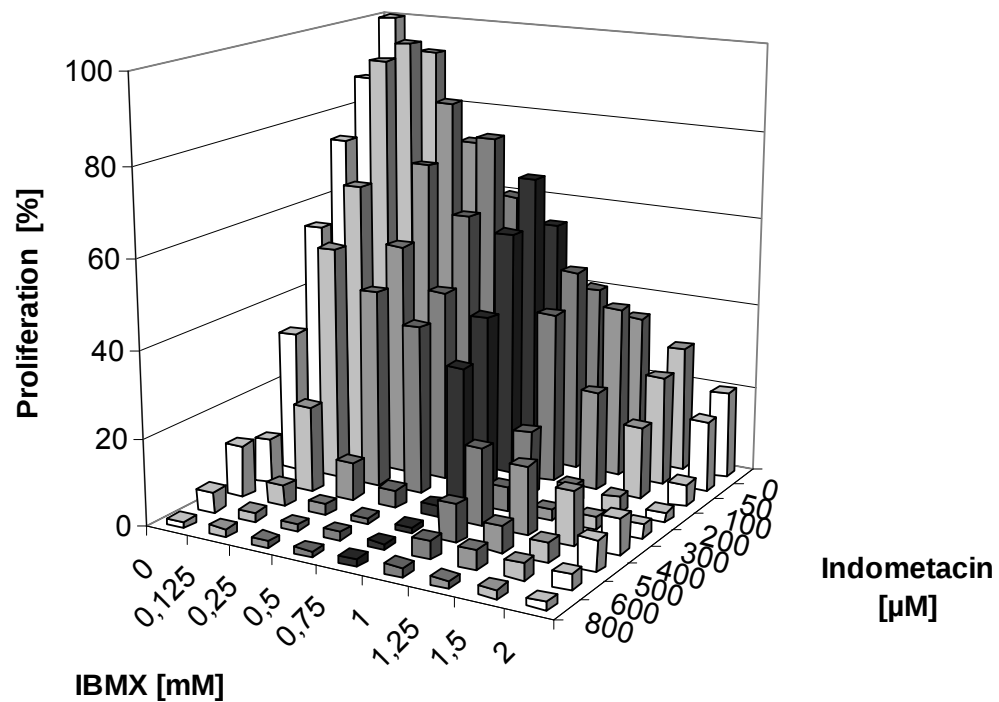


Abb. 4.38: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von SW2-Zellen mit Indometacin und IBMX. Zu erkennen ist, dass die Proliferation durch die hohen Konzentrationen von Indometacin am stärksten gehemmt wird. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

Eine Zusammenfassung der in Abb. 4.36 und Abb. 4.37 dargestellten Ergebnisse zeigt Abb. 4.38. In der 3-D-Darstellung der Behandlung der SW2-Zellen mit Indometacin und IBMX wird deutlich, dass besonders Indometacin in den hohen Konzentrationen einen starken inhibitorischen Effekt auf die Zellen hatte. Die durch IBMX verursachte Hemmung der Proliferation war dagegen nicht so ausgeprägt.

4.1.3.5 H82-Zellen

Der Versuchsaufbau für die H82-Zellen wurde im Vergleich zu den anderen Zelllinien geändert, weil die H82-Zellen ausgesprochen gut auf die Behandlung mit Indometacin reagierten. Daher wurden hier extrem kleine Konzentrationen an Indometacin und IBMX zu den Zellen gegeben (Abb. 4.39; 4.40).

Um einen zytotoxischen Effekt des Alkohols, in dem die Medikamente gelöst waren, auszuschließen, wurde die Zellproliferation in der Alkoholkontrolle derjenigen im Kulturmedium gegenübergestellt (Abb. 4.39 A). Der Unterschied in der Proliferation war nicht signifikant.

Die einzelne Behandlung mit Indometacin (Abb. 4.39 B) hatte ab einer Konzentration von 25 μM einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt auf 68 % der Alkoholkontrolle. Dieser Effekt steigerte sich auf eine hochsignifikante Inhibition des Wachstums auf 40 % (50 μM), auf 30 % (100 μM) und auf 23 % der Alkoholkontrolle (200 μM). Die einzelne Behandlung der H82-Zellen mit IBMX (Abb. 4.39 C) hatte nur in den beiden höchsten Dosen einen wachstumshemmenden Effekt und dieser belief sich lediglich auf 76 % (0,25 mM) und auf 67 % der Alkoholkontrolle (0,5 mM).

Trotz dieser kleinen Konzentrationen, hatte die kombinierte Gabe von Indometacin und IBMX (Abb. 4.39 D-I) in fast allen Konzentrationen einen proliferationshemmenden Effekt auf die H82-Zellen, außer dort, wo Indometacin in der kleinsten Konzentration zusammen mit IBMX mit den drei geringsten Dosen hinzugefügt wurde (6,25 μM) (Abb. 4.39 D-F). Der wachstumshemmende Effekt war bei den niedrigen Indometacin-Konzentrationen dort am höchsten (12 % der Alkoholkontrolle), wo es mit 0,015625 mM IBMX (Abb. 4.39 D), mit 0,03125 mM IBMX (Abb. 4.39 E), mit 0,0625 mM IBMX (Abb. 4.39 F) und 0,125 mM IBMX (Abb. 4.39 G) kombiniert wurde.

Die Behandlung mit IBMX und Indometacin in den höheren Konzentrationen (100 + 200 μM) (Abb. 4.40 D-F) hatte ebenfalls eine hochsignifikante dosisabhängige Wachstumsinhibition der H82-Zellen zur Folge. Die maximale Hemmung (8 % der Alkoholkontrolle) wurde bei der Kombination Indometacin (100 μM) und IBMX (0,25 mM) (Abb. 4.40 F) erreicht und konnte durch eine Höherdosierung der Stoffe nicht mehr gesteigert werden.

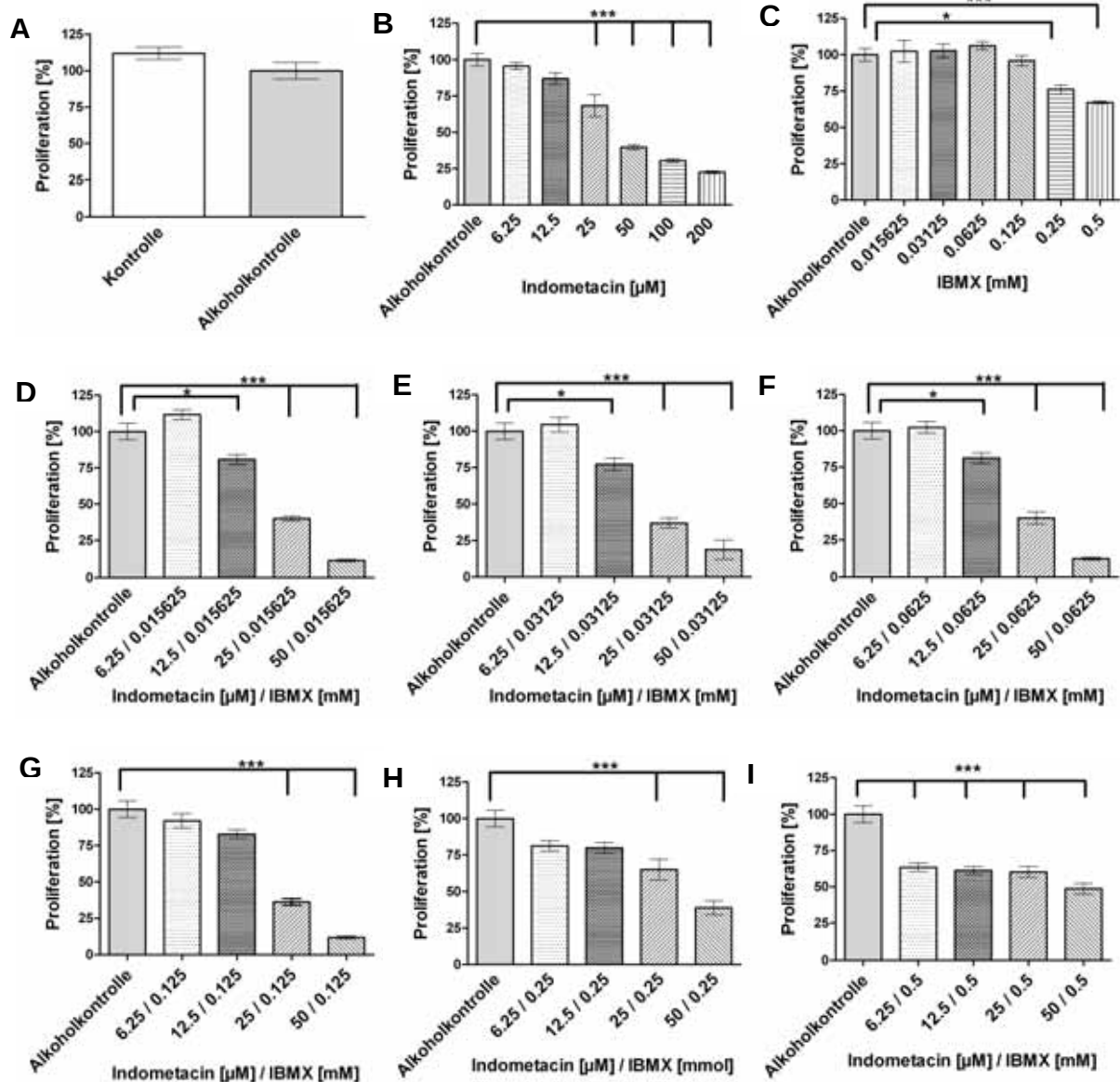


Abb. 4.39: Behandlung von H82-Zellen mit Indometacin (6,25-50 μ M) und IBMX (0,015625-0,5 mM). Gezeigt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-I**). In jeder Abbildung wurde die IBMX-Konzentration konstant gehalten. Zu erkennen ist, dass die einzelne Behandlung mit Indometacin (**B**) eine stärkere signifikante Wachstumshemmung verursacht, als die einzelne Behandlung mit IBMX (**C**). Die Kombinationsbehandlung führt schon bei der geringsten IBMX-Konzentration (0,015625 mM) (**D**) zu einer starken hochsignifikanten Hemmung der Proliferation. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 12$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

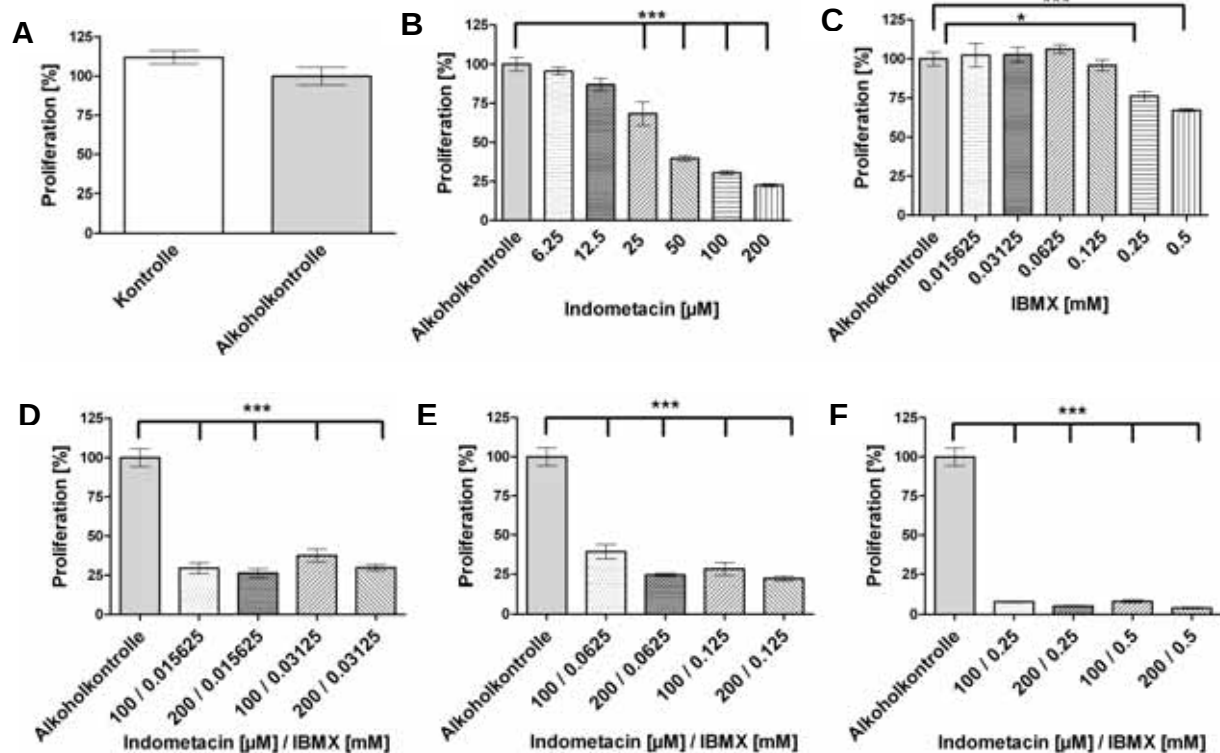


Abb. 4.40: Behandlung von H82-Zellen mit Indometacin (100-200 μ M) und IBMX (0,015625–0,5 mM). Abgebildet ist das Zellwachstum in Abhängigkeit zur Behandlung mit Indometacin (**B**), IBMX (**C**) und unter Kombination der beiden Stoffe (**D-F**). Zu erkennen ist, dass die einzelne Behandlung mit Indometacin (**B**) eine stärkere signifikante Wachstumshemmung verursacht, als die einzelne Behandlung mit IBMX (**C**). Nach Kombinationsbehandlung ist bereits bei der geringsten IBMX-Konzentration (0,015625) (**D**) ein starker, hochsignifikanter proliferationshemmender Effekt zu beobachten. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 12$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test) * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Eine Zusammenfassung der in Abb. 4.39 und Abb. 4.40 dargestellten Ergebnisse zeigt Abb. 4.41. In dieser 3-Dimensionalen Darstellung lässt sich erkennen, dass bei den H82-Zellen schon 4 bis 8 mal geringere Indometacin und IBMX Konzentrationen ausreichen, um die Proliferation auf ähnlich niedrige Werte zu hemmen, wie bei den anderen Zelllinien (8 % der Alkoholkontrolle bei 100 μM Indometacin + 0,25 mM IBMX). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar Indometacin den hauptsächlichen proliferationshemmenden Effekt auf die H82-Zellen ausmachte (23 % der Alkoholkontrolle bei 200 μM), die Kombination mit IBMX (0,25 + 0,5 mM) aber die Inhibition noch auf 8 % der Alkoholkontrolle steigerte.

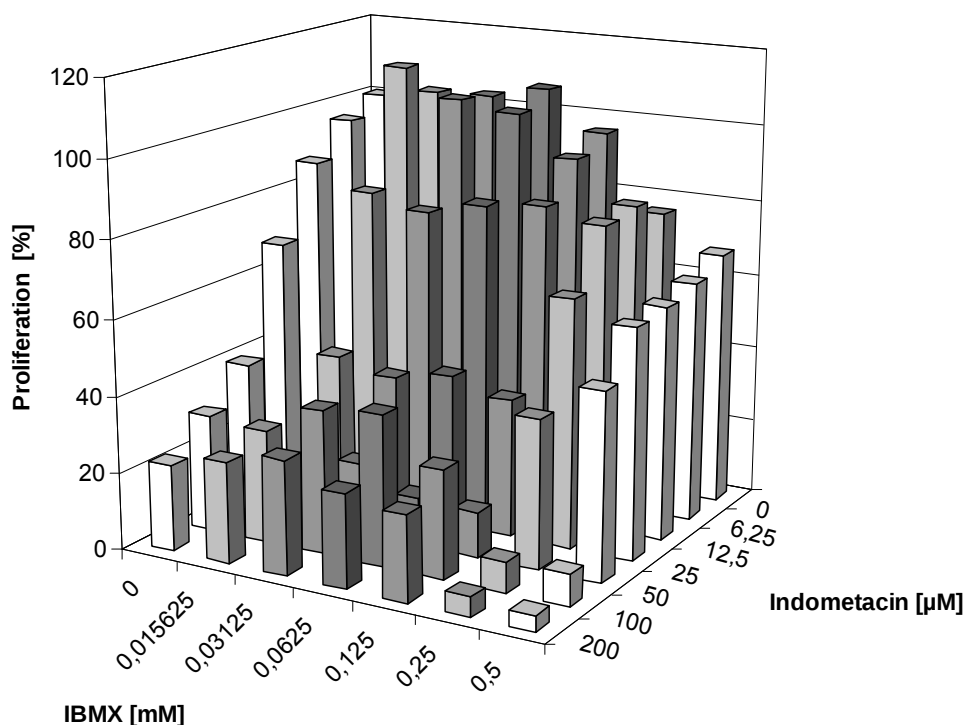


Abb. 4.41: Zusammenfassende Darstellung der Behandlung von H82-Zellen mit Indometacin und IBMX. Zu erkennen ist, dass schon nach Behandlung mit extrem kleinen Konzentrationen von Indometacin und IBMX ein starker proliferationshemmender Effekt erzielt wurde, wobei Indometacin den Hauptanteil an der Proliferationshemmung dieser Zelllinie hat. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

4.2 Elektronenmikroskopische Analyse

Um morphologische Veränderungen der Zellen nach der Einwirkung von NID darstellen zu können, wurden alle fünf Zelllinien jeweils für 72 h in Kulturmedium und in NID kultiviert und anschließend von den Zellen elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Für die graphische Darstellung wurden die lebendigen und toten Zellen ausgezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt.

4.2.1 OH1-Zellen

Die Morphologie der OH1-Zellen wies nach 72 h Behandlung mit NID (Abb. 4.42 B) keine erkennbaren Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb. 4.42 A) auf. Ein Vergleich des Anteils der lebendigen Zellen an allen ausgezählten Zellen (Abb. 4.42 C) nach 72 h NID-Behandlung mit der Kontrollgruppe (Kulturmedium), ergab keine signifikanten Unterschiede.

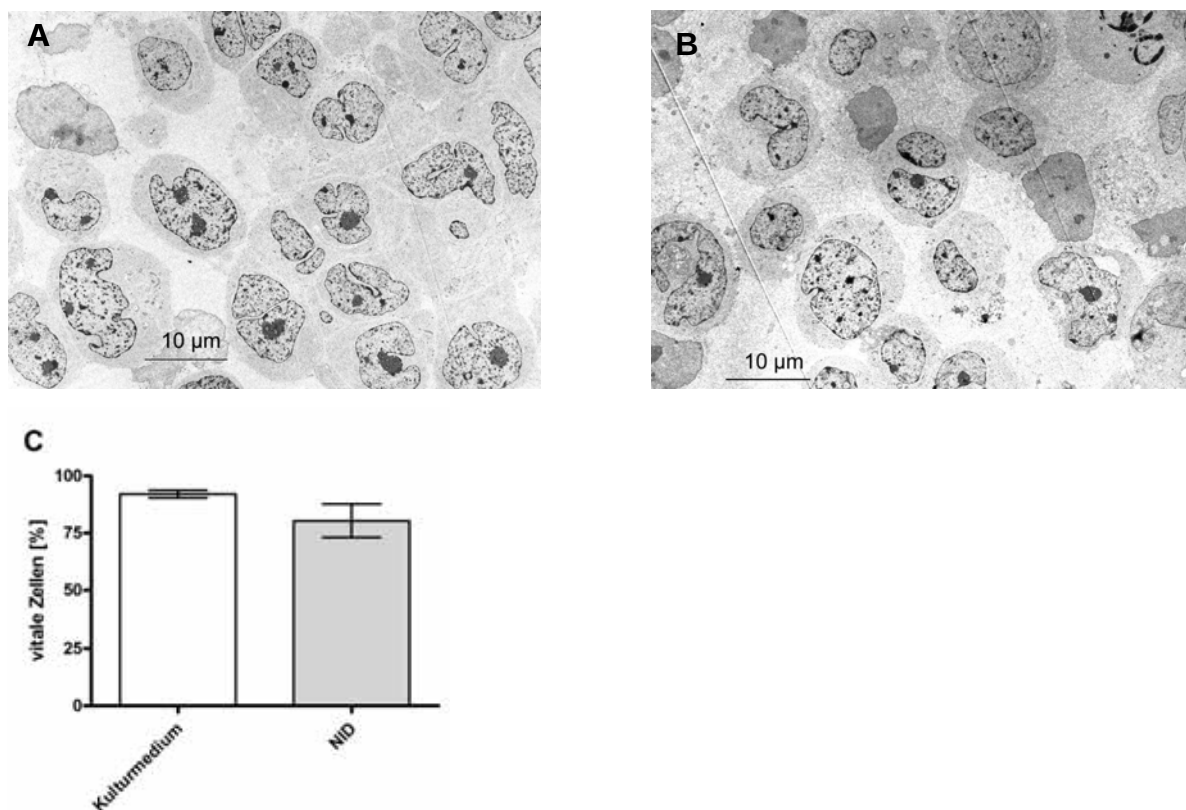


Abb. 4.42: Einfluss von NID auf die Vitalität der OH1-Zellen. Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der OH1-Zellen ohne Behandlung (A) und unter Behandlung mit NID (B) sowie der Anteil der vitalen Zellen an den ausgezählten Zellen im Kulturmedium versus (vs.) NID (C). Zu erkennen ist, dass sich nach 72 h Behandlung mit NID der Anteil der lebendigen Zellen gegenüber den Zellen im Kulturmedium nicht signifikant verändert hat. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$, t -Test.

4.2.2 OH3-Zellen

Das Bild der OH3-Zellen ähnelt dem der OH1-Zellen. Auch hier wies die Zellmorphologie nach 72 h Behandlung mit NID (Abb. 4.43 B) keine erkennbaren Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb. 4.43 A) auf. Die Gegenüberstellung der lebendigen Zellen (Abb. 4.43 C) nach 72 h NID-Behandlung mit der Kontrollgruppe (Kulturmedium), zeigen keine signifikanten Unterschiede.

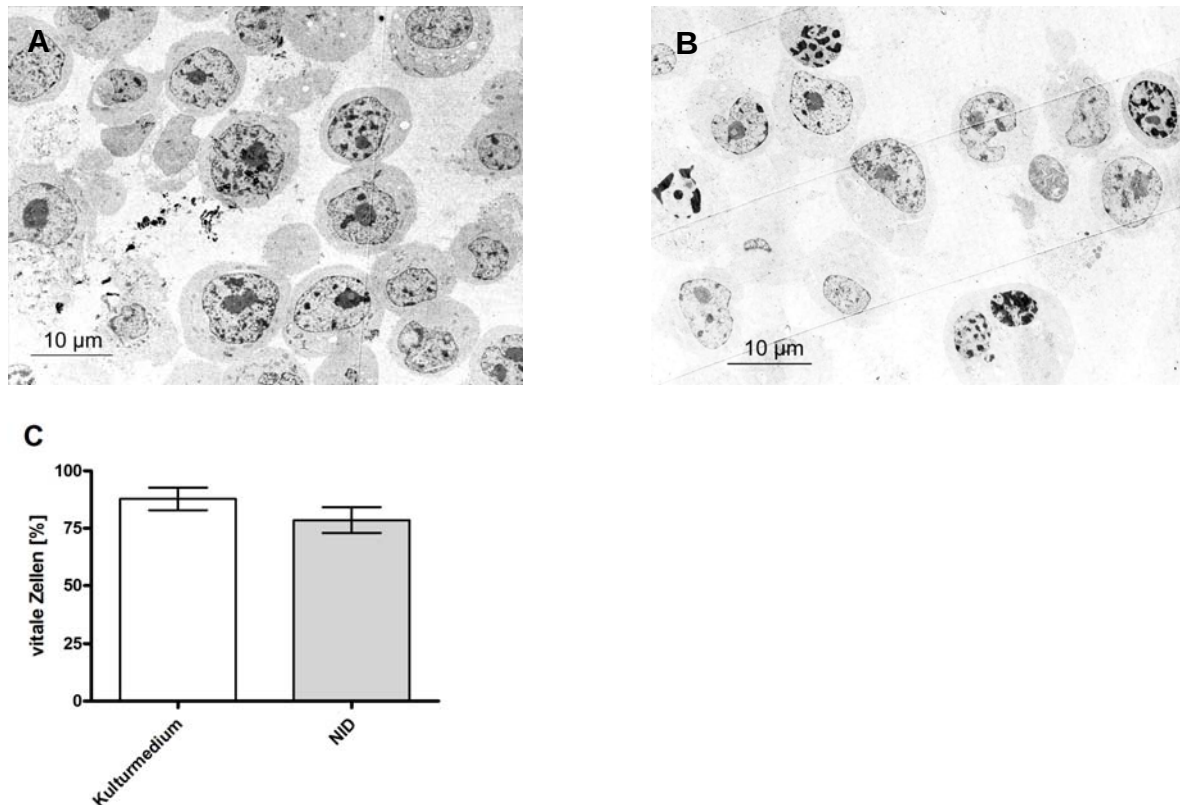


Abb. 4.43: Einfluss von NID auf die Vitalität der OH3-Zellen. Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der OH3-Zellen ohne Behandlung (A) und unter Behandlung mit NID (B) sowie der Anteil der vitalen Zellen an den ausgezählten Zellen im Kulturmedium vs. NID (C). Zu erkennen ist, dass sich nach 72 h Behandlung mit NID der Anteil der lebendigen Zellen gegenüber den Zellen im Kulturmedium nicht signifikant verändert hat. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$, t -Test.

4.2.3 H69-Zellen

Die Morphologie der H69-Zellen hatte sich nach 72 h NID-Behandlung (Abb. 4.44 B) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.44 A) verändert. Nach Behandlung (Abb. 4.44 B) waren viele Zellen tot, es waren mehrfach kondensierte Zellkerne und fragmentierte Zellen zu beobachten. Allerdings war der Unterschied in der Anzahl der lebendigen Zellen nach Behandlung und in der Kontrollgruppe (Kulturmedium) nicht signifikant (Abb. 4.44 C).

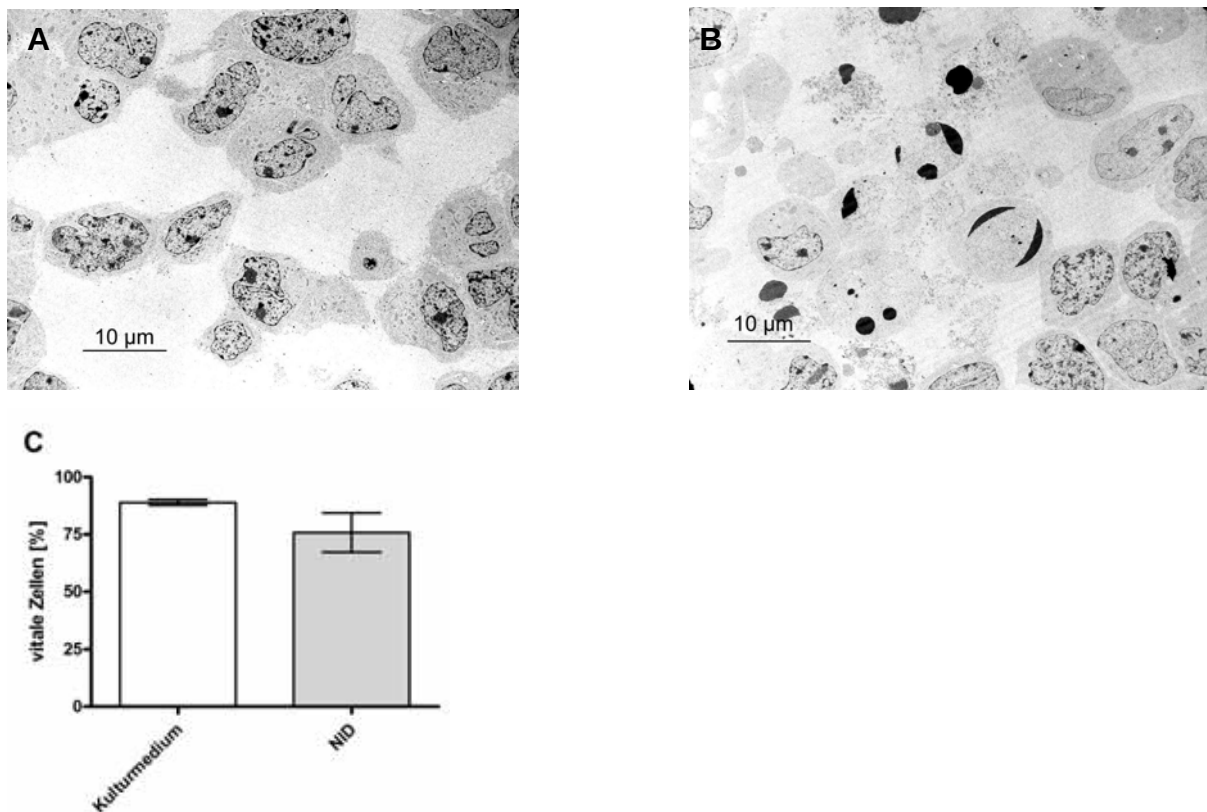


Abb. 4.44: Einfluss von NID auf die Vitalität der H69-Zellen. Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der H69-Zellen ohne Behandlung (A) und unter Behandlung mit NID (B) sowie der Anteil der vitalen Zellen an den ausgezählten Zellen im Kulturmedium vs. NID (C). Zu erkennen ist, dass sich nach 72 h Behandlung mit NID der Anteil der lebendigen Zellen gegenüber den Zellen im Kulturmedium nicht signifikant verändert hat. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$, t -Test.

4.2.4 SW2-Zellen

Die Morphologie der SW2-Zellen wies nach 72h NID-Behandlung keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Ebenso fanden sich keine Anzeichen für erhöhtes Zellsterben. Ein Vergleich des Anteils der lebendigen Zellen (Abb. 4.45 C) nach 72 h Behandlung mit NID mit der Kontrollgruppe (Kulturmedium), ergab keine signifikanten Unterschiede.

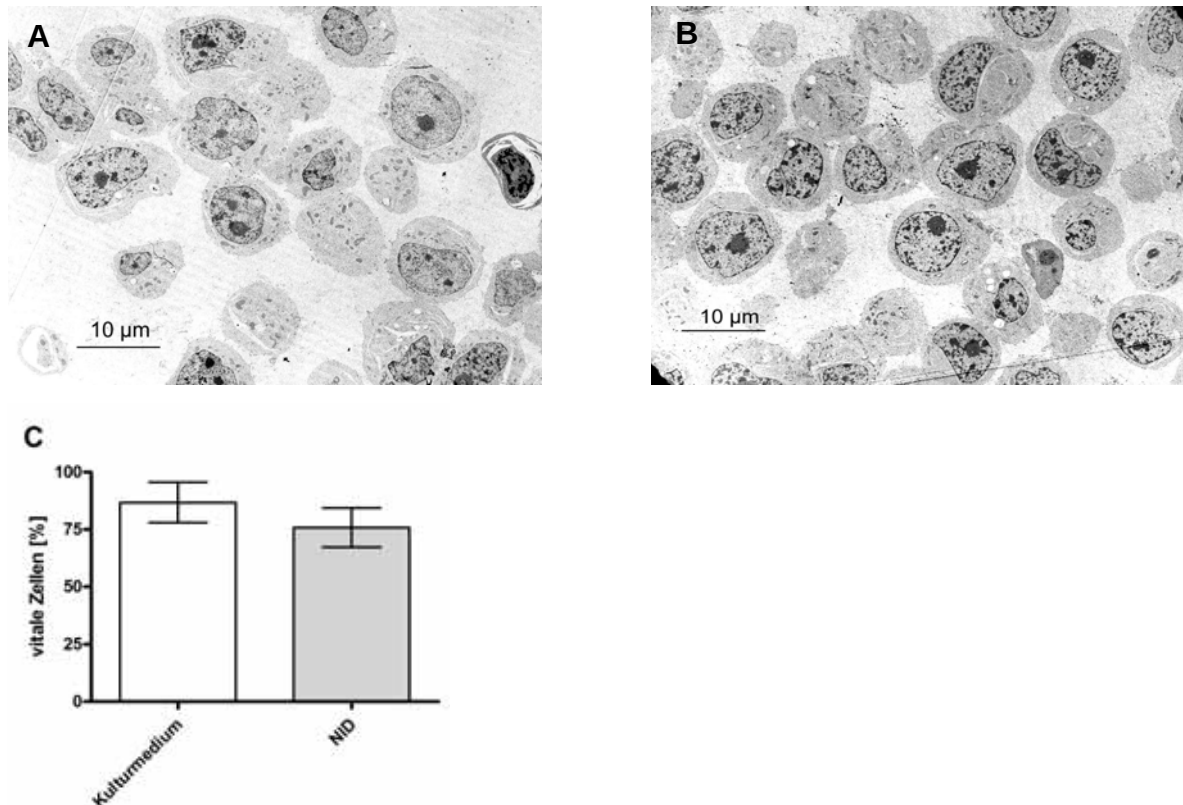


Abb. 4.45: Einfluss von NID auf die Vitalität der SW2-Zellen. Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der SW2-Zellen ohne Behandlung (A) und unter Behandlung mit NID (B) sowie der Anteil der vitalen Zellen an den ausgezählten Zellen im Kulturmedium vs. NID (C). Zu erkennen ist, dass sich nach 72 h Behandlung mit NID der Anteil der lebendigen Zellen gegenüber den Zellen im Kulturmedium nicht signifikant verändert hat. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$, t -Test.

4.2.5 H82-Zellen

Nach 72 h Behandlung der H82-Zellen mit NID (Abb. 4.46 B) waren große Unterschiede in der Morphologie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.46 A) zu beobachten. Nach Behandlung hatten die meisten H82-Zellen keine intakte Zellmembran mehr und eine Vielzahl von Zellfragmenten war zu beobachten. Auch der Vergleich der lebendigen Zellen (Abb. 4.46 C) im NID und im Kulturmedium durch Auszählen ergab hochsignifikante Unterschiede. Nach 72 h Behandlung mit NID waren fast 100% der H82-Zellen tot.

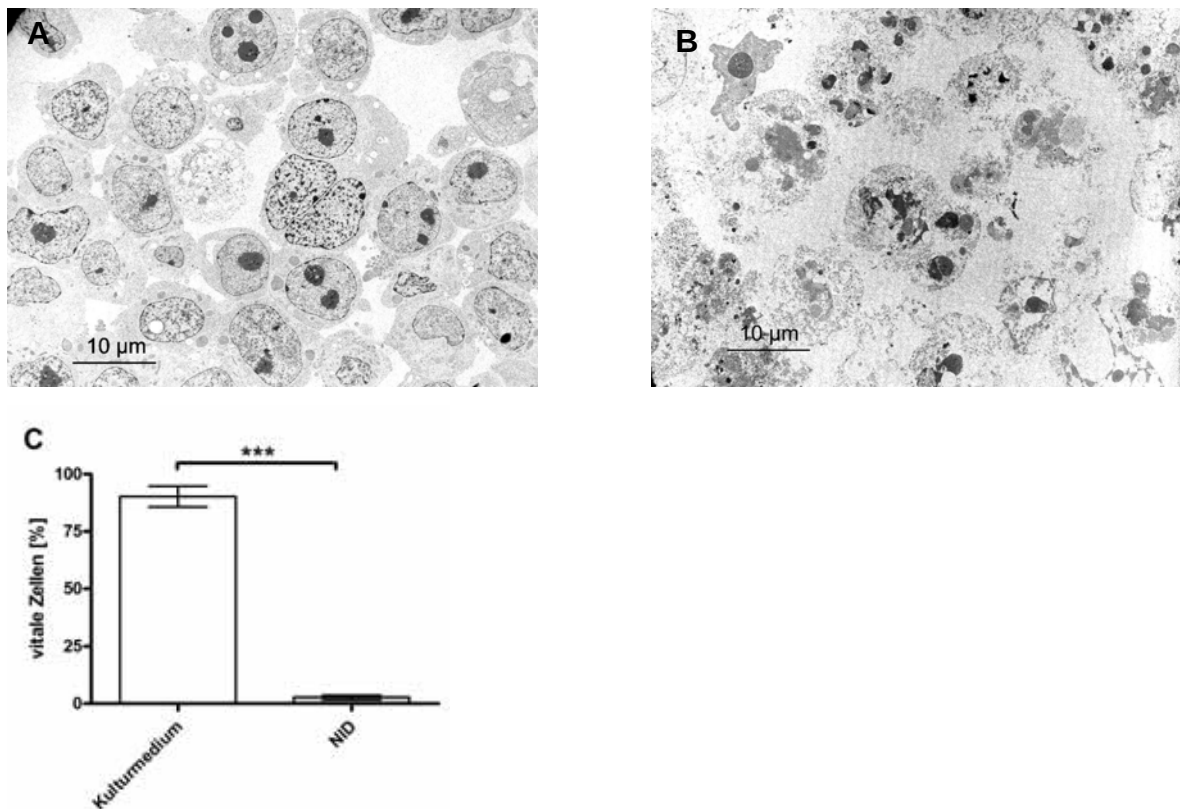


Abb. 4.46: Einfluss von NID auf die Vitalität der H82-Zellen. Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der H82-Zellen ohne Behandlung (A) und unter Behandlung mit NID (B) sowie der Anteil der vitalen Zellen an den ausgezählten Zellen im Kulturmedium vs. NID (C). Zu erkennen ist, dass nach 72 h Behandlung mit NID der Anteil der lebendigen Zellen im Vergleich zum Kulturmedium verschwindend gering ist. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$, t -Test: *** $p < 0,0001$.

4.3 Immunhistochemische Analyse

Das Vorhandensein von COX-1 (Abb. 4.47, Abb. 4.48, Abb. 4.49) und COX-2 (Abb. 4.50, Abb. 4.51, Abb. 4.52) wurde an den kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien SW2 und H82 immunhistochemisch untersucht, da die COX bekanntermaßen das Zielenzym ist, an dem Indometacin wirkt. Die Zelllinien SW2 und H82 wurden untersucht, da die Proliferation dieser Zelllinien besonders stark durch die Behandlung mit Indometacin gehemmt wurde. Als Positivkontrolle diente die Kolonkarzinomzelllinie HT29, die COX-1 und COX-2 exprimiert [Strillacci *et al.*, 2006; Lev-Ari *et al.*, 2006]. Gezeigt sind die mit dem primären Antikörper inkubierten Zellen (jeweils Abb. A), die Zellen ohne primären Antikörper (Negativkontrolle) (jeweils Abb. B) und mit IgG des Tieres, in dem der primäre Antikörper hergestellt wurde, inkubierte Zellen (Isotypenkontrolle) (jeweils Abb. C). Die Negativ- und Isotypenkontrollen wurden durchgeführt, um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers ausschließen zu können.

4.3.1 Untersuchung von COX-1 bei SW2-Zellen und H82-Zellen

Die COX-1 konnte bei den HT29-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen in schwacher Ausprägung nachgewiesen werden (Abb. 4.47). Bei den SW2- und H82-Zellen wurde keine COX-1 gefunden (Abb. 4.48 + 4.49).

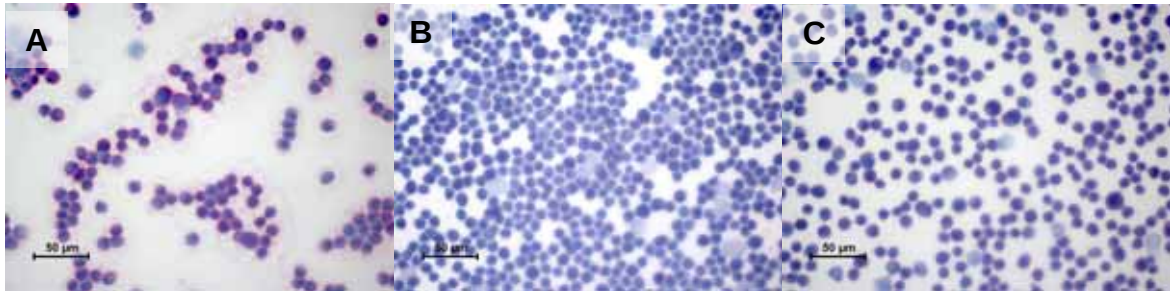


Abb. 4.47: COX-1 bei HT29-Zellen. Gezeigt ist die Positivkontrolle (A), die Negativkontrolle (B) und die Isotypen-Kontrolle (C).

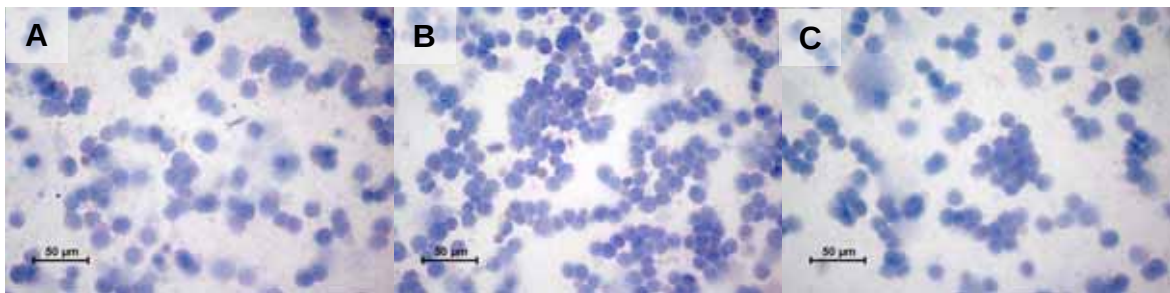


Abb. 4.48: COX-1 bei SW2-Zellen. Gezeigt ist die Positivkontrolle (A), die Negativkontrolle (B) und die Isotypen-Kontrolle (C).

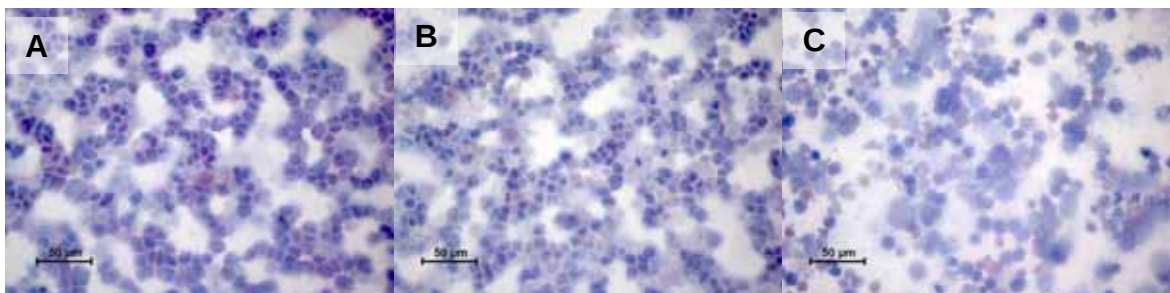


Abb. 4.49: COX-1 bei H82-Zellen. Gezeigt ist die Positivkontrolle (A), die Negativkontrolle (B) und die Isotypen-Kontrolle (C).

4.3.2 Untersuchung von COX-2 bei SW2-Zellen und H82-Zellen

COX-2 dagegen war bei allen drei Zelllinien nachweisbar. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte bei den HT29-Zellen (Abb. 4.50 A) und SW2-Zellen (Abb. 4.51 A) ein starkes Signal und bei den H82-Zellen (Abb. 4.52 A) ein schwaches Signal der COX-2 detektiert werden.

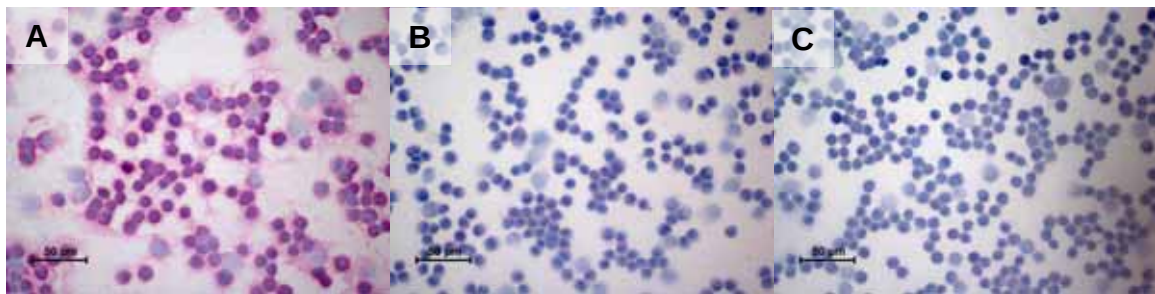


Abb. 4.50: COX-2 bei HT29-Zellen. Gezeigt ist die Positivkontrolle (A), die Negativkontrolle (B) und die Isotypen-Kontrolle (C).

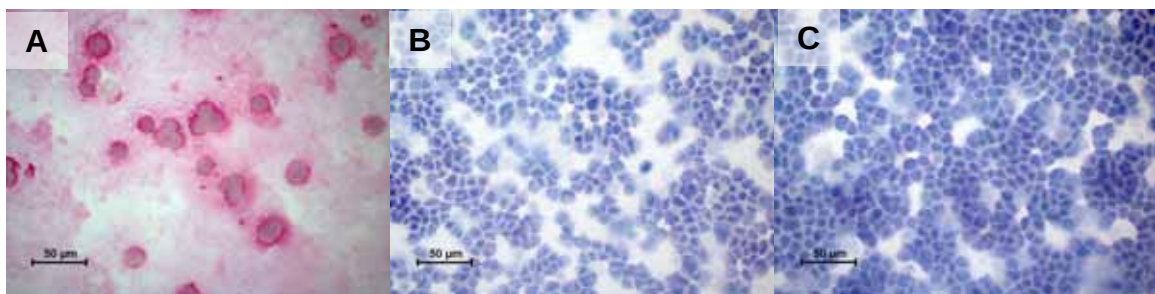


Abb. 4.51: COX-2 bei SW2-Zellen. Gezeigt ist die Positivkontrolle (A), die Negativkontrolle (B) und die Isotypen-Kontrolle (C).

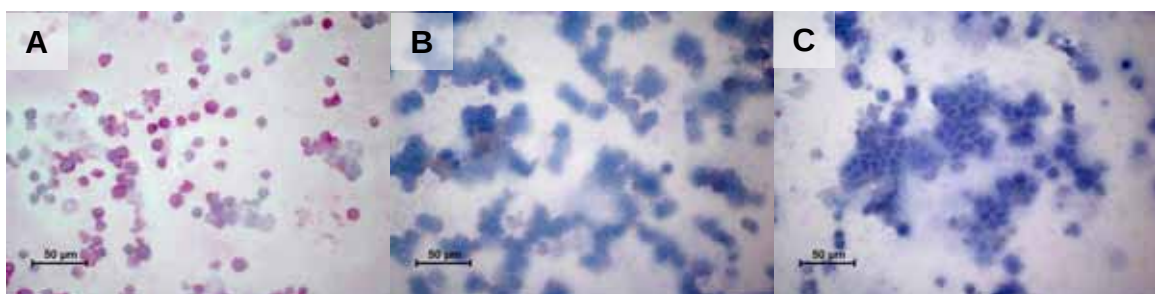


Abb. 4.52: COX-2 bei H82-Zellen. Gezeigt ist die Positivkontrolle (A), die Negativkontrolle (B) und die Isotypen-Kontrolle (C).

4.4 Western-Blot Analyse

4.4.1 Untersuchung von COX-2 bei H82-Zellen und SW2-Zellen

Um die Ergebnisse der Immunhistochemischen Analyse zu bestätigen, wurde die COX-2 in H82-Zellen und SW2-Zellen auch anhand der Western-Blot Analyse nachgewiesen. Das menschliche Protein der COX-2 hat nach der posttranslationalen Modifizierung durch Glycosylierung eine Größe von 70 bis 74 kDa [Taketo, 1998]. Allerdings haben schon Percival *et al.* [1994] beschrieben, dass außerdem eine nicht glycosylierte Form der COX-2 existiert, welche ein Molekulargewicht von 64 kDa hat. Dies wurde von Liu *et al.* [2006] bestätigt. Diese deglycosylierte COX-2 konnte sowohl in H82-Zellen als auch in SW2-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.53), wobei die Expression in H82-Zellen deutlich stärker ausgeprägt war, als in SW2-Zellen. Als Positivkontrolle diente wie in der immunhistochemischen Analyse die Kolonkarzinomzelllinie HT29, bei der bereits eine COX-2 Expression nachgewiesen werden konnte [Strillacci *et al.*, 2006; Lev-Ari *et al.*, 2006]. Zusätzlich zu der Bande bei 64 kDa erkennt man bei allen drei Zelllinien unspezifische Banden, welche zu vernachlässigen sind. Die Western-Blot Analyse wurde dreimal mit gleichem Ergebnis durchgeführt. Die Negativkontrolle war stets negativ.

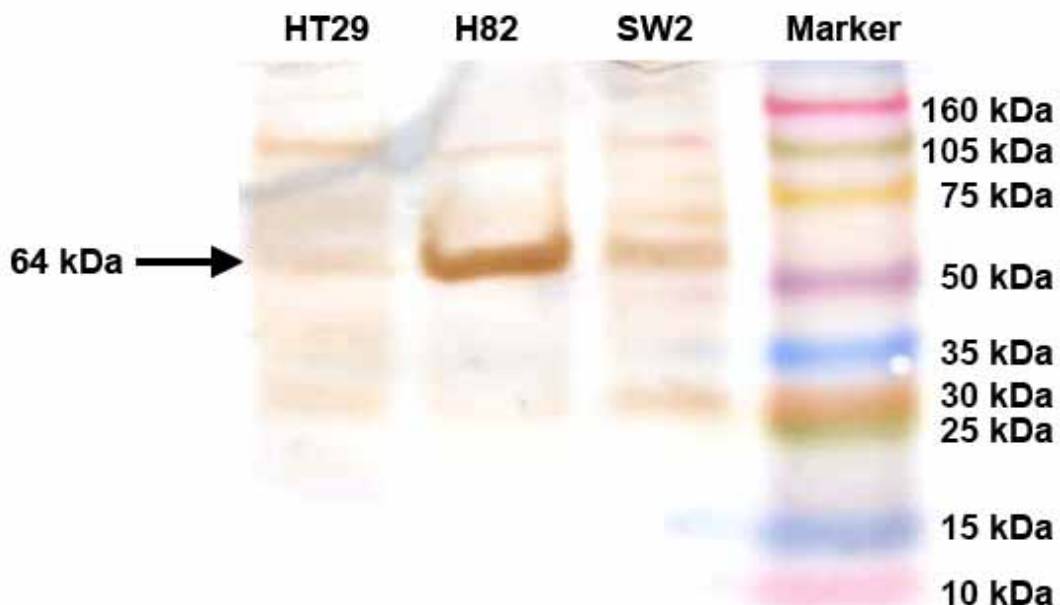


Abb. 4.53: Western-Blot Analyse der COX-2 bei H82- und SW2-Zellen. Zu erkennen ist, dass beide Zelllinien COX-2 exprimieren. Als Positivkontrolle dienten HT29-Zellen. Die Negativkontrolle war negativ.

4.5 Elektrophysiologie

Der Einfluss von NID auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen wurde an SW2-Zellen untersucht, da diese neben den H82-Zellen besonders stark durch die Behandlung mit NID in ihrer Proliferation gehemmt wurden (Abb. 4.1). An H82-Zellen war es nicht möglich nach Behandlung mit NID elektrophysiologischen Messungen durchzuführen, da nach 72 Stunden der Anteil der lebenden Zellen verschwindend gering war (Abb. 4.46).

4.5.1 Nachweis des erg-K⁺-Stroms bei SW2-Zellen

In der Zelllinie SW2 konnte anhand der Patch-Clamp-Technik ein erg-K⁺-Strom nachgewiesen werden, der als E-4031 sensibler Strom identifiziert wurde. Der in Abbildung 4.54 C dargestellte erg-K⁺-Strom resultiert aus der Differenz des endogenen Gesamtstroms der Zelle (Abb. 4.54 A) und des Stroms nach Blockierung des erg-K⁺-Stroms mittels E-4031 (Abb. 4.54 B). Die erg-K⁺-Ströme wurden in 40 mM K⁺ Extrazellulärlösung gemessen.

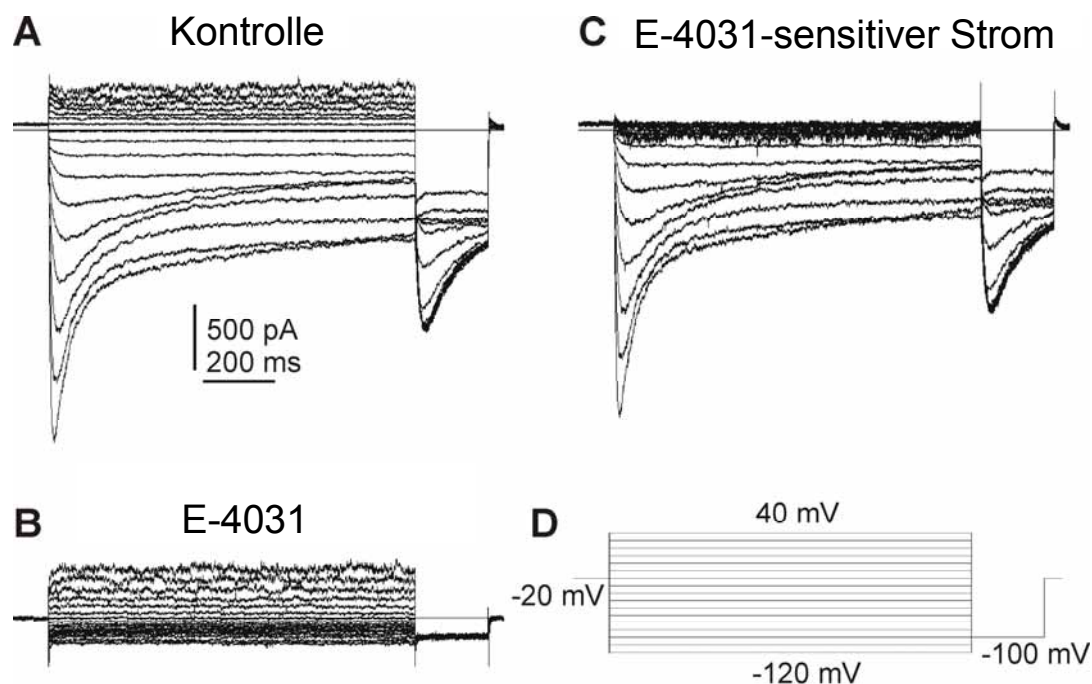


Abb. 4.54: Isolation des erg-K⁺-Stroms in der Zelllinie SW2.

Dargestellt ist der endogene Gesamtstrom der Zelle (A), Strom nach Applikation von 10 μM E-4031 (B) und der aus der Differenz von A und B errechnete E-4031 sensitive erg-K⁺-Strom (C). Das verwendete Pulsprotokoll (D) bestand aus 1-Sekunden-Testpuls mit Potentialen zwischen 40 mV und -120 mV in 10 mV Stufen und einer abschließenden 200 ms Stufe auf -100 mV.

4.5.2 Einfluss von NID auf den erg-K⁺-Strom bei SW2-Zellen

Anhand der Patch-Clamp-Technik wurde der erg-K⁺-Strom in einer mit NID behandelten SW2-Zelle detektiert (Abb. 4.55 B) und dem erg-K⁺-Strom einer in Kulturmedium gezogenen Kontrollzelle gegenübergestellt (Abb. 4.55 A). Dabei ließ sich eine geringere Amplitude des erg-K⁺-Stroms nach Behandlung mit NID beobachten (Abb. 4.55 B). Zusätzlich wurde die Dichte des erg-K⁺-Stroms nach Behandlung mit NID bestimmt und mit Kontrollzellen verglichen. Durch Bestimmung der Kapazität anhand der Ganzzell-Konfiguration konnten die einzelnen Stromamplituden des Kaliumstroms auf die Oberflächengröße der SW2-Zellen, welche proportional zur Kapazität ist, normiert werden und als Stromdichte (pA/pF) berechnet werden. In Abbildung 4.55 D ist zu erkennen, dass die Dichte des erg-K⁺-Kaliumstroms bei SW2-Zellen nach Behandlung mit NID hochsignifikant abgenommen hat.

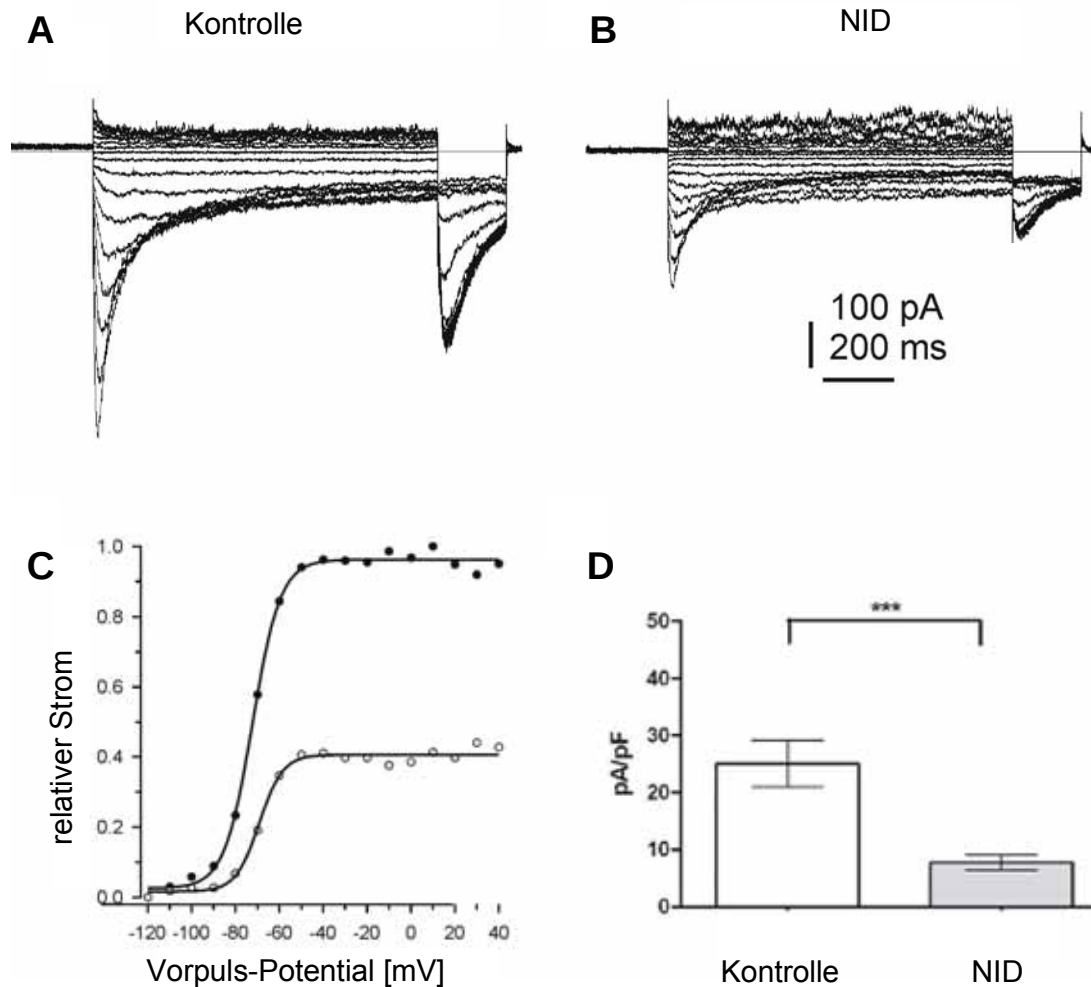


Abb. 4.55: Einfluss von NID auf Erg-K⁺-Ströme in SW2-Zellen. Gezeigt ist der erg-K⁺-Strom in einer SW2-Kontrollzelle (A) und in einer SW2-Zelle, welche zuvor 72 h mit NID behandelt worden ist (B). Es wurde in beiden Zellen dasselbe Pulsprotokoll benutzt (siehe Abb. 4.54 D). Die bei 100 mV gemessenen Tailstromamplituden wurden anhand des maximalen Kontroll-Tailstroms normiert und gegen das Vorpulspotential aufgetragen (C). Dargestellt sind die Stromamplituden der erg-Kaliumströme bezogen auf die Zellgröße bei unbehandelten Zellen und nach Behandlung mit NID (D). Zu erkennen ist, dass die Dichte der erg-Kaliumströme nach Behandlung mit NID hochsignifikant abgenommen hat. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 14$, t -Test: *** $p < 0,0001$.

4.5.3 Ableitung von Aktionspotentialen bei SW2-Zellen

Hinweise auf eine neuronale Differenzierung der SW2-Zellen nach Behandlung mit NID bilden die Dichtezunahme der Natriumströme und die abgeleiteten Aktionspotentiale bei den SW2-Zellen.

Im Gegensatz zu den herunterregulierten erg-Kalium-Strömen nach Behandlung mit NID (Abb. 4.55 D), nahm die Dichte der Natriumkanäle nach Behandlung in den SW2-Zellen signifikant zu (Abb. 4.56 D).

Bei Strominjektion von 1 pA sieht man, dass die Schwelle von -40 mV nicht erreicht wurde und kein Aktionspotential generiert werden konnte. Wurde der Reiz allerdings auf 2 pA verdoppelt, konnte bereits im Kulturmedium ein Aktionspotential gemessen werden (Abb. 4.56 E). Die gleiche Untersuchung bei SW2-Zellen im NID ergab ebenfalls ein Schwellenpotential von -40 mV. Wurde dieses Schwellenpotential erreicht, konnte in allen untersuchten Zellen ($n = 18$) ein repetitives Feuern von Aktionspotentialen - mit weit größerer Amplitude als bei den unbehandelten Zellen - beobachtet werden (Abb. 4.56 F). Die Aktionspotentiale und Natriumströme wurden in extrazellulärer Ringerlösung (5 mM KCl, 140 mM NaCl) gemessen. Die Natriumströme konnten durch 0,1 μ M Tetrodotoxin blockiert werden ($n = 5$).

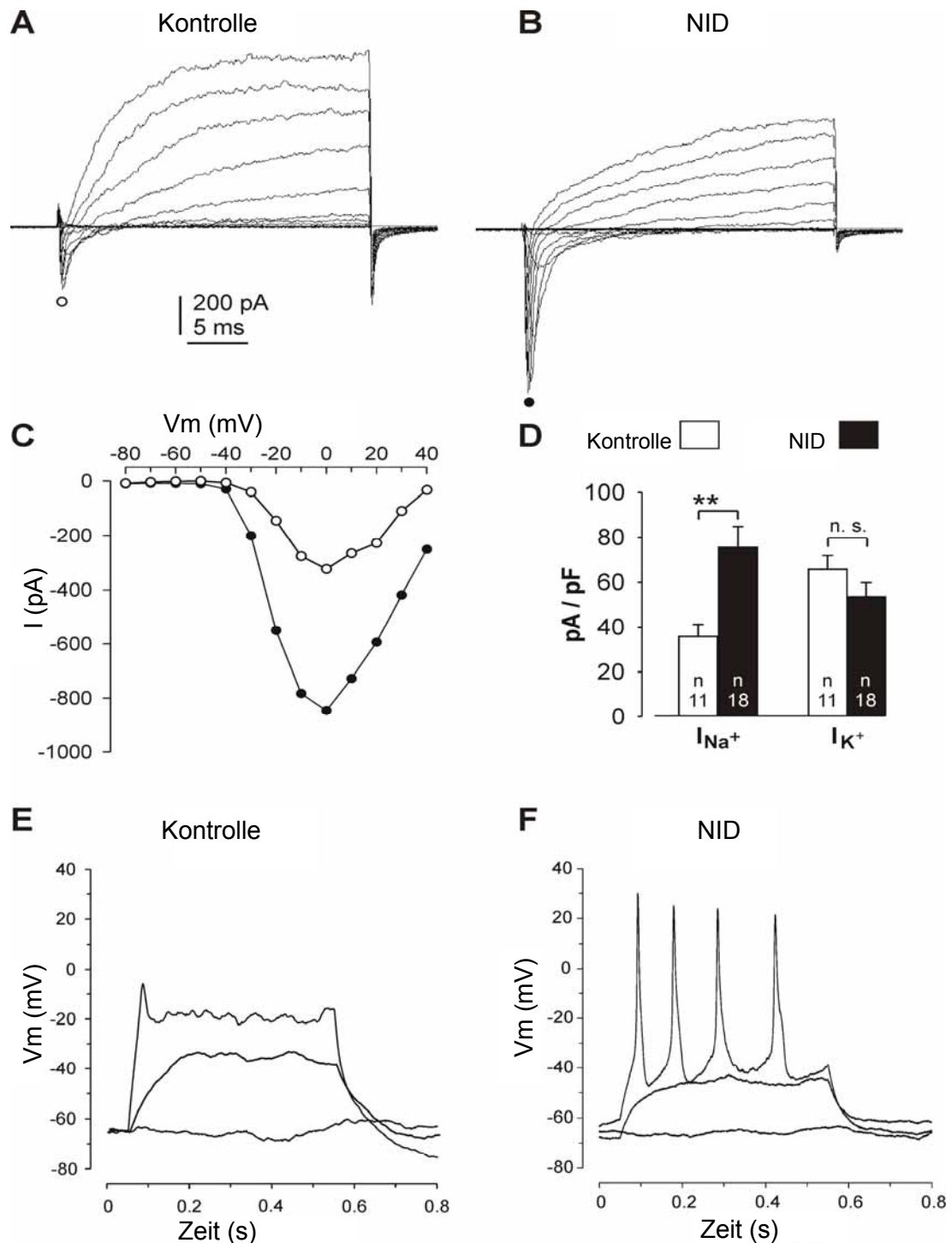


Abb. 4.56: Ableitung von Aktionspotentialen bei SW2-Zellen. Gezeigt ist eine Ganzzellableitung der Ionenströme in SW2-Kontrollzellen (**A**) und nach 72 h Behandlung mit NID (**B**). Von einem Haltepotential von -80 mV aus wurden die Ströme mit 25 ms Testpuls zwischen -70 mV und 40 mV in 10 mV Stufen bestimmt (**A+B**). Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Natriumeinwärtsstroms ist in (**C**) gezeigt. Dargestellt sind die Stromamplituden der Natriumströme bezogen auf die Zellgröße bei unbehandelten Zellen und nach Behandlung mit NID (**D**). Zu erkennen ist, dass die Dichte der Natriumströme nach Behandlung mit NID signifikant zugenommen hat. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 11$, t -Test: ** $p < 0,001$. Außerdem dargestellt ist die Ableitung von repetitiven Aktionspotentialen während einer 500 ms andauernden Strominjektion mittels Current-Clamp bei SW2-Zellen nach 72 h Behandlung mit NID (**F**) im Vergleich zu einem einzelnen Aktionspotential mit geringerer Amplitude in unbehandelten Zellen (**E**).

5 Diskussion

Der Anteil des kleinzelligen Bronchialkarzinoms unter den primären Lungenkarzinomen beträgt zwischen 13 % [Govindan *et al.*, 2006] und 25 % [Le Pechoux *et al.*, 2004]. Klinisch wird das kleinzellige Bronchialkarzinom in das Stadium der *limited disease*, welches einen Anteil von 30-40 % ausmacht, und das Stadium der *extensive disease* eingeteilt. In diesem Stadium befinden sich bei Diagnosestellung bereits 60-70 % der Patienten [Murray und Turrisi, 2006]. Das extrem schnelle Wachstum und die hohe Metastasierungsrate des kleinzelligen Bronchialkarzinoms tragen zu einer sehr kurzen medianen Überlebenszeit von unbehandelt drei (*limited disease*) bzw. zwei Monaten (*extensive disease*) [Green *et al.*, 1969] bei. Unter Behandlung verbessert sich das Überleben auf 15-20 Monate (*limited disease*) bzw. 8-13 Monate (*extensive disease*) [Lally *et al.*, 2007].

Die Standardtherapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms besteht aus 4-6 Zyklen Cisplatin und Etoposid [El Maalouf *et al.*, 2007]. Die meisten Patienten sprechen gut auf diese Therapie an, erleiden allerdings nach unterschiedlicher Zeitdauer meist ein Rezidiv. Wenn die Remission zwischen 3-6 Monaten ange dauert hat, wird eine *Second-Line*-Therapie durchgeführt [Murren *et al.*, 2005]. Topotecan i.v., welches momentan das Mittel der Wahl in der *Second-Line*-Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist, hat eine Ansprechrate von 22 % [Eckardt *et al.*, 2007]. Aufgrund dieser schlechten Behandelbarkeit des rezidierten kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist es dringend notwendig, neue Therapieansätze zu entwickeln. Da das kleinzellige Bronchialkarzinom eine Vielzahl von neuronalen Eigenschaften besitzt [Onganer *et al.*, 2005], ist es gerechtfertigt, zu untersuchen, ob ein neuronales Induktionsmedium, welches bisher dazu verwendet wurde, Fettgewebszellen zu neuronalen Vorläuferzellen zu differenzieren [Ashijan *et al.*, 2003] ein neuer Therapieansatz für das kleinzellige Bronchialkarzinom sein könnte.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Bestandteile des neuronalen Induktionsmediums, Indometacin, Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Insulin, einzeln und in Kombination auf die Proliferation und das Differenzierungsverhalten von kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien (OH1, OH3, H69, SW2 und H82) charakterisiert. Zudem sollte der Einfluss der Bestandteile des neuronalen Induktionsmediums auf die Morphologie der Zellen untersucht werden. Da

Indometacin auf die Cyclooxygenase (COX) wirkt, sollte eine mögliche COX-1 und COX-2 Expression untersucht werden. Zudem sollte überprüft werden, ob die kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen durch Inkubation mit neuronalem Induktionsmedium die für Nervenzellen typische Eigenschaft der Erregbarkeit erlangen. Dafür wurde die Dichte von Ionenkanälen und die Ionenleitfähigkeit nach Behandlung mit neuronalem Induktionsmedium mit dem Patch-Clamp Verfahren überprüft.

Indometacin gehört zu den nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), welche die COX hemmen und so zu einer reduzierten Prostaglandinsynthese führen. Eingesetzt wird es zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen bei rheumatischen Erkrankungen, aktivierten Arthrosen, Morbus Bechterew und im akuten Gichtanfall. Auf verschiedene Tumorentitäten hat Indometacin einen proliferationshemmenden Effekt *in vitro*. Dieser wurde bereits für kolorektale Karzinome [Hull *et al.*, 2003; Soh *et al.*, 2008], für Brustkrebszellen [Noguchi *et al.*, 1995] und für Melanomzellen [Chiu *et al.*, 2005] nachgewiesen. Für das kleinzellige Bronchialkarzinom konnte ein Apoptose-induzierender Effekt von Indometacin gezeigt werden [de Groot *et al.*, 2007]. Auch *in vivo* konnte durch Behandlung mit Indometacin eine Abnahme der Tumormasse beim Kolonkarzinom bei Mäusen [Wang und Zhang, 2005] und ein verbessertes Überleben im Vergleich zu der Kontrollgruppe für das Mammakarzinom bei Mäusen [Lala *et al.*, 1997] dokumentiert werden. *In vitro* und *in vivo* konnten Eli *et al.* [2001] die Zell-Proliferation bzw. das Tumorwachstum des Lewis Lungenkrebs bei Mäusen durch Behandlung mit Indometacin hemmen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Wirkung von Indometacin auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 dargestellt werden. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 5.1 gezeigt.

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass Indometacin die Zelllinien OH1 (Abb. 4.27 B) und OH3 (Abb. 4.30 B) ab einer Konzentration von 200 μ M signifikant in ihrer Proliferation hemmt, die Zelllinien H69 (Abb. 4.33 B) und SW2 (Abb. 4.36 B) ab 50 μ M und die Zelllinie H82 (Abb. 4.39 B) ab 25 μ M.

	Indometacin	IBMX	Insulin
OH1	↓ 200 µM ***		
	↓ 300 µM ***		
	↓ 400 µM ***		
	↓ 500 µM ***	↓ 1,25 mM ***	
	↓ 600 µM ***	↓ 1,5 mM ***	
	↓ 800 µM ***	↓ 2,0 mM ***	k.E.
OH3	↓ 200 µM ***	↓ 0,5 mM ***	
	↓ 300 µM ***	↓ 0,75 mM ***	
	↓ 400 µM ***	↓ 1,0 mM ***	
	↓ 500 µM ***	↓ 1,25 mM ***	
	↓ 600 µM ***	↓ 1,5 mM ***	
	↓ 800 µM ***	↓ 2,0 mM ***	k.E.
H69	↓ 50 µM *		
	↓ 100 µM ***		
	↓ 200 µM ***	↓ 0,5 mM ***	
	↓ 300 µM ***	↓ 0,75 mM ***	
	↓ 400 µM ***	↓ 1,0 mM ***	
	↓ 500 µM ***	↓ 1,25 mM ***	
	↓ 600 µM ***	↓ 1,5 mM ***	
	↓ 800 µM ***	↓ 2,0 mM ***	k.E.
SW2	↓ 50 µM *		
	↓ 100 µM ***	↓ 0,25 mM ***	
	↓ 200 µM ***	↓ 0,5 mM ***	
	↓ 300 µM ***	↓ 0,75 mM ***	
	↓ 400 µM ***	↓ 1,0 mM ***	
	↓ 500 µM ***	↓ 1,25 mM ***	
	↓ 600 µM ***	↓ 1,5 mM ***	
	↓ 800 µM ***	↓ 2,0 mM ***	↑ 5 µg/ml **
H82	↓ 25 µM ***		
	↓ 50 µM ***		
	↓ 100 µM ***	↓ 0,25 mM *	
	↓ 200 µM ***	↓ 0,5 mM ***	↑ 5 µg/ml ***

Tab. 5.1: Zusammenfassende Darstellung über die Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinome mit Indometacin, IBMX und Insulin. Aufgeführt sind die Konzentrationen, die einen signifikanten proliferationshemmenden (↓) oder proliferationssteigernden (↑) Effekt auf die Zelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 hatten. (k.E.= kein Effekt, * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001)

Einen ähnlichen Befund demonstrierten de Groot *et al.* [2005; 2007] an der Doxorubicin-resistenten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie GLC₄-Adr. Indometacin induzierte bei dieser Zelllinie bereits ab einer Konzentration von 25 µM Apoptose. Die Autoren vermuteten, dass MRP1 (*multi drug resistant protein 1*) eine wichtige Rolle bei dieser von Indometacin induzierten Apoptose spielt, da die Herunterregulierung von MRP1 zu geringerer Apoptose und einem verlängerten Überleben bei GLC₄-Adr-Zellen führte. Zur Behandlung des Lewis Lungenkrebses der Maus war schon eine niedrige Konzentration von 10-20 µM Indometacin ausreichend, um die Zellproliferation *in vitro* zu hemmen. Für die Inhibition des Tumorwachstums und der Metastasenbildung bei Mäusen wurden 2 mg/kg pro Tag verwendet [Eli *et al.*, 2001].

Für kolorektale Karzinomzellen zeigten Hull *et al.* [2003], dass Indometacin-Konzentrationen > 100 µM notwendig waren, um die Zellproliferation zu hemmen, einen G1-Zell-Zyklus-Arrest zu verursachen und Apoptose zu fördern. Als eine Theorie zu der apoptotischen Aktivität von Indometacin nennen die Autoren das proapoptische Gen BAX. Dieses ist essentiell für die Aktivität von Indometacin auf HCT116-Kolonkarzinomzellen. BAX ist ein transkriptionales Ziel und Mediator des Protoonkogens c-myc, daher könnte dies der Weg sein, über den c-myc Expressionsänderungen in Apoptose-Aktivität umgeschrieben werden [Hull *et al.*, 2003]. Auch Soh *et al.* [2008] demonstrierten, dass Indometacin das Wachstum von SW480 Kolonkarzinomzellen hemmt und in den gleichen Konzentrationen ebenfalls die subzelluläre cGMP-Phosphodiesterase. Dieses führte zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg von cGMP, was die Autoren zu der Aussage bewegte, dass auch COX-2- unabhängige Mechanismen bei dem antiproliferativen Effekt von Indometacin eine Rolle spielen. Wang und Zhang [2005] konnten zeigen, dass bei HCT116-Kolonkarzinomzellen *in vivo* nach Behandlung mit 3 mg/kg pro Tag für vier Wochen das Tumorwachstum signifikant abgenommen hatte. Als Ursache nennen die Autoren die Hemmung der Angiogenese, die vermutlich über die Hemmung von VEGF-Expression (*vascular endothelial growth factor*) moduliert wurde.

Für eine Wachstumsinhibition bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 *in vitro* war schon eine Indometacin-Konzentration zwischen 3-30 µM ausreichend [Noguchi *et al.*, 1995].

Die Melanomzelllinie A-375 wurde sogar schon mit Indometacin-Konzentrationen von 240 und 480 pM um 40 % in ihrer Proliferation inhibiert [Chiu *et al.*, 2005]. Auch hier

vermuteten die Autoren neben dem antiproliferativen Effekt über die Hemmung der COX noch andere Mechanismen, über die Indometacin Krebszellen in ihrem Wachstum inhibiert.

IBMX gehört zu den Methylxanthinen, welche die Phosphodiesterase (PDE) hemmen. Da die PDE cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) in Adenosinmonophosphat (AMP) abbaut, führt die Hemmung der PDE zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration [Firmino *et al.*, 2002]. In Kombination mit anderen Stoffen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, wurde für IBMX bereits demonstriert, dass es das Wachstum des malignen Glioblastoms *in vitro* hemmt, seine Differenzierung induziert und zu Apoptose führt [Chen *et al.*, 1998]. *In vivo*-Experimente mit Mäusen haben gezeigt, dass das Wachstum von primären und metastasiertem Lewis Lungenkrebs durch Behandlung mit IBMX gesenkt werden konnte [Janik *et al.*, 1980]. Für die kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien H345 und H69 konnte ebenfalls diese durch cAMP verursachte Wachstumsinhibition nach Behandlung mit Vasoaktiven intestinalen Peptid, IBMX und Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase, *in vitro* und in Mäusen gezeigt werden [Maruno *et al.*, 1998].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Einfluss von IBMX auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 dargestellt werden (Tab. 5.1).

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die Zelllinie OH1 ab einer IBMX-Konzentration von 1,25 mM (Abb. 4.27 C) signifikant in ihrer Proliferation gehemmt wird, wobei dieser Effekt bei den Zelllinien OH3 (Abb. 4.30 C) und H69 (Abb. 4.33 C) schon ab einer IBMX-Konzentration von 0,5 mM und bei den Zelllinien SW2 (Abb. 4.36 C) und H82 (Abb. 4.39 C) ab einer IBMX-Konzentration von 0,25 mM einsetzt.

Der Einfluss von IBMX alleine auf die Proliferation von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen ist bislang nicht getestet worden.

Allerdings fanden Maruno *et al.* [1998] heraus, dass die Zugabe von IBMX zu Vasoaktivem intestinalen Peptid (VIP) in der Behandlung von kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien den proliferationshemmenden Effekt von VIP steigert. Die Autoren beobachteten, dass die Inhibition der Zellzahl mit dem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration korrelierte und vermuteten daher, dass die Inhibition der Zellproliferation durch VIP, IBMX und Forskolin über cAMP moduliert

wird. Auch Chen *et al.* [1998] vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Proliferationshemmung von Zellen des malignen Glioblastoms, und dem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Zusätzlich beobachtete die Arbeitsgruppe eine gesteigerte Differenzierung und Induktion von Apoptose bei A-172-Zellen nach Forskolin- und IBMX-Behandlung. Aktuelle Forschungsergebnisse bestätigen, dass cAMP ein wichtiger Modulator von Apoptose in Krebszellen ist und zeigen, dass dafür die Hochregulation von Smac/DIABLO in der Zelle notwendig ist [Martinez-Velazquez *et al.*, 2007]. Janik *et al.* [1980] untersuchten die Wachstumsinhibition des Lewis Lungenkrebs durch IBMX [2,5 – 20 mg/kg] *in vivo*. Ab einer Dosis von 5 mg/kg zweimal täglich konnten die Autoren einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Herde in der Lunge im Vergleich mit der Kontrollgruppe beobachten. Bei der höchsten Konzentration von 20 mg/kg zweimal täglich waren 60 % der Tiere nach 21 Tagen tumorfrei. Die Autoren untersuchten außerdem, ob für diese höchste Konzentration eine Toxizität vorlag, fanden allerdings keine Anzeichen dafür.

Das Peptidhormon Insulin bindet an Insulinrezeptoren und bewirkt so über verschiedene Signalwege ein Sinken des Blutglucosespiegels. In der Literatur gibt es keine Belege dafür, dass Insulin das Ansprechen auf Chemotherapie verbessert. Im Gegensatz dazu zeigen aktuelle Daten, dass Insulin über den Insulinrezeptor und die Tyrosin Kinase Wachstumsfaktor Kaskade das Wachstum von Krebszellen stimuliert [Boyd, 2003] und dass Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factors*, IGF) die Proliferation, das Überleben und die Metastasierung sowie die Resistenz gegenüber Chemotherapie von Krebszellen steigern [Haddad und Yee, 2006; Yeh *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Insulin auf das Wachstumsverhalten von den kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 untersucht (Tab. 5.1).

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die Behandlung mit 5 µg/ml Insulin auf die Zelllinien OH1 (Abb. 4.2 C), OH3 (Abb. 4.7 C) und H69 (Abb. 4.12 C) keinen signifikanten Effekt hatte. Auf die Zelllinien SW2 (Abb. 4.17 C) und H82 (Abb. 4.22 C) dagegen hatte die Behandlung mit 5 µg/ml Insulin einen signifikanten wachstumssteigernden Effekt. Dieser Befund stimmt mit den Daten der Literatur überein, dass IGF die Proliferation und das Überleben von Krebszellen über die Aktivierung der PI3K-Akt Signalkaskade steigern [Haddad und Yee, 2006; Fischer *et*

al., 2007; Yeh *et al.*, 2007]. So wurde für Prostatakarzinomzellen, Brustkrebszellen, Lungenkrebs-, Darmkrebs-, Magenkrebs-, Endometriumkarzinom-, Leberzellkarzinom- und Gehirntumorzellen gezeigt, dass IGF-1 und IGF-2 hochreguliert sind und als autokrine Stimulatoren die Zellteilung dieser Tumorzellen steigern [Pavelic *et al.*, 2007]. Das Wachstum von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen konnte durch Behandlung mit einem Monoklonalen Antikörper (A12) gegen den IGF-1 Rezeptor um bis zu 70 % inhibiert werden [Yeh *et al.*, 2007].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der kombinierte Effekt von Indometacin und IBMX auf kleinzellige Bronchialkarzinomzellen demonstriert werden (Tabb. 5.2; 5.3; 5.4). Diese Daten können nicht mit aktueller Literatur verglichen werden, da noch keine Tumorentität mit dieser Kombination von Medikamenten behandelt wurde.

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit Indometacin und IBMX auf alle untersuchten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien einen signifikanten inhibitorischen Effekt hatte. Allerdings gab es Unterschiede in der Sensitivität der einzelnen Zelllinien für die Stoffe. Während die Zelllinien OH1, OH3 und SW2 weitgehend in gleichem Ausmaß auf die Behandlung mit Indometacin und IBMX reagierten, war die Zelllinie H69 tendentiell etwas weniger sensibel. Stellvertretend soll diese Beobachtung an der Kombinationsgabe [200 / 0,25] erklärt werden, der kleinsten Konzentration, welche bei allen untersuchten Zelllinien einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt hatte (Tab 5.3). So wurden die Zelllinien OH1 (Abb. 4.27 E), OH3 (Abb. 4.30 E) und SW2 (Abb. 4.36 E) bei Indometacin / IBMX-Konzentrationen von [200 / 0,25] signifikant auf etwa 50 % der Kontrolle in ihrer Proliferation gehemmt, während die Proliferation der Zelllinie H69 (Abb. 4.33 E) bei der Kombinationsgabe [200 / 0,25] signifikant auf etwa 70 % der Kontrolle gehemmt wurde.

Die Zelllinie H82 allerdings war von allen untersuchten Zelllinien mit Abstand die sensibelste für eine Behandlung mit Indometacin und IBMX. Hier lag bei Konzentrationen von [200 / 0,25] bereits eine Hemmung auf etwa 5 % der Kontrolle vor (Abb. 4.40 F).

Indometacin / IBMX	OH1	OH3	H69	SW2	H82
↓ 12,5 µM / 0,015625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	*
↓ 25 µM / 0,015625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 50 µM / 0,015625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 100 µM / 0,015625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 200 µM / 0,015625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 12,5 µM / 0,03125 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	*
↓ 25 µM / 0,03125 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 50 µM / 0,03125 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 100 µM / 0,03125 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 200 µM / 0,03125 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 12,5 µM / 0,0625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	*
↓ 25 µM / 0,0625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 50 µM / 0,0625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 100 µM / 0,0625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 200 µM / 0,0625 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 25 µM / 0,125 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 50 µM / 0,125 mM	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***
↓ 100 µM / 0,125 mM	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***
↓ 200 µM / 0,125 mM	***	***	n.s.	***	***
↓ 300 µM / 0,125 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 400 µM / 0,125 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 500 µM / 0,125 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 600 µM / 0,125 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 800 µM / 0,125 mM	***	***	***	***	k.U.

Tab. 5.2: Zusammenfassende Darstellung über die Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien mit Indometacin und IBMX in Kombination. Gezeigt sind die Konzentrationen von Indometacin [12,5 µM – 800 µM] und IBMX [0,015625 mM – 0,125 mM], die einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt (↓) auf die Zelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 hatten. (k.U. = keine Untersuchung, n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$)

Indometacin / IBMX	OH1	OH3	H69	SW2	H82
↓ 25 µM / 0,25 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 50 µM / 0,25 mM	n.s.	n.s.	n.s.	*	***
↓ 100 µM / 0,25 mM	n.s.	***	n.s.	***	***
↓ 200 µM / 0,25 mM	***	***	***	***	***
↓ 300 µM / 0,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 400 µM / 0,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 500 µM / 0,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 600 µM / 0,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 800 µM / 0,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 6,25 µM / 0,5 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 12,5 µM / 0,5 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 25 µM / 0,5 mM	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	***
↓ 50 µM / 0,5 mM	n.s.	***	n.s.	***	***
↓ 100 µM / 0,5 mM	***	***	n.s.	***	***
↓ 200 µM / 0,5 mM	***	***	***	***	***
↓ 300 µM / 0,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 400 µM / 0,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 500 µM / 0,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 600 µM / 0,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 800 µM / 0,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 50 µM / 0,75 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 100 µM / 0,75 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 200 µM / 0,75 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 300 µM / 0,75 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 400 µM / 0,75 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 500 µM / 0,75 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 600 µM / 0,75 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 800 µM / 0,75 mM	***	***	***	***	k.U.

Tab. 5.3: Zusammenfassende Darstellung über die Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien mit Indometacin und IBMX in Kombination. Gezeigt sind die Konzentrationen von Indometacin [6,25 µM – 800 µM] und IBMX [0,25 mM – 0,75 mM], die einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt (↓) auf die Zelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 hatten. (k.U. = keine Untersuchung, n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$)

Indometacin / IBMX	OH1	OH3	H69	SW2	H82
↓ 50 µM / 1,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 100 µM / 1,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 200 µM / 1,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 300 µM / 1,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 400 µM / 1,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 500 µM / 1,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 600 µM / 1,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 800 µM / 1,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 50 µM / 1,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 100 µM / 1,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 200 µM / 1,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 300 µM / 1,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 400 µM / 1,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 500 µM / 1,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 600 µM / 1,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 800 µM / 1,25 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 50 µM / 1,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 100 µM / 1,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 200 µM / 1,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 300 µM / 1,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 400 µM / 1,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 500 µM / 1,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 600 µM / 1,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 800 µM / 1,5 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 50 µM / 2,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 100 µM / 2,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 200 µM / 2,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 300 µM / 2,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 400 µM / 2,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 500 µM / 2,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 600 µM / 2,0 mM	***	***	***	***	k.U.
↓ 800 µM / 2,0 mM	***	***	***	***	k.U.

Tab. 5.4: Zusammenfassende Darstellung über die Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien mit Indometacin und IBMX in Kombination. Gezeigt sind die Konzentrationen von Indometacin [50 µM – 800 µM] und IBMX [1,0 mM – 2,0 mM], die einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt (↓) auf die Zelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 hatten. (k.U. = keine Untersuchung, * = $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$)

Eine mögliche Erklärung für das besonders gute Ansprechen der Zelllinie H82 auf die Therapie mit Indometacin und IBMX könnte die im Vergleich mit klassischen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien gesteigerte Wachstumsrate sein [Luk *et al.*, 1982; Mabry *et al.*, 1988]. Diese führten Gazdar *et al.* [1985] auf eine vermehrte Expression des Protoonkogens c-myc zurück, welche bei der Gruppe von morphologisch varianten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien wie H82 zu finden sind (siehe Tab. 3.1). Die Zelllinien OH1 und OH3 dagegen gehören zu den klassischen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien, welche das Onkogen c-myc nicht vermehrt exprimieren [Mabry *et al.*, 1988]. Die Zelllinie SW2, welche in einem vergleichbaren Ausmaß auf die Behandlung reagierte wie die Zelllinien OH1 und OH3, gehört zu den varianten kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Tab. 3.1). SW2-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu anderen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien das epitheliale Glycoprotein 2 (EGP-2) besonders stark [Zimmermann *et al.*, 1997]. Das EGP-2 kann auf der Oberfläche von vielen Tumorzellen nachgewiesen werden, findet sich aber nur sehr gering auf gesunden epithelialen Geweben [Beverly *et al.*, 1991; Stahel *et al.*, 1994]. Es ist allerdings eher unwahrscheinlich, dass die EGP-2-Expression zur Malignität von SW2-Zellen beiträgt, es könnte sich dabei auch um ein Begleitphänomen handeln.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Einfluss des neuronalen Induktionsmediums (NID) auf die Morphologie und die Zellvitalität der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien untersucht.

Dabei fanden sich aufgrund der Morphologie der Zellen keine Anzeichen für eine vermehrte neuronale Differenzierung bei den Zelllinien OH1 (Abb. 4.42 A + B), OH3 (Abb. 4.43 A + B), H69 (Abb. 4.44 A + B), SW2 (Abb. 4.45 A + B) und H82 (Abb. 4.46 A + B).

Als Kriterien für leblose Zellen wurden eine beschädigte Zellmembran, Kondensation des Zellkerns und Auflösung der Zelle in eine Vielzahl von Fragmenten herangezogen [Motyl *et al.*, 1998]. Die Zellvitalität hatte sich nach Behandlung mit NID bei den OH1-, den OH3-, den H69- und den SW2-Zellen nicht geändert (Abb. 4.42 - 4.45 C). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Behandlung mit Indometacin und IBMX hier lediglich eine Proliferationshemmung verursachte. Die Vitalität der H82-Zellen allerdings war nach Behandlung mit NID signifikant vermindert (Abb. 4.46

C). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die H82-Zellen nicht nur in ihrem Wachstum gehemmt wurden, sondern dass zusätzlich ein zytotoxischer Effekt durch die Behandlung mit NID hervorgerufen wurde. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Proliferationsversuche, wo die Zelllinie H82 im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien besonders gut auf die Therapie ansprach.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Vorhandensein der Isoenzyme COX-1 und COX-2 mittels Immunhistochemie in den zwei kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien SW2 (Abb. 4.48 + 4.51) und H82 (Abb. 4.49 + 4.52) untersucht. Als Kontrollzelllinie diente die Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Abb. 4.47 + 4.50), welche COX-1 und COX-2 exprimiert [Lev-Ari *et al.*, 2006; Strillacci *et al.*, 2006].

COX-1, welche von den meisten normalen menschlichen Zellen konstitutiv gebildet wird [Erkert *et al.*, 2003], konnte in den Zelllinien SW2 (Abb. 4.48) und H82 (Abb. 4.49) nicht nachgewiesen werden.

COX-2 war dagegen in beiden Zelllinien vorhanden. In der Zelllinie SW2 (Abb. 4.51) war die Expression ähnlich stark wie in den HT29-Zellen (Abb. 4.50), in den H82-Zellen (Abb. 4.52) war die Expression weniger stark ausgeprägt.

Das gleiche Ergebnis fanden schon Erkert *et al.* [2003] bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen. Im Vergleich mit gesundem Lungengewebe stellten die Autoren in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen eine schwache COX-1-Expression fest, während die COX-2-Expression in den Lungenkrebszellen hoch reguliert wurde. Die Autoren schlossen daraus, dass COX-2 eine wichtige Rolle für die Tumor-induzierte Angiogenese und Neovaskularisation in menschlichen Lungentumoren spielt. Des Weiteren vermuteten sie, dass die Tatsache, dass Tumor-assoziierte Blutgefäße im Gegensatz zu Blutgefäßen gesunden Lungengewebes kein COX-1 exprimierten, zu lokaler Vasokonstriktion im Tumor-umgebenden Lungenparenchym führte und somit eine bessere Blutversorgung des Tumorgewebes zur Folge hatte. Die Herunterregulierung von COX-1 wurde ebenfalls in Fibroblasten im Stroma von Adenokarzinomzellen der Lunge im Vergleich mit normalem Lungengewebe festgestellt [Nakamura *et al.*, 2004]. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch im Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals gefunden. Hier war in den Tumorzellen COX-1 herunter- und COX-2 hochreguliert [Jaeckel *et al.*, 2001]. Die Autoren vermuten, dass COX-2 im Plattenepithelkarzinom von Kopf und

Hals an der zellulären Differenzierung, der Angiogenese und der Modulation der Immunreaktion beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnten die eigenen Ergebnisse der Immunhistochemischen Analyse mittels Western-Blot bestätigt werden. Sowohl in den Zelllinien SW2 und H82 als auch in der Positivkontrolle (HT29-Zellen) konnte COX-2 nachgewiesen werden (Abb. 4.53). Es wurde jeweils das unglycosylierte Protein mit dem Molekulargewicht von 64 kDa gefunden. Diese Form der COX-2 wurde bereits mit dem gleichen Antikörper (Maus monoklonaler Anti-COX-2-Antikörper, Cayman Chemicals) bei HCT-116-Zellen und DLD1-Zellen (beide humane Kolonkarzinomzellen) und bei LN229-Zellen (humane Glioblastomzellen) nachgewiesen [Liu *et al.*, 2006]. Das reife Protein mit dem Molekulargewicht von 70-72 kDa konnte wie bei Liu *et al.* [2006] nicht detektiert werden. Die Western-Blot-Analyse zeigte eine deutlich stärkere Expression der COX-2 bei H82-Zellen im Vergleich zu den SW2-Zellen. Dieses Ergebnis könnte eine Erklärung für das besonders gute Ansprechen der H82-Zellen auf Indometacin-Behandlung sein.

Der erg-Kanal ist ein spannungsabhängiger Kaliumkanal, der zu der Familie der eag-Kanäle gehört. Er kann einerseits in vielen erregbaren Zellen, wie Herzmuskelzellen, Neuroblastomzellen und glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes gefunden werden, spielt andererseits aber auch eine herausragende Rolle in der Karzinogenese und wurde bereits in vielen Tumorarten nachgewiesen [Arcangeli *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002; Crociani *et al.*, 2003; Conti, 2004; Lastraioli *et al.*, 2004; Arcangeli, 2005]. Die Expression des erg-K⁺-Kanals ist vom Zell-Zyklus abhängig [Crociani *et al.*, 2003] und es ist bekannt, dass er an der Regulation der Zellproliferation, der Invasivität des Tumors und der Kontrolle der Neoangiogenese von Tumoren beteiligt ist [Pillozzi *et al.*, 2002; Arcangeli, 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde der erg-K⁺-Kanal-Strom bei der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie SW2 mittels Patch-Clamp-Technik nachgewiesen (Abb. 4.54 C). Dieses Ergebnis bestätigt frühere Daten der eigenen Arbeitsgruppe [Hempel, 2006]. So zeigte Hempel [2006] bereits mittels PCR, dass erg1a-mRNA in allen fünf untersuchten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien (OH1, OH3, H69, SW2 und H82) exprimiert wird. Durch Inkubation der Zellen mit dem erg-K⁺-Strom Inhibitor E-4031 konnte keine Hemmung der Zellproliferation erreicht werden, dies

war erst durch Unterdrückung des *erg1*-Gens mittels siRNA bei SW2-, OH3-, H82- und OH1- Zellen möglich. Dieses Ergebnis führte Hempel [2006] darauf zurück, dass der *erg*-K⁺-Kanal neben seinen Eigenschaften als Ionenkanal noch weitere Eigenschaften wie die Regulation intrazellulärer Signalkaskaden besitzen muss. Diese Vermutung wird durch die Daten von Lin *et al.* [2007] gestützt, die zeigen konnten, dass die Überexpression des *erg*-K⁺-Kanal-Gens Zellwachstums-Signale über die Aktivierung der Onkoproteine SP1 und NF-kappaB und die Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens Nkx3.1 vermittelt. Diese Daten lassen vermuten, dass das *erg*-K⁺-Kanal-Gen zur Malignität der kleinzelligen Bronchialkazinomzelllinie SW2 beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Dichte der *erg*-Kalium-Ströme bei SW2-Zellen nach Behandlung mit neuronalem Induktionsmedium bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zur Kontrolle die Dichte der *erg*-Kaliumströme signifikant abgenommen hatte (Abb. 4.55 D). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die antiproliferative Wirkung des neuronalen Induktionsmediums unter anderem über die Herunterregulation der *erg*-K⁺-Stromdichte vermittelt wird. Da gleichzeitig beobachtet werden konnte, dass die Substanzen Indometacin und IBMX den *erg*-Kanal nicht blockieren [Glassmeier, mündliche Mitteilung], wird die Hypothese der Proliferationsregulation des *erg*-K⁺-Kanals auf Genexpressionsebene gestützt. Möglicherweise reguliert die Behandlung mit NID die Expression von *erg*-K⁺-Kanälen in kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen herunter.

Während spannungsgesteuerte Kaliumkanäle in fast allen tierischen und pflanzlichen Zellen vorkommen [Schwarz und Bauer, 1999] und an vielen physiologischen Vorgängen wie der Regulierung der Herzfrequenz, der Muskelkontraktion, der Ausschüttung von Neurotransmittern, der Erregbarkeit von Nervenzellen und der Insulinsekretion beteiligt sind [Conti, 2004], kommen Natriumkanäle typischerweise nur in erregbaren Zellen wie Muskelzellen oder Zellen des zentralen- bzw. peripheren Nervensystems vor, wo sie Aktionspotentiale erzeugen und weiterleiten [Diss *et al.*, 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von neuronalem Induktionsmedium auf die Dichte von Natrium-Strömen in SW2-Zellen untersucht und festgestellt, dass die Dichte der Natriumströme (Abb. 4.56 D) durch die Behandlung mit NID hochsignifikant zugenommen hatte. Daher spricht dieses Ergebnis für eine vermehrte Differenzierung der SW2-Zellen in Richtung Nervenzelle, die durch die

Inkubation mit neuronalem Induktionsmedium hervorgerufen wird. Unterstützt werden kann dieser Befund durch die erstmalige Ableitung von Aktionspotentialen bei SW2-Zellen (Abb. 4.56 E + F). Schon im Kulturmedium war es möglich, bei den SW2-Zellen mittels Current-Clamp ein Aktionspotential abzuleiten, im neuronalen Induktionsmedium allerdings kam es zu einem repetitiven Feuern von Aktionspotentialen mit weit größerer Amplitude. Einzelne Aktionspotentiale konnten schon von Blandino *et al.* [1995] bei der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie H146 ausgelöst werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Aktionspotentiale aus einer gesteigerten Leitfähigkeit der spannungsgesteuerten Natriumkanäle resultierten und die Natriumkanäle die gleichen Eigenschaften hatten, wie in erregbaren Zellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass die Dichte der Natriumströme, welche schon mehrfach in kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen gefunden werden konnten [Pancrazio *et al.*, 1989; Blandino *et al.*, 1995; Onganer und Djamgoz, 2005; Onganer *et al.*, 2005], durch die Inkubation mit neuronalem Induktionsmedium zugenommen hat, so dass die Ionenleitfähigkeit der SW2-Zellen zunahm und dadurch bedingt repetitive Aktionspotentiale bei SW2-Zellen nach Inkubation mit neuronalem Induktionsmedium abgeleitet werden konnten.

Zusammengefasst haben die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergeben, dass die Kombination aus dem COX-Hemmer Indometacin und dem Methylxanthin IBMX eine hervorragende proliferationshemmende Wirkung auf alle fünf untersuchten kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen *in vitro* hatte. Aufgrund dieser guten proliferationshemmenden Ergebnisse, sollten *in vivo*-Experimente folgen, um eine Wirkung auf das Primärtumorgewicht und das Metastasierungsverhalten des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und eventuelle Nebenwirkungen der Indometacin / IBMX-Behandlung *in vivo* zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom wird meist erst im fortgeschrittenen Stadium (*extensive disease*) diagnostiziert und führt bei den Betroffenen im Mittel zu einer Überlebensdauer von nur 8 bis 13 Monaten. Aufgrund dieser sehr schlechten Prognose bedarf es dringend neuer Therapieoptionen. Da bereits eine Reihe von neuronenspezifische Eigenschaften nachgewiesen worden sind, wird ein neuronaler Ursprung dieser Zellen vermutet. Diese Erkenntnisse müssen bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien berücksichtigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirkung von neuronalem Induktionsmedium (NID), bestehend aus Indometacin, IBMX und Insulin, auf die kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 *in vitro* zu testen. Dabei wurden sowohl die Proliferation und Morphologie der Zellen, die Expression von COX-1 und COX-2 sowie der Einfluss auf erg-Kalium- und Natriumströme untersucht. Die Proliferation aller untersuchten Zelllinien wurde durch das NID signifikant ($p < 0,0001$) inhibiert. Indometacin und IBMX einzeln betrachtet hatten auf alle Zelllinien einen starken wachstumshemmenden Effekt ($p < 0,001$). Insulin hatte auf drei Zelllinien keinen und auf zwei Zelllinien (SW2 und H82) einen proliferationsfördernden Effekt. COX-1 konnte in den untersuchten Zelllinien SW2 und H82 nicht nachgewiesen werden, COX-2 dagegen wurde von beiden Zelllinien exprimiert, so dass ein möglicher Wirkort, über den NID seine antiproliferative Funktion ausübt, nachgewiesen werden konnte. Ferner war nach NID-Behandlung die Stromdichte des für die Regulation der Tumorphiliferation wichtigen erg-K⁺-Kanals signifikant erniedrigt.

Zwar ließen sich elektronenmikroskopisch keine morphologischen Hinweise für eine neuronale Differenzierung nach Behandlung mit NID finden, jedoch war über der Zellmembran die Natriumstromdichte signifikant erhöht und es konnten zusätzlich repetitive Aktionspotentiale bei SW2-Zellen abgeleitet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass das Wachstum von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen durch Behandlung mit Indometacin und IBMX *in vitro* deutlich inhibiert wird und dass dabei gleichsam vermehrt neuronale Eigenschaften in den kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen induziert werden. Somit stellt die Kombinationsbehandlung mit Indometacin und IBMX möglicherweise einen vielversprechenden neuen Therapieansatz dar.

7 Literaturverzeichnis

Abrams J, Doyle LA, Aisner J (1988). Staging, prognostic factors, and special considerations in small cell lung cancer. *Semin Oncol* 15:261-77.

Agudo A, Ahrens W, Benhamou E *et al.* (2000). Lung cancer and cigarette smoking in women: a multicenter case-control study in Europe. *Int J Cancer*. 88:820-27.

Aisner J (1996). Extensive-disease small cell lung cancer: the thrill of victory; the agony of defeat. *J Clin Oncol*. 12:658-65.

Arcangeli A (2005). Expression and role of hERG channels in cancer cells. *Novartis Found Symp* 266:225-32.

Arcangeli A, Bianchi L, Becchetti A, Faravelli L, Coronello M, Mini E, Olivotto M, Wanke E (1995). A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol*. 489: 455-71.

Arriagada R, Le Chevalier T, Riviere A, *et al.* (2002). Patterns of failure after prophylactic cranial irradiation in small-cell lung cancer: analysis of 505 randomized patients. *Ann Oncol*.13:748-54.

Asanuma M, Nishibayashi-Asanuma S, Miyazaki I, Kohno M, Ogawa N (2001). Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J Neurochem*. 76:1895-904.

Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg*. 111:1922-31.

Aupérin A, Arriagada R, Pignon JP, Le Péchoux C, Gregor A, Stephens RJ, Kristjansen PE, Johnson BE, Ueoka H, Wagner H, Aisner J (1999). Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *N Engl J Med*. 341:476-84.

Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, Ha MJ, Tsokos M, Sheahan MD, Nguyen P, Niklinski WT, Myers CE, Trepel JB (1994). Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:5330-4.

Bauer CK, Schwarz JR (2001). Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol*. 182:1-15.

Bazhin AV, Savchenko MS, Belousov EV, Jaques G, Philippov PP (2004). Stimulation of the aberrant expression of a paraneoplastic antigen, recoverin, in small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 45:299-305.

Beverly PC, Olabiran Y, Ledermann JA, Bobrow LG, Souhami RL (1991). Results of the central data analysis. *Br J Cancer [Suppl]* 14:10.

Blandino JK, Viglione MP, Bradley WA, Oie HK, Kim YI (1995). Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG. *J Membr Biol*. 143:153-63.

Boyd DB (2003). Insulin and cancer. *Integr Cancer Ther*. 2:315-29.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

Bradley JD, Dehdashti F, Mintun MA, Govindan R, Trinkaus K, Siegel BA (2004). Positron Emission Tomography in Limited-Stage Small-Cell Lung Cancer: A Prospektive Study. *Journal of Clinical Oncology*. 22:3248-54.

Burian M, Geisslinger G (2003). Clinical pharmacology of the selective COX-2 inhibitors. *Orthopade*. 32:1078-87.

Casero RA Jr, Baylin SB, Nelkin BD, Luk GD (1986). Human lung tumor sensitivity to difluoromethylornithine as related to ornithine decarboxylase messenger RNA levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 134:572-9.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13926-31.

Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, Gupta S (1984). Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 160:369-385.

Chen TC, Hinton DR, Zidovetzki R, Hofman FM (1998). Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest.* 78:165-74.

Cherubini A, Taddei GL, Crociani O et al (2000). Herg potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer* 83:1722-1729.

Chiu LC, Tong KF, Ooi VE (2005). Cytostatic and cytotoxic effects of cyclooxygenase inhibitors and their synergy with docosahexaenoic acid on the growth of human skin melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother.* 59 Suppl 2:S293-7.

Chua YJ, Steer C, Yip D (2004). Recent advances in management of small-cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews.* 30:521-43.

Conti M (2004). Targeting K⁺ channels for cancer therapy. *J Exp Ther Oncol.* 4:161-6.

Cox ME, Deeble PD, Lakhani S, Parsons SJ (1999). Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59:3821-30.

Crociani O, Guasti L, Balzi M, Becchetti A, Wanke E, Olivetto M, Wymore RS, Arcangeli A (2003). Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem.* 278:2947-55.

Crofford LJ (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl.* 49:15-9.

Crumpton TL, Seidler FJ, Slotkin TA (2001). Generation of reactive oxygen species by xanthine derivatives in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 66:143-6.

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80:795-803.

de Groot DJ, Timmer T, Spierings DC, Le TK, de Jong S, de Vries EG (2005). Indomethacin-induced activation of the death receptor-mediated apoptosis pathway circumvents acquired doxorubicin resistance in SCLC cells. *Br J Cancer*. 92:1459-66.

de Groot DJ, van der Deen M, Le TK, Regeling A, de Jong S, de Vries EG (2007). Indomethacin induces apoptosis via a MRP1-dependent mechanism in doxorubicin-resistant small-cell lung cancer cells overexpressing MRP1. *Br J Cancer*. 97:1077-83.

DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD (1984). Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307:465-468.

Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*. 282:148-52.

Diss JK, Fraser SP, Djamgoz MB (2004). Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *Eur Biophys J*. 33:180-93.

Djamgoz MBA, Mycielska M, Madeja Z, Fraser SP, Korohoda W (2001). Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Cell Sci* 114: 2697-2705.

Eckardt JR, von Pawel J, Pujol JL *et al.* (2007). Phase III study of oral compared with intravenous topotecan as second-line therapy in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 25:2086 –2092.

El Maalouf G, Rodier JM, Faivre S, Raymond E (2007). Could we expect to improve survival in small cell lung cancer? *Lung Cancer*. 57 Suppl 2:S30-4.

Eli Y, Przedecki F, Levin G, Kariv N, Raz A (2001). Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*. 61:565-71.

Ermert L, Dierkes C, Ermert M (2003). Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors. *Clin Cancer Res*. 9:1604-10.

Erren TC, Jacobsen M, Piekarski C (1999). Synergy between asbestos and smoking on lung cancer risk. *Epidemiology*. 10:405-11.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2001). GLOBOCAN 2000 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC Cancer Base No. 5, Version 1. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2001.

Firmino AAP, Ulhoa CJ, Sousa MV, Filho EXF, Ricart CAO (2002). Involvement of G Proteins and cAMP in the Production of Chitinolytic Enzymes by *Trichoderma harzianum*. *Braz. J. Micorbiol.* 33:2.

Fischer B, Marinov M, Arcaro A (2007). Targeting receptor tyrosine kinase signalling in small cell lung cancer (SCLC): what have we learned so far? *Cancer Treat Rev.* 33:391-406.

Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, Minna JD (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res.* 45:2924-30.

Glassmeier G, Strübing C, Riecken EO, Buhr H, Neuhaus P, Ahnert-Hilger G, Wiedenmann B, Scherübl H (1997). Electrophysiological properties of human carcinoid cells of the gut. *Gastroenterology.* 113:90-100.

Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, Spitznagel EL, Piccirillo J (2006). Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol.* 24:4539-44.

Green R, Humphrey E, Close H, et al. (1969). Alkylating agents in bronchogenic carcinoma. *Am J Med.* 46:516-25.

Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P (1996). Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science.* 1996 274:1383-5.

Gurrola-Diaz C, Lacroix J, Dihlmann S, Becker CM, von Knebel Doeberitz M (2003). Reduced expression of the neuron restrictive silencer factor permits transcription of glycine receptor alpha1 subunit in small-cell lung cancer cells. *Oncogene.* 22:5636-5645.

Haddad T, Yee D (2006). Targeting the insulin-like growth factor axis as a cancer therapy. *Future Oncol.* 2:101-10.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.

Hempel K (2006). Charakterisierung von HERG-Kalium-Kanälen in kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien. Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie / Molekularbiologie der Universität Hamburg.

Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandoler D, Ludwig C, Zangemeister-Wittke U, Stahel R (2003). Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ.* 10:356-64.

Huisman C, Postmus PE, Giaccone G et al. (1999). Second-line chemotherapy and its evaluation in small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev.* 25:199-206.

Hull MA, Gardner SH, Hawcroft G (2003). Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 2003 29:309-20.

Jaeckel EC, Raja S, Tan J, Das SK, Dey SK, Girod DA, Tsue TT, Sanford TR (2001). Correlation of expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and peroxisome proliferator-activated receptor delta with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 127:1253-9.

Janik P, Assaf A, Bertram JS (1980). Inhibition of growth of primary and metastatic Lewis lung carcinoma cells by the phosphodiesterase inhibitor isobutylmethylxanthine. *Cancer Res.* 40:1950-4.

Klinke R, Silbernagl, S: Lehrbuch der Physiologie. Thieme, Stuttgart 2003, S. 49-80.

Krasowska M, Grzywna ZJ, Mycielska ME, Djamgoz MB (2004). Patterning of endocytic vesicles and its control by voltage-gated Na⁺ channel activity in rat prostate cancer cells: fractal analyses. *Eur Biophys J* 33: 535-542.

Krebs in Deutschland. 5. bearbeitete, aktualisierte Auflage. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006.

Lala PK, Al-Mutter N, Orucevic A (1997). Effects of chronic indomethacin therapy on the development and progression of spontaneous mammary tumors in C3H/HEJ mice. *Int J Cancer*. 73:371-80.

Lally BE, Urbanic JJ, Blackstock AW, Miller AA, Perry MC (2007). Small cell lung cancer: have we made any progress over the last 25 years? *Oncologist*. 12:1096-104.

Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H, Bencini L, Calistri M, Messerini L, Scatizzi M, Moretti R, Wanke E, Olivotto M, Mugnai G, Arcangeli A (2004). *herg1* gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res* 64:606-11.

Le Pechoux C, Dhermain F, Bretel JJ et al (2004). Modalities of radiotherapy in small cell lung cancer: thoracic radiotherapy and prophylactic cerebral irradiation. *Rev. Pneumol. Clin.* 60:3S91-103.

Ledermann JA, Pasini F, Olabiran Y, Pelosi G (1994). Detection of the neuronal cell adhesion molecule (NCAM) in serum of patients with small-cell lung cancer (SCLC) with 'limited' or 'extensive' disease, and bone-marrow infiltration. *Int J Cancer* 8:49-52.

Lev-Ari S, Kazanov D, Liberman E, Ben-Yosef R, Arber N (2006). Down-regulation of PGE2 by physiologic levels of celecoxib is not sufficient to induce apoptosis or inhibit cell proliferation in human colon carcinoma cell lines. *Dig Dis Sci*. 52:1128-33.

Lin H, Xiao J, Luo X, Wang H, Gao H, Yang B, Wang Z (2007). Overexpression HERG K(+) channel gene mediates cell-growth signals on activation of oncoproteins SP1 and NF-kappaB and inactivation of tumor suppressor Nkx3.1. *J Cell Physiol*. 212:137-47.

Lira EC, Graca FA, Goncalves DA, Zanon NM, Baviera AM, Strindberg L, Lannroth P, Migliorini RH, Kettelhut IC, Navegantes LC (2007). Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. *Shock*. 27:687-94.

Liu YT, Kardosh A, Cooc J, Schönthal AH (2006). Potential misidentification of cyclooxygenase-2 by Western blot analysis and prevention through the inclusion of appropriate controls. *Mol Biotechnol*. 34:329-35.

Luk GD, Goodwin G, Gazdar AF, Baylin SB (1982). Growth-inhibitory effects of DL-alpha-difluoromethylornithine in the spectrum of human lung carcinoma cells in culture. *Cancer Res.* 42:3070-3.

Mabry M, Nakagawa T, Nelkin BD, McDowell E, Gesell M, Eggleston JC, Casero RA Jr, Baylin SB (1988). v-Ha-ras oncogene insertion: a model for tumor progression of human small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6523-7.

Martinez-Velazquez M, Melendez-Zajgla J, Maldonado V (2007). Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional upregulation. *Cell Signal.* 19:1212-20.

Maruno K, Absood A, Said SI (1998). Vasoactive intestinal peptide inhibits human small-cell lung cancer proliferation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14373-8.

Masi A, Becchetti A, Restano-Cassulini R, Polvani S, Hofmann G, Buccoliero AM, Paglierani M, Pollo B, Taddei GL, Gallina P, Di Lorenzo N, Franceschetti S, Wanke E, Arcangeli A (2005). hERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines. *Br J Cancer* 93:781-92.

Meert AP, Paesmans M, Berghmans T, Martin B, Mascaux C, Vallot F, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP (2001). Prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *BMC Cancer.* 1:5.

Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O (1976). Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *Biol Chem.* 251:2629-36.

Motyl T, Grzelkowska K, Zimkowska W, Skierski J, Wareski P, Ploszaj T, Trzeciak L (1998). Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *Eur J Cell Biol.* 75:367-74.

Murray N, Turrisi AT (2006). A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 1:270-8.

Murren JR, Turrisi AT, Pass HI. Small cell lung cancer. In: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology.* 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2005; 810–843.

Mycielska ME, Dye J, Stepien E, Djamgoz MBA (2004). Substrate influences voltage-gated Na⁺ channel expression in strongly metastatic rat prostate cancer cell line. *J Physiol* 557P: C85.

Nakamura N, Iijima T, Mase K, Furuya S, Kano J, Morishita Y, Noguchi M (2004). Phenotypic differences of proliferating fibroblasts in the stroma of lung adenocarcinoma and normal bronchus tissue. *Cancer Sci.* 95:226-32.

Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M, Negoro S, Sugiura T, Yokoyama A, Fukuoka M, Mori K, Watanabe K, Tamura T, Yamamoto S, Saijo N (2002). The Japan Clinical Oncology Group. *N Engl J Med.* 346:85-91.

Noguchi M, Rose DP, Earashi M, Miyazaki I (1995). The role of fatty acids and eicosanoid synthesis inhibitors in breast carcinoma. *Oncology.* 52:265-71.

O' Shaughnessy MJ, Chen ZM, Gramaglia I, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Vogtenhuber C, Palmer E, Grader-Beck T, Boussiotis VA, Blazar BR (2007). Elevation of intrazellulär cyclic AMP in alloreactive CD4 (+) T Cells induces alloantigen-specific tolerance that can prevent GVHD lethality in vivo. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13: 530-42.

Onganer PU, Djamgoz MB (2005). Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na(+) channel expression in vitro. *J Membr Biol.* 204:67-75.

Onganer PU, Seckl MJ, Djamgoz MBA (2005). Neuronal Characteristics of small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 93:1197-201.

Pancrazio J, Viglione MP, Tabbara IA, Kim YI (1989). Voltage-dependent ion channels in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 49:5901-5906.

Pardo LA (2004). Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* 19:285-92.

Parson W J, Ramkumar V, Stiles GL (1988). Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, G_i. *Molecular Pharmacology* 34: 37-41.

Pavelić J, Matijević T, Knezević J (2007). Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J Med Res.* 125:511-22.

Percival MD, Ouellet M, Vincent CJ, Yergey JA, Kennedy BP, O'Neill GP (1994). Purification and characterization of recombinant human cyclooxygenase-2. Arch. Biochem. Biophys. 315:111-118.

Pignon JP, Arriagada R, Ihde DC, et al. (1992). A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small-cell lung cancer. N Engl J Med. 327:1618-24.

Pillozzi S, Brizzi MF, Balzi M, Crociani O, Cherubini A, Guasti L, Bartolozzi B, Becchetti A, Wanke E, Bernabei PA, Olivetto M, Pegoraro L, Arcangeli A (2002). HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. Leukemia 16:1791-8.

Plitzko D, Rumpel S, Gottmann K (2001). Insulin promotes functional induction of silent synapses in differentiating rat neocortical neurons. Eur J Neurosci. 14:1412-5.

Sambrook RJ, Girling DJ (2001). A national survey of the chemotherapy regimens used to treat small cell lung cancer (SCLC) in the United Kingdom. Br J Cancer. 84:1447-52.

Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. Cell 81:299-307.

Saracci R, Boffetta P (1994). Interaction of tobacco smoking with other causes of lung cancer. In: Samet J (Ed). Epidemiology of lung cancer. New York: Marcel Dekker Inc, 465-93.

Schwarz JR, Bauer CK (1999). The ether-à-go-go-Related Gene K(+) Current: Functions of a Strange Inward Rectifier. News Physiol Sci. 14:135-142.

Schwarz JR, Bauer CK (2004). Functions of erg K⁺ channels in excitable cells. J Cell Mol Med 8:22-30.

Serke M, Schönfeld N (2007). Diagnosis and staging of lung cancer. Dtsch Med Wochenschr. 132:1165-9.

Simonato L, Agudo A, Ahrens W, et al. (2001). Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. Int J Cancer. 91:876-87.

Smith GA, Tsui HW, Newell EW, Jiang X, Zhu XP, Tsui FW, Schlichter LC (2002). Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cell. *J Biol Chem* 277:18528-34.

Snyders DJ, Chaudhary A (1996). High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol Pharmacol*. 49:949-55.

Soh JW, Kazi JU, Li H, Thompson WJ, Weinstein IB (2008). Celecoxib-induced growth inhibition in SW480 colon cancer cells is associated with activation of protein kinase G. *Mol Carcinog*.

Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC (1996). Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res*. 78:499-503.

Spira A, Ettinger DS (2004). Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med*. 350:379-92.

Stahel RA, Gilks WR, Lehmann HP, Schenker T (1994). Third International Workshop on Lung Tumor and Differentiation Antigens: overview of the results of the central data analysis. *Int J Cancer [Suppl]* 8:6

Strillacci A, Griffoni C, Spisni E, Manara MC, Tomasi V (2006). RNA interference as a key to knockdown overexpressed cyclooxygenase-2 gene in tumour cells. *Br J Cancer*. 94:1300-10.

Taketo MM (1998). Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst*. 90:1529-36.

Tegeder I, Neupert W, Gühring H, Geisslinger G (2000). Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther*. 292:1161-8.

von Pawel J, Schiller JH, Shepherd FA, et al. (1999). Topotecan versus cyclophosphamid, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 17:658-67.

Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, Wang YT (1997). Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature*. 388:686-90.

Wang H, Zhang Y, Cao L, Han H, Wang J, Yang B, Nattel S, Wang Z (2002). HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res.* 62:4843-8.

Wang HM, Zhang GY (2005). Indomethacin suppresses growth of colon cancer via inhibition of angiogenesis in vivo. *World J Gastroenterol.* 11:340-3.

Warde P, Payne D (1992). Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small-cell lung cancer carcinoma of the lung? A meta-analysis. *J Clin Oncol.* 10:890-95.

Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science* 252:1560-2.

Warmke JW, Ganetzky B (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3438-42.

Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR (1997). The class III antiarrhythmic agent E-4031 selectively blocks the inactivating inward-rectifying potassium current in rat anterior pituitary tumor cells (GH3/B6 cells). *Pflugers Arch.* 434:1-10.

Wickenden A (2002). K(+) channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther.* 94:157-82.

Wonderlin WF, Strobl JS (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol.* 154: 91-107.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2692-6.

Yeh J, Litz J, Hauck P, Ludwig DL, Krystal GW (2007). Selective inhibition of SCLC growth by the A12 anti-IGF-1R monoclonal antibody correlates with inhibition of Akt. *Lung Cancer.*

Zhong L, Goldberg MS, Parent M-E, Hanley JA (2000). Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer.* 27:3-18.

Zimmermann S, Wels W, Froesch BA, Gerstmayer B, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (1997). A novel immunotoxin recognising the epithelial glycoprotein-2 has potent antitumoural activity on chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 44:1-9.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für die Möglichkeit diese Arbeit am Anatomischen Institut II durchführen zu können und für seine stets wunderbare Betreuung, sein Interesse am Vorankommen meiner Versuche und seine wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge.

Frau Dr. rer. nat. Heike Gustke möchte ich ganz herzlich für die unübertreffbare Betreuung meiner Arbeit, ihre Motivation und ihre hervorragenden Tipps und Ratschläge und ihre Unterstützung beim Verfassen der Doktorarbeit danken.

Herrn Dr. rer. nat. Günter Glassmeier aus dem Institut für vegetative Physiologie und Pathophysiologie danke ich für die Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen und seine Hilfestellung bei wissenschaftlichen Fragen zu diesem Thema.

Frau Elke Schäfer aus dem Institut für Anatomie I danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dem gesamten MTA-Laborteam möchte ich für die hervorragende Einarbeitung, die tolle Unterstützung und die nette Zeit im Labor herzlich danken. Dieses gilt vor allem Frau Renate Gehrke, Herrn Klaus Siebert und Frau Susanne Feldhaus.

Bei meinen Mitdoktoranden, besonders Eva Nagel, bedanke ich mich für die schöne gemeinsame Zeit mit vielen anregenden Gesprächen, gegenseitiger Unterstützung und Motivation.

Meinen Eltern danke ich besonders für ihr stetiges Interesse und ihre tolle Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Mann für seine unermessliche Geduld, seine liebe Motivation und Unterstützung.

10 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 24.06.2010

Annika Lange