Aus der Klinik für Innere Medizin A
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Markus M. Lerch)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Präklinische Evaluation der Wirksamkeit und des Wirkmechanismus von Triptolid und Minnelide™ im Kolonkarzinom *in vivo* und *in vitro* unter besonderer Berücksichtigung des Jak-2/STAT-3-Signalwegs

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald

2015

vorgelegt von:
Georg Beyer
geb. am: 24.02.1988
in: Jena

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus M. Lerch

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Raum O 0.66

Tag der Disputation: 12.10.2015

Inhalt

1. Einleitung 5
1.1 Fragestellung und Hypothesen 9
2. Material und Methoden 10
2.1 Tierexperimente 10
2.1.1. Subkutanes Xenotransplantatmodell 10
2.1.2. Lebermetastasenmodell 11
2.2 Zellkultur 11
2.2.1 Behandlung mit Triptolid, Erfassung von Zellviabilität, Caspase-3/7-Aktivität und Zellzyklusanalyse 12
2.2.2 Zellzyklusanalyse 13
2.3 Western Blot 13
2.4 Real-time PCR 14
2.5 Immunopräzipitation 15
2.6 Reporter Assay 16
2.7 Statistik 17
2.8 Geräte und Reagenzien 17
3. Ergebnisse 18
3.1 Evaluation der Wirkung von Minnelide™ auf das Wachstum des kolorektalen Karzinoms in Mausmodellen 18
3.1.1 Effekt von Minnelide™ auf das Tumorvolumen von subkutanen HCT116-Xenotransplantaten in Nacktmäusen 18
3.1.2 Effekt von Minnelide™ auf die Entwicklung von Lebermetastasen im Milzinjektionsmodell in Nacktmäusen 20
3.1.3 Effekt von Minnelide™ auf das Überleben von Mäusen mit Lebermetastasen im Milzinjektionsmodel 21
3.2 Einfluss von Triptolid auf das Zellüberleben in HCT116 und HT29 Kolonkarzinomzellinien in vitro 22
3.2.1 Einfluss von Triptolid auf die Zellviabilität von HCT116 und HT29 Zellen 22
3.2.2 Einfluss von Triptolid auf Zelltodmechanismen in HCT116 und HT29 Zellen 23
3.3 Expression von Zellzyklusregulatoren und Apoptoseinhibitoren 27
3.3.1 Einfluss von Triptolid auf die Expression antiapoptotischer Proteine 27
3.3.2 Einfluss von Triptolid auf die Expression von Regulatoren des G_1-S-Phasenübergangs 28

3.3.3 Mechanismus der Hemmung des Tumorwachstums in mit Minnelide™ behandelten HCT116 Xenotransplantaten 29
3.4 Einfluss auf den Jak-2/STAT-3-Signalweg 31
3.4.1 Änderungen der Jak-2 Aktivierung nach Behandlung mit Triptolid 31
3.4.2 Änderung der STAT-3 Aktivierung nach Behandlung mit Triptolid 33
3.4.3 Pharmakologische Inhibition des Jak-2-Signalwegs mit WP1066 in Kolonkarzinomzellen 35
3.5 Vergleich mit duktalen Pankreasadenokarzinomzelllinien 37
3.5.1 Einfluss von Triptolid auf den Jak-2/STAT-3-Signalweg in duktalen Pankreasadenokarzinomzelllinien 37
3.5.2 Pharmakologische Inhibition des Jak-2-Signalwegs mit WP1066 in duktalen Pankreasadenokarzinomzellen 38
4. Diskussion 40
4.1 Wirksamkeit von Minnelide™ im Kolonkarzinom in vivo 40
4.2 Hemmung des Zellüberlebens von humanen Kolonkarzinomzelllinien in vitro 42
4.3 Mechanismen der Triptolid-abhängige Regulation des Zellüberlebens 43
4.4 Schlussfolgerung 50
5. Anhänge 51
5.1 Auflistung der Verwendeten Geräte, Materialien und Reagenzien 51
5.1.1. Geräte 51
5.1.2. Verbrauchsmaterialien 52
5.1.3. Chemikalien, Medien und Antikörper 52
5.1.4. Hergestellte Puffer und Lösungen 55
5.1.5. Primer 55
5.2. Abkürzungsverzeichnis 56
5.3. Abbildungsverzeichnis 59
6. Zusammenfassung 60
7. Literatur 62
8. Eidesstattliche Erklärung 73

1. Einleitung

Im Jahr 2014 lebten in den USA geschätzte 1.2 Millionen Menschen mit der Diagnose eines Kolon- oder Rektumkarzinoms. Davon sind in 2014 136 000 Neuerkrankungen und man schätzt, dass etwa 51 000 Patienten im selben Zeitraum daran verstorben sind (1). Bösartige Tumoren des Kolons oder Rektums sind damit die vierthäufigste Tumorerkrankung bezogen auf alle Geschlechter in den USA. In Europa ist es die zweit- bzw. dritthäufigste krebsassoziierte Todesursache nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Bronchial- und Mammakarzinom bei Frauen (2). In Deutschland betrug das relative 5-Jahrsüberleben in der Zeit von 2007 bis 2010 über alle UICC Stadien (3) 67.1% für die Unter- und 56.1% für die Über-75-Jährigen (4). Im UICC-Stadium IV (Fernmetastasen) kann bis zu 30% der Patienten operativ nicht mehr geholfen werden, was zur unbefriedigenden Prognose mit einem 5-Jahresüberleben von 12% in diesem Tumorstadium beiträgt, trotz Fortschritten in der medikamentösen Therapie von metastasierten Tumoren (5). Die Inzidenz ist über die letzte Dekade in Amerika wie auch in Deutschland leicht gefallen, was unter anderem darauf zurückgeführt wird, dass immer mehr Menschen am Screening mittels Koloskopie teilnehmen und Risikofaktoren wie das Tabakrauchen gleichzeitig zurückgehen (1,6–8). Wie die meisten soliden Tumoren des Menschen, ist das sporadisch auftretende kolorektale Karzinom eine Erkrankung des älteren Menschen mit einem medianen Erkrankungsalter von 70 Jahren (1).

Die mittleren Behandlungskosten betragen in Deutschland nach Analyse von Krankenkassendaten in Abhängigkeit von Stadium und Lokalisation zwischen 28.000€ und 69.000€. Eine Lokalisation im Rektum ist im Vergleich zum reinen Kolonkarzinom dabei in frühen Tumorstadien (UICC I-II) kostenintensiver, ein Verhältnis, dass sich in späteren Krankheitsstadien (UICC III-IV) jedoch umkehrt (9). Damit stellt das fortgeschrittenen Kolon- und Rektumkarzinom nicht nur ein medizinische, sondern auf Grund seiner Häufigkeit und der assoziierten Gesundheitskosten sogleich eine gesundheits- und volkswirtschaftliche Herausforderung erheblichen Ausmaßes dar.

Die Mehrheit der kolorektalen Karzinome des Menschen entstehen auf dem Boden eines Adenoms, weshalb die Modellvorstellung einer Adenom-Karzinom-Sequenz mit einer zunehmenden Zahl somatischer Mutationen bei Chromosomeninstabilität favorisiert wird (10). Die „gatekeeper“ Mutation kolorektaler Karzinome findet sich im APC-Gen und wurde zunächst bei der *familären Adenomatosis Poliposis Coli* (FAP) identifiziert (11). Von dieser Erbkrankheit Betroffene weisen bereits in jungen Jahren

hunderte Adenome auf, die in nahezu 100 % der Fälle entarten. Doch auch bei sporadischen Kolonkarzinomen finden sich in bis zu 80 % somatische Mutationen im APC-Gen (12,13). Diese Mutation führt zu einer Daueraktivierung von β-Catenin, welches in den Zellkern transloziert und dort die Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie aktiviert (14), mit weitreichende Konsequenzen für die Steuerung der Proliferation, z.B. durch die Regulation des Cyclin D1, welches den Übergang von der G_1- in die S-Phase einleitet (15). Im Laufe der Zeit sind weitere Mutationen in diesem als Wnt-Signalweg bezeichneten System hinzugekommen, die z.B. auch β-Catenin selbst betreffen können (16). Zur karzinomatösen Entartung sind jedoch weitere Mutationen notwendig und hier finden sich gehäuft bei dem auch aus anderen Karzinomen bekannte Tumorsupressor p53 sowie Mutationen im protoonkogenetischen Signalweg RAS-RAF-MAPK (10). Eine Subgruppe von Kolonkarzinomen (ca. 15%) gehen nicht aus klassischen tubulären Adenomen hervor, sind bevorzugt im rechten Kolon lokalisiert und zeichnen sich durch Mikrosatelliteninstabilität aus (10). Zu dieser Form gehören auch Tumoren die im Rahmen der *hereditären nicht-polypomatösen Carcinomatosis Coli* (HNPCC) entstehen. In der Summe führen diese Veränderungen zu einem Missverhältniss von Proliferation und Apoptose in dem die Zellteilung von externen Stimuli unabhängig gemacht wird und es gleichzeitig zur Inhibition proaptotischer und einer Aktivierung antiapoptotischer Signalwege kommt (17).

Weitere Mutationen die in unkontrolliert proliferierenden Zellen mit gestörten Schadenssensoren und dysfunktionalen Reparaturmechanismen akkumulieren komplettieren den Weg zum invasiven Karzinom. Klassische Vertreter dieser Gruppen sind Proteine der BCL-2 Familie, die IAPs (Inhibitors of Apoptosis), Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks) sowie der Transkriptionsfaktor c-myc (10). Weitere wichtige Signalwege steuern die Interaktion mit dem Tumorstroma und dem Immunsystem. So führt die Überaktivierung des RAS-RAF-MAPK-Wegs zu einer Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen die para- und autokrin ein proliferationsförderndes Millieu schaffen. Als wichtiger Mediator dieses Effekts wurde der JAK-2/STAT-3-Signalweg identifiziert (18), der zunächst nur im Zusammenhang mit Colitis-assoziierten Tumoren wahrgenommen worden war.

Das Diterpenoid Triepoxid Triptolid wurde erstmals im Jahr 1972 von Kupchen et al. isoliert und strukturell charakterisiert (Abbildung 1). Schon diese erste Untersuchung

war durch die Beobachtung geleitet, dass die Essigsäurethylester Fraktion eines Alkoholextrakts von Pflanzenbestandteilen von *Tripterygium wilfordii* Hook inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Leukämie- und Nasopharynxkarzinomzelllinien hatte (19,20). *Tripterygium wilfordii* Hook (Wilfords Dreiflügelfrucht) ist eine in Ostasien verbreiteten Zierpflanze aus der Familie der Celastracaeen (Spindelbaumgewächse). Neben Triptolid kann auch noch Triptiolid gewonnen werden, dessen tumortoxische Wirkung allerdings weitaus geringer ist.

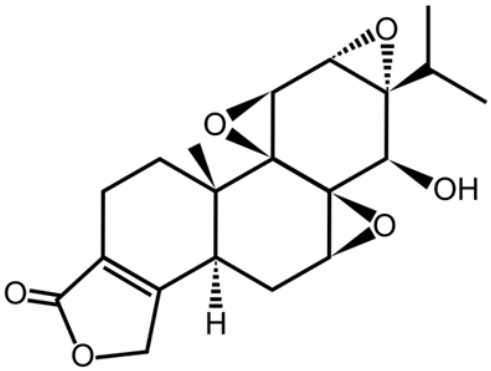


Abbildung 1. Strukturformel von Triptolid. Triptolid ist ein Diterpen Triepoxid und der potenteste Inhaltsstoff des Extraktes der ostasiatischen Pflanzen *Tripterygium wilfordii* Hook (Wilfords Dreiflügelfrucht) aus der Familie der Celastracaeen (Spindelbaumgewächse).
Bildnachweis: Wilfords Dreiflügelfrucht [Internet]. Wikipedia. 2014 [zitiert 2015 Jan 14]. Available from: http://de.wikipedia.org/w/index. php?title=Wilfords_Dreifl %C3%BCgelfrucht&oldid=130008174

Es sollten jedoch fast 20 Jahre vergehen, bis Wei und Adachi die erste größere Studie zum Einfluss von Triptolid auf verschiedenen Karzinomzelllinien durchführten, in der sie eine dosisabhängige Inhibition der Koloniebildung feststellten (21). Diese Arbeit wird heute von vielen Autoren als der eigentliche Beginn der Erforschung von Tripolid als Zytostatikum gewertet. Lisa Shamon et al. konnten später zeigen, dass Triptolid in der Lage ist, das Wachstum von Mammakarzinom-Xenograft-Tumoren in athymischen Mäusen zu hemmen und publizierten zeitgleich die ersten Ergebnisse zur Dosisfindung im Tierexperiment (22).

Triptolid zog besondere Aufmerksamkeit auf sich, als bekannt wurde, dass es ein effektiver Inhibitor der induzierbaren Hitzeschockproteinantwort ist (23). Hitzeschockprotein 70 ist ein bedeutender Überlebensmechanismus in Karzinomzellen, da es als Faltungshilfe für Proteine dient und so tödlichen Stress, der durch das Anfallen großer Mengen falsch gefalteter Proteine in translational hochaktiven Zellen entsteht, abfängt. Es ist unter anderem im Pankreaskarzinom und Kolonkarzinom überexprimiert (24–26) und seine Inhibtion durch Triptolid führt zum programmierten Zelltod (27,28).

Es fiel jedoch auf, dass selbst eine vollständige Inhibition des Hitzeschockproteins 70 nicht zu 100 % Zelltod führte und insbesondere Kolonkarzinomzellen resistent gegen HSP70-Inhibitoren, nicht jedoch gegen Triptolid waren (29). Somit stellte sich die Frage nach weiteren Wirkmechanismen von Triptolid.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der vorherrschende Zelltodmechanismus nicht zwangsläufig eine Caspase-abhängige Apoptose sein muss. Bei einige Pankreaskarzinom- und Neuroblastomzelllinien fehlt die Aktivierung von Effektorcaspasen ganz oder teilweise, stattdessen kommt es zur Aktivierung der Autophagie (30,31). Andere Forschergruppen berichten von einer Arretierung von Kolonkarzinom- und Myelomzelllinien im Zellzyklus und einen damit verbundenen Zelluntergang (32–34).

Obwohl weiter Unklarheiten über den molekularen Wirkmechanismus von Triptolid herrschen, scheinen zwei Punkte aus den bisher publizierten Arbeiten ableitbar: der Stoff Triptolid besitzt großes Potential in der Behandlung verschiedener Tumorentitäten, wie vielfach *in vitro* und *in vivo* gezeigt und eine Behandlung mit Triptolid in tumortoxischen Dosen scheint für nicht maligne transformierte Zellen bzw. gesunde Organismen ungefährlich zu sein (22,27,35). Ein Hindernis auf dem Weg zur Anwendung im Menschen war zunächst die schlechte Wasserlöslichkeit und damit geringe Bioverfügbarkeit des Stoffes Triptolid. Einer Gruppe an der University of Minnesota ist es jedoch gelungen, den Naturstoff Triptolid in ein 14-O-Phosphonooxymethyltriptolid Dinatrium Salz zu überführen, das wasserlösliche Pro-Drug Minnelide™ (PCT/US2010/034117; (36)). Dieses wird in Anwesenheit der in Körperflüssigkeiten ubiquitär vorhandenen alkalischen Phosphatase, durch Abspaltung der Phosphatester-Gruppe und Abgabe von Formaldehyd, rasch wieder in Triptolid überführt. Triptolid und Minnelide™ sind in ihrer biologischen Wirkung hinsichtlich der Tumortoxizität im Pankreaskarzinom *in vitro* und *in vivo* äquivalent (35). Eine Phase-I-Studie zur Bestimmung der maximal tolerierten Dosis (MTD) und der Dosis-limitierenden Toxizität (DLT) wurde im Juni 2014 begonnen und wird an zwei amerikanischen Zentren durchgeführt (37).

1.1 Fragestellung und Hypothesen

Ziel dieser Arbeit ist es, den tumortoxischen Effekt von Minnelide™ in klinisch relevanten Mausmodellen für das Kolonkarzinom zu evaluieren. Aus der Literatur ergeben sich Hinweise, dass Triptolid auch im Kolonkarzinom wirksam ist. Wir stellen die Hypothese auf, dass Triptolid *in vitro* und Minnelide™ das Tumorwachstum *in vivo* hemmen. Der molekulare Wirkmechanismus von Triptolid ist nicht vollständig geklärt. In dieser Arbeit sollen der vorherrschende, durch Triptolid verursachte Zelltodmechanismus im Kolonkarzinom bestimmt und die molekularen Mechanismen genauer beleuchtet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden durch das *Animal Care and Use Committee* der Universität von Minnesota genehmigt und überwacht. Sämtliche Tierxperimente wurden in weiblichen nu/nu Nacktmäusen von der Firma Charles River, USA, durchgeführt, die zu Beginn eines Versuchs in etwa 8 Wochen alt waren. Die Haltung und Durchführung erfolgte unter SPF-Bedingungen in der zentralen Tierversuchsanlage der Universität von Minnesota. Während der Durchführung von Experimenten wurden die Tiere täglich von geschultem Personal begutachtet und das Körpergewicht mindestens wöchentlich erfasst. Abbruchkriterien für jede Art von Experiment waren Gewichtsverlust von mehr als 20 % des Ausgangswerts, Verhaltensauffälligkeiten, Zeichen einer Cholestase, Blutungen, Hautschäden, Nahrungsverweigerung oder sonstige Gedeihstörungen.

2.1.1. Subkutanes Xenotransplantatmodell

Für die Implantation wurden 10^6 humane HCT116-Kolonkarzinomzellen in 50 µl PBS gelöst und anschließend mit der gleichen Menge 4 °C kaltem Matrigel gemischt und auf Eis gelagert. Die Applikation von 100 µl Zellgemisch erfolgte mittels einer ebenfalls eisgekühlten Hammilton-Spritze mit 31,5G Kanüle in das Unterhautfettgewebe der rechten Flanke der Tiere.

Die Randomisierung der Tiere erfolgte 7 Tage nach Implantation in eine Behandlungs- und eine Kontrollgruppen. Zum gleichen Zeitpunkt wurde mit täglichen intraperitonealen Injektionen von 0,42 mg/kg Körpergewicht Minnelide™ in der Behandlungsgruppe begonnen, was bei etwa 24 g schweren Mäusen 200 µl physiologischer Kochsalzlösung mit 50 µg/ml Minnelide™ entspricht. Die Kontrolltiere erhielten gleiche Mengen physiologischer Kochsalzlösung ohne Minnelide™. Gewicht und Tumorgröße wurden im Abstand von 3 Tagen erfasst. Die Tumoren wurden mittels Schiebelehre in 2 Dimensionen vermessen und das Tumorvolumen anhand der empirischen Formel 0.52 x Länge x $(\text{Breite})^2$ errechnet. Das Experiment wurde beendet, wenn eine Gruppe das durchschnittliche Tumorvolumen von 1000 mm^3 überschritten hatte. Die Tiere wurden in einer CO_2-Gaskammer euthanasiert und Tumorgewebe für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.1.2. Lebermetastasenmodell

Für die Untersuchung des Einflusses von Minnelide™ auf das Wachstum von Lebermetastasen und das Überleben von Tieren mit Lebermetastasen wurde ein Milzinjektionsmodell verwendet. Wie oben beschrieben wurde eine konzentrierte Matrigel-Zell-Suspension hergestellt, die nun $1x10^6$ HCT116-Zellen für die Metastasenquantifizierung bzw. $2x10^6$ HCT116-Zellen für die Überlebenskurve in je 10µl Injektionsvolumen enthielten und auf Eis gelagert.

Für die Operation erfolgte eine Narkose mittels Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg). Nach Hautdesinfektion mit Alkoholtupfer wurden die Bauchhaut und das Peritoneum mittels medianer Oberbauchlaparotomie eröffnet, die Milz dargestellt und mittels einer eisgekühlten Hamiltonspritze mit 31,5G Kanüle 10 µl der Zellsuspension unter die Milzkapsel injeziert. Der Wundervschluss erfolgte subkutan mit resorbierbarem Vicryl und die Haut wurde mit chirurgischen Hautklammern verschlossen. Die Tiere wurden perioperativ auf einer 37 °C warmen Heizmatte gelagert, etwa halbstündig gewendet und die Augen mittels Augensalbe vor dem Austrocknen bewahrt. Die postoperative Analgesie erfolgte mittels subkutaner Gabe von 30 µg Morphin über drei Tage. Fünf Tage nach Operation erfolgte die Randomisierung und Start der Behandlung wie oben beschrieben.

Für die Quantifizierung von Lebermetastasen wurden die Tiere 28 Tage nach Behandlungsbeginn euthanasiert, die Lebern für 2 Tage in 10%iger Formalinlösung fixiert und anschließend die Metastasen exzidiert und gezählt. Der Überlebensversuch wurde bei täglicher Gabe von Minnelide™ bzw. äquivalenter Mengen physiologischer Kochsalzlösung bis zum Versterben des letzten Tieres einer Gruppe durchgeführt.

2.2 Zellkultur

Die beiden verwendeten Zelllinien HCT116 und HT29 (Kolonkarzinom) bzw, S2-VP10 und MiaPaCa-2 (Pankreaskarzinom) wurden entsprechend der Empfehlung in *McCoy´s 5A Medium* (HCT116 und HT29), *Roswell Park Memorial Institute Medium* (S2-VP10) und *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (Mia-PaCa-2) unter Zugabe von 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO_2 in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zelllinien HCT116, HT29 und MiaPaCa-2 wurden bei ATCC erworben und S2-VP10 kamen aus dem Labor von Prof. Masato Yamamoto, Universität von

Minnesota (38). Die Passagierung erfolgte in der Regel zwei mal wöchentlich. Dafür wurden die Zellen, nach Absaugen des Mediums, zunächst mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend entsprechend der Größe der Zellkulturflasche, mit 1-3 ml 0,25 % Trypsinlösung für 5-10 min inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe des doppelten Volumens Zellkulturmedium und die Überführung in ein 50ml Zentrifugenröhrchen. Für die Fortsetzung der Kultur wurde 1/24 für HCT116, S2-VP10 und MiaPaCa-2 bzw. 1/8 für HT29 des Volumens der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben und diese mit 5-10 ml Medium befüllt. Die verbleibende Zellsuspension wurde für weitere Experimente verwendet oder verworfen. Die Verwendung der Zellen erfolgte höchstens bis zur dreißigsten Passage. Ein Zellvorrat wurde unter Zugabe von 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert vorgehalten. Die Zellkonzentration wurde mittels modifiziertem Hämozytometer nach Neubauer bestimmt.

2.2.1 Behandlung mit Triptolid, Erfassung von Zellviabilität, Caspase-3/7-Aktivität und Zellzyklusanalyse

Die Behandlung mit Triptolid und WP1066 erfolgte mit, durch serielle Verdünnung eines konzentrierten DMSO-haltigen Vorratsaliquots, frisch angesetzten Lösungen im entsprechenden Zellkulturmedium. Dabei wurde die DMSO-Konzentration durch entsprechende Zugabe in allen Verdünnungsstufen konstant gehalten. Die Behandlung wurde 48 h nach Aussaat bei ca. 75 % Konfluenz begonnen.

Für die Messung von Viabilität und Caspase-3/7-Aktivität wurden je 3000 Zellen in 100 µl Medium in 96-Well-Platten in Triplets ausgesät. Für die Viabilitätsbestimmung kamen klare, für die Caspasemessung weiße Flachbodenplatten zum Einsatz.

Die Viabilität wurde mittles Cell-Counting-Kit-8 bestimmt, bei welchem die NADH/NADPH-Dehydrogenase-abhängige Reduktion des Tetrazolium-Salzes WST-8 photometrisch gemessen wird. Pro Well wurden 10 µl der im Kit enthaltenen Lösung zugeben, für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die Absorption bei 450 nm im Photometer bestimmt.

Die Aktivität der Caspase 3/7 wurde nach Zugabe und Mischen mit 100 µl des zuvor nach Herstellerangaben rekonstituierten Caspase-Glo-Substrates sowie Inkubation unter Lichtschutz für 45 min bei Raumtemperatur im Fluorometer gemessen. Für die Auswertung wurden die Lumineszenzrohwerte mittels einer parallel erfolgten Viabilitätsmessung für die relative Zellzahl korrigiert.

2.2.2 Zellzyklusanalyse

Für die Untersuchung des Zellzyklus wurden die $1{,}25 \times 10^5$ Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und nach Adhärenzbildung für 12 h in serumfreien Medium inkubiert um den Zellzyklus zu synchronisieren. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Triptolid für 12 h oder 24 h. Danach wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und mit 70 % eiskaltem Ethanol für mindestens eine Stunde bei 4 °C fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 200 µl Guava Zellzyklus Reagenz versetzt und nach 30 min Inkubation im Durchflusszytometer auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht und so den Zellzyklusphasen zugeordnet.

2.3 Western Blot

Für die vergleichende Messung der Proteinexpression nach Behandlung mit Triptolid oder WP1066 wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Je nach Fragestellung wurden $1{,}25 \times 10^5$ in 6-Well-Platten oder 10^6 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen in 2 ml bzw. 10 ml Medium ausgesät und nach 48 h mit der Behandlung begonnen. Für die Zelllyse wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und nach erneuter Zugabe einer geringen Menge PBS mit einem Zellschaber vorsichtig von der Oberfläche gelöst. Anschließend erfolgte die Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß und die Zentrifugation bei 300 U/min für 5 min. Überstehendes PBS wurde entfernt und das Pellet in 35-100 µl Lysepuffer auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 20min bei 14.000 U/min und 4 °C zentrifugiert.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mittels BCA-Kit in 96-Well-Platten in Triplikaten. Standards wurden mittels serieller Verdünnung aus Albuminstandardlösung (2mg/ml) in RIPA-Puffer angesetzt und zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die zu messenden Proben wurden 1:5 in RIPA-Puffer vorverdünnt und dann mit den Standards zu 10 µl pro Well ausgebracht. Die Detektionslösung wurde entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und pro Well 200 µl mit einer Mehrkanalpipette zugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C erfolgte die Messung der Absorption bei 550 nm im Photometer. Die Proteinkonzentrationen in den Proben wurden durch lineare Regression aus den Werten der Standardreihe ermittelt.

Für Western Blots wurde das zu 20 µg Gesamtprotein äquivalente Volumen Zelllysats entnommen und das Volumen auf 30 µl mit PBS aufgefüllt. Anschließend wurden 5 µl 6fach SDS-Ladepuffer ergänzt und die Proben zur vollständigen Denaturierung 10 min

bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde das komplette Probenvolumen und 5µl eines entsprechenden Proteinmarkers auf ein 4-15 %-Gradientengel geladen, welches zuvor in die entsprechende Gelapparatur eingespannt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt worden war. Die angelegte Spannung für die Gelelektrophorese betrug für die ersten 30 min 70 V und wurde später auf 110 V erhöht. Die Gelelektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront kurz davor war das untere Ende des Gels zu erreichen.

Anschließend erfolgte der Nass-Transfer auf Nitrozellulosemembranen. Diese wurden zuvor in frisch angesetztem Transferpuffer kurz aktiviert. Die Transfervorrichtung wurde entsprechend den Herstellerangaben unter Vermeidung von Blaseneinschluss zusammengesetzt und der Transfer anschließend entweder unter Zuhilfenahme von Kühlpacks oder in einer Eiswanne bei 100 V für 1 h durchgeführt. Nach Ende des Transfers wurden die Markerbanden mit Kugelschreiber nachgezogen, und die nun beladenen Membranen mit Ponceau-S gefärbt um die Qualität des Transfers zu überprüfen. Danach folgte das Waschen mit TBS-T bis zur Entfärbung und Blocken unspezifischer Bindungen mit 5% fettfreier Pulvermilch oder 5 % BSA, jeweils gelöst in TBS-T. Die primären Antikörper wurden 1:1.000 in 5 % BSA- oder 5% fettfreier Pulvermilch/TBS-T gelöst (entsprechend den Herstellerangaben und laborinterner Standardisierung) und über Nacht (min. 16 h) bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgten drei Waschschritte á 10 min mit TBS-T bei Raumtemperatur, die Inkubation mit dem 1:3.000 in TBS-T mit 5 % BSA gelösten, HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei leichtem Schütteln ebenfalls bei Raumtemperatur und drei weitere Waschschritte. Die Blots wurden unter Verwendung von ECL-Substrat im Lumineszenzimager analysiert. Nicht verwendete Proteinproben wurden im Lysepuffer bei -80 °C aufbewahrt. Das Stripping der Membranen erfolgte, falls erforderlich, mit Restore Stripping Puffer für 10 min bei leichtem Schütteln unter Raumtemperatur. Anschließend wurde dreifach mit TBS-T gewaschen und das Verfahren mit dem Schritt der Ponceau-S-Färbung erneut begonnen. Homogenate aus Geweben wurden nach Auftauen von Gewebe in Lysepuffer auf Eis durch anschließendes homogenisieren und Ultraschallaufschluss hergestellt und anschließend wie Zelllysate behandelt.

2.4 Real-time PCR

Gesamt-RNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen. Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert und wie oben beschrieben behandelt. Zu jedem Well wurde

je 1 ml Trizolreagenz gegeben und nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 µl Chloroform versetzt und durch kräftiges Schütteln gemischt. Nach Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C über 15 min zur Phasenseperation wurde die wässrige, RNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein frisches RNase-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 0,5 ml Isopropanol ausgefällt und bei 12.000 g und 4 °C über 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 7.500 g und 4 °C für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet über Nacht fast vollständig luftgetrocknet. Das Pellet wurde im Anschluss in 50 µl in RNase-freiem Wasser gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch im Nanodrop bestimmt.

Zum Umschreiben der Gesamt-RNA in Komplementär-DNA wurden 1 µg RNA je Probe eingesetzt und unter Verwendung des cDNA Reverse Transcription Kits prozessiert. Für die Real-Time-PCR wurde Sybr-Green Mastermix in 10 µl Reaktionen mit 1 µl 1:10 verdünnter cDNA eingesetzt und in 37 Zyklen amplifiziert. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C, die Primerhybridisierung bei 60 °C und die Elongation bei 72 °C. Primerspezifität und PCR-Konditionen wurden zuvor mit regulärer PCR und Temperaturgradient kontrolliert und optimiert. Als interne Kontrolle diente 18S-Ribosomale RNA. Die Auswertung erfolgte nach $2^{-\Delta\Delta CT}$-Methode (39).

2.5 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation kamen 300 µg Gesamtprotein aus Zelllysaten in einem Volumen von 300 µl zum Einsatz. Das Lysat wurde unter Einsatz von 1 µg Kaninchen IgG und 20 µl Protein-A-gekoppelten Sepharose-Beads für 30 min bei 4 °C geklärt und im Anschluss bei 1.000 g für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2 µl anti-STAT-3-Antikörper versetzt und über Nacht (min. 16 Stunden) unter ständigem langsamem Überkopfrotieren bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Protein-A-gekoppelten Sepharose-Beads zugegeben und die Inkubation für weitere 2 h fortgesetzt. Die beladenen Beads wurden durch Zentrifugation bei 1.000 g für 30 sec vom Überstand getrennt und dieser abgenommen und aufbewart. Die Beads wurden dreimal für 10 min mit Lysepuffer gewaschen und anschließend mit 1fach konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt. Die Elution wurde durch Erhitzen auf 95 °C für maximal 5 min abgeschlossen und der Überstand nach Zentrifugation bei 1.000 g für 30 sec im Western Blot, wie bereits beschrieben, analysiert. Dabei wurden

Überstand mit ungebundenem Protein sowie vollständiges Lysat als Kontrolle mit laufen gelassen.

2.6 Reporter Assay

Die im STAT-3-Reporter Assay verwendeten Plasmide sind kommerziell erhältlich. Sie enthalten eine Renilla-Luciferase, die kontinuierlich über einen minimal-CMV-Promotor exprimiert wird und als interne Transfektionskontrolle dient, während eine Firefly Luciferase unter transkriptioneller Kontrolle eines Promotors mit Tandem-repeats der STAT-3-Promotorregion die eigentliche Aktivität des untersuchten Transkriptionsfaktors misst. Als Transfektionsreagenzien kamen FuGENE für Kolonkarzinomzelllinien und Attractene für Pankreaskarzinomzelllinienen zum Einsatz. Die Transfektion erfolgte unter fast-Track-Bedingungen simultan mit der Aussaat der Zellen ($3x10^4$ in 250 µl in 48-Well-Platten).

Der Transfektionsansatz für HCT116 enthielt pro Well 25 µl OPTImem-Medium, 0,75 µl FuGENE-Reagenz und 100 ng des Reporter-Plasmids bzw. der entsprechenden Kontrollplasmide. Für HT29-Zellen kam die doppelte Menge pro Well zum Einsatz. In den beiden Pankreaskarzinomzelllinien wurden 50 µl OPTImem-Medium mit 0,75 µl Attractene und 200 ng des Plasmids verwendet.

FuGENE bzw. Attractene wurde zunächst in OPTImem verdünnt und das Gemisch für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Plasmide zugegeben und für ca. 15 min zur Komplexbildung ruhen gelassen. Anschließend erfolgte die Zugabe zu den entsprechenden Zellsuspensionen. Nach 48 h wurde die Transfektioneffizienz mittels der im Kit ebenfalls enthaltenen GFP-Positivkontrolle im Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Behandlung mit Triptolid begonnen. Um ausreichende Signalstärken zu erreichen wurden alle Zellen mit 10 ng/ml rekombinantem IL-6 stimuliert. Dies diente gleichzeitig als Spezifitätskontrolle des Reporters.

Die Messung der Reporter-Aktivität nach Behandlung mit Tripolide erfolgte mittels eines Dual-Luciferase-Reporter-Assay-Kits. Das Zellmedium wurde vollständig entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Nach Absaugen der Waschlösung wurden pro Well 65 µl des Passiv-Lysepuffers (im Kit enthalten) zugegeben und die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln lysiert. 20 µl des Lysats wurden in ein FACS-Röhrchen überführt, welches 100 µl des Luciferase-Assay-Substrats-II für die Firefly-Luciferase enthielt. Anschließend wurde die erste Messung der Lumineszenz im Luminometer vorgenommen, welche Aufschluss über die Aktivität des untersuchten Transkriptionsfaktors gibt. Im Anschluss

wurde das 100 µl Stop & Glo-Substrates zugegeben und nach Durchmischen die Lumineszenz erneut gemessen. Der zweite Wert steht für die Renilla-Luciferase. Anschließend wurde die Hintergrundlumineszenz abgezogen und Firefly durch Renilla geteilt um für die Transfektionseffizienz zu korrigieren.

2.7 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und Messungen bei großen messbedingten Schwankungen in Triplikaten ausgeführt. Die verwendeten statistischen Tests sind bei den entsprechenden Experimenten angegeben. Bei einem p-Wert von <0,05 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied angenommen. Messwertverarbeitung erfolgte mittels Microsoft Excel 2010. Repräsentative Western Blots und Fotografien wurden mittels Adobe Photoshop CS4 formatiert. Die Erstellung der Graphen und die statistische Auswertung erfolgten mit Graphpad Prism 5. Die Abbildungen wurden mit Microsoft Powerpoint 2010 erstellt.

2.8 Geräte und Reagenzien

Eine vollständige Auflistung der verwendeten Geräte, Puffer und Reagenzien sowie weiterer Materialien ist der Anlage zu entnehmen.

3. Ergebnisse

Das Kolonkarzinom ist eine der häufigsten tumorassoziierten Todesursachen in Deutschland, mit schlechten Überlebensraten im Stadium der Fernmetastasierung, was die begrenzte Effektivität nicht-chirurgischer Behandlungsmodalitäten für diesen Tumor unterstreicht. Das Triptolid Prodrug Minnelide™ ist eine vielversprechende Substanz, deren Effektivität für die Behandlung des Kolonkarzinoms hier in präklinischen Modellen untersucht werden soll. Obwohl die Tumortoxizität der Muttersubstanz Triptolid vielfach gezeigt wurde, ist der Wirkmechanismus nach wie vor nicht verstanden.

3.1 Evaluation der Wirkung von Minnelide™ auf das Wachstum des kolorektalen Karzinoms in Mausmodellen

Minnelide™ ist ein wasserlösliches Derivat und Prodrug des pflanzlichen Wirkstoffs Triptolid, welches aus den Wurzeln der asiatischen Dreiflügelfrucht *Tripterygium wilfordii* gewonnen wird. Ursprünglich für die Behandlung des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas in Minneapolis entwickelt und dort bereits erfolgreich präklinisch getestet (35), wurde in dieser Studie zunächst die Frage gestellt, ob eine ähnliche Inhibition des Tumorwachstums auch in Mausmodellen für das kolorektale Karzinom beobachtet werden kann.

3.1.1 Effekt von Minnelide™ auf das Tumorvolumen von subkutanen HCT116-Xenotransplantaten in Nacktmäusen

In einem ersten Modell wurde der Effekt von Minnelide™ auf das Wachstum von humanen Kolonkarzinomzellen in einem *in vivo* System untersucht, um eine generelle Aussage über dessen therapeutisches Potential treffen zu können. Wang et al. hatten bereits zeigen können, dass die Entwicklung von Colitis-assoziierten-Kolonkarzinomen in Mäusen durch die Behandlung mit der Muttersubstanz Triptolid gehemmt werden kann (40). Zum Effekt des chemisch-modifizierten Derivats Minnelide™ auf das kolorektale Karzinom liegen keine Erkenntnisse vor. Um das Tumorwachstum longitudinal verfolgen zu können, wurde ein subkutanes Xenotransplantat-Model mit aggresiv wachsenden, dedifferenzierten humanen Kolonkarzinomzellen HCT116 gewählt. Bereits 10 Tage nach Tumorinitiierung hatten die Tumoren mit durchschnittlich 203 mm^3 ein Größe erreicht, bei der eine zuverlässige

Messung der Tumordimensionen möglich war, woraufhin die Behandlung mit täglich 0,42 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal (35) begonnen werden konnte. Als Kontrolle dienten Injektionen mit äquivalenten Mengen physiologischer Kochsalzlösung. Bereits eine Woche nach Behandlungsbeginn ließ sich ein tendenzieller Unterschied im durchschnittlichen Tumorvolumen feststellen, der nach zwei Wochen ein Signifikanzniveau von p=0,0278 erreichte (Abbildung 2a). Die Abbildung 2b. zeigt repräsentative Tiere aus beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt. Das mittlere Tumorvolumen lag in den Kontrollen bei 638.7 mm³ ± 76.81 mm³ (SEM) und in der Behandlungsgruppe bei 396.0 mm³ ± 64.43 mm³ (SEM). In der dritten Woche überschritt das durchschnittliche Tumorvolumen in den Kontrolltieren mit 1349 mm³ ± 157,3 mm³ (SEM) den zulässigen Höchstwert von 1000 mm³ für diese Art von Tumormodellen, weshalb das Experiment beendet wurde. Die Tumoren in der Behandlungsgruppe waren nur geringfügig auf 519.6 mm³ ± 79.08 mm³ (SEM) gewachsen. Der Unterschied erreicht mit p=0,0002 höchste Signifikanz. Die Gruppengröße lag bei n=9 in jedem Arm.

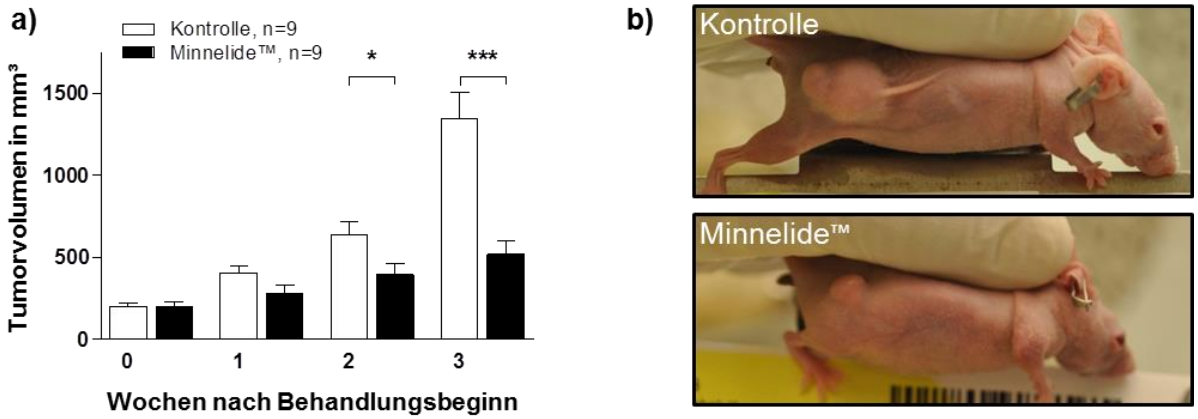


Abbildung 2. Einfluss von Minnelide™ auf das Tumorwachstum im subkutanen HCT116-Xenotransplantatmodell. 10^6 HCT116-Kolonkarzinomzellen wurden 1:1 mit Matrigel versetzt und subkutan in die rechte Flanke von athymischen Nacktmäusen injeziert. 10 Tage nach Tumorinitiierung hatte das durchschnittliche Tumorvolumen 203mm³ erreicht. Daraufhin wurden die Tiere verblindet in 2 Gruppen randomisiert und die Behandlung mit 0,42mg/kg KG Minnelide™ täglich intraperitoneal vs. äquivalente Mengen physiologischer Kochsalzlösung begonnen werden. a) Es ist das durchschnittliche Tumorvolumen±SEM für beide Gruppen, berechnet nach V=Länge x Breite x 0,52mm, gegen die Zeit nach Behandlungsbeginn in Wochen aufgetragen. Nach zwei Wochen lässt sich eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums in der Minnelide™-Gruppe feststellen. Nach drei Wochen überschreitet das Tumorvolumen in der Kontrollgruppe die zulässige Höchstgrenze von 1000mm³. Das Tumorvolumen in der Minnelide™-Gruppe ist zu diesem Zeitpunkt signifikant geringer. * p<0,05, *** p<0,001, Student´s t-Test. b) Fotografien repräsentativer Vertreter beider Versuchsgruppen, 2 Wochen nach Behandlungsbeginn. Das Tumorvolumen in dem Kontrolltier ist deutlich größer.

3.1.2 Effekt von Minnelide™ auf die Entwicklung von Lebermetastasen im Milzinjektionsmodell in Nacktmäusen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Minnelide™ in der Lage ist das Tumorwachstum *in vivo* zu hemmen, haben wir die Wirksamkeit des Medikaments im klinisch relevanten Zustand der multiplen Lebermetastasierung untersucht. Trotz großer Fortschritte bei der Früherkennung kolorektaler Tumoren und der Therapie bei lokal begrenzter Tumorausbreitung (41,42), liegt das 5-Jahres-Überleben im Stadium der Fernmetastasierung bei 12 % (43). Aus diesem Grund haben wir die Frage gestellt, ob Minnelide™ in der Lage ist, das Fortschreiten der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms im Milzinjektionsmodell zu beeinflussen. Nach operativem Einbringen von HCT116-Zellen in die Milz wurden nach fünf Tagen zwei zufällig ausgewählte Tiere wiedereröffnet, um das Vorhandensein von Lebermetastasen zu überprüfen. Nach anschließender Randomisierung und Behandlung mit entweder täglich 0,42 mg/kg Körpergewicht Minnelide™ intraperitoneal oder entsprechenden Mengen physiologischer Kochsalzlösung über 28 Tage, wurden die Tiere euthanasiert, die Lebern entnommen und 2 Tage in Formalin fixiert. Anschließend konnten die einzelnen Lebermetastasen exzidiert und gezählt werden. Es zeigt sich, dass die Anzahl der Metastasen in den mit Minnelide™ behandelten Tieren mit $p=0,0082$ signifikant geringer ist (Abbildung 3). Die durchschnittliche Anzahl pro Maus beträgt 5,182 ± 1,256 (SEM) bei den Kontrollen und 1,000 ± 0,3333 (SEM) bei den mit Minnelide™ behandelten Tieren. Die Gruppengröße lag bei 11 in der Kontrollgruppe und 10 in der Behandlungsgruppe. Bei der statistischen Auswertung wurde ein Minnelide™-Tier von der Betrachtung ausgeschlossen, weil bei einer gefundenen Anzahl von 16 Metastasen von einem Fehler bei der Implantation ausgegangen werden musste.

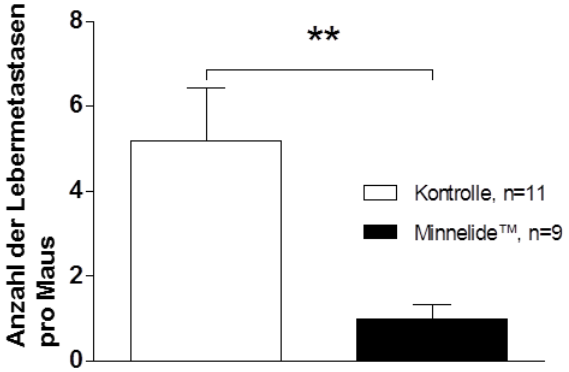


Abbildung 3. Effekt von Minnelide™ auf die Entwicklung von Lebermetastasen im Milzinjektionsmodell in Nacktmäusen. 10^6 HCT116-Kolonkarzinomzellen wurden 1:1 mit Matrigel versetzt und in die Milz von athymischen Nacktmäusen eingebracht. 5 Tage nach Tumorinitiierung wurden die Tiere verblindet in 2 Gruppen randomisiert und die Behandlung mit 0,42mg/kg KG Minnelide™ täglich intraperitoneal vs. äquivalente Mengen physiologischer Kochsalzlösung begonnen. 28 Tage nach Behandlungsbeginn wurden die Tiere euthanasiert und die Lebermetastasen nach Formalinfixierung gezählt. Dargestellt ist die durchschnittliche Metastasenzahl pro Maus ± SEM. Mit Minnelide™ behandelte Tier haben signifikant weniger Metastasen als die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tiere. ** p<0,01, Student´s t-Test mit Welch´s correction.

3.1.3 Effekt von Minnelide™ auf das Überleben von Mäusen mit Lebermetastasen im Milzinjektionsmodel

In einem weiteren Schritt haben wir die Frage gestellt, ob die Behandlung mit Minnelide™ über die Reduktion der Metastasenzahl als Surrogatparameter für die Ausprägung der Metastasierung hinaus, das Überleben von Mäusen mit ausgeprägter Lebermetastasierung beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll Lebermetastasen etabliert und die Behandlung mit täglich 0,42 mg/kg Körpergewicht Minnelide™ intraperitoneal oder physiologischer Kochsalzlösung respektive begonnen. Als Endpunkt wurde Tod als Folge der Metastasierung festgelegt. Das Experiment lief, bis alle Tiere einer Gruppe oder die Mehrheit aller Tiere verstorben waren. Das erste Versuchstier aus der Gruppe der mit Kochsalzlösung behandelten Tiere verstarb an Tag 41 nach Behandlungsbeginn, das Letzte an Tag 78. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten alle Tiere, die Minnelide™ erhielten, überlebt (Abbildung 4). Das mittlere Überleben in der Kontrollgruppe betrug 50 Tage. Nach Log-rank (Mantel-Cox)-Test und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test war der Unterschied jeweils signifikant mit p-Werten von p=0,0073 beziehungsweise p=0,0158. Die Gruppengröße betrug n=7 in jedem Arm.

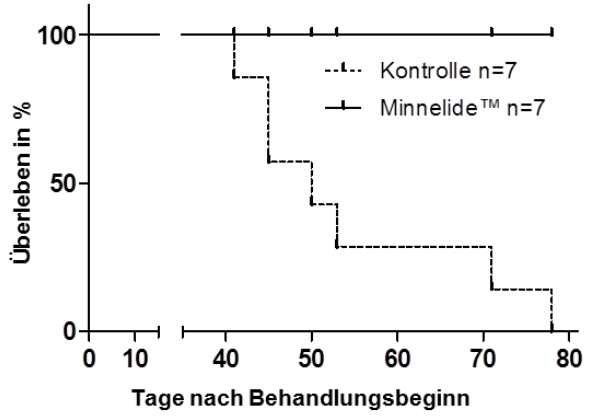


Abbildung 4. Effekt von Minnelide™ auf das Überleben von Mäusen mit Lebermetastasen im Milzinjektionsmodel. $2x10^6$ HCT116-Kolonkarzinomzellen wurden 1:1 mit Matrigel versetzt und in die Milz von athymischen Nacktmäusen eingebracht. 5 Tage nach Tumorinitiierung wurden die Tiere in 2 Gruppen randomisiert und die Behandlung mit 0,42mg/kg KG Minnelide™ täglich intraperitoneal vs. äquivalente Mengen physiologischer Kochsalzlösung begonnen. Die Beobachtung erfolgte bis zum Tod des letzten Tieres in der Kontrolgruppe an Tag 78 nach Behandlungsbeginn. Aufgetragen ist der Anteil der überlebenden Tiere der entsprechenden Ausgangsgruppe in % gegen die Zeit in Tagen nach Behandlungsbeginn in Form einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Das erste Kontrolltier verstarb an Tag 41, das letzte an Tag 78. Das mittlere Überleben der Kontrollgruppe betrug 50 Tage. Alle Tiere die Minnelide™ erhielten, haben bis Tag 78 überlebt. Der Unterschied ist nach Log-rank (Mantel-Cox) Test und Gehan-Breslow-Wilcoxon Test signifikant mit p-Werten von p=0,0073 und p=0,0158 respektive. Die Gruppengröße betrug n=7 in jeder Gruppe.

3.2 Einfluss von Triptolid auf das Zellüberleben in HCT116 und HT29 Kolonkarzinomzellinien in vitro

Triptolid ist ein pflanzlicher Wirkstoff und Muttersubstanz von Minnelide™. Es konnte gezeigt werden, dass Triptolid das Wachstum verschiedener Tumorentitäten *in vitro* hemmt, der eigentliche Wirkmechanismus wird jedoch nicht abschließend verstanden. Wir sahen es an dieser Stelle als ausreichend erwiesen an, dass Minnelide™ und Triptolid äquivalentes zytostatisches Potential *in vitro* besitzen (35) und haben deswegen auf vergleichende Experimente verzichtet.

Im Folgenden wurde untersucht, in welchem Ausmaß Triptolid die Viabilität der beiden humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT29 inhibiert und welche Zelltodmechanismen dabei eine Rolle spielen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Triptolid je nach Tumorentität und Charakteristika einzelner Modelle verschiedene Kaskaden aktivieren kann, die letzlich zum Zelltod führen.

3.2.1 Einfluss von Triptolid auf die Zellviabilität von HCT116 und HT29 Zellen

Als Grundlage für alle weiteren Versuche und um das generelle Ausmaß der Inhibierung des Zellüberlebens zu erfassen, wurden beide Zelllinien in identischer

Weise mit aufsteigenden Konzentrationen Triptolid (0-100nM) behandelt und die Zellviabilität mittels der Dehydrogenase-abhängigen Reduktion des Tetrazolium-Salzes WST-8 photometrisch bestimmt (Abbildung 5).

In beiden Zelllinien ist eine Zeit- und dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität zu verzeichnen. HCT116 Zellen zeigen bei geringen Dosen bzw. frühen Zeitpunkten ein besseres Ansprechen (24 h, 25 nM: 86.6 % ± 12.1 % (SEM) vs. 111.2 % ± 9.980712% (SEM)), während bei HT29 Zellen der Effekt nach 72 h größer ist (72 h, 100 nM: 33.48996 % ± 7.610019 % (SEM) vs. 17.28008 % ± 5.271032 % (SEM)). In beiden Zelllinien flacht die Kurve nach 72 h Behandlung mit höheren Konzentrationen ab. Behandlung mit 50 nM oder 100 nM hat bei einer ausreichend langen Behandlungszeit die gleiche Reduktion des Zellüberlebens zur Folge. Die statistische Auswertung erfolgte mittels regulärer 2-Wege-ANOVA mit Bonferroni post-Test für Konzentration und Zeitpunkt. Das Experiment wurde zwischen zwei und vier mal wiederholt.

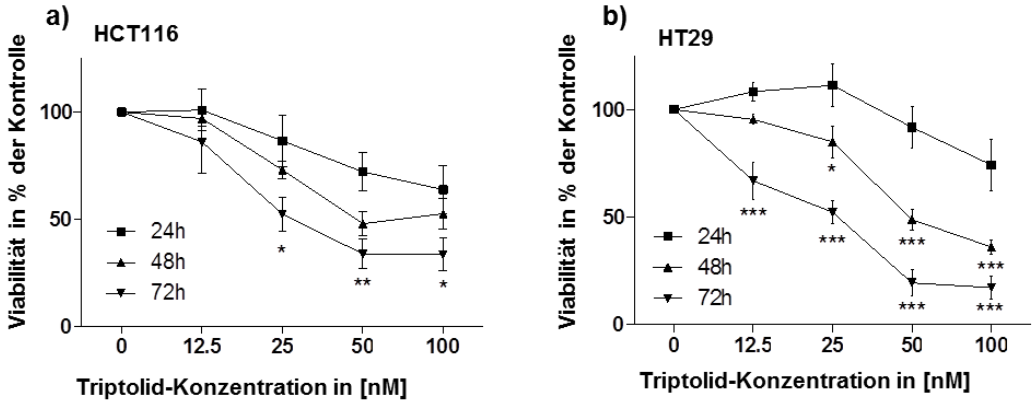


Abbildung 5. Einfluss von Triptolid auf die Zellviabilität von HCT116 und HT29 Zellen. 5x10^3 Zellen wurden in 3 96-Well-Platten ausgesäht und nach zwei Tage mit aufsteigenden Dosen Triptolid behandelt. 24h, 48h und 72h nach Behandlungsbeginn wurde die Zellviabilität mittels der Dehydrogenase-abhängigen Reduktion des Tetrazolium-Salzes WST-8 photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Das Zellüberleben ist als Prozentanteil der Kontrolle±SEM zum jeweiligen Zeitpunkt gegen die Triptolidkonzentration in nM aufgetragen. Behandlung mit Triptolid führt in beiden Zelllinien zu einer Zeit- und Dosis-abhängigen Reduktion des Zellüberlebens. a) HCT116 Zellen zeigen ein schnelleres Ansprechen. b) HT29 Zellen sprechen besser auf die Langezitbehandlung an (Abblindung 4. b). Die statistische Auswertung erfolgte mittels regulärer 2-Wege-ANOVA mit Bonferroni post-Test für Konzentration und Zeitpunkt. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, n=3-5.

3.2.2 Einfluss von Triptolid auf Zelltodmechanismen in HCT116 und HT29 Zellen

Die *in vivo* und *in vitro* Versuche mit Minnelide™ und Triptolid haben gezeigt, dass der Wirkstoff in der Lage ist, das Wachstum von Kolonkarzinomzellen in erheblichem Maße zu inhibieren. Weiterhin ungeklärt ist, welcher Mechanismus zu dieser Verminderung der Viabilität führt. Grundsätzlich kommen drei Möglichkeiten in Betracht: programmierter Zelltod durch Apoptose, verminderte Proliferation und Zellzyklusarrest oder Zelltod durch Autophagie. Um diese Frage zu beantworten

wurden HCT116 und HT29 mit aufsteigenden Konzentrationen Triptolid (0-100 nM) behandelt und Marker für alle drei Vorgänge gemessen.

Die Apoptose kann sowohl über intra- als auch auch extrazelluläre Auslöser aktiviert werden, doch beide Wege laufen in der Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 zusammen, die durch Spaltung verschiedener Substrate den kontrollierten Zelltod einleiten. Aus diesem Grund wurden die Aktivitäten der Caspasen-3/7 durch Zugabe eines lumineszenten Substrates fluorometrisch bestimmt. Die Zellen wurden parallel zum Viabilitätsassay mit Triptolid behandelt und die Werte zur entsprechenden Viabilität ins Verhältnis gesetzt. HCT116 Zellen zeigen bis zu einer Konzentration von 25 nM einen Zeit und dosisabhängigen Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität bis zu einem Maximum von 1305.103 % ± 324.6857 % (SEM), um bei höheren Konzentrationen fast auf Normalniveau zurückzufallen (Abbildung 6a). Auch die HT29 Zellen zeigen die höchste Caspase-3/7-Aktivtät bei der submaximalen Triptolidkonzentration von 50 nM (1613.948 % ± 221.4924 % (SEM)), doch bleibt auch bei der höchsten untersuchten Konzentration von 100nM ein Zeit-abhängiger Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität erhalten (Abbildung 6b). Die statistische Auswertung erfolgte mittels regulärer 2-Wege-ANOVA mit Bonferroni post-Test für Konzentration und Zeitpunkt. Das Experiment wurde zwei bis drei mal wiederholt.

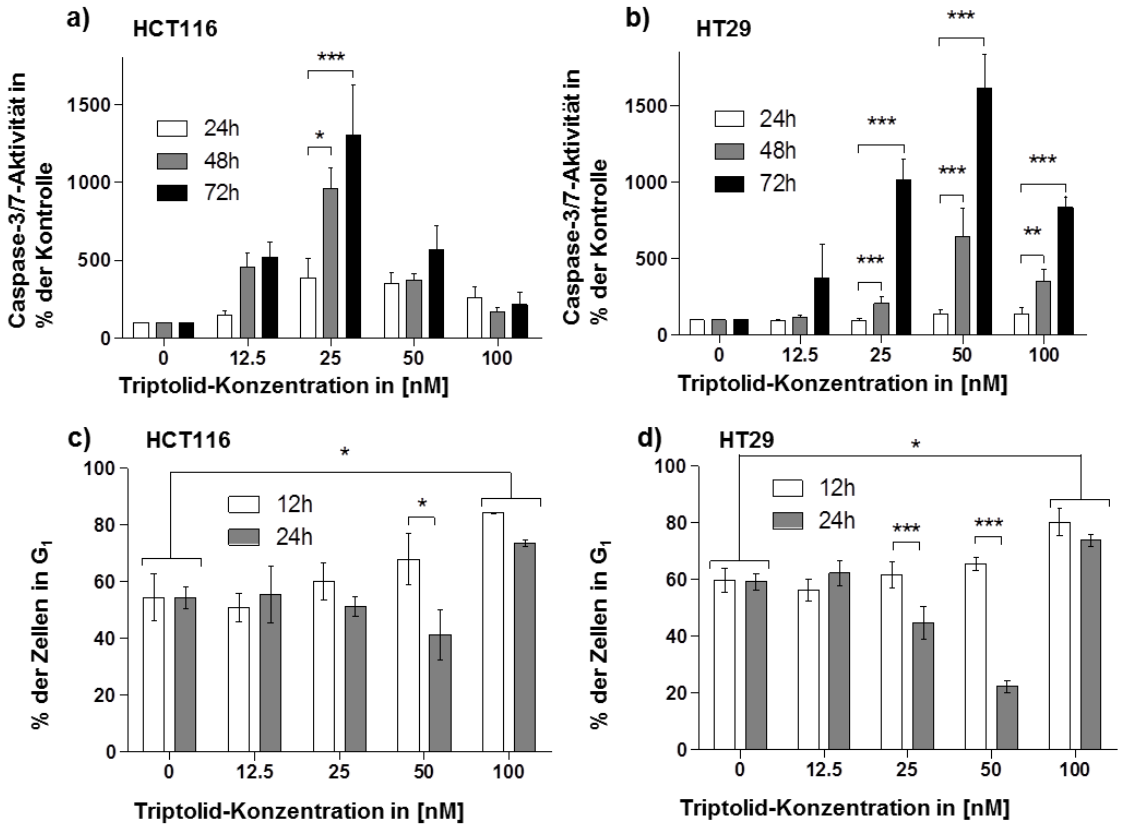


Abbildung 6. Einfluss von Triptolid auf die Aktivierung der Apoptose und Regulation des Zellzyklus. Als Maß für die Apoptose wurde die Caspase-3/7-Aktivität unter Triptolidbehandlung bestimmt und zur Viabilität unter gleichen Bedingungen ins Verhältnis gesetzt. Zu diesem Zweck wurden $5x10^3$ Zellen in 3 96-Well-Platten ausgesäht und nach zwei Tage mit aufsteigenden Dosen Triptolide behandelt. 24h, 48h und 72h nach Behandlungsbeginn wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Zugabe eines lumineszenten Substrates fluorometrisch bestimmt. a) Die Caspase-3/7-Aktivität in Triptolid-behandelten HCT116 Zellen steigt bis zu einer Konzentration von 25nM zeitabhängig bis auf ein Maximum von 1305.103% ± 324.6857% (SEM) und fällt dann wieder ab . b) Die Caspase-3/7-Aktivität in HT29 Zellen zeigt eine zeitabhängige Dynamik bis zur höchsten Konzetration von 100nM, erreicht ihr Maximum allerdings bereits bei 50nM mit 1613.948% ± 221.4924% (SEM). Spiegelbildlich zum biphasischen Verlauf der Caspase-Aktivierung bleibt der Anteil der in der G_1-Phase des Zellzyklus arretierten Zellen bei niedrigen Triptolid-Konzentrationen zunächst nahezu konstant. c) Der Anteil von G_1-arretierten HCT116 Zellen fällt bei einer Konzentration von 50nM nach 24h Behandlung auf ein Minimum von 41,4% ± 8,9% (SEM) und erreicht bei einer Konzentration von 100nM ein Maximum von 73,6% ± 1,3% (SEM). d) In ähnlicher Weise fällt der Anteil der G_1-arretierten HT29 Zellen bei 25nM und 50nM nach 24h Behandlung signifikant ab (Minimumum: 22,4% ± 2,1% (SEM)), um dann ebenfalls Maxima bei 100nM zu erreichen (73,7% ± 2,0% (SEM)). Die statistische Auswertung erfolgte mittels regulärer 2-Wege-ANOVA mit Bonferroni post-Test für Konzentration und Zeitpunkt. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, n=3-4.

Eine gebräuchliche Methode zur Zellzyklusanalyse in Zellkulturexperimenten ist die Färbung mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid (PI). Das messbare Fluoreszenssignal ist ein direktes Maß für den DNA-Gehalt der Zelle und so indirekt für die Zellzyklusphasen. HCT116 und HT29 Zellen wurden zunächst durch Serum-Entzug über 12h synchronisiert und dann für 12h und 24h mit Triptolid behandelt, anschließend mit dem PI-haltigen Guava Zellzyklus Reagenz gefärbt und mittels Durchflusszytometrie die Verteilung in $G_{0/1}$-, S- und G_2-Phase ermittelt. Der Anteil der in G_1-arretierten Zellen zeigt in beiden Zelllinien eine zur Caspase-3/7-Aktivierung gegensätzliche Dynamik, mit einem dosisabhängigen Anstieg und Maxima bei 100nM

von 73.63333 % ± 1.291424 % (SEM) für HCT116 (Abbildung 6c) und 73.86667 % ± 1.978497 % (SEM) für HT29 (Abbildung 6d). Gleichzeitig ist zu beobachten, dass bei Behandlung mit submaximalen Konzentrationen zwischen 25 nM und 50 nM zum 24 h-Zeitpunkt der Prozentsatz der Zellen in der G_1-Phase in beiden Zelllinien am geringsten ist. Dies sind zugleich die Bedingungen, unter denen die Caspase-3/7-Aktivität tendenziell am höchsten war. Die statistische Auswertung erfolgte mittels regulärer 2-Wege-ANOVA mit Bonferroni post-Test für Konzentration und Zeitpunkt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

Autophagie ist ein physiologischer Mechanismus der an der Degradierung und Wiederverwertung von Makromolekülen und Zellorganellen beteiligt ist und so einen wichtigen Beitrag zur Versorgung der Zelle mit Aminosäuren und Peptiden leistet. Es ist bekannt, dass die Autophagie unter Stresssituationen, wie z.B. dem Entzug von Aminosäuren, vermehrt aktiviert wird und so zum Zellüberleben beiträgt (30). Gleichzeitig kann übermäßige oder dysregulierte Autophagie zum Zelltod führen. Mujumdar et al. haben gezeigt, dass Triptolid-Behandlung in S2-Pankreaskarzinomzellen den Zelltod mit Autophagie induziert (30). Autophagosomen werden von einer Doppelmembran umschlossen, deren Formierung die Rekrutierung des ubiquitär exprimierten Proteins LC3 erfordert. LC3 wird dabei von seiner cytosolischen Form LC3-I in die membrankonjugierte Form LC3-II umgewandelt, was mit einer geringfügigen Verringerung des Molekulargewichts einhergeht. LC3-I/II sind daher im Western Blot als Doppelbande bei ca. 16 kDa zu erkennen. Eine Aktivierung der Autophagie geht mit einer Zunahme des LC3-II-Signals einher. Um die Rolle der Autophagie für den durch Triptolid verursachten Zelltod in Kolonkarzinomzellen zu untersuchen, wurden beide Zelllinien für 24 h und 48 h mit 100 nM Triptolid behandelt. Zelllysate mit 100 µg Protein wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot und anti-LC3-Antikörper die Expression bestimmt. In keiner der beiden Zelllinien konnte ein relevanter Anstieg des LC3-II-Signals verzeichnet werden (Abbildung 7.). Die β-Aktin-Expression diente als interne Kontrolle. Das Experiment wurde drei mal durchgeführt.

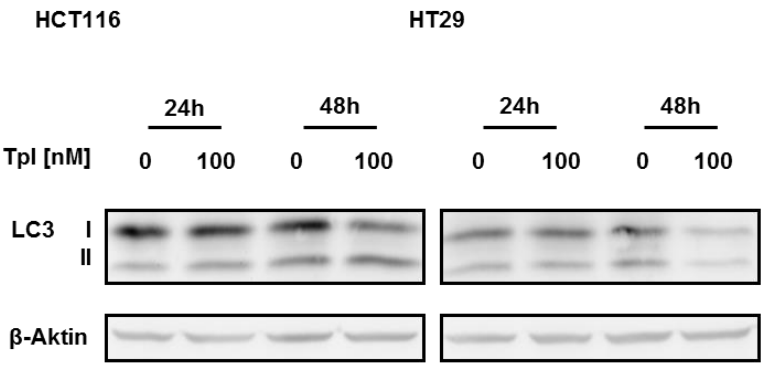


Abbildung 7. Einfluss von Triptolid auf die Aktivierung Autophagie. HCT116 und HT29 Zellen wurden für 24h und 48h mit Triptolid 100nM behandelt. Als Maß für die Autophagie wurde die LC3-I/II-Expression mittels Western Blot bestimmt. Es konnte kein wesentlicher Anstieg der LC3-II-Expression festgestellt werden, welche mit der Bildung von Autophagosomen assoziiert ist. n=3, ein repräsentativer Blot wird gezeigt. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

3.3 Expression von Zellzyklusregulatoren und Apoptoseinhibitoren

In den vorangegangen Kapiteln konnten wir zeigen, dass Triptolid die Zellviabilität der beiden Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT29 inhibiert. Dieser Effekt wird durch zwei Mechanismen hervorgerufen. Bei niedrigen Konzentrationen gehen die Zellen in Apoptose, wie durch den dramatischen Anstieg der Caspas-3/7-Aktivität gezeigt werden konnte. Höhere Konzentrationen führen kaum zu einer Heraufregulation von Apoptosemarkern, jedoch verharren bis 75 % aller Zellen in G_1-Phase, was für einen Zellzyklusarrest spricht. Beide Vorgänge, Apoptose und Zellzyklus, sind genau regulierte Mechanismen. Auf welche Weise Triptolid in die Regulation der Proliferation und Apoptoseinhibition eingreift, ist nur unzureichend geklärt. In einem nächsten Experiment haben wir deshalb die Expression einzelner Onkoproteine gemessen, die eine entscheidende Rolle für die Proliferation und Apoptoseresistenz kolorektaler Tumoren spielen.

3.3.1 Einfluss von Triptolid auf die Expression antiapoptotischer Proteine

Im Einzelnen wurde die Expression von Survivin, XIAP und Bcl-XL nach Behandlung mit Triptolid untersucht und mit unbehandelten Zellen verglichen. Dazu wurden jeweils 10^6 Zellen in 10 cm Schalen ausgesät und nach zwei Tagen die Behandlung mit 0 nM, 25 nM, 50 nM, und 100 nM Konzentrationen Triptolid für 24 h begonnen. Die Zellen wurden lysiert, 50 µg Protein in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern die Expression bestimmt. Survivin, XIAP und Bcl-XL werden durch Behandlung mit Triptolid dosisabhängig herunterreguliert. Dieser Effekt ist in beiden getesteten Kolonkarzinomzellinien gleichermaßen festzustellen

(Abbildung 8.). Die β-Aktin-Expression diente als interne Kontrolle. Alle Experimente wurden drei mal durchgeführt.

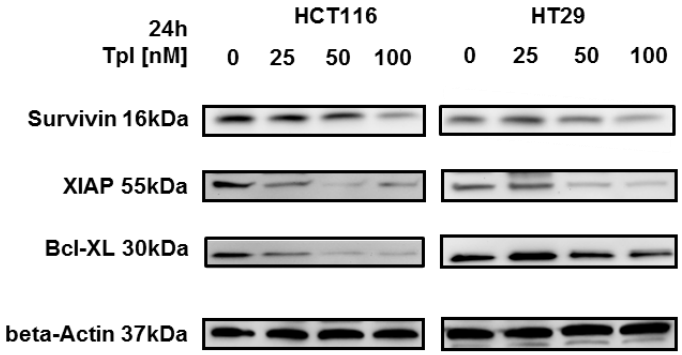


Abbildung 8. Einfluss von Triptolid auf die Expression antiapoptotischer Proteine in Kolonkarzinomzellen. 10^6 Zellen wurden in 10cm Platten ausgesäht und nach zwei Tage mit aufsteigenden Dosen Triptolid für 24h behandelt. Die Expression von Survivin, XIAP und Bcl-XL wurde im Western Blot bestimmt. Die Expression der verschiedenen antiapoptotischen Proteine wird Dosis-abhängig durch Triptolid gehemmt. Der Effekt ist in beiden Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT 29 vergleichbar stark ausgeprägt. n=3, ein repräsentativer Blot wird gezeigt. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

3.3.2 Einfluss von Triptolid auf die Expression von Regulatoren des G_1-S-Phasenübergangs

Mit dem vorangegangen Experiment kann die Aktivierung der Apoptose in mit Triptolid behandelten Kolonkarzinomzellen erklärt werden. Wir wissen jedoch, dass ein nicht unerheblicher Teil der Zellen nicht in Apoptose geht, sondern in der G_1- und/oder G_0-Phase des Zellzyklus verharrt. Dies passt auch zu der Beobachtung, dass in beiden untersuchten Zelllinien selbst nach 72 h Behandlung mit 100 nM Triptolid ein gewisser Anteil von Zellen überlebt. Ähnliches zeigte sich in den Tumormodellen, in welchen auch die mit Minnelide™ behandelten Tiere zum Ende der Experimente nicht tumorfrei waren. Der Eintritt in die S-Phase ist ein von der Zelle streng regulierter Vorgang, da die Verdopplung des Chromosomensatzes zum einen sehr energieaufwändig ist und zum anderen die Gefahr von neuen Übertragungsfehlern bzw. das Weitertragen von bestehenden Mutationen besteht. C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, dem eine wichtige Rolle in der Steuerung von Proliferation und Überleben von Tumoren zukommt (13,44). Der eigentliche Schritt von der G_1- in die S-Phase wird über die Aktivierung von Cdk-4 (Cyclin abhängige Kinase 4) durch Cyclin D1 initiiert, welche dann verschiedene Substrate, u.a. Rb1 phosphoryliert.

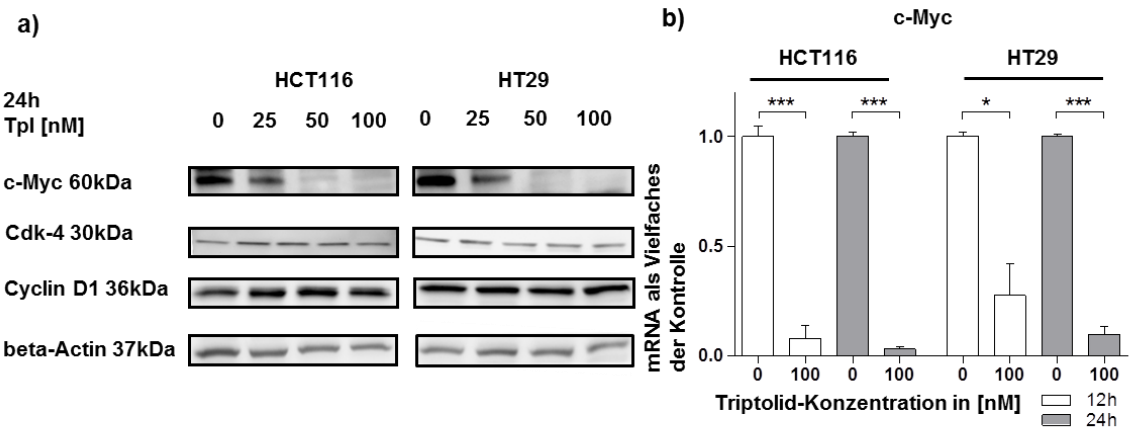


Abbildung 9. Einfluss von Triptolid auf die Expression von Zellzyklusregulatoren HCT116 und HT29 Zellen wurden für 12h und 24h mit Triptolid bis 100nM behandelt. Die Expression von c-Myc, Cdk-4 und CyclinD1 wurde im Western Blot bestimmt. a) Triptolid hemmt Dosi-abhängig die Expression von c-Myc, jedoch nicht von Cyclin D1 und Cdk-4. RNA wurde mittels Phenol-Chlorofrom-Extraktion gewonnen, in cDNA umgeschrieben und mittels semiquantitativer RT-PCR die Expressionänderung von c-Myc mittels ΔΔCT-Methode relativ zu 18s im zeitlichen Verlauf bestimmt. b) Triptolid führt bereits nach 12h zu einer Inhibtion der Transkription von c-Myc. Ein repräsentativer Blot wird gezeigt. β-Aktin und 18s dienten als interne Kontrollen. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, n=3-4, Student´s t-Test..

Wir haben zunächst die Expression von c-Myc, Cdk-4 und Cyclin D1 mittels SDS-PAGE und Western Blot in HCT116 und HT29 Zellen überprüft, die über 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen Triptolid behandelt wurden. Dabei zeigt sich, dass c-Myc jedoch nicht Cyclin D1 und Cdk-4 dosisabhängig herunterreguliert werden. (Abbildung 9a). Um zu etablieren, ob der Verringerung der Proteinlevel von c-Myc eine verminderte Bildung oder ein verstärkter Abbau zu Grunde liegt und um die zeitliche Abfolge der Geschehnisse die zum Zellzyklusarrest führen genauer eingrenzen zu können, haben wir zusätzlich RNA aus 12 h und 24 h mit 100 nM behandelten HCT116 und HT29 Zellen mittels Phenol-Chlorofrom-Extraktion gewonnen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und so die relativen Änderungen der mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels semiquantitativer Real-time PCR nach der ΔΔCT-Methode (39) bestimmt. Wir sehen, dass unter diesen Bedingungen, unter denen auch die meisten Zellen in der G_1-Phase arretiert waren, die mRNA-Mengen von c-Myc verringert waren, was für eine Hemmung der Transkription dieses Gens spricht (Abbildung 9b,c). Als interne Kontrolle diente die äußerst stabile 18s rRNA. Die Experimente wurden drei bis vier mal durchgeführt.

3.3.3 Mechanismus der Hemmung des Tumorwachstums in mit Minnelide™ behandelten HCT116 Xenotransplantaten

Triptolid hemmt die Proliferation von Kolonkarzinomzelllinien durch Induktion eines G_1-Phase-Zellzyklusarrest und kann zusätzlich die Aktivierung der Apoptose induzieren. Für die Regulation beider Vorgänge wichtige Onkoproteine werden bereits 12h bis 24h

nach Beginn der Behandlung mit Triptolid herunterreguliert. Im Kapitel 3.1 wurde bereits besprochen, dass die von Triptolid abgeleitete wasserlösliche Prodrug Minnelide™ in der Lage ist, das Wachstum von Kolonkarzinomen im Tiermodel drastisch zu bremsen.

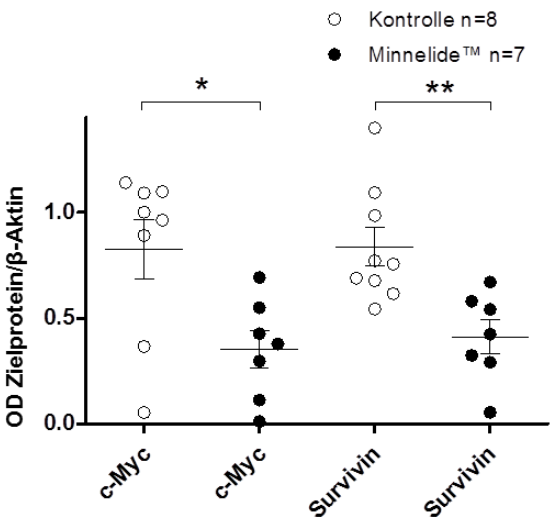


Abbildung 10. Expression von c-Myc und Survivin in mit Minnelide™ behandelten HCT116 Xenotransplantaten.
10^6 HCT116-Kolonkarzinomzellen wurden 1:1 mit Matrigel versetzt und subkutan in die rechte Flanke von athymischen Nacktmäusen injeziert. 10 Tage nach Tumorinitiierung hatte das durchschnittliche Tumorvolumen 203mm³ erreicht. Daraufhin wurden die Tiere verblindet in 2 Gruppen randomisiert und über 21 Tage mit 0,42mg/kg KG Minnelide™ täglich intraperitoneal vs. äquivalente Mengen physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Das Tumorgewebe wurde anschließend homogenisiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Densitometry. Dargestellt ist die optische Dichte (OD) der einzelnen Banden im Verhältnis zur zugehörigen β-Aktin-Kontrolle und das arithmetische Mittel ± SEM. Die Expression von c-Myc und Survivin ist in Tumorgewebe aus Minnelide™-behandelten Tieren signifikant geringer. * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Student´s t-Test..

Um der Frage nachzugehen, ob der zu Grunde liegende Mechanismus *in vivo* den in der Zellkultur gesehenen Effekten entspricht, wurde Tumorgewebe aus den Xenotransplantaten homogenisiert, das Gesamtprotein in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose mittels Western Blot relativ zur Kontrolle bestimmt. Da zur Expression von direkten Zellzyklusregulatoren wie cdk-4 und Cyclin D1 in nicht synchron wachsenden Geweben keine zielführende Aussage gemacht werden kann, wurde nur die Expression von c-Myc erfasst. Die Quantifizierung erfolgte mittels Densitometry und ist relativ zur β-Aktinexpression dargestellt. In entsprechender Weise wurde die Expression von Survivin, einem potenten Apoptoseinhibitor, bestimmt. Es zeigt sich, dass beide Onkoproteine in Tumorgewebe aus Minnelide™-behandelten Tieren deutlich herunterreguliert werden (Abbildung 10.). Der Unterschied erreicht in beiden Fällen statistische Signifikanz.

Ob dies nun auch in den Tumoren zum Zellzyklusarrest führt, kann nur indirekt beantwortet werden, da eine Bestimmung von Proliferationsmarkern im Homogenat nur wenig sinnvoll ist. Deshalb wurde über die Bestimmung von Apoptosemarkern ein indirekter Weg gewählt. Mittels Western Blot und Densitometry wurde die Expression von PARP1 (Poly-[ADP-Ribose]Polymerase) relativ zu β-Aktin und das Verhältnis von gespaltener Caspase 3 zu Caspase 3 bestimmt. PARP ist ein DNA-Reparaturprotein, das im Zuge der Apoptose abgebaut wird und die Caspase 3 wird im Zuge ihrer Aktivierung gespalten. In den mit Minnelide™ behandelten Tumoren ist keine

Abnahme der PARP-Expression zu erkennen und der Anteil an gespaltener Caspase 3 nimmt sogar ab. Somit ist keine Zunahme von Apoptosmarkern zu verzeichnen, was durch einen Zellzyklusarrest in den Tumoren erklärt werden könnte (Abbildung 11.).

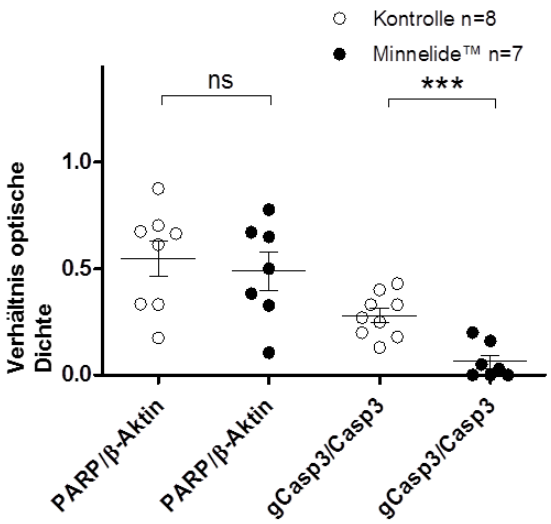


Abbildung 11. Apoptosemarker in mit Minnelide™ behandelten HCT116 Xenotransplantaten.
10^6 HCT116-Kolonkarzinomzellen wurden 1:1 mit Matrigel versetzt und subkutan in die rechte Flanke von athymischen Nacktmäusen injeziert. 10 Tage nach Tumorinitiierung hatte das durchschnittliche Tumorvolumen 203mm³ erreicht. Daraufhin wurden die Tiere verblindet in 2 Gruppen randomisiert und über 21 Tage mit 0,42mg/kg KG Minnelide™ täglich intraperitoneal vs. äquivalente Mengen physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Das Tumorgewebe wurde anschließend homogenisiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Densitometry. Dargestellt ist die optische Dichte (OD) von PARP1 relativ zu β-Aktin und das Verhältnis von gespaltener Caspase 3 (gCasp3) zu Caspase 3 (Casp3) der einzelnen Banden und das arithmetische Mittel ± SEM. Die Expression von PARP1 bleibt nach Behandlung mit Minnelide™ unverändert und die Menge gespaltener Caspase 3 nimmt relativ ab. *** $p<0,001$. Student´s t-Test..

3.4 Einfluss auf den Jak-2/STAT-3-Signalweg

Wir konnten zeigen, dass Triptolid dosisabhängig zu Apoptose und Zellzyklusarrest in der Zellkultur führt und dies mit einer Herunterregulation von antiapoptotischen und proliferationsfördernden Proteinen in Zellkultur und Minnelide™ behandelten Xenografttumoren einhergeht. Dieser breite Einfluss auf Onkoproteine legt einen Einfluss von Triptolid, respektive Minnelide™, auf die transkriptionelle Kontrolle dieser untersuchten Proteine nahe. Eine systematische Analyse der jüngeren Literatur ergab, dass der Jak-2/STAT-3-Signalweg an der Regulation aller hier untersuchten Proteine beteiligt ist und zudem eine bisher wenig untersuchte Rolle in der Entstehung und Progression kolorektaler Tumoren zu haben scheint (45,46).

3.4.1 Änderungen der Jak-2 Aktivierung nach Behandlung mit Triptolid

Die Aktivierung des Jak-2/STAT-3-Signalwegs wird durch Rekrutierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase Jak-2 nach Bindung aktivierender Zytokine, z.B. IL-6 oder Interferon-α, an ihre entsprechenden Rezeptoren initiiert. Die Bindung von zwei Jak-2-Molekülen an den Rezeptorkomplex führt zur gegenseitigen Phosphorylierung von Jak-2 an Tyr-1007/08. Diese Phosphorylierung erhöhte die Kinaseaktivität von Jak-2 und kann als Aktivierungsmarker gemessen werden. Aktiviertes Jak-2 phosphoryliert

intrazelluläre Bindungsstellen am Zytokinrezeptor an den es rekrutiert wurde, was die Fortsetzung der intrazellulären Signaltransduktion zur Folge hat (Abbildung 12.) (47).

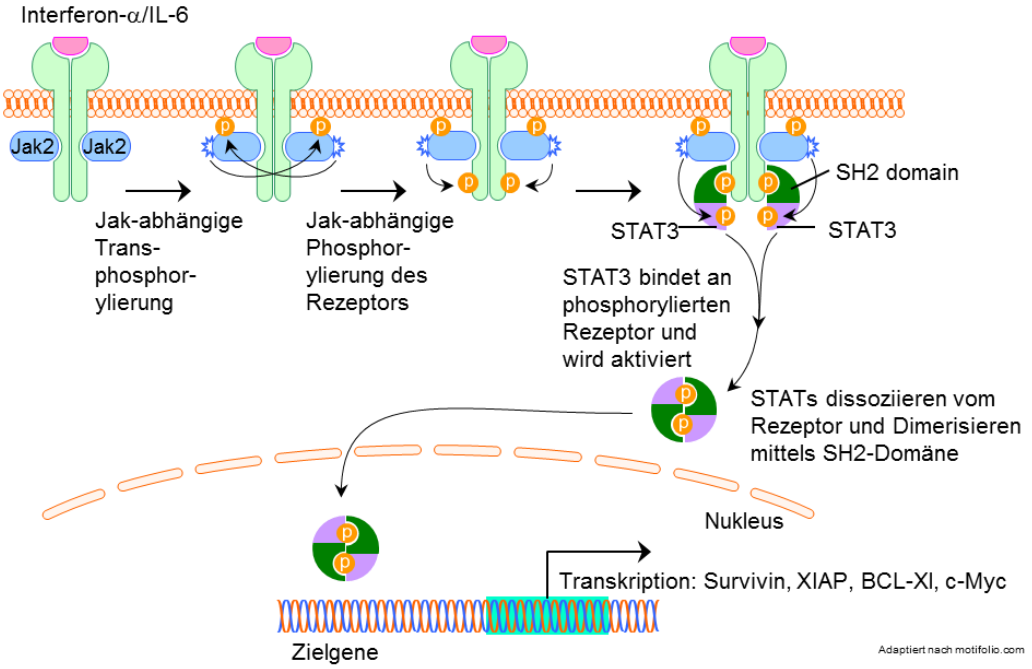


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Jak-2/STAT3-Signalwegs.

Eine etablierte Methode zur Messung der Phosphorylierung von Proteinen ist die Darstellung im Western Blot. Dafür werden Antikörper verwendet, die selektiv phosphorylierte Epitope des Proteins, in diesem Fall Jak-2, erkennen. Die Stärke des Phospho-Jak-2-Signals (P-Jak-2) wird dann zum Gesamt-Jak-2-Signal ins Verhältnis gesetzt. Dafür muss in einem zweiten Schritt die Menge des gesamten Jak-2, jetzt mit einem anderen Jak-2 spezifischen Antikörper, auf derselben Membran gemessen werden. Da einzelne Phosphorylierungen das Molekulargewicht und die Laufeigenschaften in der SDS-PAGE nur unwesentlich ändern, wird die Membran zwischen beiden Hybridisierungen einem Stripping unterzogen, um alle gebundenen Antikörper zu lösen. P-Jak-2 und Jak-2 wurden in Lysaten aus HCT116 und HT29 Zellen gemessen, die analog zu den vorangegangen Experimenten für 12 h und 24 h mit 100 nM Triptolid behandelt wurden. In beiden Zelllinien ist eine Abnahme von P-Jak-2 zu verzeichnen. Die Expression des Jak-2 änderte sich dabei nicht (Abbildung 13.). Dies indiziert, dass Triptolid zur Zeit-abhängigen Inhibition der Phosphorylierung und damit Aktivierung von Jak-2 führt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

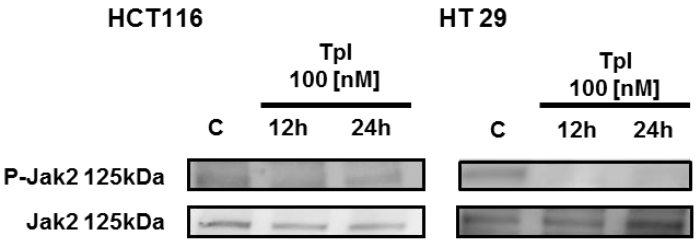


Abbildung 13. Änderungen der Jak-2-Phosporylierung nach Behandlung mit Triptolid. 10^6 Zellen werden in 10cm Platten ausgesäht und nach zwei Tage für 12h oder 24h mit 100nM Triptolid behandelt. Die Phosphorylierung von Jak-2 (P-Jak-2) und die Gesamtexpression (Jak-2) wurden konsekutive im Western Blot auf der gleichen Membran bestimmt. Zwischen beiden Messungen wurde ein Stripping durchgeführt. Die Phosphorylierung von Jak-2 wird Zeit-abhängig durch Triptolid gehemmt. Die Expression von Jak-2 ändert sich nicht. Der Effekt ist in beiden verwendeten Kolonkarzinomzelllinien gleichermaßen nachweisbar. n=3, ein repräsentativer Blot wird gezeigt.

3.4.2 Änderung der STAT-3 Aktivierung nach Behandlung mit Triptolid

Die im vorangegangen Kapitel beschriebene Jak-2 Aktivierung und folgliche Rezeptorphosphorylierung führt zur Bindung des zytosolischen Signalmoleküls und Transkriptionsfaktors STAT-3 über dessen SH2-Domäne.

Dieser erhält dadurch sein Aktivierungssignal, dimerisiert nach Konformationsänderung über die gleichen SH_2-Domänen, transloziert in den Nukleus, wo er durch Bindung an seine DNA-Promotorregionen die Transkription STAT-3-kontrollierter Gene einleitet (47). Ob die durch Triptolid verursachte Inhibition der Jak-2-Phosporylierung zu einer verminderten Interaktion zwischen Jak-2 und STAT-3 führt, wurde durch Koimmunopräzipitation untersucht. Dazu wurden HCT116 Zellen für 1 h, 6 h und 12 h mit 100 nM Triptolid behandelt. Anschließend wurde das Lysat mit Sepharose-Beads inkubiert, an die zuvor ein STAT-3-spezifischer Antikörper gekoppelt wurde. Nach Zentrifugation wurde das so isolierte STAT-3 von den Beads gelöst. Der Überstand mit ungebundenem Protein und das von den Beads gelöste Extrakt wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Anschließend erfolgt die Darstellung von STAT-3 und Jak-2 mittels spezifischer Anitkörper. Die STAT-3-Bande gibt Auskunft über die Qualität der Immunopräzipitation (IP). Die Jak-2-Bande zeigt, ob die physische Interaktion zwischen Jak-2 und STAT-3 durch Triptolid beeinflusst wird, da nach IP nur das Jak-2 im Lysat enthalten ist, welches zur Zeit der Isolation an STAT-3 gebunden war.

Es zeigt sich, dass die Menge des STAT-3-gebundenen Jak-2 unter Behandlung mit Triptolid Zeit-abhängig abnimmt (Abbildung 14). Der Großteil des STAT-3 ist in den IP-Spuren enthalten, sodass von einer hohen Reinheit der IP ausgegangen werden kann.

Die Expression von STAT-3 ändert sich durch Behandlung mit Triptolid nicht, was auch in vollständigem Lysat nachgewiesen werden kann. Das Experiment wurde drei mal durchgeführt.

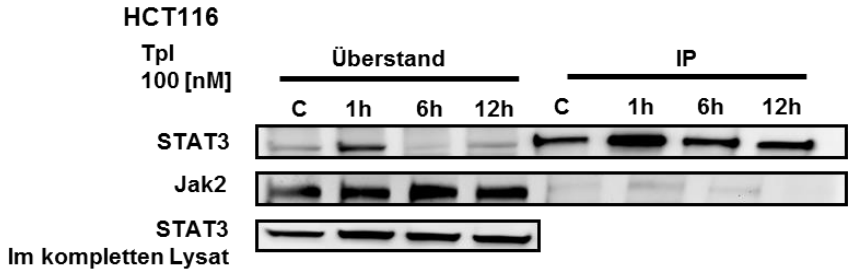


Abbildung 14. STAT-3/Jak-2 Koimmumopräzipitation. 10^6 Zellen werden in 10cm Platten ausgesäht und nach zwei Tage für 1h, 6h und 12h mit 100nM Triptolid behandelt. Die Immunopräzipitation (IP) wurde mit einem STAT-3-Antikörper durchgeführt der an Sepharose-Beads gekoppelt ist. Nach IP wurden die Überstände und die zugehörigen IPs in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot STAT-3 und Jak-2 dargestellt. Die zum Zeitpunkt der Zelllyse an STAT-3 gebundene Jak-2-Menge nimmt unter Behandlung mit Triptolid Zeit-abhängig ab. STAT-3 ist nach IP fast vollständig aus dem Überstanden entfernt. Die Expression von STAT-3 ändert sich unter Behandlung mit Triptolid nicht, was sich auch im mit dargestellten kompletten Lysat zeigt. n=3, ein repräsentativer Blot wird gezeigt.

Die Inhibition der Jak-2-Phosphorylierung führt also zu einer verminderten Bindung von STAT-3. Ob dies auch die STAT-3-Aktivität beeinflusst, wird in einem weiteren Experiment untersucht. Dafür wurde ein STAT-3-Reporter-Assay verwendet. Dabei wurden die Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT29 mit einem Plasmid transfeziert, welches für eine Firefly-Luziferase unter STAT-3-Promotorkontrolle kodiert. Die Firefly-Luziferaseaktivität ist somit direktes Korrelat der STAT-3-Aktivität. Sie kann unter Zugabe eines spezifischen Substrates luminometrisch gemessen werden. Als Transfektionskontrolle werden zwei weitere Konstrukte transfeziert. Eines kodiert für eine Renilla-Luziferase und das zweite für GFP, beide sind konstitutionell aktiv. Auch die Aktivität der Renilla-Luziferase kann spezifisch luminometrisch bestimmt werden. Die Firefly/Renilla-Relation gibt transfektionsbereinigt Auskunft über die STAT-3-Aktivität. GFP dient der Transfektionskontrolle im Verlauf bei lebenden Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion für 8 h und 24 h mit 100 nM Triptolid behandelt und anschließend die STAT-3-Aktivität bestimmt (Abbildung 15). Triptolid führt zu einer deutlichen Reduktion der STAT-3-Aktivität mit einem zeitabhängigen Trend. Die statistische Überprüfung der Unterschiede erfolgte mit dem Student´s t-Test, ein $p<0,05$ gilt als statistisch signifikant. Jeder Versuch wurde drei bis vier mal durchgeführt.

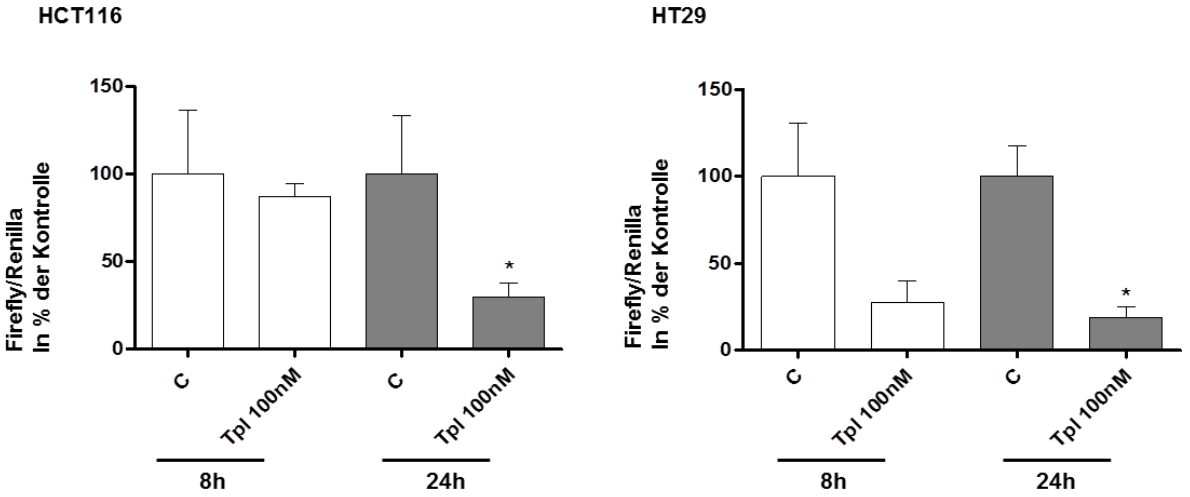


Abbildung 15. STAT-3-Luciferase-Reporter-Assay. 3x10^4 Zellen werden in 24-Well-Platten ausgesäht und zeitgleich die präformierten Plasmid-Fugene™-Komplexe zugegeben. Nach 48h wurde die Transfektion mittels GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Behandlung mit 100nM Triptolid über 8h und 24h begonnen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Aktivität von Firefly (STAT-3-Aktivität)- und Renilla (Transfektionseffiziens)-Luziferase durch Zugabe spezifischer Substrate luminometrisch bestimmt. Dargestellt ist das Verhälnis von Firefly- zu Renilla-Aktivität in % der Kontrolle ± SEM. Die Behandlung mit Triptolid führt zu einer Reduktion der transfektionsbereinigten STAT-3-Aktivität mit Zeit-abhängigem Trend in beiden Kolonkarzinomzelllinien. *p<0,05, Student´s t-Test, n=3-4.

3.4.3 Pharmakologische Inhibition des Jak-2-Signalwegs mit WP1066 in Kolonkarzinomzellen

Mit den vorangegangen Experimenten konnten wir zeigen, dass Triptolid und Minnelide™ eine effektive Inhibition des Zellüberlebens vermitteln und diese mit einer Inhibition des Jak-2-Signalwegs einhergeht. Im Ergebnis können wir eine Herunterregulation STAT-3-abhängiger Überlebensproteine beobachten.

Durch Verwendung einer alternativen Methode der Jak-2-Inhibition mit einem *small-molecule*-Inhibitor, untersuchen wir die Fragestellung, ob die beobachtete Inhibtion des Jak-2/STAT-3-Signalwegs tatsächlich für die verringerte Zellviabilität verantwortlich ist.

Für die pharmakologishce Hemmung von Jak-2 wurde der bereits beschriebene Inhibitor WP1066 verwendet. WP1066 ist ein chemisches Derivat des Tyrphostins AG490 (Abbildung 16d), das jedoch wesentlich potenter ist und deshalb in geringeren Konzentrationen eingesetzt werden kann (48). Zudem hemmt WP1066 Jak-2 spezifischer und führte in Studien zu AML und Polyzytämia vera zur Inhibtion der Proliferation und Apoptose (49,50).

Um einen Vergleich zur Behandlung von Kolonkarzinomzellen mit Tripolide ziehen zu können, wurden HCT116 und HT29 Zellen in analoger Weise mit WP1066-Konzentrationen zwischen 2,5 µM und 20 µM für bis zu 72 h behandelt und der Einfluss auf Zellviabilität und die Expression von c-Myc, Survivin, XIAP und Bcl-XL im Western

Blot ermittelt. Die Methodik entsprach der Vorgehensweise bei den Triptolid-Experimenten.

Es zeigt sich, dass WP1066 in der verwendeten Dosierung zu einer effektiven Inhibtion der Zellviabilität in beiden verwendeten Kolonkarzinomzelllinien führt. Das Zellüberleben lag nach 72h Behandlung mit 20µM WP1066 bei durchschnittlich 6.7% ± 4.5% in HCT116-Zellen und 9.9% ± 3.5% in HT29-Zellen (Abbildung 16a und b).

Bei der Expression von antiapoptotischen Proteinen (Survivin, XIAP, Bcl-XL) und c-Myc führt eine Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen WP1066 über 24h in analoger Weise zu Triptolid zur Inhibition der Expression im Western Blot (Abbildung 16c). Alle Experimente wurden drei bis vier mal durchgeführt.

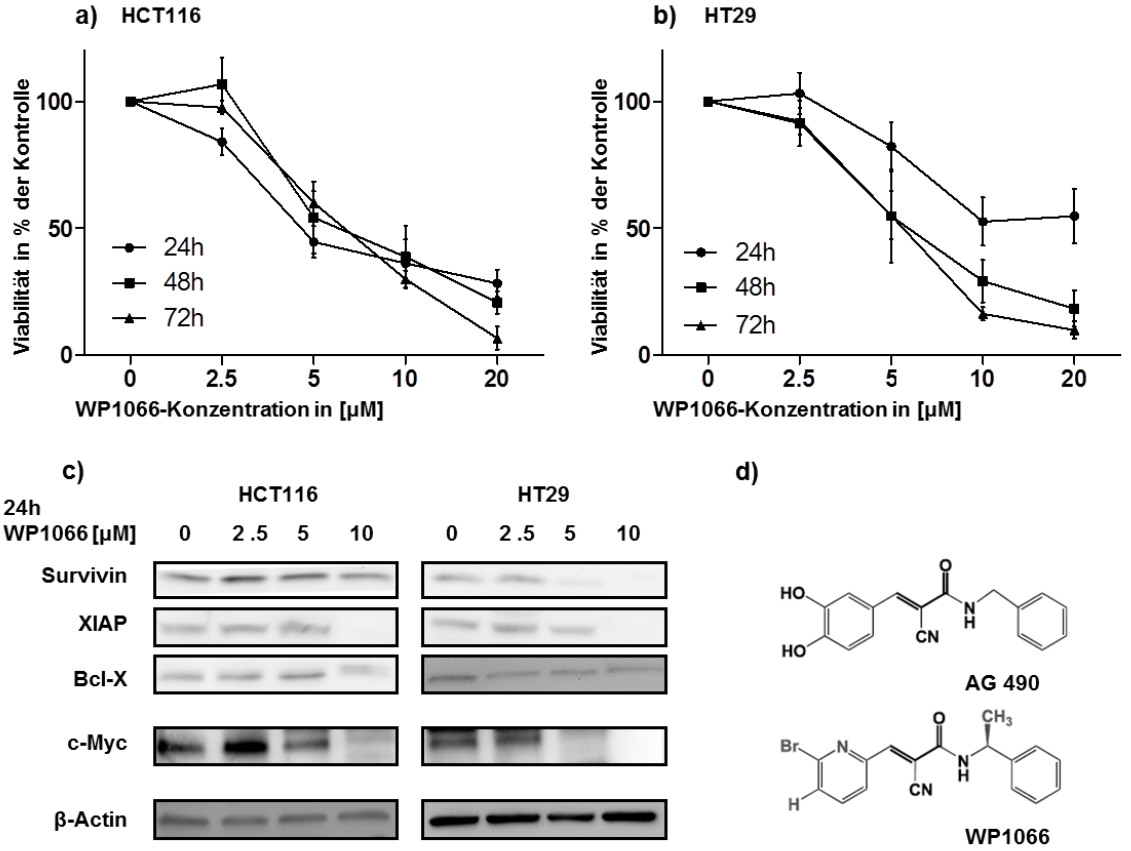


Abbildung 16. Pharmakologische Inhibition des Jak-2-Signalwegs. a) und b): $5x10^3$ Zellen wurden in 3 96-Well-Platten ausgesäht und nach zwei Tage mit aufsteigenden Dosen Wp1066 behandelt. 24h, 48h und 72h nach Behandlungsbeginn wurde die Zellviabilität mittels der Dehydrogenase-abhängigen Reduktion des Tetrazolium-Salzes WST-8 photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Das Zellüberleben ist als Prozentanteil der Kontrolle±SEM zum jeweiligen Zeitpunkt gegen die WP1066-Konzentration in µM aufgetragen. WP1066 führt zu einer Dosis- und Zeit-abhängigen Reduktion der Zellviabilität. HCT116 und HT29 Zellen zeigen ein vergleichbares Ansprechen. n=3. c) 10^6 Zellen wurden in 10cm Platten ausgesäht und nach zwei Tage mit aufsteigenden Dosen WP1066 für 24h behandelt. Die Expression von Survivin, XIAP, Bcl-X und c-Myc wurde im Western Blot bestimmt. Die Expression der verschiedenen antiapoptotischen Proteine und des Transkriptionsfaktors c-Myc wird Dosis-abhängig durch Wp1066 gehemmt. Der Effekt ist in beiden Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT29 vergleichbar stark ausgeprägt. n=3, ein repräsentativer Blot wird gezeigt. β-Aktin diente als Ladekontrolle. d) WP1066 [(E)-3(6-bromopyridin-2-yl)-2-cyano-N-((S0-1-phenylethyl)acrylamide)] ist ein Derivat des Tyrphostins AG490 [2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(benzyl)-2-propenamide;2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide].

3.5 Vergleich mit duktalen Pankreasadenokarzinomzelllinien

Die Arbeitsgruppe von Ashok Saluja in Minneapolis hat bereits gezeigt, dass Triptolid und Minnelide™ in der Lage sind das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen wirkungsvoll zu hemmen. Um zu unterscheiden, ob es sich bei der in Kolonkarzinomzelllinien gesehenen Inhibtion der Jak-2/STAT-3-Signalwegs um einen wirkstoff- oder gewebsspezifischen Effekt handelt, sind Schlüsselexperimente in duktalen Pankreasadenokarzinomzellen durchgeführt worden. Verwendet wurden S2-VP10 und MiaPaCa-2 Zellen, von denen bereits bekannt ist, dass sie auf Triptolid ansprechen (27,30,35).

3.5.1 Einfluss von Triptolid auf den Jak-2/STAT-3-Signalweg in duktalen Pankreasadenokarzinomzelllinien

Zunächst wurde analog zu den Kolonkarzinomzellen das dosisabhängige Expressionsmuster von Survivin, XIAP, Bcl-XL und c-Myc im 24 h-Triptolidversuch untersucht. Auch hier zeigt sich eine vergleichbare Inhibtion antiapoptotischer Proteine und des für die Proliferation wichtigen Transkriptionsfaktors c-Myc in beiden Pankreaskarzinomzelllinien im Western Blot (Abbildung 17a).

Weiter wurde analysiert, ob Triptolid die Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase Jak-2 beeinflusst. Erneut ist bei einer Konzentration von 100 nM eine Inhibtion der Phosphorylierung von Jak-2 bei unveränderter Expression von Jak-2 im zeitlichen Verlauf feststellbar (Abbildung 17b). Der Aktivierungszustand der Endstrecke des Jak-2/STAT-3-Signalwegs wurde mit Hilfe des beschriebenen Luciferase-Reporter-Assays untersucht. Bei gleichem Transfektions- und Behandlungsschema sieht man auch beim Pankreaskarzinom eine signifikante, zeitabhängige Inhibition der transfektionsbereinigten STAT-3-Aktivität durch Triptolid (Abbildung 17c). Die statistische Überprüfung der Unterschiede erfolgte mit dem Student´s t-Test, ein $p<0,05$ gilt als statistisch signifikant. Jeder Versuch wurde drei bis vier mal durchgeführt.

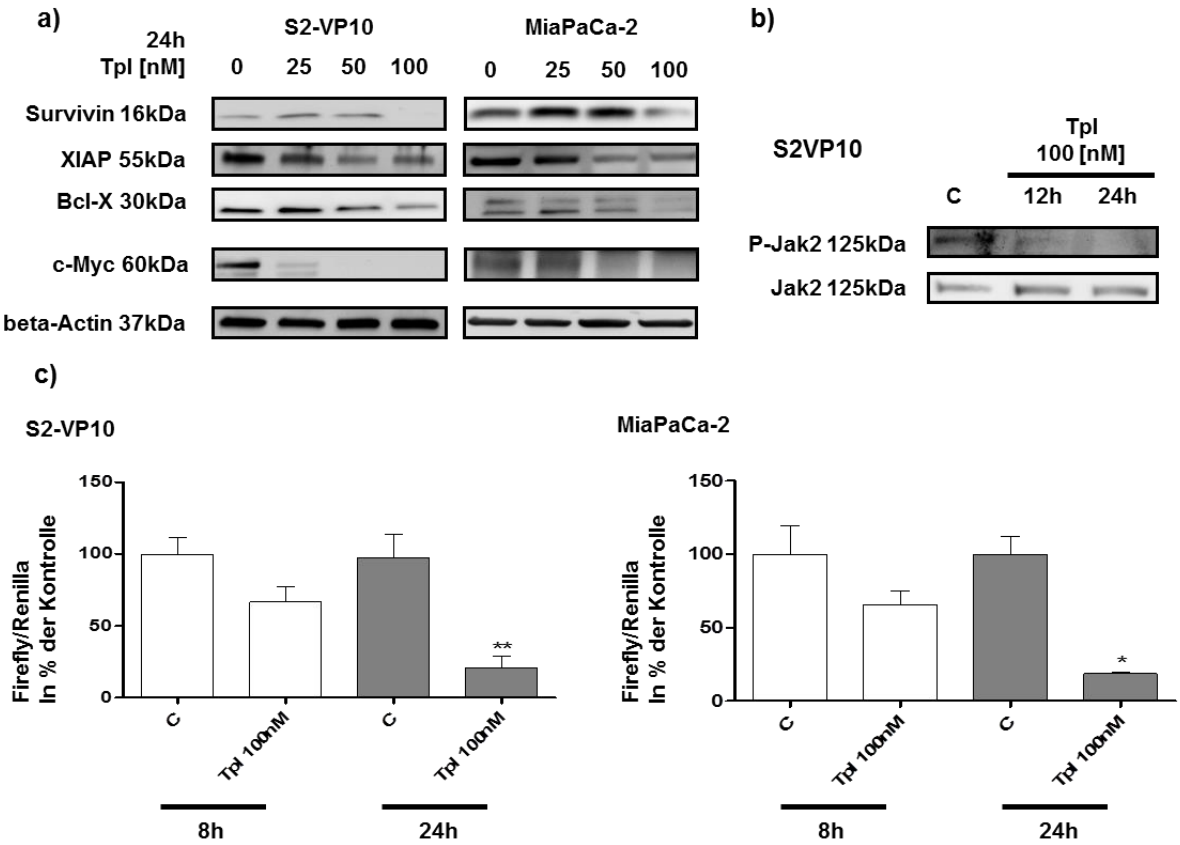
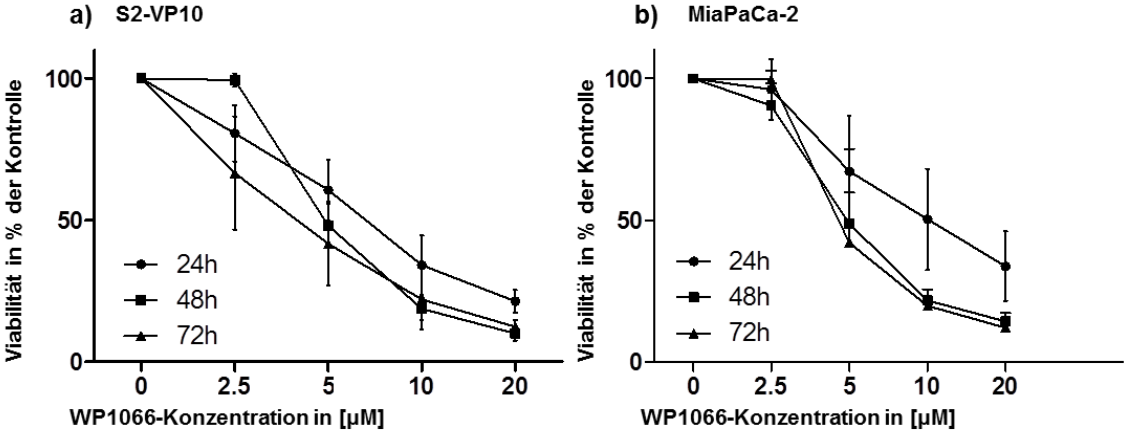


Abbildung 17. Einfluss von Triptolid auf den Jak-2/STAT-3-Signalweg in duktalen Pankreasadenokarzinomzelllinien. a) 10^6 S2-VP10 und MiaPaCa-2 Zellen wurden in 10cm Platten ausgesäht und nach zwei Tage mit aufsteigenden Dosen Triptolid für 24h behandelt. Die Expression von Survivin, XIAP, Bcl-X und c-Myc wurde im Western Blot bestimmt. Die Expression wird Dosis-abhängig durch Triptolid gehemmt. Der Effekt ist in beiden Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT 29 vergleichbar stark ausgeprägt. n=3, repräsentative Blots werden gezeigt. β-Aktin diente als Ladekontrolle. b) 10^6 S2-VP10 Zellen werden in 10cm Platten ausgesäht und nach zwei Tage für 12h oder 24h mit 100nM Triptolid behandelt. Die Phosphorylierung von Jak-2 (P-Jak-2) und die Gesamtexpression (Jak-2) wurden konsekutive im Western Blot auf der gleichen Membran bestimmt. Zwischen beiden Messungen wurde ein Stripping durchgeführt. Die Phosphorylierung von Jak-2 wird Zeit-abhängig durch Triptolid gehemmt. Die Expression von Jak-2 ändert sich nicht. Der Effekt ist in beiden verwendeten Kolonkarzinomzelllinien gleichermaßen nachweisbar. n=3, ein repräsentativer Blot wird gezeigt. c) $3x10^4$ S2-VP10 und MiaPaCa-2 Zellen werden in 24-Well-Platten ausgesäht und zeitgleich die präformierten Plasmid-Attractene™-Komplexe zugegeben. Nach 48h wurde die Transfektion mittels GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Behandlung mit 100nM Triptolid über 8h und 24h begonnen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Aktivität von Firefly (STAT-3-Aktivität)- und Renilla (Transfektionseffiziens)-Luziferase durch Zugabe spezifischer Substrate luminometrisch bestimmt. Dargestellt ist das Verhälnis von Firefly- zu Renilla-Aktivität in % der Kontrolle ± SEM. Die Behandlung mit Triptolid führt zu einer Reduktion der transfektionsbereinigten STAT-3-Aktivität mit Zeit-abhängigem Trend in beiden Kolonkarzinomzelllinien. *p<0,05, ** p<0,01, Student´s t-Test, n=3-4.

3.5.2 Pharmakologische Inhibition des Jak-2-Signalwegs mit WP1066 in duktalen Pankreasadenokarzinomzellen

Die biologische Relevanz von Jak-2 als Ziel einer pharmakologischen Intervention beim duktalen Adenokarzinom des Pankreas wurde zuletzt unter Verwendung des bereits vorgestellten Inhibtors WP1066 überprüft. Parallel zu den Versuchen mit Kolonkarzinomzellen HCT116 und HT29 wurden S2-VP10 und MiaPaCa-2 Zellen mit WP1066 inkubiert. Es zeigt sich eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Zellviabiltät, photometrisch bestimmt durch die Dehydrogenase-abhängige Reduktion des Tetrazolium-Salzes WST-8 in beiden Zelllinien (Abbildung 18a und b). Die

maximale Reduktion bei 20 µM nach 72 h ist mit 12.4 % ± 2.4 % bei S2-VP10 und 12.2 % ± 1.1 % vergleichbar. Die Expression von Survivin, XIAP, Bcl-XL und c-Myc nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen WP1066 über 24 h in S2-VP10 Zellen wurde im Western Blot untersucht. In analoger Weise zu Triptolid zeigt sich eine Inhibition der Expression in Abhängigkeit zur gewählten Konzentration (Abbildung 18c). Alle Experimente wurden drei mal durchgeführt.



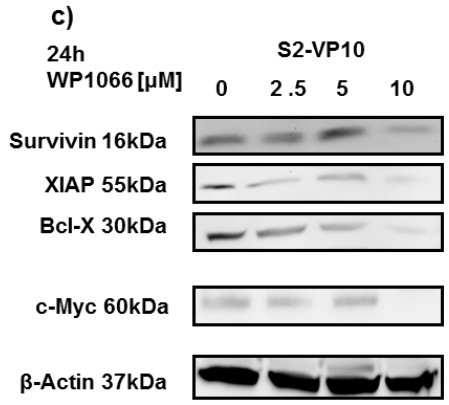


Abbildung 18. Pharmakologischen Inhibition des Jak-2-Signalwegs mit WP1066 in duktalen Pankreasadenokarzinomzellen. a) und b): $5x10^3$ Zellen wurden in 3 96-Well-Platten ausgesäht und nach zwei Tage mit aufsteigenden Dosen Wp1066 behandelt. 24h, 48h und 72h nach Behandlungsbeginn wurde die Zellviabilität mittels der Dehydrogenase-abhängigen Reduktion des Tetrazolium-Salzes WST-8 photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Das Zellüberleben ist als Prozentanteil der Kontrolle±SEM zum jeweiligen Zeitpunkt gegen die WP1066-Konzentration in µM aufgetragen. WP1066 führt zu einer Dosis- und Zeit-abhängigen Reduktion der Zellviabilität. S2-VP10 und MiaPaCa-2 Zellen zeigen ein vergleichbares Ansprechen. n=3. c) 10^6 S2-VP10 Zellen wurden in 10cm Platten ausgesäht und nach zwei Tage mit aufsteigenden Dosen WP1066 für 24h behandelt. Die Expression von Survivin, XIAP, Bcl-X und c-Myc wurde im Western Blot bestimmt. Die Expression der verschiedenen antiapoptotischen Proteine und des Transkriptionsfaktors c-Myc wird Dosis-abhängig durch Wp1066 gehemmt..n=3, repräsentative Blots werden gezeigt. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

4. Diskussion

Das kolorektale Karzinom ist nach Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland die zweit- bzw. dritthäufigste maligne Erkrankung in Deutschland und gleichzeitig die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache bezogen auf alle Geschlechter (3–5). Diese Zahlen veranschaulichen, dass trotz enormer Fortschritte in der Früherkennung von tumorösen Läsionen (41,42) und bei chirurgischen wie lokal-ablativen Verfahren (51,52) die hohe Mortalität bei fortgeschrittenem Tumorstadium nach wie vor ein klinisches Problem darstellt und bessere Therapieoptionen erfordert. Das durchschnittliche 5-Jahresüberleben bei Fernmetastasierung betrug in den USA im letzten Jahrzehnt nur 12% (43) - jeder fünfte Patient wurde in diesem Stadium erstdiagnostiziert.

Triptolid ist ein pflanzlicher Wirkstoff, der zunächst auf Grund seiner Eigenschaften als wirksamer Inhibitor des induzierbaren HSP-70 untersucht wurde und sich als äußerst zytostatisch erwiesen hat. In einer Reihe von Publikationen beschreiben Saluja et al. die erfolgreiche präklinische Testung von Triptolid in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen für das Pankreaskarzinom (27,30,35).

Um die für die Anwendung im Menschen unerlässliche Wasserlöslichkeit zu erreichen, wurde Triptolid in seiner Struktur verändert und das Prodrug Minnelide™ entwickelt (35).

Der Wirkmechanismus von Triptolid ist bisher nur in Grundzügen verstanden und die bisher veröffentlichten Studien zu Triptolid in Modellen für das kolorektale Karzinom lassen keine Rückschlüsse auf die Wirksamkeit bei Lebermetastasen zu. Dies ist zudem die erste Untersuchung zur Wirksamkeit von Minnelide™ im kolorektalen Karzinom.

4.1 Wirksamkeit von Minnelide™ im Kolonkarzinom in vivo

Wir konnten zeigen, dass der neue Wirkstoff Minnelide™ erhebliches therapeutisches Potential für die Behandlung des Kolonkarzinoms im Mausmodell hat.

Im *proof of principle* Experiment in einem subkutanen Xenotransplantatmodell mit aggressiven HCT116-Zellen konnte das Tumorwachstum deutlich verlangsamt werden (Abbildung 1). So konnten wir zeigen, dass Minnelide™ im Vergleich zur Muttersubstanz Triptolid zumindest gleichwertig ist. Tang et al. haben bereits 2007 über die erfolgreiche Inhibition subkutaner Tumoren mit Triptolid in Nacktmäusen

berichtet (32). Die Vorteile von Minnelide™ gegenüber Triptolid hinsichtlich seiner pharmakologischen Eingenschaften wurden bereits an anderer Stelle diskutiert.

In einem weiteren Experiment wurde die Effektivität von Minnelide™ in der Behandlung des klinisch relevanten Stadiums der Lebermetastasierung untersucht (Abbildung 2). Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da mehr als die Hälfte aller Patienten mit Kolonkarzinomen im Laufe ihrer Erkrankung solche Absiedelungen entwickeln (53). Die chirurgische Resektion von Lebermetastasen führt zwar oft zu einem deutlich längeren krankheitsfreien Überleben, jedoch kann nur ein Bruchteil der Patienten einer solchen Behandlung zugeführt werden und diese weisen selbst nach erfolgreicher Metastasenchirurgie ein hohes Rezidivrisiko auf. Wegen unseres Fokus auf die Behandlung vorhandener Metastasen und die Schwierigkeit der Etablierung metastasierender orthotoper Modelle im Kolonkarzinom wurde hierfür das Milzinjektionsmodell gewählt. Minnelide™ senkt dabei nachweislich die Metastasenanzahl in Tieren, bei denen vor Randomisierung sicher Metastasierung aus den Milztumoren nachgewiesen wurden. Dies legt den Schluss nahe, dass Minnelide™ die Bildung weiterer Lebermetastasen signifikant reduziert. Der Effekt von Triptolid oder Minnelide™ auf die Metastasierung im Kolonkarzinom wurde bisher nicht untersucht. Aus Untersuchungen zum Pankreaskarzinom ist bekannt, dass auch dort die Leber- und Lungenmetastasierung in orthotopen Modellen durch Minnelide™ deutlich reduziert war (35). Die Behandlung mit Minnelide™ wirkte sich nicht nur günstig auf die Metastasenzahl aus, sondern auch auf das Gesamtüberleben von Tieren mit Lebermetastasen nach Milzinjektion (Abbildung 3). Daraus läßt sich schließen, dass Minnelide™ auch das Fortschreiten der Metastasierung bzw. das Weiterwachsen bereits vorhandener Metastasen, welches sonst unweigerlich zum Tod der Tiere führt, verhindert. Diese vorläufigen Ergebnisse der Testung von Minnelide™ in klinisch relevanten Tiermodellen sind vielversprechend und öffnen die Tür für eine weitere Evaluation von Minnelide™ als Medikament bei metastasiertem Kolonkarzinom.

Alle Tierexperimente wurden in Nacktmäusen durchgeführt und damit in einem Modell, in dem die zelluläre Immunantwort aufgrund des fehlenden Thymus erheblich gestört ist. Auf diese Weise können menschliche Tumorzellen in Mäuse implantiert werden, jedoch ist die mauseigene, den Tumor vermutlich bekämpfende, Immunreaktion und

die Entwicklung eines echten Tumormikromilleus mit desmoplastischer Stromareaktion nicht gegeben. Die vielversprechenden Ergebnisse mit Minnelide™ können unter diesen Gegebenheiten nur begrenzt zur Prädiktion der Effekte beim Menschen genutzt werden und weitere Studien sind notwendig. Aus der Literatur ergeben sich Hinweise darauf, dass Triptolid auch in immunkompetenten Tieren die Bildung von Tumoren verhindern kann. Im Colitis-assoziierten DMH/DSS-Kolonkarzinommodell konnten Wang et al. zeigen, dass unter Behandlung mit Triptolid die Inzidenz und Anzahl von Tumoren wie auch Präkanzerosen zurückgeht (40).
Eine weitere Schwäche dieser Arbeit ist, dass der Therapieerfolg mit Minnelide™ nicht mit den heute empfohlenen Standardchemotherapien, stadienabhängig 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan (54), für das Kolonkarzinom verglichen worden ist. Zwar ist die wiederhohlte intravenöse Gabe oxaliplatinhaltiger Chemotherapeutika in Mäusen technisch anspruchsvoll, doch das Schlündeln von 5-FU-Vorstufen wie Capecitabin wäre denkbar gewesen. In zwei Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Triptolid und 5-FU *in vitro* und *in vivo* additiv bis synergistisch wirken (32,55). Auch diese Studien sind in immunkompromitierten Tieren durchgeführt worden.

4.2 Hemmung des Zellüberlebens von humanen Kolonkarzinomzelllinien in vitro

Wir bestätigen in dieser Studie, dass Triptolid bereits in sehr geringen Konzentrationen dosis- wie auch zeitabhängig zur Inhibtion der Zellviabilität in HCT116 und HT29 Zellen führt (Abbildung 4). Dies war bereits aus Arbeiten anderer Gruppen wie auch der eigenen bekannt und stellt allein genommen keine neue Erkenntnis dar (27,55). Nicht bekannt war jedoch, dass der Mechanismus dieser Inhibtion einer biphasischen Dynamik folgt, die in beiden Zelllinien in ähnlicher Weise ausgeprägt ist. Wir sehen, dass geringe Dosen Triptolid (25-50nM) eher zur Apoptose der Zellen führen, während 100nM vor allem einen G_1-Arrest zur Folge haben (Abbildung 5). Umgekehrt ist es so, dass sich bei geringeren Konzentrationen sogar signifikant weniger Zellen in der G_1-Phase befinden. Dieser Zusammenhang ist in der Literatur bisher nicht beschrieben, sondern Apoptose oder Zellzyklusarrest bei Kolonkarzinomzellen bisher nur alleinstehend beobachtet worden (32,40,55–57). In zwei Publikationen von der Arbeitsgruppe Zhang et al. konnte ein Triptolid-induzierter G_1-Phasen-Arrest auch in multiplen Myelomzellen gezeigt werden (33,34). Dass Triptolid in Abhängigkeit von der Zelllinie auch innerhalb einer Tumorentität in der Lage ist unterschiedliche Zelltodmechanismen zu aktivieren und diese Signalwege durch Änderung der

Bedingungen ineinander überführbar sind, wurde bereits beobachtet. Mujumdar et al. haben gezeigt, dass Triptolid im Pankreaskarzinom bei S2-Zelllinien, im Gegensatz zu MiaPaca-2, Autophagie als prädominanten Mechansimus auslöst. Erst wenn dieser Weg blockiert ist, kommt es zur Aktivierung von Caspasen (30). Einen wesentlichen Anstieg des LC3-II nach Behandlung mit Triptolid konnte in Kolonkarzinomzellen nicht beobachtet werden (Abbildung 6), woraus geschlussfolgert werden kann, dass Autophagie als Zelltodmechanismus eine untergeordnete Rolle spielt. Wir schließen daraus, dass der Wirkmechanismus von Triptolid sowohl die Regulation der Apoptose als auch des Zellzyklus beeinflusst. Dieser Effekt ist p53-unabhängig, da nur HT29-Zellen p53 mutiert sind (58,59), der Effekt jedoch in beiden verwendeten Zelllinien in ähnlicher Weise zu beobachten ist. Dass der Effekt von Triptolid auf das Überleben von Tumorzellen p53-unabhängig ist, konnte zuvor bereits in einem Modell für das Prostatakarzinom gezeigt werden (60).
Die Möglichkeit eines Zellzyklusarrest als Ursache für die Wachstumsinhibition bei mit Minnelide™ behandelten Tumoren, ist indirekt auch aus den Messungen von Apoptosemarkern in den exzidierten Tumoren des Xenograftmodells abzuleiten. Weder PARP noch gespaltene Caspase 3 sind wesentlich verändert, obwohl die Tumoren signifikant kleiner waren (Abbildung 1 und Abbildung 10).

4.3 Mechanismen der Triptolid-abhängige Regulation des Zellüberlebens

Unsere Experimente zeigen, dass Triptolid das Überleben von HCT116 und HT29 Kolonkarzinomzelllinien hemmt. Dieser Effekt wird durch einen biphasischen Mechanismen hervorgerufen. Bei niedrigen Konzentrationen gehen die Zellen in Apoptose, zu sehen am deutlichen Anstieg der Aktivität der Caspase-3/7. Mit höheren Dosen behandelte Zellen hingegen zeigen kaum Heraufregulation von Apoptosemarkern, jedoch befinden sich bis 75% aller Zellen im Zellzyklusarrest. Beide Vorgänge, Apoptose und Zellzyklus, sind genau regulierte Mechanismen.

Die Proteine der IAP-Familie sind, durch ihre Fähigkeit Caspasen zu binden, potente Inhibitoren der Apoptose (10). Sie sind wichtige Onkogene, da bei Dysregultaion bzw. abnormer Überexpression externe Todessignale nicht mehr wahrgenommen werden und den Zellen so ein Überlebensvorteil entsteht. Besonders gut charakterisierte Vertreter dieser Gruppe sind XIAP und Survivin. Sie sind bereits in prämalignen Läsionen der Kolonmukosa zu finden, was ihre Rolle in der Kanzerogenese des

Kolonkarzinoms unterstreicht (61–63). Wir zeigen, dass Triptolid die Expression dieser zwei Vertreter aus der IAP-Familie dosisabhängig inhibiert. Ein Effekt von Triptolid auf die Expression von Survivin und XIAP konnte *in vitro* bereits für die monozytäre Leukämie, die akute und chronische myeloischer Leukämie, das Ovarialkarzinom, das cholangiozellulärem Karzinom und das Osteosarkom nachgewiesen werden, wobei ebenfalls Konzentrationen bis 50 nM zum Einsatz kamen (64–70). Ein ähnlicher Effekt wurde bei Magenkarzinomzelllinien gesehen, wobei hier allerdings ein p53-abhängiger Prozess vermutet wurde (71).

Die zweite wichtige Familie, die vorrangig die intrinsisch oder stressinduzierte Apoptose reguliert, ist nach dem Apoptoseinhibitor Bcl-2 benannt und umfasst über 20 Vertreter, welche pro- oder antiapoptotische Funktionen ausüben und den programmierten Zelltod streng kontrollieren (72). Störungen in diesem Regelkreis können katastrophale Folgen für das Zellüberleben und die Homöostase von Geweben haben. Auch in gesunden Zellen hemmen Bcl-2, Bcl-XL, MCl-1 und andere die Apoptosemaschinerie, sie können jedoch durch ihre molekularen Gegenspieler, die *BH3-only* und multi-Domain-Proteine, gebunden und dadurch in ihrer Funktion gehemmt werden. Ein wichtiger Regulator dieses Vorgangs ist der Tumorsupressor p53, welcher jedoch in vielen Tumoren funktionslos ist. Ein wichtiger Inhibitor der Apoptose ist das Produkt der langen Splice-Variante von Bcl-X, das Protein Bcl-XL (30kDa). Es ist in einer Vielzahl solider Tumoren, Lymphome und Leukämien überexprimiert und ist mit erhöhter Chemotherapieresistenz assoziiert, unabhängig von deren p53-Status (73). In beiden von uns verwendeten Kolonkarzinomzellinien ist Bcl-XL überexprimiert (73). Triptolid inhibiert die Expression von Bcl-XL auf Proteinebene dosisabhängig. Wir demonstrieren somit einen Triptolid-induzierten Effekt, der zuvor nur beim myeloproliferativen Syndrom und in einem Nierenzellkarzinommodell beschrieben worden war (74,75).

Damit wurden zwei Signalwege gefunden über welche der Anstieg der Caspaseaktivität in Folge der Behandlung mit Triptolid zu erklären ist.

Der Übergang der Zelle aus der G_1-in die S-Phase des Zellzyklus ist ein gut regulierter Prozess, da hier die Weichenstellung zwischen Ausdifferenzierung oder Duplikation des Chromosomensatzes in Vorbereitung einer weiteren Zellteilung getroffen wird. Kernkriterien tumoröser Entartung sind die gesteigerte Proliferation klonaler Zellen unter Aufrechterhaltung oder Förderung der Ausschüttung mitogener Botenstoffe,

veränderte Rezeptordichte für Wachstumshormone, Änderung intrazellulärer Signalwege durch somatische Muatationen, Umgehung negativer Feedback-Mechanismen und Ausschalten von Tumorsupressoren (17).

Zwei entscheidende Proteine in der Zellzykluskontrolle mit Funktion eines Tumorsupressors sind RB und p53. Während das RB Protein eine Reihe intra- und extrazellulärer Signale integriert und letztendlich den Übergang in die S-Phase erlaubt, ist p53 Teil eines Kontrollprogramms am Eingang zur Teilungsphase, welches die Verfügbarkeit von notwendigen Nucleotiden und Glukose sowie das Fehlen von Stresssignalen und DNA-Schäden überprüft. Triptolid führt in Konzentrationen größer als 50 nM zu einem G_1-Arrest, weswegen in dieser Studie Regulatoren des S-Phaseübetritts untersucht worden sind.

C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl proliferativer und antiapoptotischer Gene reguliert. Er wird demnach auch als ein „Hauptschalter“ der Zellteilung bezeichnet. Es ist daher nicht verwunderlich, dass er in vielen Tumorgeweben überexprimiert ist. Aufgrund dieser Eigenschaften ist er auch als mögliche Zielstruktur von Therapien interessant, jedoch fehlt es bisher an spezifischen Inhibitoren. Im Kolonkarzinom nimmt er eine Schlüsselrolle ein, da die nukleäre Akkumulation von β-Catenin zu einer Überexpression von c-Myc führt (13,44). Dass Triptolid die Expression von c-Myc hemmt, wurde zuvor in Osteosarkomzellen gezeigt (65), was bei diesem mesenchymalen Tumor jedoch vor allem einen apoptotischen Zelltod induzierte. Wir zeigen jetzt, dass die Inhibition von c-Myc in Kolonkarzinomzellen auch mit Zellzyklusarrest assoziiert sein kann (Abbildung 8). Es verwundert jedoch nicht, dass c-Myc sowohl in die Regulation des Zellzyklus wie auch der Apoptose eingreift. So hat zum Beispiel auch der Promotor des Survivingens eine Bindungsstelle für c-Myc (76).

Die spezifische Regulation des Übertritts aus der G_1- in die S-Phase erfolgt durch die sequenzielle Hochregulation der Cycline und die Aktivierung der von ihnen abhängigen Cyclin Kinasen (Cdks). Die Initiation erfolgt durch die Bildung des Cyclin D1/cdk-4-Komplexes, gefolgt von der Bindung von cdk2 durch Cyclin E. In Kolonkarzinomzellinien HCT116 und HT29 führt die Behandlung mit Triptolid in einer Konzentration von 100 nM nach 12 h zu keiner signifikanten Reduktion von Cyclin D1 oder cdk-4. Triptolid reguliert mit c-Myc einen generellen, jedoch einen unspezifischen Regulatoren des S-Phasenübertritts herunter und könnte über diesen Mechanismus zur Arretierung der Zellen in der G_1-Phase führen.

Die Inhibtion der Expression der Proteine Survivin und c-Myc konnte in den mit Minnelide™ behandelten Xenografttumoren ebenfalls nachvollzogen werden (Abbildung 9). Damit konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die *in vitro* gefundenen Effekte auch im Tiermodell zu finden sind und Triptolid und das Prodrug Minnelide™ auch im therapeutsichen Ansatz ihre Wirkung über die gleichen Mechanismen vermitteln.

Somit stellte sich als nächstes die Frage nach einer gemeinsamen Zielstruktur, die diesen breit gefächerten Effekt hervorrufen kann. STAT-3 ist ein Transkriptionsfaktor für den alle untersuchten Gene eine Bindungsstelle im Promotor haben und folglich unter dessen transkriptioneller Kontrolle stehen (45,46,77–80).
STAT-3 ist in über 70 % der kolorektalen Karzinome auf Grund einer konstititutionellen Tyrosinphosphorylierung daueraktiviert, wobei der Phosphorylierungsstatus mit der Tumorinvasion, der Metastasierung und dem klinischen Tumorstadium korreliert (77,80–82). Die Aktivierung von STAT-3 in Zellen der intestinalen Mukosa macht diese resistent gegen Apoptose-induzierende Signale (83). Von Lin et al. wurde gezeigt, dass die Überaktivierung auch in HT29 Zellen zu finden ist (80). Die Ursache für diese Daueraktivierung ist nicht abschließend geklärt, jedoch entstehen ca. 20 % der Darmtumoren auf dem Boden einer chronischen Entzündung. Die Phosphorylierung von STAT-3 erfolgt maßgeblich durch Jak-2, eine Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase, welche nach Bindung des Liganden paarweise an einen mebranständigen Rezeptor rekrutiert wird und diesen, wie auch das jeweils andere Jak-2-Molekül, phosphoryliert. Dies führt zu einer Konformationsänderung, wodurch es zur Bindung von STAT-3 und dessen konsekutiver Aktivierung kommt. Ein Hauptaktivator dieser Signaltransduktionskette ist das proinflammatorische Interleukin-6 (IL-6) (47). IL-6 ist in verschiedenen Formen der chronischen Kolitis überexprimiert, welche wiederum einen Risikofaktor für die Entwicklung kolorektaler Karzinome darstellt (10,18,84). Dieser Mechanismus wird in Colitis-assoziierten, chemisch induzierten Mausmodellen für Kolonkarzinome nachempfunden. IL-6-defiziente Mäuse entwickeln deutlich weniger Tumoren in diesen Modellen, was auf eine verminderte STAT-3-Aktivität zurückgeführt wird (84,85). Neuere Erkenntnisse zeigen weiterhin eine Rolle für Toll-like-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Entstehung Colitis-assoziierter Tumoren auf. Zudem wird vermutet, dass Tumorzellen in der Lage sind

selbstständig IL-6 zu produzieren und auf autokrinem Weg eine Signalschleife zu unterhalten, die unabhängig von der Immunantwort ist (86). Auch die IL-6 unabhängige verstärkte Expression von STAT-3 konnte beobachtet werden und ist mit einem schlechteren Outcome assoziiiert (77). Darüber hinaus finden sich dauerhaft aktivierte STATs in einer Reihe weiterer Erkrankungen des Menschen, z.B. Tumoren von Brust, Prostata, Lunge oder Pankreas sowie bei verschiedenen Lymphomen und Leukämiearten (87,88).

Wir zeigen, dass Triptolid zu einer Inhibition der Phosphorylierung von Jak-2 führt und dadurch vermindert mit STAT-3 interagiert, was letztendlich in einer geringeren Expression STAT-3 kontrollierter Onkoproteine resultiert (Abbildung 19). Dies wiederum verursacht eine vermindertes Zellüberleben durch Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest. Dieser Mechanismus konnte über eine pharmakologische Inhibition des Jak-2/STAT-3-Signalwegs mit WP1066 bestätigt werden. Auch hier zeigt sich ein dosisabhängiger Viabilitätsverlust in beiden Kolonkarzinomzelllinien sowie eine Inhibition der Expression von Überlebensproteinen. Die Veröffentlichungen der präklinischen Testung von Minnelide™ stammen aus Experimenten mit Pankreaskarzinommodellen (27,35). Daher war es für uns wichtig, den im Kolon gezeigten Mechanismus der Jak-2/STAT-3-Inhibition auch für diesen Tumor zu demonstrieren. Analog zum Kolonkarzinom findet sich auch hier die

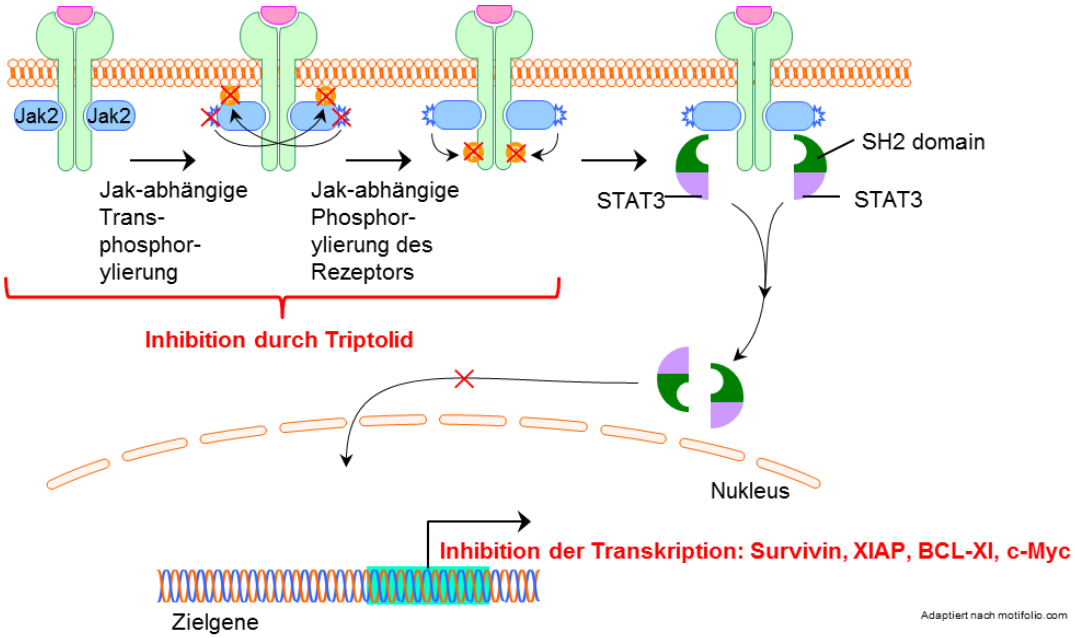


Abbildung 19. Schematische Darstellung des Einflusses von Triptolid auf den Jak-2/STAT3-Signalwegs.

dosisabhängige Herunterregulation von STAT-3-abhängigen Onkoproteinen bei gleichzeitiger Dephosphorylierung von Jak-2 und Aktivitätsverlust von STAT-3. Der

Effekt kann durch pharmakologische Inhibition des Jak-2/STAT-3-Signalwegs mittels WP1066 nachgeahmt werden. Damit scheinen die Auswirkungen einer Behandlung mit Triptolid auf den Jak-2/STAT-3-Signalweg und die darüber kontrollierten Überlebensmechanismen keine Besonderheit von Kolonkarzinomen, sondern überdies auf andere Karzinome übertragbar zu sein.

Dass eine Inhibition der STAT-3 das Überleben von Tumorzellen hemmt, ist seit längerem bekannt. WP1066, der auch in dieser Studie verwendete Inhibitor des Jak-2/STAT-3-Signalwegs, induziert Apoptose in Nierenkarzinomzelllinien und proliferierenden myeloischen bzw. leukämischen Zellen (49,50,79). Das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen wurde durch den STAT-Inhibitor Cucurbitacin B *in* vitro und *in* vivo gehemmt, wobei Einflüsse auf Apoptose und Zellzyklus feststellbar waren. Der Zellzyklusarrest erfolgte jedoch in der G_2-Phase (89). Für HT29-Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von STAT-3 mittels AG490, einem Jak3-Inhibitor, zu einer Induktion der Apoptose führt, unter anderem durch Expressionsverlust von Bcl-XL. Der Einfluss auf den Zellzyklus wurde jedoch nicht untersucht (80). Subkutane Xenografttumoren aus HT29-Zellen wachsen deutlich langsamer wenn die Zellen zuvor stabil mit einer STAT-3-Variante transfiziert wurden, in welcher der phosphorylierbare Tyrosinrest fehlt (90).

Über die Zielstruktur von Triptolid ist bereits viel spekuliert worden, ein spezifischer Interaktionspartner oder ein Bindungsmotiv konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden. Die Gruppe von Saluja et al. untersuchte zunächst den Einfluss von Triptolid auf die Expression der induzierbaren Form von HSP70, welches in verschiedenen Karzinomen überexprimiert ist und dessen Inhibierung zum Zelltod führt (24–27). Jener Effekt wird vermutlich durch Inhibierung des Transkriptionsfaktors HSF-1 (Heat-shock-factor 1) verursacht (23,28). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde auch über Triptolid-induzierte Reexpression von miR-142-3p und miR-204 sowie die Veränderung der Glykosilierung des Transkriptionsfaktors SP1 berichtet, die alle unabhängig von einander untersucht wurden und jeweils das Überleben von Pankreaskarzinomzellen hemmen (91–93). Über den Einfluss von Triptolid auf den Jak-2/STAT-3 ist nur wenig bekannt.

Wang et al. haben in Caco 2 und SW480 Zellen gezeigt, dass Triptolid die Phosphorylierung von Jak1 und in Folge dessen auch die Aktivität von STAT-3 hemmt und abhängige Gene herunterreguliert werden (40). Dieser Effekt kann durch Stimulation mit IL-6 teilweise aufgehoben werden und IL-6-Rezeptor-Antagonisten

haben einen zu Triptolid additiven Effekt (40). Dies belegt, dass die Inhibtion von STAT-3 durch Triptolid ein plausibler Mechansimus ist, jedoch ist, wie die Rescue- und Additionsexperimente zeigen, Jak-1 wohl nicht das einzige Target, sondern auch Jak-2 könnte beteiligt sein. Dies wird durch eine weitere Arbeit bestätigt, in der Triptolid Apoptose und G_1-Zellzyklusarrest in einer Erythroleukämiezelllinie über die Inhibition des Jak-2/STAT-3 dosisabhängig auslöst, welche die für myeloproliverative Syndrome typische Jak-2-Mutation Jak-2V617F tragen (74). Auch in einer AML-Zelllinie kann Triptolid, neben weiteren Effekten, die Phosphorylierung von Jak-2 hemmen (94). In nicht neoplastischen Erkrankungen lässt sich ebenfalls eine Inhibtion dieser Signalkaskade finden, die sich mit den anti-inflammatorischen Wirkungen von Triptolid in Zusammenhang bringen lassen (95,96).

Damit bleibt die Frage nach einem einzigen, alle bisherigen Erkenntnisse vereinenden Wirkmechanismus von Triptolid, respektive Minnelide™ weiterhin unbeantwortet. Die Vielfalt der im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Veränderungen, die durch diesen Wirkstoff hervorgerufen werden, läßt zwei mögliche Modelle für dessen Wirkweise zu:

Zum einen könnte es sein, dass die Zielstruktur von Triptolid in der Hierarchie der Kontrolle von Zellfunktionen sehr weit oben angeordnet ist und auf diese Weise seine breite Wirkung entfaltet. Zur Identifikation einer solchen Zielstruktur kämen zunächst transkriptom- oder proteomweite Analysen mit behandelten und nicht behandelten Zellen und Geweben aus unterschiedlichen Krankheitsmodellen in Frage. Diese sind jedoch technisch aufwendig, kostenintensiv und die Interpretation der Ergebnisse bei einer großen Anzahl der geprüften Systeme sehr komplex. So ist bisher auch nur eine Arbeit publiziert, in welcher eine Proteomanalyse durchgeführt wurde, welche zu dem Schluss kommt, das Triptolid die Expression und Translokation der 14-3-3 Proteinfamilie verändert, welche über Phosphorylierungsmuster in vielfältiger Weise mit der Regulation von Zelltod und Proliferation interagieren (97). Die Studie weist allerdings einige methodische Schwächen auf und ist zu dem in nur einer Zelllinie durchgeführt, weshalb die Ergebnisse nur als ein erster Hinweis gewertet werden dürfen.

Eine zweite Möglichkeit ist, dass Triptolid anstatt eines einzelnen Proteins eine breite Palette von Zellbestandteilen verändert und so eine Vielzahl von Interaktionen beinflusst. Dies könnten posttranslationale Modifikationen an Proteinen oder DNA wie

Phosphorylierungen, Glykosilierungen, Methylierungen und Acetylierungen sein. Vorläufige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Triptolid in die Regulation des Heterochromatins eingreift, ein Mechanismus der über die Modifikation von Histonen gesteuert wird und sehr weitreichende Folgen für die Translationsaktivtät der Zelle hat. Ein Steuerungsmechanismus des Heterochromatins ist Jak-2-abhängig (98,99), was wiederum zu den Ergebnissen passt, die in dieser Arbeit dargestellt wurden und so weitreichende Möglichkeiten zur Vertiefung dieses spannenden Feldes bieten.

4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte in zwei Xenograftmodellen gezeigt werden, dass das neue Triptolid-Prodrug Minnelide™ Wachstum und Metastasierung des Kolonkarzinoms hemmt und erkrankten Mäusen dadurch ein Überlebensvorteil entsteht. Der Zelltod wird *in vitro* durch eine Jak-2/STAT-3-abhängige Inhibition von Onkoproteinen verursacht, was zu Apoptose und Zellzyklusarrest von Kolonkarzinomzelllinien führt. Eine Hemmung des Jak-2/STAT-3 Signalwegs durch Triptolid ist auch in Pankreaskarzinomzellen nachweisbar. Triptolid, respektive Minnelide™, sind somit vielversprechende Wirkstoffe, deren Potential für die medikamentöse Behandlung fortgeschrittener Dickdarmtumoren weiter untersucht werden sollte. Ebenso sollte die medikamentöse Inhibtion der Jak-2/STAT-3-Achse im Kolonkarzinom weiter untersucht werden. Verschiedene Jak-Inhibitoren befinden sich bereits in der klinischen Erprobung (18,100).

Die tatsächliche Wirkungsweise von Triptolid auf molekularer Ebende bleibt weiter ungeklärt. Breit angelegte Screeninguntersuchungen auf Transkriptom- und Proteomebene sowie posttranslastionaler Modifikationen könnten hier Aufschluss geben.

Minnelide™ durchäuft derzeit eine Phase I Studie an Patienten mit fortgeschrittenen pankreatikobiliären Tumoren. Die Ergebnisse unserer Studie weisen daraufhin, dass eine klinische Erprobung auch im Kolonkarzinom vielversprechend ist.

5. Anhänge

5.1 Auflistung der Verwendeten Geräte, Materialien und Reagenzien

5.1.1. Geräte

Name	Hersteller
-20°C Gefrierschrank	Frigidair, USA
4°C Kühlschrank	Frigidair, USA
-80°C Gefrierschrank	Thermo Scientific, USA
Chirurgische Instrumente	Aesculap, Deutschland
Durchflusszytometer	BD, USA
Elektrische Pipettierhilfe	Drummond, USA
Fluorometer Fluorostar Omega	BMG Labtech, USA
Gel-Apparatur	Biorad, USA
Gewebehomogenisator	Omni International, USA
Hammiltonspritze	Hammilton, USA
Heizmatte	Conair, USA
Invertiertes Mikroskop	
• Durchlicht, Phasenkontrast	Leica, Deutschland
• Fluoreszenz	Nikon, Japan
Laborschüttler	Stoval Lifescience, USA
Laminarbox 1300 A2	Thermo Scientific, USA
Lumineszenzimager	Ultralum Omega, USA
Luminometer TD 2020	Turner Design, USA
Nanodrop	Thermo Scientific, USA
Photometer EL808	Biotek, USA
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Real-Time PCR System 7500	Applied Biosystems, USA
Schiebelehre	Fowler, USA
Stromquelle	Thermo Scientific, USA
Transfervorrichtung	Biorad, USA
Ultraschallquelle UP400S	Hielscher, Deutschland
Waage für Körpergewicht Versuchstiere	Mettler Toledo, Schweiz
Zellkulturinkubator Napco 8000 DH	Thermo Scientific, USA
Zentrifugen Microfuge 22R	Beckmann Coulter, USA

5.1.2. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
4-15%-TGX-Gradientengele	Biorad, USA
Alkoholtupfer	Fisher Brand, USA
Augensalbe	AK-Poly-Bac, USA
chirurgische Hautklammern	Clay Adams, USA
Hämozytometer	Fisher Scientific, USA
Nahtmaterial Vicryl	Ethicon, USA
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, USA
Pipettenspitzen	Denville, USA
Reaktionsgefäß 0,5ml, 1,5ml	Denville, USA
Serologische Pipetten	BD-Falcon, USA
Zellkultur	
• Flaschen mit Filterdeckel 75cm^2	TPP, Schweiz
oder 150cm^2	TPP, Schweiz
• Zellschaber	TPP, Schweiz
• Zellkulturschalen 87mm	TPP, Schweiz
• Zellkulturplatten transparent: 6-Well, 48-Well, 96-Well	TPP, Schweiz
• Zellkulturplatten weiß: 96-Well	BD-Falcon, USA
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	TPP, Schweiz
96-Well PCR Platten	Applied Biosystems, USA

5.1.3. Chemikalien, Medien und Antikörper

Name	Hersteller
Antikörper	
• Anti-BCL-X (2H12)	Millipore, USA
• Anti-beta Actin sc1616	Santa Cruz, USA
• Anti-Caspase-3 #9662	Cell Signaling, USA
• Anti-cleaved Caspase 3 (51AE) #9664	Cell Signaling, USA
	Cell Signaling, USA

• Anti-cdk4 (DCS156) #2906	Cell Signaling, USA
• Anti-c-myc (D84C12) #5605	Cell Signaling, USA
• Anti-Cyclin D1#2922	Cell Signaling, USA
• Anti-Jak-2 (D2E12) #3230	Cell Signaling, USA
• Anti-LC3 #2775	Cell Signaling, USA
• Anti-PARP (46D11) #9532	Cell Signaling, USA
• Anti-p(Tyr1007/08)-Jak-2 C80C3) #3776	Cell Signaling, USA
• Anti-STAT-3 (124H6) #9139	Cell Signaling, USA
• Anti-Survivin (71G4B7) #2808	Cell Signaling, USA
• Anti-XIAP sc-11426	Santa Cruz, USA
• Anti-Maus-IgG-HRP sc-2005	Santa Cruz, USA
• Anti-Kaninchen-IgG-HRP #7074	Cell Signaling, USA
• Anti-Ziege-IgG-HRP sc-2020	Santa Cruz, USA
Attractene	Qiagen, Deutschland
BCA-Kit	Thermo Scientific, USA
Beta-Glycerolphosphat 200mM	Boston Bioproducts, USA
BSA	Sigma Aldrich, USA
Caspase-Glo 3/7	Promega, USA
cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, USA
Cell-Counting-Kit-8	Dojindo, USA
Chloroform	Sigma Aldrich, USA
DMSO	Sigma Aldrich, USA
Dual-Luciferase-Reporter-Assay-Kit	Promega, USA
Dulbecco´s Modified Eagle Medium	Hy Clone, USA
E2F Reporter Assay	SABiosciences, USA
ECL-Substrat Super Signal	Thermo Scientific, USA
Ethanol	Decon, USA
FACS-Röhrchen	BD, USA
fettfreie Pulvermilch	Boston Bioproducts, USA
FBS	Hy Clone, USA
Formalinlösung 10%	Thermo Scientific, USA
FuGENE	Roche, Deutschland
Glyzin	Sigma Aldrich, USA

Guava Zellzyklus Reagenz	Guava, USA
IL-6	eBioscience, USA
Isopropanol	Macron, USA
Kaninchen IgG sc2027	Santa Cruz, USA
Ketamin	Phoenix, USA
Matrigel	BD, USA
McCoy´s 5A Medium	Hy Clone, USA
Minnelide™	Minneamrita Therapeutics LLC, India
Morphin	BR Healthcare, Vereinigtes Königreich
NaCl	Sigma Aldrich, USA
Natriumpyrophosphat 200mM	Boston Bioproducts, USA
OPTImem Medium	Gibco, USA
PBS	Life Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin	Hy Clone, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	Calbiochem, USA
Physiologische Kochsalzlösung	Winchester Laboratories, USA
Ponceau-S	Sigma Aldrich, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Deutschland
Protein-A-gekoppelte Beads	GE Healthcare, USA
Proteinmarker	Biorad, USA
RIPA-Puffer	Boston Bioproducts, USA
RNase freies Wasser	Hy Clone, USA
Roswell Park Memorial Institute Medium	Hy Clone, USA
SDS	Sigma Aldrich, USA
SDS-Ladepuffer	Boston Bioproducts, USA
STAT-3 Reporter Assay	SABiosciences, USA
Restore Stripping Puffer	Thermo Scientific, USA
Sybr Green Master Mix	Applied Biosystems, USA
Triptolide	Laurus Labs, India
Tris	Sigma Aldrich, USA
Trizol	Life Technologies, USA
Trypsinlösung 0,25%	Hy Clone, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, USA

WP1066	EMD Chemicals, USA
Xylazin	Lloyd, USA

5.1.4. Hergestellte Puffer und Lösungen

Name	**Inhaltsstoffe**	**Menge**
Protease Inhibitor Cocktail	Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette
	destil. Wasser	1ml
Lysepuffer	Protease Inhibitor Cocktail	10µl
	Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	10µl
	Beta-Glycerolphosphat 200mM	20µl
	Natriumpyrophosphat 200mM	10µl
	RIPA Puffer	950µl
Laufpuffer	Tris	3.03g
	Glyzin	14,4g
	SDS 10%	10ml
	destil. Wasser	ad 1000ml
Transferpuffer	Tris	3.03g
	Glyzin	14,4g
	Methanol	200ml
	destil. Wasser	ad 1000ml
TBS-T	Tris	6,05g
	NaCl	8,76g
	Tween 20	1ml
	destil. Wasser	ad 1000ml
	pH auf 7.5 einstellen	

5.1.5. Primer

Name	***Sequenz***
c-myc	F 3’-AGGACGCGACTCTCCCGACG-5’,
	R 3’ AAAGGCAAGTGGACTTCGGTGCT-5’
18-S	Hs_RN18S1_QF_2 QuantiFast Probe Assay, Qiagen, USA

5.2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	**Bedeutung**
(P)-Jak-2	(Phospho)-Januskinase 2
°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluoruracil
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	Varianzanalyse
APC	Adenomatosis Polyposis Coli (Genlocus)
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure Assay
Bcl-2	B-Cell-Lymphom 2 Protein
Bcl-Xl	B-cell lymphoma-extra large
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Cdk	Cyclin dependent Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
c-myc	Mit Myelocytomatose assoziiertes Protoonkogen
CO_2	Kohlendioxid
DLT	Dosis-limitierende Toxizität
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAP	Familiäre Adenomatosis Poliposis
FKS	Fetales Kälberserum
G	Gauge, Maß für Kanülendurchmesser
g	Gramm/Maß für die Erdbeschleunigung
$G_{0/1}$	Erste Phase des Zellzyklus
G_2	Zweite Phase des Zellzyklus, in der die Zellteilung vorbereitet wird
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

h	Stunde
HNPCC	Hereditäre nicht-polipöse Carcinomatosis Coli
HRP	Horseradishperoxidase
HSF-1	Heatshock factor 1
HSP70	Hitzeschockprotein 70
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
kg	Kilogramm
l	Liter
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
M	Mol
MAPK	Mitogen-activated protein-Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
miR	Micro-Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm^3	Kubikmillimeter
MTD	Maximal tollerierte Dosis
n	Stichprobengröße
NADH	Oxidierte Form von Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Oxidierte Form von Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
nM	Nanomol
p53	Tumorsupressor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP1	Poly-[ADP-Ribose]Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RAF	Rat fibrosarcoma Protoonkogen
RAS	Rat sarcoma Protoonkogen
RB	Retinoblastom Proonkogen
RIPA-Puffer	Radioimmunopräzipitations-Puffer

RNA	Ribonukleinsäure
S	Phase des Zellzyklus, in der es zur Chromosomenverdopplung kommt
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SP1	Specific protein
SPF	Specific pathogen free
STAT-3	Signal Transducer and Activater of Transcription 3
TBS-T	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TCF/LEF	Transcription Factor/Lymphoid enhancer-binding factor
Tpl	Triptolid
Tyr	Tyrosinrest
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	Union internationale contre le cancer/Internationale Vereinigung gegen Krebs
USA	Vereingte Staaten von Amerika
V	Volt
WST-8	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz-8
XIAP	X-linked inhibitor of apoptotic protein
z.B.	zum Beispiel
µg	Microgramm
µl	Microliter
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium

5.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Strukturformel von Triptolid

Abbildung 2. Einfluss von Minnelide™ auf das Tumorwachstum im subkutanen HCT116-Xenotransplantatmodell

Abbildung 3. Effekt von Minnelide™ auf die Entwicklung von Lebermetastasen im Milzinjektionsmodell in Nacktmäusen

Abbildung 4. Effekt von Minnelide™ auf das Überleben von Mäusen mit Lebermetastasen im Milzinjektionsmodel

Abbildung 5. Einfluss von Triptolid auf die Zellviabilität von HCT116 und HT29 Zellen

Abbildung 6. Einfluss von Triptolid auf die Aktivierung der Apoptose und Regulation des Zellzyklus

Abbildung 7. Einfluss von Triptolid auf die Aktivierung Autophagie

Abbildung 8. Einfluss von Triptolid auf die Expression antiapoptotischer Proteine in Kolonkarzinomzellen

Abbildung 9. Einfluss von Triptolid auf die Expression von Zellzyklusregulatoren

Abbildung 10. Expression von c-Myc und Survivin in mit Minnelide™ behandelten HCT116 Xenotransplantaten

Abbildung 11. Apoptosemarker in mit Minnelide™ behandelten HCT116 Xenotransplantaten

Abbildung 12. Schematische Darstellung des Jak-2/STAT-3-Signalwegs

Abbildung 13. Änderungen der Jak-2-Phosporylierung nach Behandlung mit Triptolid

Abbildung 14. STAT-3/Jak-2 Koimmumopräzipitation

Abbildung 15. STAT-3-Luciferase-Reporter-Assay

Abbildung 16. Pharmakologische Inhibition des Jak-2-Signalwegs

Abbildung 17. Einfluss von Triptolid auf den Jak-2/STAT-3-Signalweg in duktalen Pankreasadenokarzinomzelllinien

Abbildung 18. Pharmakologischen Inhibition des Jak-2-Signalwegs mit WP1066 in duktalen Pankreasadenokarzinomzellen

Abbildung 19. Schematische Darstellung des Einflusses von Triptolid auf den Jak-2/STAT-3-Signalwegs

6. Zusammenfassung

Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen der westlichen Welt und die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache bezogen auf die Gesamtbevölkerung. Im Stadium IV beträgt das 5-Jahresüberleben unbefriedigende 12%. Minnelide™ ist das wasserlösliche Prodrug des pflanzlichen Wirkstoffs Triptolid, der vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung des Pankreaskarzinoms zeigt. Über die Effektivität von Minnelide™ im Kolonkarzinom und den Mechanismus von Triptolide ist nur wenig bekannt.

Material und Methoden

Der Einfluss von Minnelide™ auf das Tumorwachstum, das Fortschreiten der Metastasierung und das Gesamtüberleben wurde in einem subkutanen und einem Lebermetastasen-Xenograftmodell mit humanen HCT116-Zellen in nu/nu-Mäusen untersucht. *In vitro* Studien zum Mechanismus von Triptolid wurden in HCT116 und HT29 Zelllinien durchgeführt und mit Pankreaskarzinomzelllinien S2-VP10 und MiaPaCa-2 verglichen. Zellviabilität wurde mittels CCK-8, Caspaseaktivität fluorometrisch und der Zellzyklusarrest mittels FACS bestimmt. Autophagie und die Expression von anti-apoptotischen und proliferationsfördernden Proteinen XIAP, Survivin, BCL-Xl, c-Myc, Cyclin D1 und Cdk-4 in Zelllysaten und Tumorhomogenaten wurden im Western Blot bestimmt. C-myc mRNA wurde mittels Real-Time-PCR gemessen. Jak-2-Aktivierung wurde durch Bestimmung von P-Jak-2 im Western Blot bestimmt und die physische Interaktion zwischen Jak-2 und STAT-3 in Co-Immunopräzipitationen untersucht. Der Einfluss auf die STAT-3-Aktivität wurde mit STAT-3-Dual-Luciferase-Reporter-Assay erfasst. Als spezifischer Jak2-Inhibitor kam WP1066 zum Einsatz.

Ergebnisse

Minnelide™ hemmt das Wachstum von subkutanen Tumoren und von Lebermetastasen signifikant und verlängert das Überleben von Mäusen mit Lebermetastasen. Triptolid führt dosisabhängig zu Zelltod durch Apoptose und G_1-Zellzyklusarrest in dem es die Expression von XIAP, Survivin, BCL-Xl und c-Myc, nicht jdeoch Cyclin D1 und Cdk-4 hemmt. Dies geht mit einem Verlust von P-Jak-2 und STAT-3-Aktivität einher und der Effekt läßt sich durch Verwendung eines Jak2-Inhibitors validieren. Die Inhibtion des Jak-2/STAT-3-Signalweg ist in Kolon- und Pankreaskarzinomzellen gleichermaßen nachvollziehbar.

Diskussion

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Minnelide™ in Analogie zu den Ergebnissen in Pankreaskarzinommodellen das Tumorwachstum signifkant hemmt, die Metastasierung bremst und das Überleben der Versuchstiere verbessert und damit eine vielversprechende Substanz für die Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms darstellt. Weitere Studien zum Vergleich mit Standardsubstanzen und in nicht-immundefizienten Tiermodellen sind jedoch notwendig. Eine Inhibtion von Jak-2 durch Triptolid war bisher weder für das Kolon- noch für das Pankreaskarzinom beschrieben. Jak-2, als Zielstruktur von Triptolid, reiht sich damit in eine ständig wachsende Liste von möglichen Wirkmechanismen ein. In welcher Weise Triptolid mit Jak-2 und anderen Signalwegen interagiert, bleibt weiter unverstanden und bedarf weiterer Forschung.

7. Literatur

1. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin. 2014 Apr;64(2):104–17.

2. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2014 Aug;25(8):1650–6.

3. Wittekind C, Meyer H-J. TNM: Klassifikation maligner Tumoren. 7th ed. Weinheim: Wiley-Blackwell; 2010. xix+295 p.

4. Jansen L, Castro FA, Gondos A, Krilaviciute A, Barnes B, Eberle A, et al. Recent cancer survival in Germany: An analysis of common and less common cancers. Int J Cancer J Int Cancer. 2014 Nov 7;

5. Michl M, Holtzem B, Koch J, Moosmann N, Holch J, Hiddemann W, et al. [Metastatic colorectal cancer--analysis of treatment modalities and survival now and then]. Dtsch Med Wochenschr 1946. 2014 Oct;139(41):2068–72.

6. Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012 Jul;62(4):220–41.

7. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010 Oct;60(5):277–300.

8. GEKID-Atlas - Tabellenabfrage [Internet]. [cited 2015 Jan 19]. Available from: http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=INCIDENCE_EU&ICD10=C18-C21&Year_from=2008&Year_to=2011&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on

9. Haug U, Engel S, Verheyen F, Linder R. Estimating colorectal cancer treatment costs: a pragmatic approach exemplified by health insurance data from Germany. PloS One. 2014;9(2):e88407.

10. Watson AJM. An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2006 Feb;57(2):107–21.

11. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science. 1991 Aug 9;253(5020):661–5.

12. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. Science. 1991 Aug 9;253(5020):665–9.

13. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012 Jul 19;487(7407):330–7.

14. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science. 1997 Mar 21;275(5307):1784–7.

15. Li H, Pamukcu R, Thompson WJ. beta-Catenin signaling: therapeutic strategies in oncology. Cancer Biol Ther. 2002 Dec;1(6):621–5.

16. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science. 1997 Mar 21;275(5307):1787–90.

17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646–74.

18. Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2012 Mar 20;30(9):1005–14.

19. Kupchan SM, Court WA, Dailey RG Jr, Gilmore CJ, Bryan RF. Triptolide and tripdiolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from Tripterygium wilfordii. J Am Chem Soc. 1972 Oct 4;94(20):7194–5.

20. Kupchan SM, Schubert RM. Selective alkylation: a biomimetic reaction of the antileukemic triptolides? Science. 1974 Aug 30;185(4153):791–3.

21. Wei YS, Adachi I. Inhibitory effect of triptolide on colony formation of breast and stomach cancer cell lines. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1991 Sep;12(5):406–10.

22. Shamon LA, Pezzuto JM, Graves JM, Mehta RR, Wangcharoentrakul S, Sangsuwan R, et al. Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from Tripterygium wilfordii. Cancer Lett. 1997 Jan 15;112(1):113–7.

23. Westerheide SD, Kawahara TLA, Orton K, Morimoto RI. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. J Biol Chem. 2006 Apr 7;281(14):9616–22.

24. Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, et al. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res. 2007 Jan 15;67(2):616–25.

25. Antonoff MB, Chugh R, Skube SJ, Dudeja V, Borja-Cacho D, Clawson KA, et al. Role of Hsp-70 in triptolide-mediated cell death of neuroblastoma. J Surg Res. 2010 Sep;163(1):72–8.

26. Dudeja V, Mujumdar N, Phillips P, Chugh R, Borja-Cacho D, Dawra RK, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. Gastroenterology. 2009 May;136(5):1772–82.

27. Phillips PA, Dudeja V, McCarroll JA, Borja-Cacho D, Dawra RK, Grizzle WE, et al. Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70. Cancer Res. 2007 Oct 1;67(19):9407–16.

28. Dudeja V, Chugh RK, Sangwan V, Skube SJ, Mujumdar NR, Antonoff MB, et al. Prosurvival role of heat shock factor 1 in the pathogenesis of pancreatobiliary tumors. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 Jun;300(6):G948–55.

29. Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, et al. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Aug;66(3):535–45.

30. Mujumdar N, Mackenzie TN, Dudeja V, Chugh R, Antonoff MB, Borja-Cacho D, et al. Triptolide induces cell death in pancreatic cancer cells by apoptotic and autophagic pathways. Gastroenterology. 2010 Aug;139(2):598–608.

31. Krosch TCK, Sangwan V, Banerjee S, Mujumdar N, Dudeja V, Saluja AK, et al. Triptolide-mediated cell death in neuroblastoma occurs by both apoptosis and autophagy pathways and results in inhibition of nuclear factor-kappa B activity. Am J Surg. 2013 Apr;205(4):387–96.

32. Tang X, Zhu Y, Tao W, Wei B, Lin X. Synergistic effect of triptolide combined with 5-fluorouracil on colon carcinoma. Postgrad Med J. 2007 May;83(979):338–43.

33. Wen L, Chen Y, Zeng L, Zhao F, Li R, Liu Y, et al. Triptolide induces cell-cycle arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells in vitro via altering expression of histone demethylase LSD1 and JMJD2B. Acta Pharmacol Sin. 2012 Jan;33(1):109–19.

34. Zhao F, Chen Y, Li R, Liu Y, Wen L, Zhang C. Triptolide alters histone H3K9 and H3K27 methylation state and induces G0/G1 arrest and caspase-dependent apoptosis in multiple myeloma in vitro. Toxicology. 2010 Jan 12;267(1-3):70–9.

35. Chugh R, Sangwan V, Patil SP, Dudeja V, Dawra RK, Banerjee S, et al. A Preclinical Evaluation of Minnelide as a Therapeutic Agent Against Pancreatic Cancer. Sci Transl Med. 2012 Oct 17;4(156):156ra139–56ra139.

36. Georg IG, Patil SP, Saluja AK, Chugh R, Vickers S. Triptolide Prodrugs [Internet]. WO/2010/129918, 2010 [cited 2015 Jan 15]. Available from: http://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2010129918&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio

37. Study of Minnelide™ in Patients With Advanced GI Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2015 Jan 15]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01927965

38. Taniguchi S, Iwamura T, Katsuki T. Correlation between spontaneous metastatic potential and type I collagenolytic activity in a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) and sublines. Clin Exp Metastasis. 1992 Jul;10(4):259–66.

39. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101–8.

40. Wang Z, Jin H, Xu R, Mei Q, Fan D. Triptolide downregulates Rac1 and the JAK/STAT-3 pathway and inhibits colitis-related colon cancer progression. Exp Mol Med. 2009 Oct 31;41(10):717–27.

41. Nishihara R, Wu K, Lochhead P, Morikawa T, Liao X, Qian ZR, et al. Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. N Engl J Med. 2013 Sep 19;369(12):1095–105.

42. Shaukat A, Mongin SJ, Geisser MS, Lederle FA, Bond JH, Mandel JS, et al. Long-term mortality after screening for colorectal cancer. N Engl J Med. 2013 Sep 19;369(12):1106–14.

43. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. Natl Cancer Inst Bethesda MD.

44. Wilkins JA, Sansom OJ. C-Myc is a critical mediator of the phenotypes of Apc loss in the intestine. Cancer Res. 2008 Jul 1;68(13):4963–6.

45. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. STAT-3 as an oncogene. Cell. 1999 Aug 6;98(3):295–303.

46. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2002 Apr;8(4):945–54.

47. Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Sep;3(9):651–62.

48. Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, Aoki H, Yokoyama T, Fokt I, et al. A novel inhibitor of the STAT-3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. Oncogene. 2007 Apr 12;26(17):2435–44.

49. Ferrajoli A, Faderl S, Van Q, Koch P, Harris D, Liu Z, et al. WP1066 disrupts Janus kinase-2 and induces caspase-dependent apoptosis in acute myelogenous leukemia cells. Cancer Res. 2007 Dec 1;67(23):11291–9.

50. Verstovsek S, Manshouri T, Quintás-Cardama A, Harris D, Cortes J, Giles FJ, et al. WP1066, a novel JAK2 inhibitor, suppresses proliferation and induces apoptosis in erythroid human cells carrying the JAK2 V617F mutation. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2008 Feb 1;14(3):788–96.

51. Mathis KL, Boostrom SY, Pemberton JH. New developments in colorectal surgery. Curr Opin Gastroenterol. 2013 Jan;29(1):72–8.

52. De Rosa A, Gomez D, Hossaini S, Duke K, Fenwick SW, Brooks A, et al. Stage IV colorectal cancer: Outcomes following the liver-first approach. J Surg Oncol. 2013 Sep 5;

53. Wanebo HJ, LeGolvan M, Paty PB, Saha S, Zuber M, D'Angelica MI, et al. Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. Clin Exp Metastasis. 2012 Oct;29(7):821–39.

54. Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heußner P, et al. [S3-guideline colorectal cancer version 1.0]. Z Für Gastroenterol. 2013 Aug;51(8):753–854.

55. Xu B, Guo X, Mathew S, Armesilla AL, Cassidy J, Darling JL, et al. Triptolide simultaneously induces reactive oxygen species, inhibits NF-kappaB activity and sensitizes 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. Cancer Lett. 2010 May 28;291(2):200–8.

56. Johnson SM, Wang X, Evers BM. Triptolide inhibits proliferation and migration of colon cancer cells by inhibition of cell cycle regulators and cytokine receptors. J Surg Res. 2011 Jun 15;168(2):197–205.

57. Liu J, Shen M, Yue Z, Yang Z, Wang M, Li C, et al. Triptolide inhibits colon-rectal cancer cells proliferation by induction of G1 phase arrest through upregulation of p21. Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm. 2012 Jun 15;19(8-9):756–62.

58. Landers JE, Cassel SL, George DL. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. Cancer Res. 1997 Aug 15;57(16):3562–8.

59. Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M, et al. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. Int J Cancer J Int Cancer. 1988 Feb 15;41(2):287–96.

60. Li W, Liu Y, Li X-X, Yu Y, Wu J-J, Wang Q, et al. MAPKs are not involved in triptolide-induced cell growth inhibition and apoptosis in prostate cancer cell lines with different p53 status. Planta Med. 2011 Jan;77(1):27–31.

61. Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. Cell Cycle Georget Tex. 2009 Sep 1;8(17):2708.

62. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? Mol Cell. 2008 Apr 25;30(2):123–35.

63. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. Cancer. 2001 Jun 1;91(11):2026–32.

64. Park S-W, Kim YI. Triptolide induces apoptosis of PMA-treated THP-1 cells through activation of caspases, inhibition of NF-κB and activation of MAPKs. Int J Oncol. 2013 Oct;43(4):1169–75.

65. Banerjee S, Thayanithy V, Sangwan V, Mackenzie TN, Saluja AK, Subramanian S. Minnelide reduces tumor burden in preclinical models of osteosarcoma. Cancer Lett. 2013 Mar 14;

66. Park B, Sung B, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Triptolide, histone acetyltransferase inhibitor, suppresses growth and chemosensitizes leukemic cells through inhibition of gene expression regulated by TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-NIK-TAK1-IKK pathway. Biochem Pharmacol. 2011 Nov 1;82(9):1134–44.

67. Shi X, Jin Y, Cheng C, Zhang H, Zou W, Zheng Q, et al. Triptolide inhibits Bcr-Abl transcription and induces apoptosis in STI571-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T315I mutation. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2009 Mar 1;15(5):1686–97.

68. Zhong Y-Y, Chen H-P, Tan B-Z, Yu H-H, Huang X-S. Triptolide avoids cisplatin resistance and induces apoptosis via the reactive oxygen species/nuclear factor-

κB pathway in SKOV3(PT) platinum-resistant human ovarian cancer cells. Oncol Lett. 2013 Oct;6(4):1084–92.

69. Huang M, Zhang H, Liu T, Tian D, Gu L, Zhou M. Triptolide inhibits MDM2 and induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells through a p53-independent pathway. Mol Cancer Ther. 2013 Feb;12(2):184–94.

70. Clawson KA, Borja-Cacho D, Antonoff MB, Saluja AK, Vickers SM. Triptolide and TRAIL combination enhances apoptosis in cholangiocarcinoma. J Surg Res. 2010 Oct;163(2):244–9.

71. Wang B-Y, Cao J, Chen J-W, Liu Q-Y. Triptolide induces apoptosis of gastric cancer cells via inhibiting the overexpression of MDM2. Med Oncol Northwood Lond Engl. 2014 Nov;31(11):270.

72. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. Oncogene. 2007 Feb 26;26(9):1324–37.

73. Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. Cancer Res. 2000 Nov 1;60(21):6101–10.

74. Chen Q, Lu Z, Jin Y, Wu Y, Pan J. Triptolide inhibits Jak2 transcription and induces apoptosis in human myeloproliferative disorder cells bearing Jak2V617F through caspase-3-mediated cleavage of Mcl-1. Cancer Lett. 2010 May 28;291(2):246–55.

75. Li J, Zhu W, Leng T, Shu M, Huang Y, Xu D, et al. Triptolide-induced cell cycle arrest and apoptosis in human renal cell carcinoma cells. Oncol Rep. 2011 Apr;25(4):979–87.

76. Cosgrave N, Hill ADK, Young LS. Growth factor-dependent regulation of survivin by c-myc in human breast cancer. J Mol Endocrinol. 2006 Dec;37(3):377–90.

77. Lassmann S, Schuster I, Walch A, Göbel H, Jütting U, Makowiec F, et al. STAT-3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT-3-inducible

targets linked to cell survival and proliferation. J Clin Pathol. 2007 Feb;60(2):173–9.

78. Zushi S, Shinomura Y, Kiyohara T, Miyazaki Y, Kondo S, Sugimachi M, et al. STAT-3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. Int J Cancer J Int Cancer. 1998 Oct 29;78(3):326–30.

79. Horiguchi A, Asano T, Kuroda K, Sato A, Asakuma J, Ito K, et al. STAT-3 inhibitor WP1066 as a novel therapeutic agent for renal cell carcinoma. Br J Cancer. 2010 May 25;102(11):1592–9.

80. Lin Q, Lai R, Chirieac LR, Li C, Thomazy VA, Grammatikakis I, et al. Constitutive activation of JAK3/STAT-3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT-3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells. Am J Pathol. 2005 Oct;167(4):969–80.

81. Klampfer L. The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. Front Biosci J Virtual Libr. 2008;13:2888–99.

82. Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Nagayasu T, et al. Expression of p-STAT-3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors. J Clin Pathol. 2005 Aug;58(8):833–8.

83. Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. STAT-3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. Biochem J. 2005 Dec 1;392(Pt 2):335–44.

84. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu G-Y, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and STAT-3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. Cancer Cell. 2009 Feb 3;15(2):103–13.

85. Nandan MO, Yang VW. Genetic and Chemical Models of Colorectal Cancer in Mice. Curr Colorectal Cancer Rep. 2010 Mar 10;6(2):51–9.

86. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT-3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. Nat Rev Cancer. 2014 Nov;14(11):736–46.

87. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. J Clin Invest. 2002 May;109(9):1139–42.

88. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. Nat Rev Cancer. 2004 Feb;4(2):97–105.

89. Thoennissen NH, Iwanski GB, Doan NB, Okamoto R, Lin P, Abbassi S, et al. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. Cancer Res. 2009 Jul 15;69(14):5876–84.

90. Corvinus FM, Orth C, Moriggl R, Tsareva SA, Wagner S, Pfitzner EB, et al. Persistent STAT-3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. Neoplasia N Y N. 2005 Jun;7(6):545–55.

91. Chen Z, Sangwan V, Banerjee S, Mackenzie T, Dudeja V, Li X, et al. miR-204 mediated loss of Myeloid cell leukemia-1 results in pancreatic cancer cell death. Mol Cancer. 2013;12(1):105.

92. MacKenzie TN, Mujumdar N, Banerjee S, Sangwan V, Sarver A, Vickers S, et al. Triptolide induces the expression of miR-142-3p: a negative regulator of heat shock protein 70 and pancreatic cancer cell proliferation. Mol Cancer Ther. 2013 Jul;12(7):1266–75.

93. Banerjee S, Sangwan V, McGinn O, Chugh R, Dudeja V, Vickers SM, et al. Triptolide-induced cell death in pancreatic cancer is mediated by O-GlcNAc modification of transcription factor Sp1. J Biol Chem. 2013 Oct 15;

94. Zhou G-S, Hu Z, Fang H-T, Zhang F-X, Pan X-F, Chen X-Q, et al. Biologic activity of triptolide in t(8;21) acute myeloid leukemia cells. Leuk Res. 2011 Feb;35(2):214–8.

95. Li Y, Yu C, Zhu W-M, Xie Y, Qi X, Li N, et al. Triptolide ameliorates IL-10-deficient mice colitis by mechanisms involving suppression of IL-6/STAT-3 signaling pathway and down-regulation of IL-17. Mol Immunol. 2010 Sep;47(15):2467–74.

96. Hongqin T, Xinyu L, Heng G, Lanfang X, Yongfang W, Shasha S. Triptolide inhibits IFN-γ signaling via the Jak/STAT pathway in HaCaT keratinocytes. Phytother Res PTR. 2011 Nov;25(11):1678–85.

97. Liu Y, Song F, Wu WKK, He M, Zhao L, Sun X, et al. Triptolide inhibits colon cancer cell proliferation and induces cleavage and translocation of 14-3-3 epsilon. Cell Biochem Funct. 2012 Jun;30(4):271–8.

98. Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. Nature. 2009 Oct 8;461(7265):819–22.

99. Shi S, Calhoun HC, Xia F, Li J, Le L, Li WX. JAK signaling globally counteracts heterochromatic gene silencing. Nat Genet. 2006 Sep;38(9):1071–6.

100. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. N Engl J Med. 2015 Jan 29;372(5):426–35.

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Georg Beyer, geboren am 24.02.1988 in Jena, diese Arbeit und alle dafür notwendigen Arbeitsschritte, mit Außnahme der FACS-Analysen zur Untersuchung des Zellzyklusarrests, selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt zu haben.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, Georg Beyer