

*Analyse relevanter Signalwege der strahleninduzierten
COX-2 Expression in Tumorzellen*

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Zoologie

Sektion Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung
Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen

vorgelegt von

Guido Klaus Krebiehl

aus Pforzheim

2006

Die vorliegende Arbeit wurde am 25.01.2007 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer

1. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. H.-Peter Rodemann

2. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Harald Rösner

Eingereicht am: 27.11.2006

Mündliche Prüfung am: 01.02.2007

Vorwort

Die Vollendung dieser Doktorarbeit stellt einen wichtigen Punkt in meinem Leben dar. Aus diesem Anlass möchte ich denen Menschen danken, die mich bei dieser Arbeit gefördert, unterstützt und motiviert haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Rodemann für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit bedanken, sowie bei Herrn Prof. Rösner, der freundlicherweise die Betreuung an der Universität Hohenheim übernommen hat.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Petra A. Ohnseit für die Unterstützung im Labor und die Motivation während der gesamten Zeit.

Ebenso möchte ich mich bei Sonja Nolte bedanken, für die angenehmen Stunden im Labor.

Schließlich bedanke ich mich bei allen Kollegen der Sektion Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung für die gute Zusammenarbeit.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mich über die gesamte Zeit meines Studiums sowie der Promotion unterstützt haben und ohne die dieser Abschluss nicht möglich gewesen wäre.

1. Einleitung	6
1.1 Cyclooxygenase 2.....	7
1.2 COX-2 Induktion.....	10
1.3 Signalwege zur COX-2 Expression.....	11
1.4 Selektive COX-2 Inhibitoren - Celecoxib	12
1.5 Ziel der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 weitere Materialien.....	15
2.1.3 Kits	15
2.1.4 Geräte	15
2.1.5 Lösungen	16
2.1.6 Inhibitoren	17
2.1.7 Antikörper.....	18
2.1.8 Zellkultur-Medium	18
2.1.9 Zelllinien.....	19
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 Bestrahlung.....	20
2.2.3 Behandlung mit Inhibitoren.....	20
2.2.4 Wachstumstest	20
2.2.5 Koloniebildungstest	20
2.2.6 Flow Zytometrie	21
2.2.7 Methoden zur Analyse von Proteinen (Western-Blot)	21
2.2.8 Densitometrie	22
3. Ergebnisse.....	23
3.1 Induktion der COX-2 Expression und Aktivität durch ionisierende Strahlung in Prostatakarzinomzelllinien	23
3.1.1 Dosisabhängigkeit der COX-2 Expression in Prostatakarzinomzelllinien.....	23
3.1.2 Die Zeitabhängigkeit der COX-2 Expression in Prostatakarzinomzelllinien	25
3.1.3 Die COX-2 Expression und Aktivität nach fraktionierter Bestrahlung in Kombination mit Celecoxib in Prostatakarzinomzelllinien	27

3.2 Klonogenes Überleben und Proliferation nach Bestrahlung und kombinierter Behandlung mit Celecoxib	30
3.2.1 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit Einzeldosen alleine und in Kombination mit Celecoxib	30
3.2.2 Klonogenes Überleben und Proliferation nach fraktionierter Bestrahlung und kombinierter Behandlung mit Celecoxib	31
3.2.3 Apoptose-Induktion durch Celecoxib in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3	32
3.2.4 Phosphorylierung von AKT nach Celecoxib-Behandlung und Bestrahlung.....	33
3.3 COX-2 Expression - Potentielle Signalwege nach Bestrahlung.....	34
3.3.1 Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Strahlung.....	34
3.3.2 Induktion der der COX-2 Expression durch ionisierende Strahlung in Kombination mit dem spezifischen PKC-d Inhibitor Rottlerin.....	36
3.3.3 Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Strahlung in Kombination mit EGFR-Inhibitoren.....	37
3.3.4 Phosphorylierung von AKT nach Bestrahlung und Behandlung mit dem spezifischen PI3-Kinase Inhibitor LY294002	38
3.3.5 Phosphorylierung von ERK1/2 (MAPK) nach Bestrahlung und Behandlung mit dem spezifischen MEK Inhibitor PD98059	39
3.3.6 Phosphorylierung von P38-MAPK nach Bestrahlung und Behandlung mit dem spezifischen P38 Inhibitor SB203580	40
3.4 Interaktionen potentieller Signalwege zur COX-2 Expression.....	41
3.4.1 Interaktion von P38 MAPK und PI3-Kinase-AKT Signalweg	42
3.4.2 Interaktion von PI3-Kinase-AKT Signalweg und P38 MAPK	43
3.4.3 Interaktion von PKCd und P38 MAPK Signalweg.....	43
4. Diskussion	45
4.1 COX-2 und Celecoxib in der Strahlentherapie.....	45
4.2 COX-2 - Signalinduktion und Signalwege	50
5. Zusammenfassung	56
6. Abkürzungen	58
7. Literaturverzeichnis	57

1. Einleitung

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts erkranken in Deutschland jedes Jahr ca. 400 000 Menschen an Krebs. Etwa die Hälfte der Krankheitsverläufe endet tödlich. Somit ist Krebs, nach den Herz-Kreislauferkrankungen, die zweithäufigste Todesursache. Dabei ist Prostatakrebs die am häufigsten auftretende Krebsart beim Mann, während bei Frauen in den meisten Fällen Brustkrebs diagnostiziert wird. Die stetig steigenden statistischen Werte für Krebsneuerkrankungen werden zum einen dadurch erreicht, dass in den letzten Jahrzehnten die Krebsdiagnostik stetig verbessert wurde, zum anderen spielen negative Umwelteinflüsse und Lebensgewohnheiten, vor allem der Zigarettenkonsum, eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu der ständig ansteigenden Zahl der Neuerkrankungen ist die Sterberate bei Krebspatienten in den letzten Jahren jedoch konstant geblieben. Diese positive Tendenz ist vor allem auf eine bessere Diagnostik und neue Ansätze in der Therapie zurückzuführen. Für die Zukunft ist zu erwarten, dass das zunehmende Verständnis der molekularen Signalwege in Tumorzellen zu weiteren Fortschritten in der Tumorthherapie führt.

Die Behandlung von Tumoren erfolgt in den allermeisten Fällen durch einen chirurgischen Eingriff, durch Strahlen- oder Chemotherapie, sowie durch die Kombination der verschiedenen Behandlungen. Im Laufe einer Tumorbehandlung erhält ca. die Hälfte der Patienten eine Strahlentherapie. Häufig wird die Strahlentherapie ergänzend nach einem chirurgischen Eingriff eingesetzt um das Entstehen neuer Tumore zu verhindern oder verbliebene Tumorzellen im umliegenden Gewebe zu zerstören. Der Vorteil der Bestrahlung, im Vergleich zur Chemotherapie, liegt darin, dass gezielt diejenigen Bereiche behandelt werden können, in denen verbliebene Tumorzellen vermutet werden.

Das zytotoxische Potential der ionisierenden Strahlung liegt in der Schädigung der DNA durch Strangbrüche. Dabei gibt es verschieden Arten von DNA-Strangbrüchen. Zum einen sind es Einzelstrangbrüche, zum anderen Doppelstrangbrüche, die durch die Bestrahlung induziert werden. In einer durchschnittlichen Säugerzelle entstehen bei der Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy ca. 40 Doppelstrang-, sowie 1000 Einzelstrangbrüche und 2700 Basenschäden (Ward, 1995). Eine weitere Folge der Bestrahlung ist die Entstehung freier Radikale, welche die DNA durch Depurinierung oder durch Bildung von Thymidindimeren schädigen können. Die freien Radikale greifen ebenfalls Membranlipide an und stören den

Membrantransport. Die Störung der Membranfunktion kann, unabhängig von der Schädigung der DNA, ebenfalls zum Zelltod führen (Riley, 1994).

Tumore kennzeichnen gegenüber gesundem Gewebe Veränderungen bei der Wachstumskontrolle bzw. Apoptose der Zellen und den damit verbundenen Signalwegen. In der aktuellen Forschung ist die Untersuchung molekularer Ziele Z für die Behandlung von Tumoren sowie das Verständnis der betreffenden Signalwege in der Zelle eines der wichtigsten Aufgabengebiete. Ein entscheidender Schritt hierbei ist, Unterschiede zwischen Tumorzellen und gesundem Gewebe zu erkennen und für die Therapie zu nutzen.

Die aktuelle Forschung konzentriert sich dabei auf molekulare Ziele in der Zelle, die z.B. die Zellproliferation oder die Angiogenese in Tumoren fördern. Von großem Interesse sind auch molekulare Targets, die damit in Verbindung gebracht werden in Tumoren Resistenzen gegen Bestrahlung zu induzieren. Im Bereich der Strahlentherapie können diese molekularen „Targets“ das Ziel einer verbesserten Tumorthherapie sein. Das Ziel ist es die Strahlensensitivität der Tumoren durch geeignete Maßnahmen zu erhöhen, um die benötigte Strahlendosis verringern zu können und somit die Belastung des gesunden Gewebes durch Strahlenschäden zu senken. Vielversprechende Targets, die hierfür in Frage kommen, und zum Teil schon in klinischen Studien getestet werden, sind unter anderem EGFR, KGF, TGF- β , VEGFR und COX-2 (Baumann *et al.*, 2004).

1.1 Cyclooxygenase 2

Ein wichtiges molekulares Ziel in der Strahlentherapie ist das Protein Cyclooxygenase 2 (COX-2, Prostaglandine G/H Synthase). COX-2 ist eine von drei Isoformen des Proteins. Während COX-1 überwiegend generelle physiologische Prozesse übernimmt und permanent in der Zelle vorliegt, ist COX-2 eine induzierbare Form, die durch verschiedene Stimulansien aktiviert werden kann. Eine dritte Isoform, COX-3, die eine Splicevariante von COX-1 darstellt, wurde im Gehirn eines Hundes nachgewiesen. Über eine mögliche Funktion von COX-3 im Menschen ist bisher allerdings noch nichts bekannt (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

Die Cyclooxygenasen spielen eine Schlüsselrolle bei der Synthese von Prostaglandinen und Thromboxanen aus Arachidonsäure (Herschman, 1996). Prostaglandine sind hormonähnliche

Eicosanoide und können sowohl autokrine als auch parakrine Signale übermitteln. Sie sind mitverantwortlich für verschiedene physiologische, sowie für pathologische Prozesse. Zu diesen Prozessen zählen unter anderem Entzündungsreaktionen, Knochenentwicklung und gesteigerte Schmerzempfindlichkeit (Hyperalgesie), sowie die Integrität der Magenschleimhaut, die Nierendurchblutung und die Aggregation der Blutplättchen (Levy, 1997; Smith *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2000b). Die Prostaglandine wirken über G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die vier EP-Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind an verschiedene Signaltransduktionswege gebunden (Hata & Breyer, 2004). Die Bindung einiger Prostaglandine an die EP-Rezeptoren EP2 und EP4 kann zudem einen positiven feedback loop nach sich ziehen (Bradbury *et al.*, 2003; Jabbour *et al.*, 2005). Die Synthese der Prostaglandine erfolgt durch Hydrolyse von Membran-Phospholipiden durch die Phospholipase A. Die entstandene freie Arachidonsäure wird durch COX oxidiert und es entsteht ein instabiles Zwischenprodukt, das Prostaglandin G_2 . Das PGG_2 wird in einem zweiten Schritt durch die Peroxidase Aktivität von COX zu Prostaglandin H_2 umgewandelt. PGH_2 ist das Ausgangsmolekül für verschiedene Prostaglandine, Thromboxane und andere Prostanoiden (Smith *et al.*, 2000b).

COX-2 rückte in den Blickpunkt nachdem eine Studie der American Cancer Society gezeigt hatte, dass die Einnahme von Aspirin über einen längeren Zeitraum das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, senkt (Thun *et al.*, 1991). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass COX-2 in einer großer Anzahl von Tumoren überexprimiert wird. Darunter befinden sich Tumoren der Prostata, der Brust, der Lungen, der Haut und des Dickdarms (Gupta *et al.*, 2000; Masferrer *et al.*, 2000; Soslow *et al.*, 2000; Subbaramaiah *et al.*, 2002; Uotila *et al.*, 2001). Diese Überexpression korreliert mit einer erhöhten Metastasenbildung und einer schlechten Prognose für den Patienten (Kim *et al.*, 2002b). Weiter konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression von COX-2 mit einer verminderten Apoptoserate in Verbindung steht. Die Regulation der Apoptose ist zelltypspezifisch und abhängig von der Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren (Smith *et al.*, 2000a). Für die Apoptose werden zwei Hauptsignalwege beschrieben. Ein Signalweg beschreibt die Einleitung der Apoptose über den „Death Receptor“ Signalweg, bei dem der Fas-Rezeptor eine maßgebliche Rolle spielt. Der Zweite zeigt die Regulation der Apoptose über einen mitochondrialen Signalweg. Bei der Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Signalweg wird Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma der Zelle abgegeben. Dieser Schritt wird durch die bcl-2 Familie reguliert. Die bcl-2 Familie kann in zwei Gruppen unterteilt werden, zum einen in die

antiapoptotischen Proteine bcl-XL und bcl-w, zum anderen in die apoptotischen Proteine bax und bak (Cummings *et al.*, 2004). COX-2 synthetisierte Prostaglandine können die Apoptoserate reduzieren, indem sie den mitochondrialen Apoptosesignalweg inhibieren. Diese Inhibition zeigt sich in einer verminderten Freisetzung von Cytochrom c und der daraus resultierenden Abnahme der Caspase-9 und Caspase-3 Aktivierung. Zudem erfolgt eine Hochregulierung von bcl-2 (Wang *et al.*, 2005). Weiter wird beschrieben, dass eine Überexpression von COX-2 zu einer Inhibition der Expression des Death Receptors 5 (DR-5) führen kann. Dies hat eine verminderte Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) vermittelte Apoptose zur Folge (Tang *et al.*, 2002). Ein Zusammenhang der COX-2 Expression wurde für verschiedene Tumoren gezeigt, wie zum Beispiel Hirntumoren, Ösophaguskarzinome, Tumore der Lunge oder der Prostata (Hida *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2000; Tanji *et al.*, 2000).

Ein wichtiger Faktor für die Tumorgenese ist die Angiogenese. Das Wachstum solider Tumoren und die Bildung von Metastasen sind abhängig von der Bildung neuer Blutgefäße (Folkman, 1995). Die Angiogenese kann von den Zellen selbst gesteuert werden, indem sie spezielle Wachstumsfaktoren ausschütten. Der wahrscheinlich wichtigste Faktor für die Angiogenese ist der Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF (Marme, 1996). Weitere Faktoren die Induktion der Angiogenese sind der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Interleukin-8, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Prostaglandine (PGE₂, PGI₂). Neuere Daten geben Hinweis darauf, dass VEGF ein downstream Effektor für die COX-2 induzierte Angiogenese sein könnte. Es wurde gezeigt, dass PGE₂ die Expression von VEGF stimulieren kann (Tjiu *et al.*, 2006; Wang & DuBois, 2004). Aus einer älteren Untersuchung von (Daniel *et al.*, 1999) geht hervor, dass das COX-2 Produkt Thromboxan A₂ einen Aktivator für die Angiogenese darstellen könnte.

Neben der Angiogenese spielt auch die Migration von Tumorzellen bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle. Die COX-2 Expression wird auch mit der Metastasenbildung von Tumoren bzw. der Migration von Tumorzellen in umliegende Gewebe in Verbindung gebracht. Es zeigte sich, dass Darmkrebszellen, die mit COX-2 transfiziert wurden, eine erhöhte Invasivität aufwiesen. Dieser Umstand wurde von einer erhöhten Aktivität der Metalloproteinase MMP-2 begleitet (Tsujii *et al.*, 1997). Die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sind Gelatinasen und ermöglichen die Invasivität und die Migration von Zellen durch Degradation der zellulären Matrix (Yao *et al.*, 2004). Die Zellmigration und Invasivität von LS174T Zellen

wird durch PGE₂-induzierte Transaktivierung des EGFR reguliert (Buchanan *et al.*, 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch einen Antagonisten des EP4 Rezeptors die Bildung von Metastasen bzw. die Proliferation inhibiert werden konnte (Ma *et al.*, 2006).

Weitere Punkte bei der Tumorgenese sind die Überexpression von COX-2 in chronischen Wunden, sowie die Suppression der Immunantwort durch COX-2 synthetisiertes PGE₂ (Balch *et al.*, 1984; Weitzman & Gordon, 1990). In normalem Gewebe erkennt das Immunsystem entartete Zellen und zerstört sie. Tumorzellen sezernieren Faktoren, die dazu führen, dass Monozyten und Makrophagen zur Synthese von PGE₂ angeregt werden. Dieses PGE₂ kann die Produktion von Lymphokinen, die T- und B-Zellproliferation des Immunsystems und die natürlichen Killerzellen inhibieren. PGE₂ inhibiert zudem die Produktion von TNF und induziert IL-10, was ebenfalls zu immunsuppressiven Effekten führt (Kambayashi *et al.*, 1995).

1.2 COX-2 Induktion

Cyclooxygenase-2 wird unterschiedlichen Geweben exprimiert. Die Induktion der Expression kann durch viele verschiedene Stimulansien angeregt werden. Die Art der Stimulation ist abhängig vom jeweiligen Gewebe. COX-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und kann durch Lipopolysaccharide oder verschiedene Mediatoren der Immunantwort induziert werden. Zu diesen Mediatoren zählen z.B. das Macrophage-activating Lipopeptide-2 (MALP-2), Leukotrine, Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interferon γ oder Interleukinen (IL), wie IL-1 β , IL-6 oder IL-15 (Asano *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 1993; Mitsunari *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2004; Wikstrom *et al.*, 2003). Ebenso kann die COX-2 Expression durch Faktoren induziert werden, welche mit der Angiogenese in Verbindung stehen, z.B. Hypoxie oder VEGF (Timoshenko *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Eine weitere Substanz, die als Mediator für die Angiogenese, Proliferation, sowie für Entzündungsreaktionen gilt, ist Sphingosine-1-Phosphate (S1P). S1P ist in der Lage COX-2 zu induzieren (Kitano *et al.*, 2006). Die vielfältigen Möglichkeiten zur Induktion von COX-2 lassen sich noch um einige Substanzen erweitern. So wurde nachgewiesen, dass verschiedene chemische Verbindungen im Rauch von Zigaretten, speziell Nikotin, COX-2 induzieren können. Nikotin steht zudem im Verdacht die Angiogenese zu fördern, sowie die Invasivität und Metastasenbildung von Tumoren zu verstärken (Martey *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005a). Eine interessante Beobachtung bei hormonabhängigen Tumoren ist, dass auch

Östrogen COX-2 zu induzieren kann. Das von COX-2 synthetisierte, PGE₂ kann die Östrogensynthese regulieren (Brodie *et al.*, 2001; Tamura *et al.*, 2002). Des Weiteren kann in Osteoblasten COX-2 auch durch extrazelluläre Ca²⁺ Ionen induziert werden, die in Verbindung mit Zellwachstum und Proliferation stehen (Choudhary *et al.*, 2003; Rodriguez-Mora *et al.*, 2005). Eine weitere Stoffgruppe, die die Expression von COX-2 induzieren kann sind die Phorbolster. Dazu gehören z.B. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) oder 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetat (TPA) (Chang *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2004). Die Einbindung von COX-2 in Prozesse der Proliferation zeigt sich auch dadurch, dass verschiedene Wachstumsfaktoren, wie der Epidermal Growth Factor (EGF) oder der Transforming Growth Factor β die Fähigkeit besitzen, COX-2 zu induzieren (Hiraga *et al.*, 2006; Huh *et al.*, 2003; Slice *et al.*, 2003). Ein wichtiger Aspekt für die Strahlentherapie ist, dass COX-2 nicht nur durch Wachstumsfaktoren, sondern auch durch ionisierende Strahlung induziert werden kann. Das COX-2 synthetisierte PGE₂ kann zur Radioprotektion von Zellen beitragen (Ashida *et al.*, 2003; Buckman *et al.*, 1998; Choy & Milas, 2003; Mahns *et al.*, 2004; Steinauer *et al.*, 2000).

1.3 Signalwege zur COX-2 Expression

Die Induktion von COX-2 kann über verschiedene Signalwege erfolgen, die durch unterschiedliche Rezeptoren aktiviert werden. Die jeweiligen Rezeptoren und Signalwege sind gewebeabhängig (Chang *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003). Rezeptoren, die in die COX-2 Induktion eingebunden sein können, sind z.B. der IL-1 β -Rezeptor, der TNF-Rezeptor 1, die EP-Rezeptor und der EGF-Rezeptor (Ashida *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Riehl *et al.*, 2004; Rosch *et al.*, 2005). In den meisten Fällen verläuft die weitere Signaltransduktion über einen Signalweg der Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)-Signalwegfamilie. Die MAPK Signalwege können durch verschiedene Liganden sowie durch Bestrahlung aktiviert werden. Die MAPK Signalwegfamilie kann in den p38 MAPK-, den JNK-, den ERK-Signalweg und den PI3-Kinase Signalweg aufgeteilt werden. Der p38 MAPK Signalweg kann durch zellulären Stress aktiviert werden. Über die Aktivierung durch ionisierende Strahlung gibt es keine einheitlichen Aussagen. Die Rolle des p38 Signalwegs kann abhängig vom Gewebe und der Art der Stimulierung unterschiedlich sein. Es wurde gezeigt, dass sowohl Apoptose, als auch verstärktes Wachstum und erhöhtes Überleben über den p38 Signalweg vermittelt werden können (Juretic *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002a; Lin *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000; Yosimichi *et al.*, 2001). Ähnlich wie der p38

MAPK Signalweg, kann auch der JNK-Signalweg sowohl durch zellulären Stress, als auch durch UV- und ionisierende Strahlung aktiviert werden. Durch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-jun via JNK können AP-1 Enhancer-Elemente transaktiviert werden. AP-1 Bindesequenzen finden sich in den Promotor-Regionen verschiedener Gene. Unter anderem findet sich auch in der Promotor-Region von COX-2 eine Bindestelle für AP-1 (Davis, 1999; Subbaramaiah *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1998). Ein weiterer Signalweg aus der MAPK Signalwegfamilie, über den die Induktion von COX-2 erfolgen kann, ist der ERK-Signalweg. Die Regulation von ERK erfolgt durch RAF und MEK. Am Ende der Signaltransduktionskette steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB, AP-1 oder NF- κ B (Chang *et al.*, 2005; Dent *et al.*, 2003; Riccio *et al.*, 1999). Ein weiterer wichtiger Signalweg aus der MAPK-Familie, der bei der Induktion von COX-2 berücksichtigt werden muss, ist der Phosphatidyl inositol 3 Kinase (PI3K)-Weg. Die PI3-Kinase Kaskade verläuft über PDK1 zu AKT. Der PI3-Kinase/AKT Signalweg spielt eine Rolle bei der Weiterleitung antiapoptotischer Signale und steht in Verbindung mit Radioresistenz. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade können downstream von AKT weitere Kinasen phosphoryliert werden, darunter Isoformen der Protein Kinase C (PKC), mTOR, GSK-3. Als ein weiteres downstream Ziel des PI3-Kinase/AKT Signalweges kann der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert werden (Dent *et al.*, 2003; Toulany *et al.*, 2005).

In der Promotorregion von COX-2 finden sich Bindesequenzen für die Transkriptionsfaktoren CREB, AP-1 und NF- κ B (Inoue & Tanabe, 1998; Subbaramaiah *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2002). Diese Transkriptionsfaktoren können durch verschiedene Signalwege der MAPK-Signalwegfamilie aktiviert werden.

1.4 Selektive COX-2 Inhibitoren - Celecoxib

COX-2 ist in vielen Tumoren überexprimiert und korreliert mit einer schlechten Prognose und einem schlechtem Ansprechen auf gängige Tumorbehandlungen, einschließlich der Strahlentherapie (Choy & Milas, 2003; Kim *et al.*, 2002b). Daher könnte die selektive Inhibition von COX-2 einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei der Behandlung von Tumoren sein. Die spezifische Inhibition von COX-2 hat den Vorteil, dass die durch COX-1 gesteuerten Funktionen, wie die Nierendurchblutung und die Integrität der Magenschleimhaut, nicht beeinflusst werden. Auf die Verwendung von COX-2 Inhibitoren wie Celecoxib in der Tumorbehandlung wurde man nach Studien aufmerksam, die zeigten,

dass die Behandlung mit selektiven COX-2 Inhibitoren, die Polypenbelastung bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis deutlich reduzierte (Oshima *et al.*, 1996; Steinbach *et al.*, 2000). In weiteren Untersuchungen hat sich zudem gezeigt, dass die Behandlung mit Celecoxib die Proliferation und das Wachstum von Tumoren verschiedener Gewebe reduziert. Die antiproliferative Wirkung von Celecoxib und anderen COX-2 Inhibitoren kann dabei unabhängig von COX-2 sein. So konnte nachgewiesen werden, dass Celecoxib durch Induktion der Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren p21^{waf1/cip1} und p27^{kip1} einen Zellzyklusarrest induzieren kann (Han *et al.*, 2004; Han & Roman, 2006; Srinath *et al.*, 2003). Für die reduzierte Proliferation nach Behandlung mit Celecoxib, gibt es noch weitere COX-2 unabhängige Mechanismen. Dazu zählt die Blockade der AKT Phosphorylierung durch PDK-1 (Arico *et al.*, 2002; Kulp *et al.*, 2004). Die Inhibition der Phosphorylierung von AKT steht auch in Zusammenhang mit der Celecoxib induzierten Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass es neben der Inaktivierung von AKT auch zu einer Translokation von proapoptotischem Bax, einer Ausschüttung von Cytochrom c und einer Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 9 kommen kann. Zudem wurde nachgewiesen, dass antiapoptotisches Bcl-2 und Bcl-XL reduziert wird (Nam *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Neben der Reduktion der Proliferation ist auch die Inhibition der Angiogenese ein Ziel der Tumorthherapie. Es wurde gezeigt, dass selektive COX-2 Inhibitoren, darunter auch Celecoxib, die Angiogenese hemmen können (Davis *et al.*, 2004; Klenke *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2003). Die Inhibition der Angiogenese kann ihre Ursache darin haben, dass Celecoxib zum Teil die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der damit verbundenen Proteine verhindern kann. Neben NF- κ B kann auch die durch TNF induzierte Aktivierung von JNK, p38 MAPK und ERK durch Celecoxib inhibiert werden.

Für die Strahlentherapie spielen NSAIDs (non steroid antiinflammatory drugs) eine interessante Rolle, da sie in bestimmten Tumoren die Strahlensensitivität erhöhen können. Die gesteigerte Strahlensensitivität kann verschieden Ursachen haben, die sowohl COX-2 abhängig als auch unabhängig sein können (Basu *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2004). Zum einen wird durch die Behandlung mit Celecoxib oder einem anderen selektiven COX-2 Inhibitor, die Synthese des radioprotektiv wirkenden PGE₂ inhibiert (Davis *et al.*, 2004; Kishi *et al.*, 2000). Andere, COX-2 unabhängige Mechanismen, die zur Strahlensensitivierung durch Behandlung mit Celecoxib führen, zielen auf die Regulation des Zellzyklus durch Celecoxib (Cui *et al.*, 2005; Grosch *et al.*, 2001; Kardosh *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2005; Takada *et al.*, 2004). Celecoxib kann den durch Bestrahlung induzierten Zellzyklusarrest in der G2-M Phase

aufheben. Die Zelle hat die Möglichkeit die Mitose zu vollenden und stirbt im Anschluss daran (Shin *et al.*, 2005b). Ein weiterer COX-2 unabhängiger Mechanismus, der durch Behandlung mit Celecoxib zur einer erhöhten Strahlensensitivität führen kann, ist der Eingriff in die DNA-Reparatur. So konnte gezeigt werden, dass Celecoxib die Expression von Ku70 herunterreguliert und die Kinaseaktivität der DNA-PK reduziert. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Zudem zeigte sich, dass Celecoxib die DNA Bindung des Ku/DNA-PK Komplexes reduziert (Nakata *et al.*, 2004; Raju *et al.*, 2005).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der COX-2 Expression in der Determination der zellulären Strahlensensitivität in Prostatakarzinomzellen zu untersuchen. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung von Signalwegen, die bei strahleninduzierten Expression von COX-2 von Bedeutung sind. Dabei spielen vor allem die Signalwege der MAPK-Signalwegfamilie eine große Rolle.

Dementsprechend wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Besitzt die Behandlung mit dem spezifischen COX-2 Inhibitor Celecoxib radiosensitivierende Wirkung auf Prostatakarzinomzellen?
2. Welche Signalwege sind in strahleninduzierte COX-2 Expression involviert?
3. Welche Rolle spielt dabei der EGF-Rezeptor?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Merck, Fluka, Roth, Sigma-Aldrich oder Pharmacia Biotech erworben. Der Kaleidoscope prestained standards Marker für die SDS-PAGE wurde bei Bio-Rad gekauft. LipofectamineTM 2000 für die Transfektion von Zellen mit siRNA stammt von Invitrogen.

2.1.2 weitere Materialien

ECL-Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinnachweis Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
PVDF 0,2µm Membran	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Röntgenfilm	Agfa-Gevaert, Belgien
Sterilfilter 0,2µm	Sartorius, Hannover, Deutschland
Zellkulturgefäße	Becton Dickinson, UK

2.1.3 Kits

Das Prostaglandin E2 EIA-Kit zur Bestimmung der COX-2 Aktivität wurde bei Cayman-Chemicals erworben.

2.1.4 Geräte

ELISA-Reader	Anthos Labtec, Salzburg, Österreich
Gel-Elektrophorese Kammer	Hofer, USA
Röntngenerator (RS-225)	Gulmay, England
Zentrifugen	Eppendorf, Deutschland

2.1.5 Lösungen

<u>Blotting-Puffer (Anode)</u>	3,1 g Borsäure
	20% Methanol
	4 ml SDS (10%)
	ad. 1 l H ₂ O
	pH 9
<u>Blotting-Puffer (Kathode)</u>	3,1 g Borsäure
	5% Methanol
	4 ml SDS (10%)
	ad. 1 l H ₂ O
	pH 9
<u>Coomassie^R blue Färbelösung</u>	50% Methanol
	10% Eisessig
	0,25% Coomassie ^R
<u>Laufpuffer</u>	72,05 g Glycin
	15,15 g Tris-Base
	5 g SDS
	ad 5 l H ₂ O
<u>Lysepuffer</u>	50 mM Tris-HCl pH 7,5
	150mM NaCl
	10% Glycerin
	1% Tween 20
	1 mM NaF
	50 mM Glycerophosphat
	1 mM NaVO ₄
	1 mM DTT
	1% Phosphatse Inhibitor
	Protease Inhibitor (Roche, Mannheim)
<u>PBS</u>	13.7 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	80.9 mM Na ₂ HPO ₄
	1.5 mM KH ₂ PO ₄

<u>Probenpuffer (4x)</u>	2,5 ml	Sammelpuffer (4x)
	1 ml	SDS (20%)
	4 ml	Glycerin
	0,5 ml	β-Mercaptoethanol
	0,25 mg	Bromphenol Blau
	ad 10 ml	H ₂ O
<u>Sammelpuffer</u>	6,06 g	Tris-Base
	2 ml	SDS (20%)
	ad 100 ml	H ₂ O
		pH 6,8
<u>TBS</u>	10 mM	Tris-HCl
	100 mM	NaCl
	0,05%	Tween20
		pH 7,5
<u>Trennpuffer</u>	18,17 g	Tris-Base
	2 ml	SDS (20%)
	ad 100 ml	H ₂ O
		pH 8,8

2.1.6 Inhibitoren

Zur Untersuchung strahleninduzierter Signaltransduktion wurden folgende Inhibitoren verwendet.

AG 1478	EGFR Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
BIBX1382BS	EGFR Inhibitor	Boehringer Ingelheim, Österreich
Celecoxib	COX-2 Inhibitor	Pharmacia-Pfizer
LY 294002	PI3-Kinase Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
PD 98059	MEK Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Rottlerin	PKCδ Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
SB 202190	p38 MAPK Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
SB 203580	p38 MAPK Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
SP 600125	JNK Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland

2.1.7 Antikörper

Folgende Antikörper wurden bei der Immundetektion der Western-Blot Experimenten verwendet.

Primärer Antikörper	Herkunft	Hersteller
Actin	Kaninchen, monoclonal	Sigma
AKT	Maus, monoclonal	BD, Transduction Laboratories
Caspase 3	Maus, monoclonal	Cell Signaling
Cleaved Caspase-3	Kaninchen, polyclonal	Cell Signaling
COX-2	Maus, monoclonal	Cayman Chemical
ERK1/2	Kaninchen, polyclonal	Promega
p38 MAPK	Maus, monoclonal	Cell Signaling
p-AKT/PKB (Ser-472/3)	Maus, monoclonal	BD Pharmingen
p-ATF-2 (Thr71)	Kaninchen, polyclonal	Cell Signaling
p-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204)	Kaninchen, polyclonal	Promega
p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Maus, monoclonal	Cell Signaling
<u>Sekundärer Antikörper</u>		
anti Maus	Esel	Amersham Pharmacia Biotech
anti Kaninchen	Schaf	Amersham Pharmacia Biotech

2.1.8 Zellkultur-Medium

Für die Kultivierung von MDA-MB 231 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco verwendet. Das Medium enthielt zusätzlich 44.04 mM NaHCO₃. PC-3 und DU145 Zellen wurden in RPMI-1640 Medium von Gibco kultiviert. Dem Medium wurden zusätzlich mit 26.8 mM NaHCO₃ zugegeben. Zudem wurden beiden Medien, sowohl DMEM als auch RPMI-1640, 10% fetales Kälberserum zugegeben.

2.1.9 Zelllinien

In den Versuchen wurden folgende etablierte Zelllinien verwendet.

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
DU145	Prostatakarzinom	ATCC, HTB-81
MDA-MB 231	Brustadenokarzinom	ATCC, HTB-26
PC-3	Prostataadenokarzinom	ATCC, CRL-1435

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellen wuchsen in einem Brutschrank (Heraeus, Binder) bei 37°C und 7% CO₂. Die Zelllinien DU145 und PC-3 wurden in RPMI-1640, MDA-MB231 Zellen in DMEM Medium kultiviert. Alle Medien enthielten 10% FCS.

2.2.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellkulturen erfolgte mit Röntgenstrahlung und wurde mit dem Gulmay RS225 Röntgenerators durchgeführt. Die Dosisleistung betrug 3 Gy/min.

2.2.3 Behandlung mit Inhibitoren

Die Behandlung der Zellen mit den COX-2 Inhibitoren Celecoxib erfolgte 24 Stunden vor der Bestrahlung.

Zur Untersuchung strahleninduzierter Signalwege wurden die Zellen mit entsprechenden Inhibitoren behandelt. Die Behandlung erfolgte 1 Stunde vor Bestrahlung in serumfreien Medium. Die Inhibitoren verblieben, bis zum Zeitpunkt der Lyse der Zellen, im Medium.

2.2.4 Wachstumstest

Zur Bestimmung der Wachstumsrate nach fraktionierter Behandlung wurde die Zellzahl über einen Zeitraum von 5 Tagen bestimmt. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der ersten Messung mit Celecoxib vorbehandelt und im Anschluss daran mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte 6 Stunden nach der Bestrahlung mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer. Die Analyse erfolgte an Hand einer Wachstumskurve.

2.2.5 Koloniebildungstest

Um das klonogene Überleben nach Behandlung zu untersuchen, wurden je 1000 Zellen in Ø100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Nach 10 Tagen wurden die Kulturschalen mit Coomassie gefärbt. Kolonien mit mehr als 50 Zellen wurden gezählt und das klonogene Überleben an Hand der Anwachsrate der unbehandelten Kontrolle berechnet.

2.2.6 Flow Zytometrie

Zur Bestimmung der Apoptoserate der Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen, wurde eine Zellzyklusanalyse nach einem Standardprotokoll von Ohneseit *et al.* durchgeführt. Der Anteil der Zellen in der sub-G1 Phase entspricht der Apoptoserate.

2.2.7 Methoden zur Analyse von Proteinen (Western-Blot)

2.2.7.1 Lyse der Zellen

Zur Lyse der Zellen wurden sie zuerst mit PBS gewaschen und anschliessend mit einem Zellschaber von dem Kulturgefäss abgelöst und in ein Reaktionsgefäss überführt. Im Anschluss wurde eine Ultraschallbehandlung durchgeführt. Die Lysate wurden mit 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.7.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Kits zur quantitativen Proteinbestimmung von Bio-Rad gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurde eine BSA-Lösung mit definierter Konzentration verwendet.

2.2.7.3 Trennung der Proteine mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung der Proteine wurden 100 µg Protein mit Probenpuffer versetzt und für 5 min. in kochendem Wasser erhitzt. Die SDS-PAGE erfolgte nach Protokoll von Sambrook *et al.*

2.2.7.4 Blotten der Proteine

Für die Immundetektion wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte in einem Semi-Dry Blotter bei 0,8 mA/cm² Gelfläche über einen Zeitraum von 2 Stunden. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran im Anschluss an den Transfer mit Ponceau S gefärbt.

2.2.7.5 Immunoblot-Detektion

Die Untersuchung der Proteine von Interesse erfolgte durch Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden wurde die Membran zunächst 1 Stunde bei RT in 5 % Trockenmilch vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper bei 4°C über Nacht. Danach wurde die Membran 3x5 min mit TBST gewaschen. Der Nachweis der Antikörper-Protein Bindung wurde durch

eine Lumineszenz-Reaktion mit einem HRC-gekoppelten sekundären anti-IgG-Antikörper durchgeführt. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

2.2.8 Densitometrie

Die densitometrische Analyse der Western-Blots wurde mit Hilfe einer Computer-Software von Scion Image durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion der COX-2 Expression und Aktivität durch ionisierende Strahlung in Prostatakarzinomzelllinien

Die Expression von COX-2 ist in vielen Tumorentitäten erhöht. Um zu untersuchen, ob die COX-2 Expression bzw. die PGE₂-Synthese in Prostatakarzinomen durch Bestrahlung mit ionisierender Strahlung induziert werden kann, wurden Western-Blot Analysen mit den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 durchgeführt. Ergänzend zu der Proteinexpression wurde die Aktivität von COX-2 bzw. die PGE₂-Synthese durch ELISA nachgewiesen. Überdies wurden Experimente durchgeführt um Expression von COX-2 nach kombinierter Behandlung mit dem spezifischen COX-2 Inhibitor Celecoxib und Bestrahlung zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden vor der Bestrahlung mit Celecoxib behandelt und die Induktion von COX-2 in Abhängigkeit der Strahlendosis und des zeitlichen Verlaufes untersucht.

3.1.1 Dosisabhängigkeit der COX-2 Expression in Prostatakarzinomzelllinien

Um die COX-2 Expression in Abhängigkeit der Strahlendosis zu untersuchen, wurden die Zellen mit Strahlendosen zwischen 2 und 15 Gy behandelt. Zudem wurde die COX-2 Expression in Kombination mit Celecoxib beobachtet. Die Behandlung mit Celecoxib (10µM) erfolgte 24 Stunden vor der Bestrahlung. Die Zellen wurden 14 Stunden nach der Bestrahlung lysiert und die COX-2 Expression mittels Western-Blot Analyse untersucht. Die Bestimmung der COX-2 Aktivität wurde mit einem PGE₂-ELISA nachgewiesen.

In der Zelllinie PC-3 konnte nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 2 und 10 Gy kein Anstieg der COX-2 Expression beobachtet werden. Nur nach Bestrahlung mit 15 Gy war eine schwache Steigerung der Expression zu erkennen. Auffällig war jedoch der Anstieg der Expression von COX-2 nach Behandlung mit Celecoxib alleine, sowie in Kombination mit Bestrahlung. Der beobachtete Anstieg der Expression nach kombinierter Behandlung mit Celecoxib und Bestrahlung war unabhängig von der Strahlendosis.

Ein vergleichbares Expressionsmuster von COX-2 ergab sich auch für die Zelllinie Du145. Die Bestrahlung hatte keinen Anstieg der Proteinexpression von COX-2 zur Folge. Nach Behandlung mit Celecoxib alleine und in Kombination mit Bestrahlung war, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, eine deutliche Steigerung der Expression zu erkennen (Abb. 1).

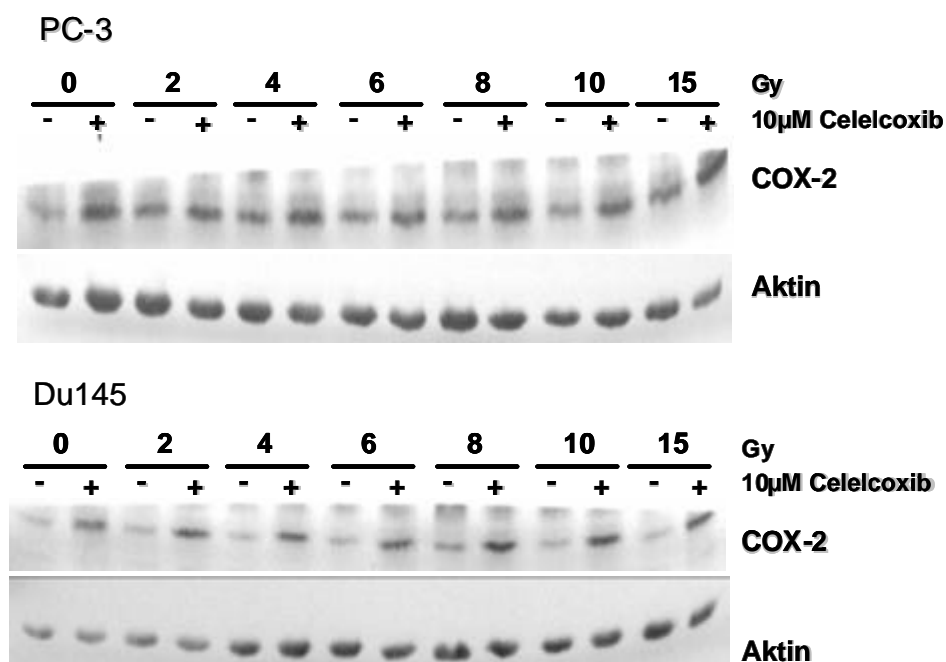


Abb. 1: Induktion der COX-2 Expression durch Bestrahlung mit verschiedenen Dosen in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145.

Western-Blot Analyse der COX-2 Expression in den Zelllinien PC-3 und Du145 nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 2-15 Gy. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Bestrahlung mit Celecoxib behandelt. Das Celecoxib verblieb über den gesamten Zeitraum des Experiments im Medium. Die Lyse der Zellen erfolgte 14 Stunden nach Bestrahlung.

Ungeachtet der Proteinexpression von COX-2, die durch Bestrahlung mit niedrigen Dosen nicht betroffen scheint, konnte eine Steigerung PGE₂-Synthese nach Bestrahlung gemessen werden. Der Anstieg der PGE₂-Synthese in der Zelllinie PC-3, nach Bestrahlung mit mehr als 2 Gy war dosisabhängig. In der Zelllinie Du145 war der PGE₂-Gehalt geringer und es wurde keine lineare Dosisabhängigkeit beobachtet. Der PGE₂-Gehalt in Du145 Zellen erreichte sein Maximum 14 Stunden nach Bestrahlung mit 15 Gy. Er betrug 270 pg/ml. Das entspricht einer Steigerung um den Faktor 3, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Im Vergleich betrug das Maximum der PGE₂-Synthese in PC-3 Zellen 1100 pg/ml, was bezogen auf die unbehandelte Kontrolle einem Anstieg um den Faktor 6 entspricht. Auch die Auswirkung der Celecoxib-Behandlung auf die PGE₂-Synthese war in der Zelllinie Du145 geringer als in der Zelllinie PC-3.

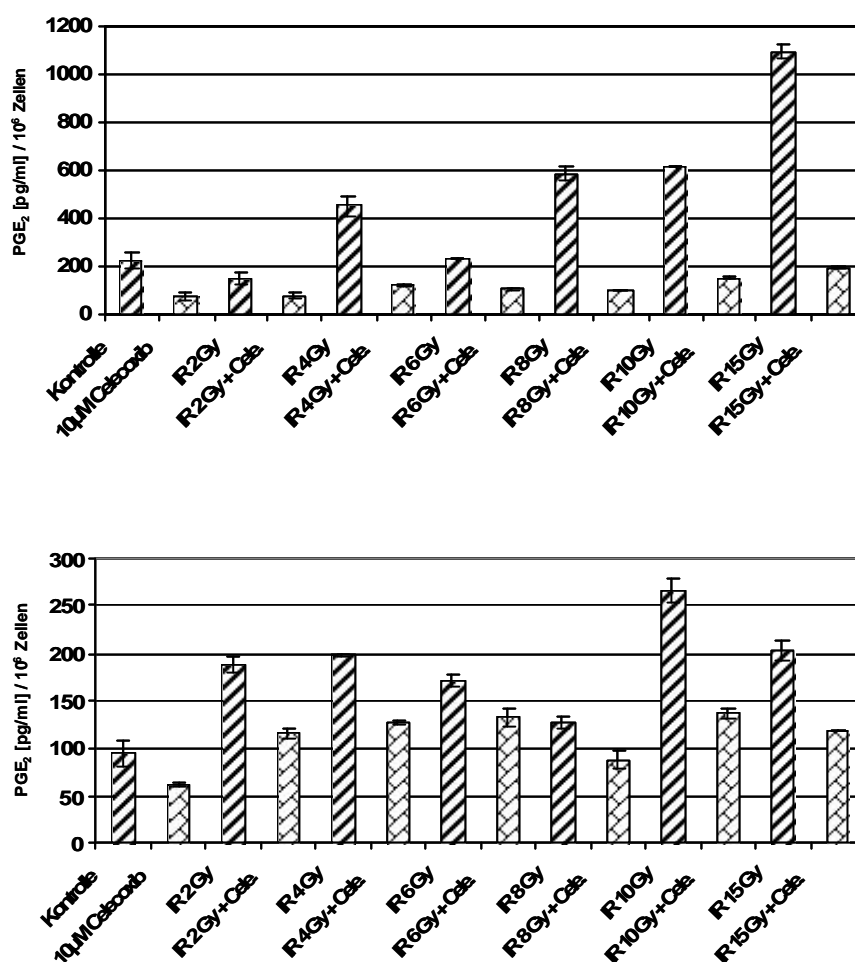


Abb. 2: Die PGE₂-Synthese nach Induktion durch Bestrahlung mit verschiedenen Dosen in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145.

Messung der COX-2 Aktivität in den Zelllinien PC-3 und Du145 nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 2-15 Gy. Die Proben aus dem Medium wurden 14 Stunden nach Bestrahlung entnommen. 30 Min vor der Entnahme der Proben wurden dem Medium 30 μM Arachidonsäure zugegeben. Der PGE₂-Gehalt wurde auf 10⁶ Zellen normalisiert.

3.1.2 Die Zeitabhängigkeit der COX-2 Expression in Prostatakarzinomzelllinien

Zur weiteren Bestimmung der COX-2 Expression nach Bestrahlung und in Kombination mit Celecoxib wurde neben der Ermittlung der Dosisabhängigkeit auch eine Zeitkinetik erstellt. Um die Auswirkungen einer kombinierten Behandlung mit Celecoxib und Bestrahlung auf den zeitlichen Verlauf der COX-2 Expression zu untersuchen, wurden die Zellen 24 Stunden mit Celecoxib (10 μM) vorbehandelt und im Anschluss mit 15 Gy bestrahlt. Die Lyse der Zellen fand 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden nach der Bestrahlung statt.

Die Ergebnisse der Western-Blot Analyse für die Zelllinie PC-3 zeigten, dass die COX-2 Expression auf Proteinebene 6 Stunden nach der Bestrahlung sichtbar erhöht war. Korrelierend mit den Resultaten aus den Experimenten zur Bestimmung der COX-2 Expression in

Abhängigkeit der Dosis, zeigte sich eine Verstärkung des Signals nach Behandlung mit Celecoxib. Die Expression von COX-2 in der Zelllinie Du145 wurde nach Bestrahlung mit 15 Gy über den Zeitraum von 24 Stunden nicht beeinflusst. Aber auch hier konnte ein Celecoxib-abhängiger Anstieg der COX-2 Expression beobachtet werden, unabhängig vom Zeitpunkt nach der Bestrahlung.

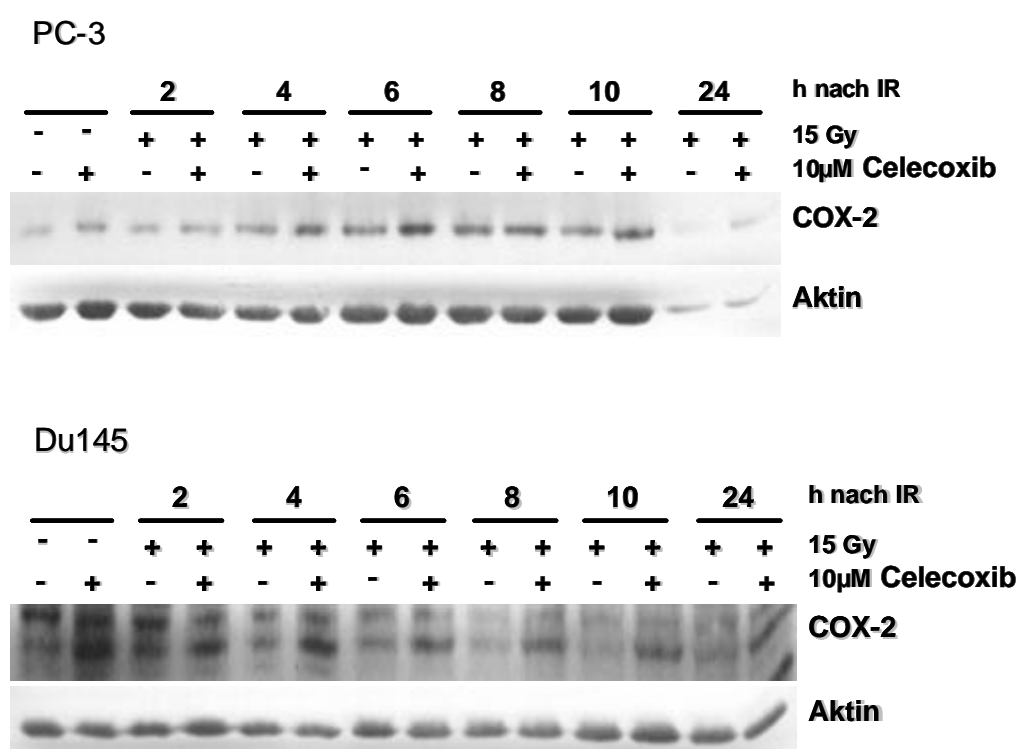


Abb. 3: Induktion der COX-2 Expression nach Bestrahlung mit 15 Gy in Abhängigkeit von der Zeit in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145.

Western-Blot Analyse der COX-2 Expression in den Zelllinien PC-3 und Du145 nach Bestrahlung mit 15 Gy und in Kombination mit Celecoxib-Behandlung (10µM). Die Behandlung mit Celecoxib erfolgte 24 Stunden vor Bestrahlung. Die Lyse der Zellen erfolgte 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden nach Bestrahlung.

Die Untersuchung der COX-2-vermittelten PGE₂-Synthese in der Zelllinie PC-3 ergab eine zeitliche Abhängigkeit zur Bestrahlung. Die PGE₂-Synthese war 4 Stunden nach der Bestrahlung ca. um einen Faktor 2 erhöht. Das Maximum wurde nach 10 Stunden erreicht. Die Behandlung mit Celecoxib führte zu einer deutlichen Inhibition der PGE₂-Synthese unter das Niveau der unbehandelten Kontrolle. Im Vergleich dazu, war auch hier, das PGE₂-Niveau in Du145 Zellen deutlich geringer und eine Induktion durch Bestrahlung erst nach 8 Stunden zu erkennen. Durch Celecoxib-Behandlung wurde die PGE₂-Synthese gehemmt, wenn auch nicht in dem Maße, wie in der Zelllinie PC-3 (Abb. 4).

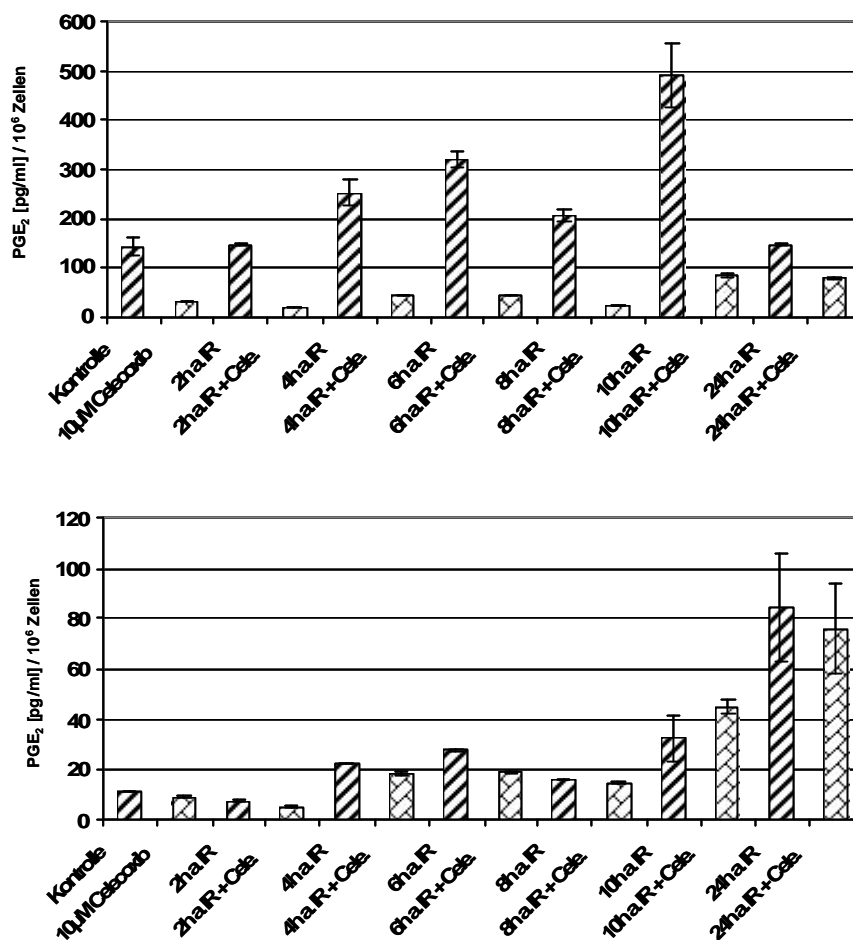


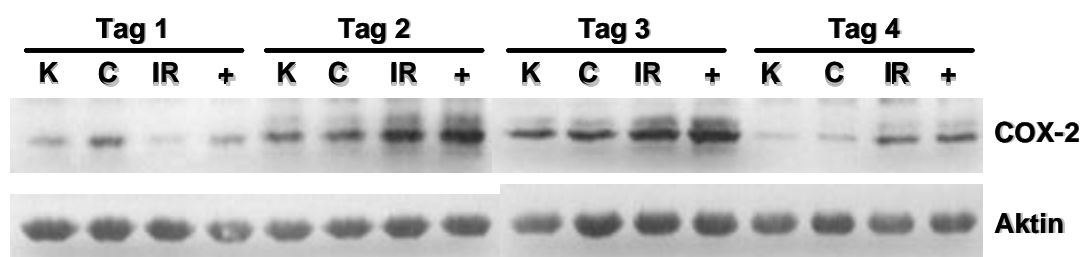
Abb. 4: Die PGE₂-Synthese nach Induktion durch Bestrahlung mit 15 Gy in Abhängigkeit von der Zeit in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145.

PGE₂-ELISA in den Zelllinien PC-3 und Du145 nach Bestrahlung mit 15 Gy und in Kombination mit Behandlung mit Celecoxib (10 μM). Die Behandlung mit Celecoxib erfolgte 24 Stunden vor Bestrahlung. 30 Min vor der Entnahme der Proben wurden dem Medium 30 μM Arachidonsäure zugegeben. Der PGE₂-Gehalt wurde auf 10⁶ Zellen normalisiert.

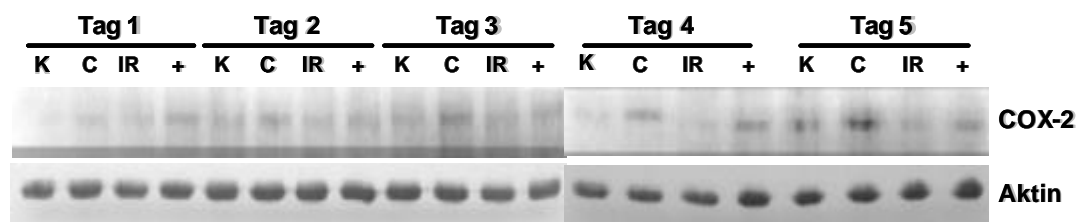
3.1.3 Die COX-2 Expression und Aktivität nach fraktionierter Bestrahlung in Kombination mit Celecoxib in Prostatakarzinomzelllinien

Ein wichtiger Aspekt für die klinische Anwendung ist die fraktionierte Bestrahlung von Tumoren. Für die Untersuchung der COX-2 Expression nach fraktionierter Behandlung in den Zelllinien PC-3 und Du145, wurden die Zellen täglich mit einer klinisch relevanten Dosis von 2 Gy bestrahlt. Zudem wurde die Expression in Kombination mit Celecoxib (10 μM) und nach Behandlung mit Celecoxib alleine bestimmt. Für die Untersuchung wurde das Medium der Zellen täglich vor der Bestrahlung gewechselt und frisches Celecoxib zugegeben. Eine Vorbehandlung mit Celecoxib erfolgte 24 Stunden vor der ersten Bestrahlung. Der tägliche

Wechsel verhinderte eine Akkumulation von Celecoxib im Medium. Die Präparation der Lysate erfolgte 6 Stunden nach der Bestrahlung.



K: Kontrolle; C: 10µM Celecoxib; IR: 2 Gy; +: C + IR



K: Kontrolle; C: 10µM Celecoxib; IR: 2 Gy; +: C + IR

Abb. 5: Die Expression von COX-2 nach fraktionierter Behandlung mit 2 Gy und in Kombination mit Celecoxib (10µM) in Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145.

Western-Blot Analyse der COX-2 Expression in den Zelllinien PC-3 und Du145 nach fraktionierter Behandlung mit 2 Gy und in Kombination mit Celecoxib-Behandlung (10µM). Die Vorbehandlung mit Celecoxib erfolgte 24 Stunden vor Bestrahlung. Die Lyse der Zellen erfolgte 6 Stunden nach Bestrahlung.

Die fraktionierte Behandlung führte in der Zelllinie PC-3 zu einem Anstieg der strahleninduzierten COX-2 Expression am Tag 2 nach Bestrahlung mit 2x2 Gy. Wie schon zuvor bei der Behandlung mit Einzeldosen beobachtet, zeigte sich auch hier eine erhöhte Expression von COX-2 nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Celecoxib. In der Zelllinie Du145 konnte durch fraktionierte Bestrahlung mit 5x2 Gy keine COX-2 Expression induziert werden. Nach Behandlung mit Celecoxib über 5 Tage konnte eine erhöhte COX-2 Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war korrelierend zur Untersuchung mit Einzeldosen. Die durch Celecoxib induzierte COX-2 Expression zeigte sich sowohl nach Behandlung mit Celecoxib alleine, als auch in Kombination mit Bestrahlung (Abb. 5).

Bei der Untersuchung der Aktivität von COX-2 in der Zelllinie PC-3 nach fraktionierter Behandlung konnte ein konstanter Anstieg der PGE₂-Synthese über einen Zeitraum von 4 Tagen beobachtet werden. Die Syntheserate war nach Bestrahlung mit der 2. Fraktion um den

Faktor 2 erhöht und um Faktor 5 nach Fraktion 4, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Synthese von PGE₂ konnte, wie schon in den Versuchen mit Einzeldosen zuvor, durch die Behandlung mit Celecoxib (10µM) sehr effizient inhibiert werden. Auch in der Zelllinie Du145 konnte durch fraktionierte Bestrahlung über einen Zeitraum von 5 Tagen die PGE₂-Synthese induziert werden. Nach Bestrahlung mit Fraktionen von 2x2 Gy konnte ein Anstieg der PGE₂ Synthese gemessen werden. Die Inhibition der PGE₂-Synthese durch Celecoxib war nicht so deutlich, wie in der Zelllinie PC-3 (Abb. 6).

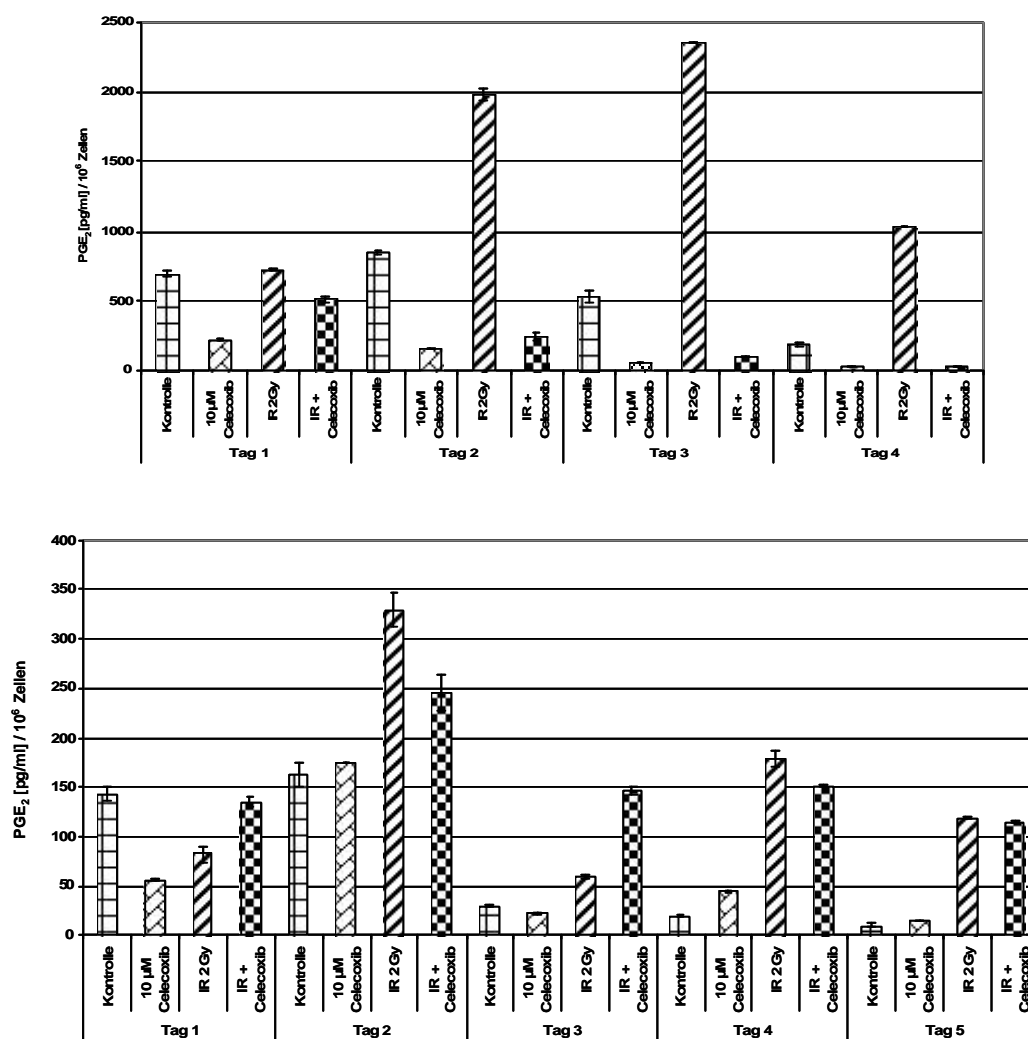


Abb. 6: Die PGE₂-Synthese nach fraktionierter Behandlung mit 2 Gy und in Kombination mit Celecoxib (10µM) in Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145.

PGE₂-ELISA in den Zelllinien PC-3 und Du145 nach fraktionierter Behandlung mit 2 Gy und in Kombination mit Celecoxib-Behandlung (10µM). Die Vorbehandlung mit Celecoxib erfolgte 24 Stunden vor Bestrahlung. 30 Min vor der Entnahme der Proben wurden dem Medium 30 µM Arachidonsäure zugegeben. Der PGE₂-Gehalt wurde auf 10⁶ Zellen normalisiert.

3.2 Klonogenes Überleben und Proliferation nach Bestrahlung und kombinierter Behandlung mit Celecoxib

3.2.1 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit Einzeldosen alleine und in Kombination mit Celecoxib

Zur Untersuchung einer potentiell radiosensitivierenden Wirkung von Celecoxib auf Tumorzellen wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Bestrahlung mit 5 bzw. 10 μM Celecoxib vorbehandelt und im Anschluss daran mit Dosen von 2, 4 und 6 Gy bestrahlt. Die Überlebensrate wurde an Hand der Koloniebildungsfähigkeit bestimmt. In den beiden untersuchten Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 zeigten sich nur minimale Veränderungen in der Koloniebildung nach Behandlung mit Celecoxib, gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 7).

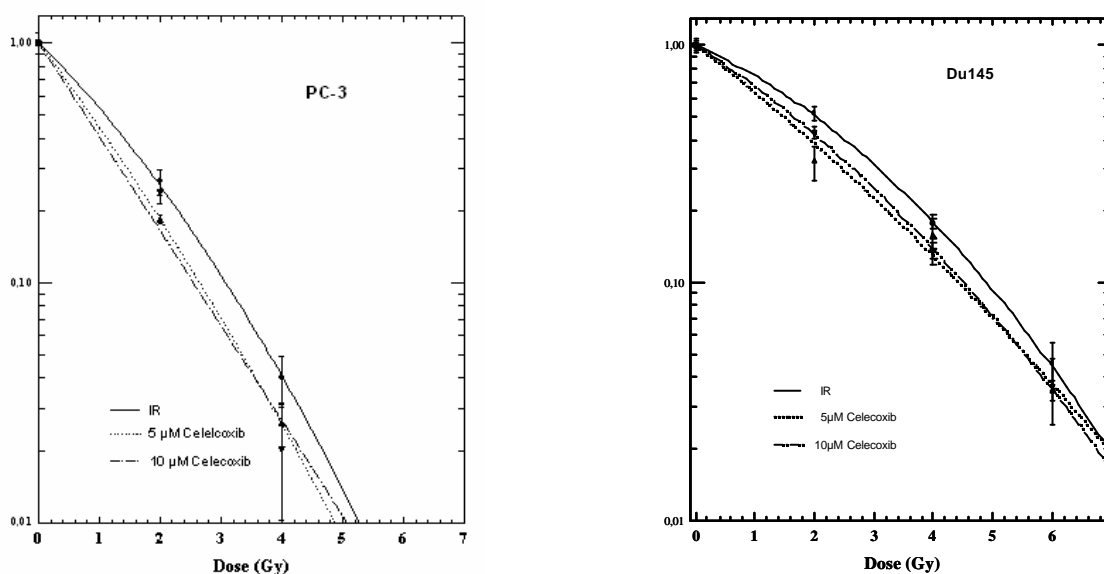


Abb. 7: Koloniebildungstest nach Bestrahlung mit Einzeldosen und Behandlung mit Celecoxib für die Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145.

Überlebensrate nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 2, 4, 6 Gy und Behandlung mit Celecoxib (5 und 10 μM). Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Bestrahlung mit Celecoxib vorbehandelt. Direkt im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Zellen für den Koloniebildungstest ausgesät. Die Anzahl der gebildeten Kolonien (Zellzahl > 50) wurden 10 Tage nach der Bestrahlung bestimmt.

3.2.2 Klonogenes Überleben und Proliferation nach fraktionierter Bestrahlung und kombinierter Behandlung mit Celecoxib

Zur näheren Bestimmung des klonogenen Überlebens wurden Versuche mit fraktionierter Behandlung durchgeführt. Die Zellen wurden täglich mit der klinisch relevanten Dosis von 2 Gy bestrahlt und 6 Stunden später für den Koloniebildungstest ausgesät. Um den Effekt der COX-2 Inhibition auf die Radiosensitivität von Tumoren zu untersuchen, wurden die Zellen 24 Stunden vor der ersten Bestrahlung mit Celecoxib (10 μ M) vorbehandelt. Der Inhibitor war über den gesamten Zeitraum des Experiments im Medium. Das Medium wurde täglich gewechselt um eine Akkumulation von Celecoxib zu verhindern. Die Überlebensrate der Zellen wurde durch die Anzahl der gebildeten Kolonien, das Wachstum an Hand der Gesamtzellzahl bestimmt.

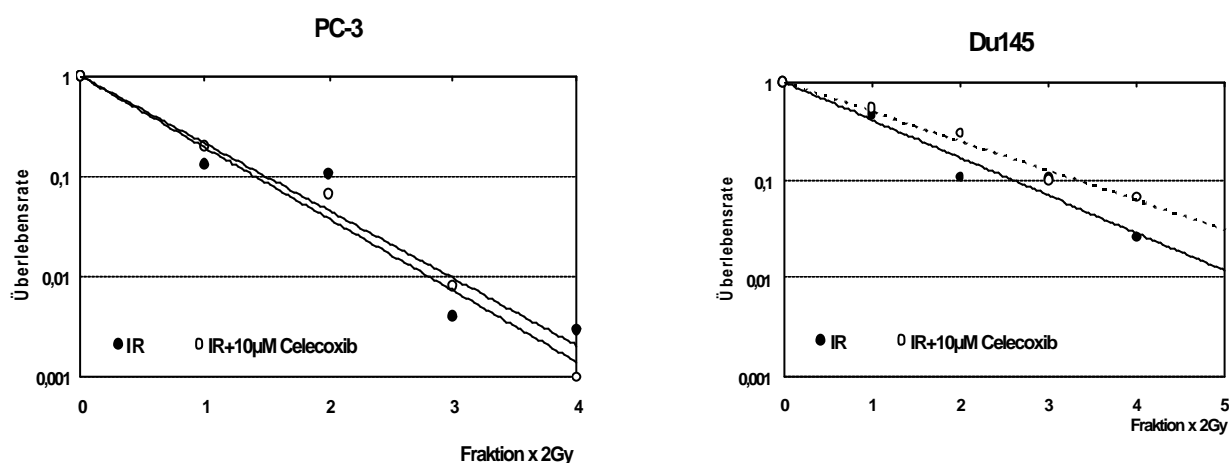


Abb. 8: Koloniebildungstest nach fraktionierter Bestrahlung und Behandlung mit Celecoxib.

Überlebensrate nach fraktionierter Bestrahlung (4 x 2 Gy) und Behandlung mit Celecoxib (10 μ M). Die Behandlung mit Celecoxib erfolgte 24 Stunden vor Bestrahlung, die Zellen wurden 6 Stunden nach der Bestrahlung für den Koloniebildungstest ausgesät. Die Anzahl der gebildeten Kolonien (Zellzahl > 50) wurden 10 Tage nach der Bestrahlung bestimmt.

Die Untersuchung der Überlebensraten beider Zelllinien ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen, die vor der Bestrahlung mit Celecoxib behandelt wurden und solchen, die nur bestrahlt wurden (Abb. 8). Bei Betrachtung der Wachstumskurven (Abb. 9) zeigte sich, dass die Proliferation der Celecoxib-behandelten Zellen gehemmt war. Nach fraktionierter Bestrahlung mit 4 x 2 Gy konnte eine effektive Inhibition der Proliferation beobachtet werden. Durch zusätzliche Behandlung mit Celecoxib, wurde das Wachstum, im

Vergleich zu unbehandelten, bestrahlten Zellen, nur geringfügig vermindert. Diese Resultate ergaben sich sowohl für die Zelllinie PC-3, als auch für Du145 Prostatakarzinomzellen.

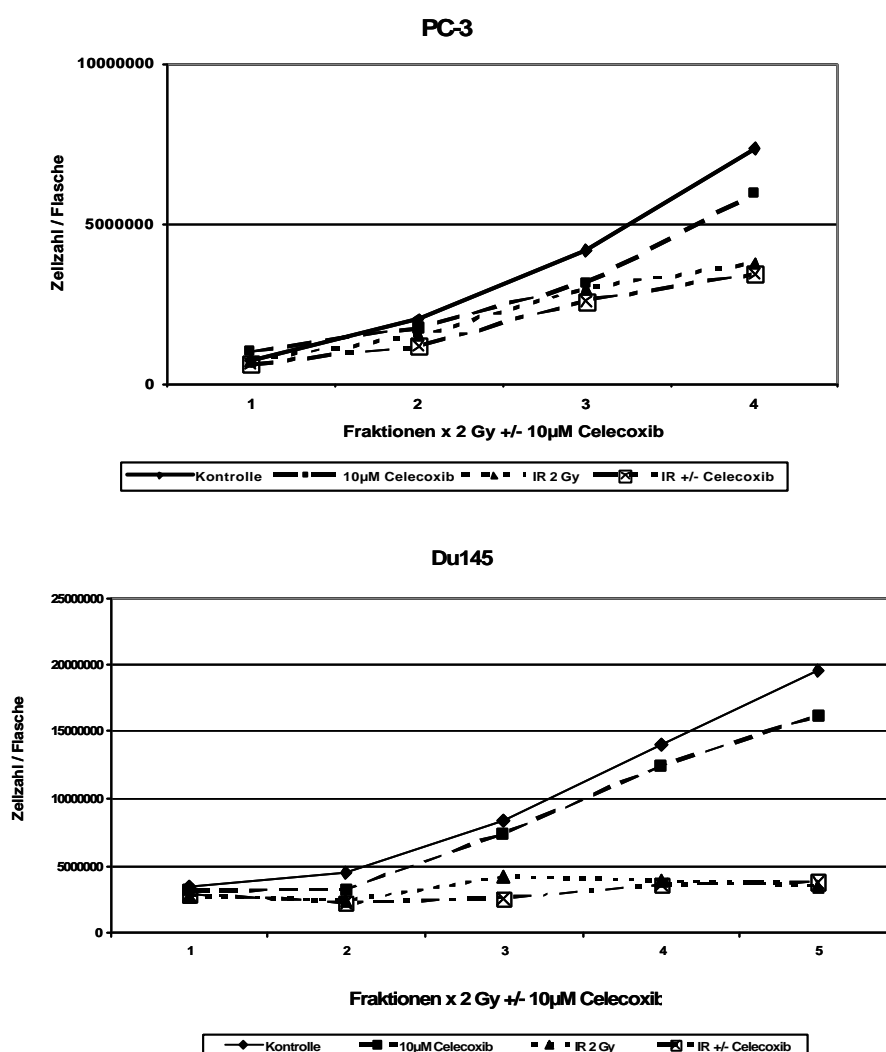


Abb. 9: Wachstumskurven nach fraktionierter Bestrahlung und Behandlung mit Celecoxib

Wachstumskurve nach fraktionierter Bestrahlung (4 x 2 Gy) und mit Celecoxib-Behandlung (10 µM). Die Behandlung mit Celecoxib erfolgte 24 Stunden vor Bestrahlung. Die Zellzahl wurde 6 Stunden nach Bestrahlung bestimmt (Fuchs-Rosenthal Zählkammer).

3.2.3 Apoptose-Induktion durch Celecoxib in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Die Behandlung mit Celecoxib mit klinisch relevanten Dosen (10 µM) führte zu einer Inhibition der Proliferation. Um zu untersuchen, ob die antiproliferative Wirkung von Celecoxib in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 mit einer Induktion der Apoptose einhergeht, wurde eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Für die Analyse wurden die Zellen mit Celecoxib (10 bzw. 75 µM) behandelt und die Zellzyklusverteilung 12 und 48

Stunden nach Behandlung durchflusszytometrisch gemessen. Die Histogramme der Celecoxib behandelten Zellen zeigten keine Veränderung der Zellzyklusverteilung. Im Falle einer Induktion der Apoptose könnten Zellfragmente als sub-G1-peak gemessen werden. Auch 48 Stunden nach Behandlung mit 75 μM Celecoxib konnte kein sub-G1-peak nachgewiesen werden.

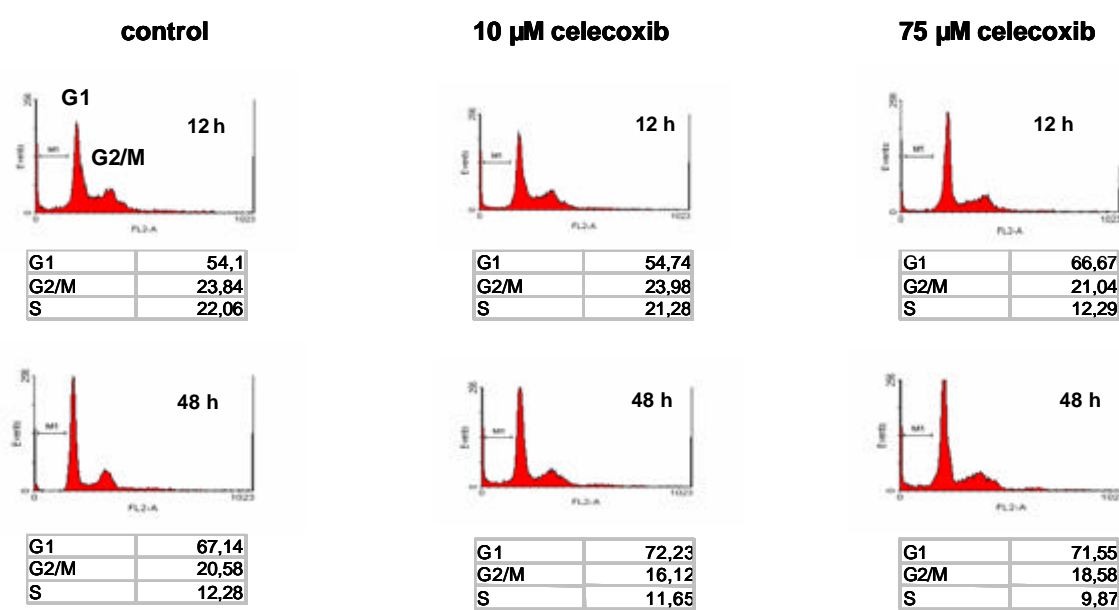


Abb. 10: Zellzyklusanalyse von PC-3 Prostatakarzinomzellen nach Behandlung mit Celecoxib

Die Histogramme zeigen die Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit Celecoxib an verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung. Die Proben wurden mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.4 Phosphorylierung von AKT nach Celecoxib-Behandlung und Bestrahlung

Der PI3-Kinase/AKT-Signalweg korreliert mit dem Überleben der Zellen und Proliferation. In diesem Zusammenhang wurde eine unspezifische Wirkung von Celecoxib auf die strahleninduzierte Phosphorylierung von AKT untersucht. Die Zellen wurden eine Stunde vor Bestrahlung in serumfreiem Medium mit Celecoxib behandelt. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Zellen in einem Zeitraum von 10 - 30 min lysiert und die Phosphorylierung von AKT (P-Ser472/473) durch Western-Blot Analyse nachgewiesen. Als Kontrollen dienten Proben, die mit EGF und dem spezifischen AKT-Inhibitor LY294002 behandelt wurden.

Die Behandlung mit Celecoxib alleine zeigte eine leichte Reduktion der Phosphorylierung von AKT im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch die Proben, die vor der

Bestrahlung mit Celecoxib behandelt wurden, wiesen eine schwächere Phosphorylierung von AKT auf. Eine Induktion der AKT-Phosphorylierung durch Bestrahlung, wie in der mit EGF behandelten Positivkontrolle, konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 11).

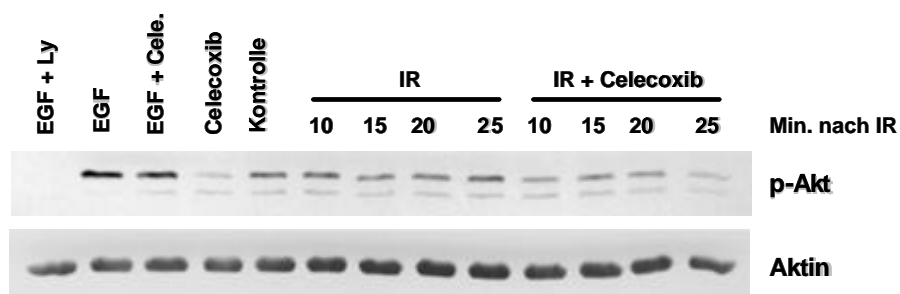


Abb. 11: Phosphorylierung von AKT in PC-3 Prostatakarzinomzellen nach Bestrahlung und Behandlung mit Celecoxib

Die Zellen wurden in serumfreiem Medium eine Stunde vor der Bestrahlung mit Celecoxib bzw. Ly294002, vorbehandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte 10-25 nach der Bestrahlung. Die Phosphorylierung von AKT wurde durch Western-Blot Analyse mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen p-AKT (p-Ser472/473) nachgewiesen.

3.3 COX-2 Expression - Potentielle Signalwege nach Bestrahlung

Die Expression von COX-2 kann durch verschiedene Stimuli induziert werden. Die Induktion der COX-2 Expression kann je nach Art der Stimulation über unterschiedliche Signalwege verlaufen. Über die Induktion der COX-2 Expression nach ionisierender Bestrahlung ist bisher wenig bekannt. Für die Untersuchung potentieller Signalwege die zur Induktion der COX-2 Expression nach Bestrahlung führen, wurden Versuche mit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 und der Mamakarzinomzelllinie MDA-MB231 durchgeführt.

3.3.1 Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Strahlung

Zur Untersuchung potentieller Signalwege, die bei der Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Bestrahlung von Bedeutung sein könnten, wurden die Zellen mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Die verwendeten Inhibitoren richteten sich gegen Kinasen der MAPK-Signalwegfamilie, P38 (SB203580), MEK (PD98059) und PI3-Kinase (LY294002). Alternativ zur Bestrahlung wurde die Expression von COX-2 auch mit dem Wachstumsfaktor EGF induziert.

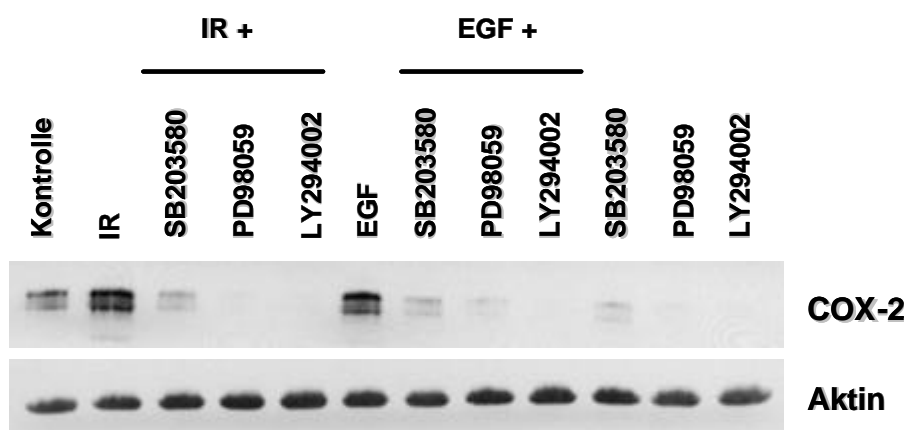
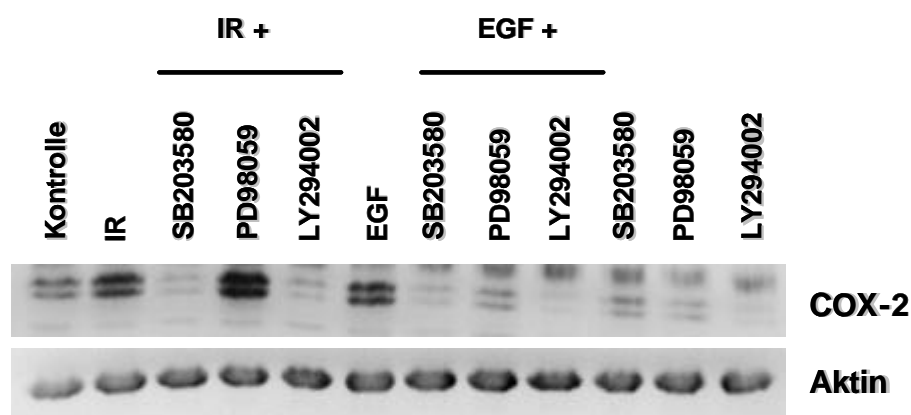


Abb. 12: Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Bestrahlung bzw. EGF in den Zelllinien PC-3 (oben) und MDA-MB231 (unten)

Die Induktion der COX-2 Expression erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy bzw. Behandlung mit EGF (100 ng/ml Medium). Die Zellen wurden 1 Stunde vor der Bestrahlung mit Inhibitoren gegen P38 (SB203580, 1 μ M), MEK (PD98059, 20 μ M) und PI3-Kinase (LY294002, 10 μ M) behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. 14 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen lysiert.

In beiden untersuchten Zelllinien PC-3 und MDA-MB231 konnte die Expression von COX-2 durch Bestrahlung mit 10 Gy bzw. Behandlung mit EGF (100 ng/ml Medium) induziert werden. Die Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren gegen Kinasen der MAPK-Signalwegfamilie zeigte unterschiedliche Resultate in Bezug auf Inhibition der COX-2 Expression. Durch die Behandlung mit den Inhibitoren SB203580 (P38 MAPK) und LY294002 (PI3-Kinase) wurde die Expression von COX-2 in beiden Zelllinien stark inhibiert. Die Inhibition war unabhängig davon, ob die Induktion durch Bestrahlung oder EGF Behandlung erfolgte. Nach Behandlung mit dem MEK-Inhibitor PD98059 zeigte sich in der Zelllinie PC-3 keine Inhibition der COX-2 Expression nach Induktion durch Bestrahlung, während nach Stimulation mit EGF das COX-2 Signal deutlich reduziert war. In MDA-

MB231 wurde die Expression von COX-2 durch PD98059 Behandlung gehemmt, unabhängig von der Art der Stimulation (Abb. 12).

3.3.2 Induktion der der COX-2 Expression durch ionisierende Strahlung in Kombination mit dem spezifischen PKC-d Inhibitor Rottlerin

Neben den oben verwendeten Inhibitoren wurde die Wirkung von Rottlerin, einem spezifischen PKC-d Inhibitor auf die strahleninduzierte COX-2 Expression untersucht. Die Zellen wurden eine Stunde vor Bestrahlung mit Rottlerin behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte 14 Stunden nach der Bestrahlung.

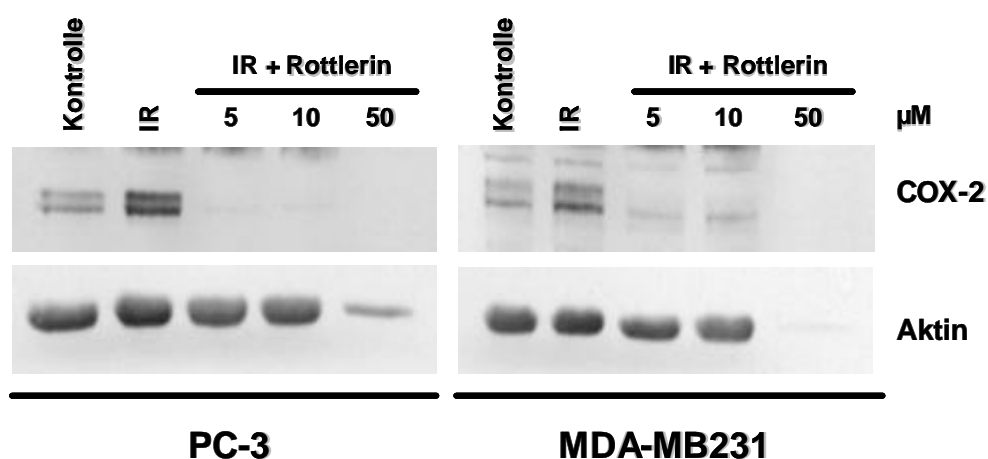


Abb. 13: Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Strahlung in den Zelllinien PC-3 (links) und MDA-MB231 (rechts)

Die Induktion der COX-2 Expression erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy. Die Zellen wurden 1 Stunde vor der Bestrahlung mit Rottlerin behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. 14 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen lysiert.

In den untersuchten Zelllinien PC-3 und MDA-MB231 ist deutlich die Induktion der COX-2 Expression durch Bestrahlung zu erkennen. Durch Vorbehandlung mit Rottlerin in Konzentrationen von 5 und 10 µM wurde die Expression von COX-2 effektiv inhibiert. Hohe Konzentrationen von Rottlerin (50 µM) wirkten auf die Zellen toxisch.

3.3.3 Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Strahlung in Kombination mit EGFR-Inhibitoren

In den oben gezeigten Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die COX-2 Expression durch den Wachstumsfaktor EGF induziert werden kann. Durch die Bindung von EGF an den EGFR-Rezeptor (EGFR) wird eine Signalkaskade aktiviert. Eine weitere Form der Aktivierung des EGFR ist die Autophosphorylierung in Folge von Bestrahlung (Schmidt-Ullrich *et al.*, 1997; Toulany *et al.*, 2005). Um nachzuweisen, ob der EGFR Ausgangspunkt einer durch ionisierende Strahlung induzierten Signalkaskade ist, die am Ende zur Expression von COX-2 führt, wurden die Zellen vor der Bestrahlung mit spezifischen EGFR-Inhibitoren behandelt. Die verwendeten Inhibitoren BIBX1382BS und AG1478 hemmen die EGFR-Tyrosin-Kinase am intrazellulären Bereich des Rezeptors.

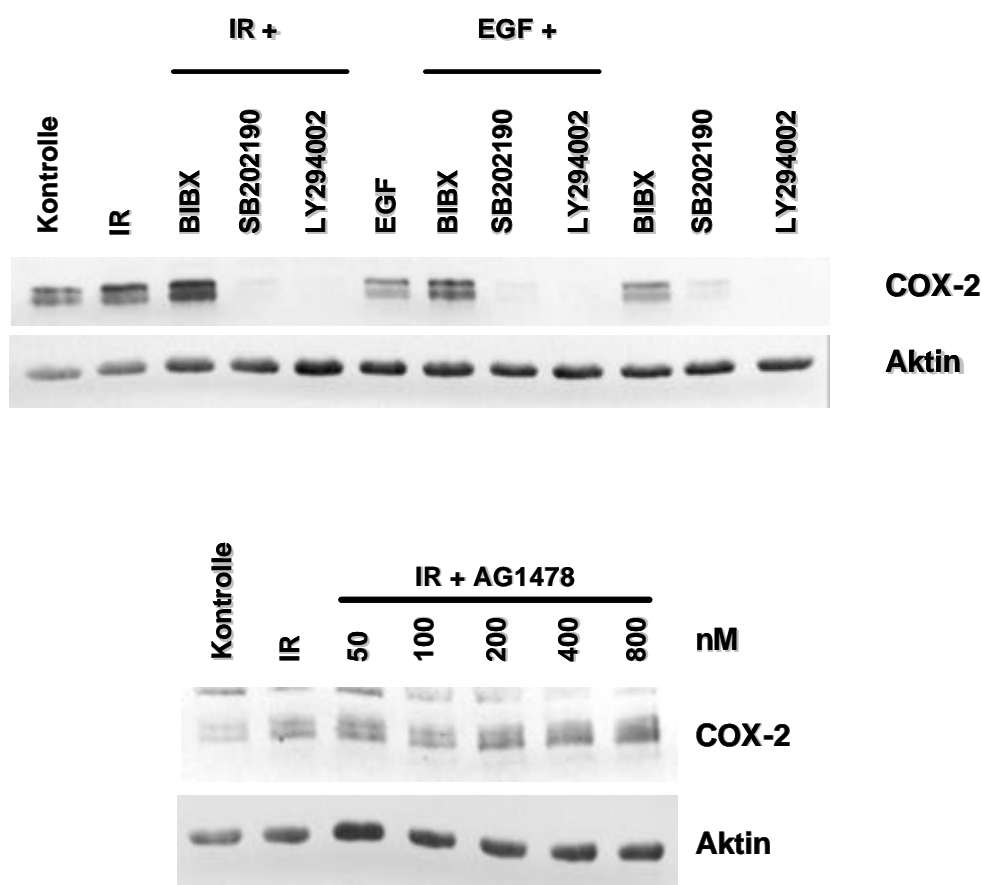


Abb. 14: Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Bestrahlung bzw. EGF in der Zelllinie MDA-MB231

Die Induktion der COX-2 Expression erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy bzw. Behandlung mit EGF (100 ng/ml Medium). Die Zellen wurden 1 Stunde vor Bestrahlung mit den EGFR-Inhibitoren BIBX1382BS (10 μ M) und AG1478 (50-800 nM) behandelt. Zudem wurden Inhibitoren gegen P38 (SB202190, 1 μ M) und PI3-Kinase (LY294002, 10 μ M) eingesetzt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. 14 Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen lysiert.

Die Ergebnisse der strahleninduzierten COX-2 Expression nach Behandlung mit den EGFR-Inhibitoren BIBX1382BS und AG1478 werden hier am Beispiel der Mamakarzinomzelllinie MDA-MB231 gezeigt. Nach Bestrahlung bzw. Behandlung mit EGF zeigte sich eine deutliche Induktion der COX-2 Expression. Nach Vorbehandlung mit den verwendeten EGFR-Inhibitoren BIBX1382BS und AG1478 konnte ein Anstieg der COX-2 Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Als Positivkontrollen für die Inhibition der COX-2 Expression dienten Proben, die mit dem P38-MAPK Inhibitor (SB202190) bzw. dem PI3-Kinase Inhibitor (LY294002) behandelt wurden. Proben, die mit P38 bzw. PI3-Kinase Inhibitor behandelten wurden, zeigten schon in vorausgegangenen Experimenten, dass die strahlen- bzw. EGF-induzierte COX-2 Expression gehemmt wird.

3.3.4 Phosphorylierung von AKT nach Bestrahlung und Behandlung mit dem spezifischen PI3-Kinase Inhibitor LY294002

Die Behandlung mit unterschiedlichen Inhibitoren, darunter auch der PI3-Kinase Inhibitor LY294002, führte in den oben gezeigten Experimenten zu einer Inhibition der strahleninduzierten COX-2 Expression. Um die Wirksamkeit von LY294002 auf sein „Zielprotein“ zu prüfen, wurde die Phosphorylierung von AKT, welches in der Signalkaskade stromabwärts der PI3-Kinase liegt, untersucht.

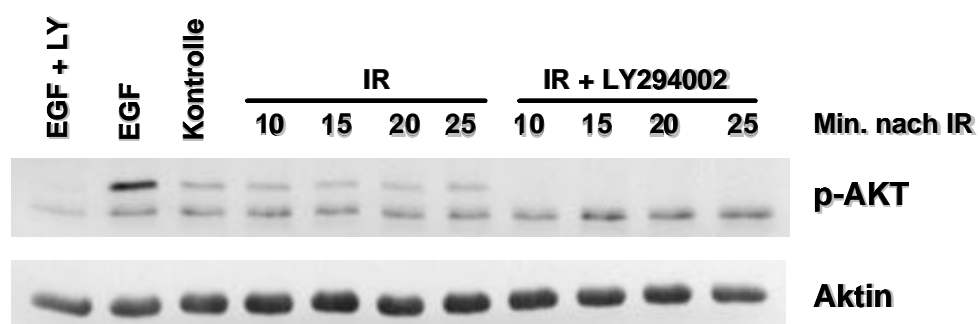


Abb. 15: Induktion der Phosphorylierung von AKT durch ionisierende Bestrahlung bzw. EGF in den Zelllinien PC-3 in Kombination mit spezifischen PI3 -Kinase Inhibitor LY294002

Die Induktion der Phosphorylierung von AKT erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy bzw. Behandlung mit EGF (100 ng/ml Medium). Die Zellen wurden 1 Stunde vor Bestrahlung mit einem Inhibitor gegen PI3-Kinase (LY294002, 10 μ M) behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. Die Lyse der Zellen erfolgte 10-25 Min nach Bestrahlung. Die EGF-behandelten Zellen wurden 15 Min nach Behandlung lysiert.

Die Behandlung mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 führte zur Inhibition der Phosphorylierung von AKT. Einen Anstieg der Phosphorylierung durch Bestrahlung konnte nicht beobachtet werden. Als Kontrollen dienten Proben, welche mit EGF und EGF in Kombination mit LY294002 behandelt wurden. Die mit EGF behandelte Probe wies eine Induktion der AKT-Phosphorylierung auf. Diese Phosphorylierung wurde durch den Inhibitor gehemmt.

3.3.5 Phosphorylierung von ERK1/2 (MAPK) nach Bestrahlung und Behandlung mit dem spezifischen MEK Inhibitor PD98059

Neben der Wirkung von LY294002 auf die PI3-Kinase wurde auch der Einfluss des MEK1/2-Inhibitors PD98059 auf die Phosphorylierung von ERK1/2 (MAPK) untersucht.

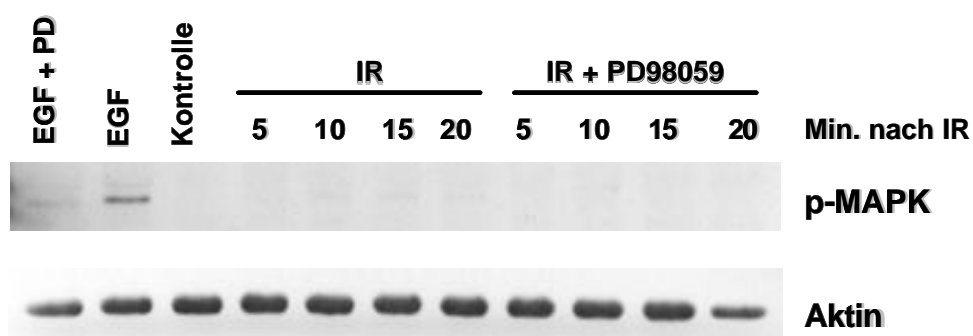


Abb. 16: Induktion der Phosphorylierung von ERK1/2 (MAPK) durch ionisierende Bestrahlung bzw. EGF in der Zelllinie PC-3 in Kombination mit dem spezifischen MEK Inhibitor PD98059

Die Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy bzw. durch Behandlung mit EGF (100 ng/ml Medium). Die Zellen wurden 1 Stunde vor der Bestrahlung mit einem Inhibitor gegen MEK (PD98059, 20 μ M) behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. Die Lyse der Zellen erfolgte 5-20 Min nach der Bestrahlung. Die EGF-behandelten Zellen wurden 15 Min nach Behandlung lysiert.

Durch Bestrahlung mit 10 Gy konnte in der Zelllinie PC-3 keine Phosphorylierung von ERK1/2 induziert werden. In der mit EGF behandelten Positivkontrolle war 15 min nach Behandlung eine Induktion der Phosphorylierung von ERK1/2 erkennbar. Die EGF-induzierte ERK1/2 Phosphorylierung wurde durch Vorbehandlung mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD98059 gehemmt.

3.3.6 Phosphorylierung von P38-MAPK nach Bestrahlung und Behandlung mit dem spezifischen P38 Inhibitor SB203580

Zudem wurde die Wirkung des P38-MAPK Inhibitor SB203580 auf die Phosphorylierung von P38 MAPK nach Bestrahlung untersucht. Letzterer zeigte ebenso, wie der PI3-Kinase Inhibitor LY294002 eine deutliche Inhibition der strahleninduzierten COX-2 Expression. Zunächst wurde eine Zeitkinetik gemacht, um den Zeitpunkt der Phosphorylierung nach Bestrahlung zu bestimmen. Den Zellen wurde hierzu eine Stunde vor Bestrahlung das Serum im Medium entzogen. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem Zeitraum von 5 Min bis 6 Stunden nach Bestrahlung.

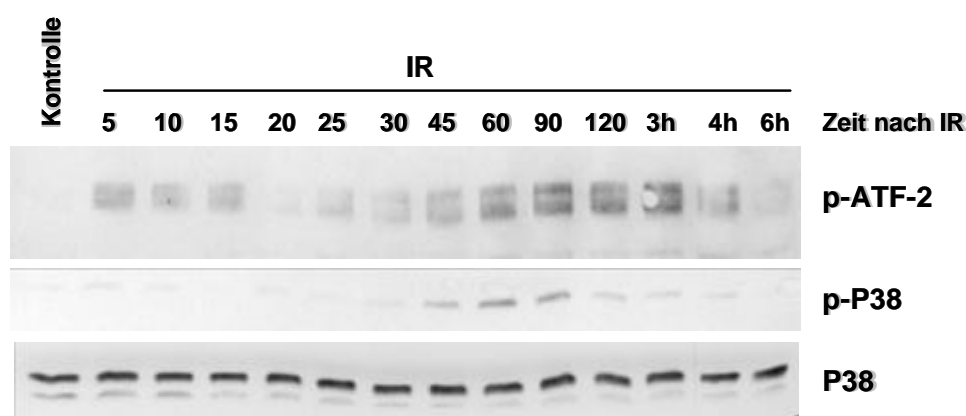


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der strahleninduzierten Phosphorylierung von P38 und ATF-2 in der Zelllinie PC-3

Den Zellen wurde eine Stunde vor der Bestrahlung das Serum entzogen. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem Zeitraum von 5 Min bis 6 Stunden nach der Bestrahlung.

Die Phosphorylierung von P38 konnte 45 Min nach der Bestrahlung nachgewiesen werden und war bis 120 Min deutlich erhöht. Der Transkriptionsfaktor ATF-2 zeigte schon nach 5 Min eine deutliche Phosphorylierung, die über den gesamten beobachteten Zeitraum erhalten blieb. Das Maximum lag zwischen 1 und 3 Stunden nach Bestrahlung.

Für die genauere Analyse wurden die Zellen mit dem spezifischen P38 Inhibitor SB203580 behandelt. Die Behandlung erfolgte eine Stunde vor der Bestrahlung unter serumfreien Konditionen. Der Phosphorylierungsstatus wurde über den Zeitraum von 60 bis 120 Min nach Bestrahlung bestimmt. In diesem Zeitraum befand sich in Vorexperimenten das Maximum der Phosphorylierung nach Bestrahlung.

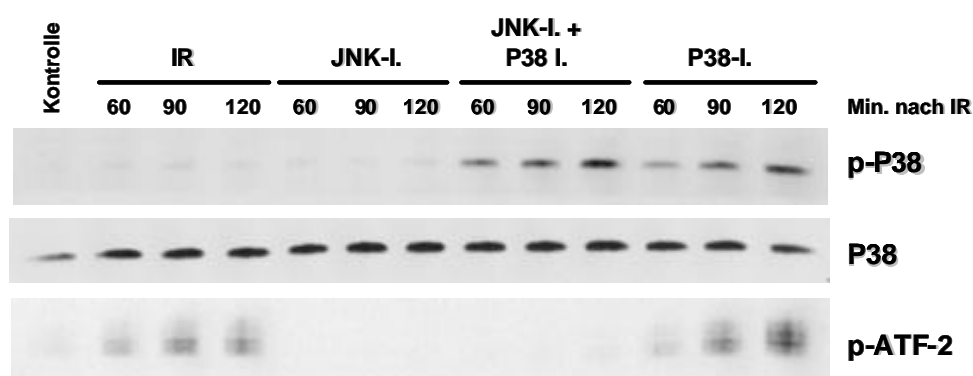


Abb. 18: Induktion der Phosphorylierung von P38-MAPK und ATF-2 durch ionisierende Bestrahlung in der Zelllinie PC-3 in Kombination mit einem spezifischen P38-MAPK bzw. JNK-Inhibitor

Die Induktion der Phosphorylierung erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy. Die Zellen wurden 1 Stunde vor Bestrahlung mit dem P38-MAPK Inhibitor (SB203580, 1 μ M) bzw. dem JNK-Inhibitor (SP600125, 10 μ M) behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. Die Lyse der Zellen erfolgte 60-120 Min nach Bestrahlung.

Proben, die nur bestrahlt oder Proben, die vor der Bestrahlung mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt wurden, wiesen eine gering erhöhte Phosphorylierung gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. Mit SB203580 behandelte Proben zeigten eine weitaus stärkere Phosphorylierung. Dies war unabhängig davon, ob die Zellen zusätzlich mit SP600125 behandelt wurden. Beide hier gehemmten Signalwege, sowohl der P38-MAPK Signalweg, als auch der JNK-Signalweg, gehören zur MAPK-Signalwegfamilie und können zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor ATF-2 führen (Dent *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung von ATF-2 wurde durch Behandlung mit SP600125 inhibiert. Proben welche nur bestrahlt oder kombiniert mit Bestrahlung und SB203580 behandelt wurden, zeigten eine deutliche Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle oder solchen Proben, die mit SP600125 behandelt wurden.

3.4 Interaktionen potentieller Signalwege zur COX-2 Expression

Oben aufgeführte Ergebnisse weisen daraufhin, dass durch Behandlung mit unterschiedlichen Inhibitoren gegen Kinasen der MAPK-Signalwegfamilie die COX-2 Expression gehemmt werden kann. Behandlung mit Inhibitoren gegen P38 MAPK, PI3-Kinase und PKC δ führte zu einer effektiven Inhibition der strahleninduzierten COX-2 Expression. Diese Resultate warfen die Frage nach einer potentiellen Interaktion der verschiedenen Signalwege auf.

3.4.1 Interaktion von P38 MAPK und PI3-Kinase-AKT Signalweg

Für die Untersuchung einer potentiellen Interaktion des P38 MAPK mit dem PI3-Kinase-AKT Signalweg nach Bestrahlung wurden die Zellen mit dem spezifischen P38 Inhibitor SB203580 behandelt und die Phosphorylierung von AKT bestimmt. Die Behandlung erfolgte, wie in den Experimenten zuvor, eine Stunde vor der Bestrahlung in serumfreiem Medium. Die Phosphorylierung von AKT wurde über einen Zeitraum von 10 bis 25 Min nach Bestrahlung beobachtet. Für den Fall einer Interaktion der beiden Signalwege würde man eine Inhibition der Phosphorylierung von AKT erwarten.

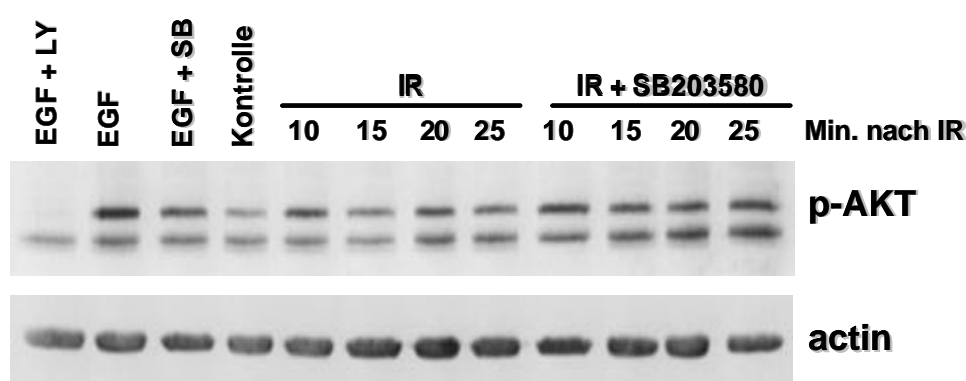


Abb. 19: Induktion der Phosphorylierung von AKT durch ionisierende Bestrahlung bzw. EGF in den Zelllinien PC-3 in Kombination mit spezifischen P38 MAPK Inhibitor SB203580

Die Induktion der Phosphorylierung von AKT erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy bzw. durch Behandlung mit EGF (100 ng/ml Medium). Die Zellen wurden 1 Stunde vor Bestrahlung mit einem Inhibitor gegen P38 (SB203580, 1 μ M) behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. Die Lyse der Zellen erfolgte 10-25 Min nach Bestrahlung. Die EGF-behandelten Zellen wurden 15 Min nach Behandlung lysiert.

Die Behandlung mit spezifischen P38 Inhibitor SB203580 hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT nach Bestrahlung. Auch die EGF-induzierte AKT Phosphorylierung konnte durch SB203580 nicht beeinflusst werden. Die mit EGF und dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 behandelte Negativkontrolle inhibierte die EGF-induzierte AKT-Phosphorylierung effektiv.

3.4.2 Interaktion von PI3-Kinase-AKT Signalweg und P38 MAPK

Weitere Experimente bezogen sich auf die strahleninduzierte Phosphorylierung von P38 MAPK nach Behandlung mit dem spezifischen PI3-Kinase Inhibitor LY294002. In diesem Fall wurde die Phosphorylierung von P38 in einem Zeitraum von 45 bis 120 Min nach der Bestrahlung beobachtet. Auch hier wäre im Falle einer Interaktion der beiden Signalwege eine Inhibition der Phosphorylierung zu erwarten.

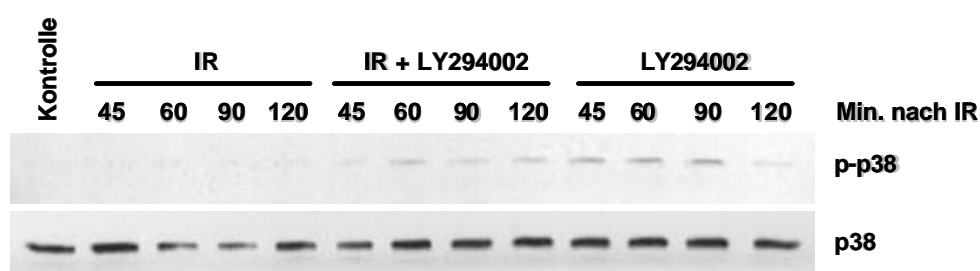


Abb. 10: Induktion der Phosphorylierung von P38-MAPK durch ionisierende Bestrahlung in der Zelllinie MDA-MB231 in Kombination mit einem spezifischen PI3 -Kinase Inhibitor

Die Induktion der Phosphorylierung erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy. Die Zellen wurden 1 Stunde vor Bestrahlung mit dem PI3-Kinase Inhibitor (LY294002, 10 μ M) behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. Die Lyse der Zellen erfolgte 45-120 Min nach Bestrahlung.

Die Behandlung mit LY294002 hatte zur Folge, dass die Phosphorylierung von P38 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und Proben, die nur bestrahlt wurden, erhöht war. Der Anstieg der Phosphorylierung war unabhängig von der Induktion durch Bestrahlung.

3.4.3 Interaktion von PKCd und P38 MAPK Signalweg

Weiterführend wurde die Möglichkeit untersucht, dass PKCd in die Regulation des P38 MAPK Signalweges nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung involviert ist. Eine Verbindung der Proteinkinase PKCd mit dem P38 MAPK Signalweg wurde bereits in einem anderen Zusammenhang beschrieben (Ivanova et al., 2006). Daher wurde die Möglichkeit untersucht, in wie weit eine potentielle Interaktion von PKCd und dem P38 MAPK Signalweg in die strahleninduzierte COX-2 Expression eingreift.

Die Zellen wurden dazu mit dem spezifischen PKC δ Inhibitor Rottlerin behandelt und die Phosphorylierung von P38 in einem Zeitraum von 45-120 Min nach Bestrahlung anhand von Western-Blot Analysen untersucht.

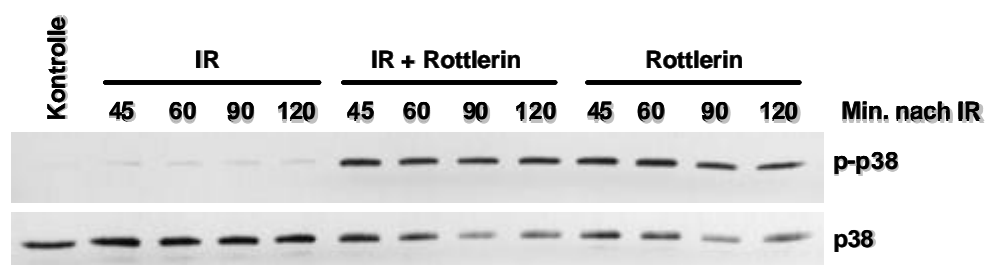


Abb. 11: Induktion der Phosphorylierung von P38-MAPK durch ionisierende Bestrahlung in der Zelllinie MDA-MB231 in Kombination mit einem spezifischen PKC δ Inhibitor

Die Induktion der Phosphorylierung erfolgte durch Bestrahlung mit 10 Gy. Die Zellen wurden 1 Stunde vor Bestrahlung mit dem PKC δ Inhibitor (Rottlerin, 10 μ M) behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. Die Lyse der Zellen erfolgte 45-120 Min nach Bestrahlung.

Wie bei der Untersuchung einer PI3-Kinase/P38 Interaktion, würde im Falle einer Interaktion von PKC δ mit dem P38 MAPK Signalweges ein Rückgang der Phosphorylierung von P38 MAPK nach Behandlung mit Rottlerin erwartet. Die Western-Blot Analyse zeigte, dass die Behandlung mit Rottlerin die Phosphorylierung von P38 MAPK induzierte, unabhängig davon, ob die Zellen bestrahlt wurden. Proben, die nur bestrahlt wurden wiesen eine deutlich geringere Phosphorylierung auf, als Proben, die mit Rottlerin behandelt wurden.

4. Diskussion

4.1 COX-2 und Celecoxib in der Strahlentherapie

Wie verschiedene Studien belegen, ist COX-2 in vielen Tumoren überexprimiert. Die erhöhte Expression von COX-2 in Tumoren korreliert mit einem schlechten Ansprechen auf die Behandlung mit Bestrahlung und einer schlechten Prognose für den Patienten (Choy & Milas, 2003; Kim *et al.*, 2002). Dieselben Studien lassen den Schluss zu, dass COX-2 als molekularerer Risikofaktor in Tumoren bewertet werden kann. Demzufolge stellt sich die Frage nach der Verwendung von COX-2 Inhibitoren in der Tumorthherapie. Eine große Anzahl von COX-2 Inhibitoren wird schon seit längerem bei der Behandlung entzündlicher Krankheiten verwendet. Auch in der Strahlentherapie verspricht eine kombinierte Behandlung mit spezifischen COX-2 Inhibitoren ein verbessertes Ansprechen (Davis *et al.*, 2004; Kishi *et al.*, 2000; Nakata *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des spezifischen COX-2 Inhibitors Celecoxib alleine und in Kombination mit Bestrahlung mit Einzeldosen bzw. fraktionierter Bestrahlung auf das Überleben und die Proliferation von Prostatakarzinomzellen untersucht. Weiterführende Experimente beschäftigen sich mit Signalkaskaden, welche die strahleninduzierte COX-2 Expression vermitteln.

Die Überexpression von COX-2 und die daraus resultierende erhöhte Menge an PGE₂ in den Tumorzellen kann das Überleben der Zellen nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung verbessern. Die Expression von COX-2 und die Menge von PGE₂ kann durch Bestrahlung induziert werden (Steinauer *et al.*, 2000). Diese Daten entsprechen den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit für die Prostatakarzinomzelllinie PC-3. Jedoch konnte dieser Effekt in der Prostatakarzinomzelllinie Du145 nicht bestätigt werden. In beiden untersuchten Zelllinien führte die Behandlung mit Celecoxib zu einer Induktion der Proteinexpression von COX-2, nicht aber zu einem Anstieg der PGE₂-Synthese. Die strahleninduzierte PGE₂-Synthese in PC-3 Zellen wurde durch die Behandlung durch Celecoxib effizient unterdrückt. Auch in der Zelllinie Du145, bei der kein messbarer Anstieg der COX-2 Expression auf Proteinebene nach Bestrahlung zu erkennen war, zeigte sich eine Abnahme der strahleninduzierten PGE₂-Synthese nach Celecoxib-Behandlung. Der Anstieg der COX-2 Expression nach Behandlung mit einem COX-2 Inhibitor wurde auch nach NS-398 Behandlung in PC-3 Zellen beobachtet (Steinauer *et al.*, 2000). Die Induktion der COX-2 Expression nach Behandlung mit COX-2 Inhibitoren spricht für eine Gegenregulation der Zelle in Folge der Inhibition der PGE₂-

Synthese. Im Gegensatz zu dem hier gezeigten Anstieg der COX-2 Expression nach Celecoxib-Behandlung ergaben Resultate einer Studie von Chun *et al.*, 2004, dass durch die Behandlung mit Celecoxib sowohl die PGE₂-Synthese, als auch die TPA-induzierte COX-2 Expression in der Haut von Mäusen inhibiert werden kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Untersuchungen von Takada *et al.*, 2004. Die Behandlung mit verschiedenen NSAIDs führte zu einer Inhibition der TNF-induzierten COX-2 Expression. Die Inhibition der COX-2 Expression durch Celecoxib wird hierbei nicht auf die Unterdrückung der PGE₂-Synthese, sondern auf eine COX-2 unabhängige Wirkung auf Transkriptionsfaktoren und Kinasen des COX-2 Signalweges zurückgeführt.

In Bezug auf die strahlensensitivierende Wirkung von COX-2 Inhibitoren auf Tumoren gibt es kontroverse Ergebnisse. So ergaben die Daten in der hier vorliegenden Arbeit, dass die Behandlung mit Celecoxib in klinisch relevanten Dosen (5 bzw. 10 µM) keinen Effekt auf das klonogene Überleben der untersuchten Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 nach Bestrahlung hatte. Diese Resultate wurden durch Untersuchungen von Steinauer *et al.* 2000 unterstützt. Er konnte ebenfalls zeigen, dass in den von ihnen untersuchten PC-3 Zellen die strahleninduzierte PGE₂-Synthese durch die Behandlung mit dem spezifischen COX-2 Inhibitor NS-398 unterdrückt wurde. Eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Bestrahlung durch die Behandlung mit NS-398 konnte jedoch auch hier nicht festgestellt werden. Andere frühere Studien zeigten dem entgegen, dass durch die Behandlung mit selektiven COX-2 Inhibitoren die Strahlensensitivität von Tumoren erhöht werden kann. Kishi *et al.*, 2000 kamen zu dem Schluss, dass eine Behandlung mit SC-236 vor der Bestrahlung in einer deutlich besseren Strahlenantwort des Tumors resultierte, während das Normalgewebe nicht beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse wurden durch Petersen *et al.*, 2000 bestätigt, die eine strahlensensitivierende Wirkung von SC-236 sowohl in einem Xenograft-Model mit U251 Glioblastomzellen *in vivo*, als auch durch Bestimmung des klonogenen Überlebens von HT29 Kolonkarzinomzellen *in vitro* nachweisen konnten. Diese und weitere Studien führten Davis *et al.*, 2004 zu einem Arbeitsmodell, welches besagt, dass die Inhibition von COX-2 und damit die Inhibition der Synthese des Überlebensfaktors PGE₂ zu einem verbesserten Ansprechverhalten von Tumoren gegenüber Bestrahlung führt. Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen gestützt, die unterschiedliche Effekte im Wachstum nach Behandlung mit Celecoxib in Zelllinien mit unterschiedlichem COX-2 Anteil zeigten (Basu *et al.*, 2005). Das Wachstum bei Zellen mit einem hohen Anteil an COX-2 wurde erheblich besser gehemmt, als bei Zellen, die einen relativ geringen Anteil COX-2 an der Gesamtproteinmenge aufwiesen.

Diese Resultate aus der Studie von Basu *et al.* 2005 stehen jedoch nicht im Einklang mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit. Auch die hier untersuchten Zelllinien PC-3 und Du145 hatten einen unterschiedlich hohen Anteil von COX-2 an der Gesamtproteinmenge. Im Verhältnis wiesen PC-3 Zellen weit mehr PGE₂ als Du145 Zellen. Das Wachstum wurde durch die Behandlung mit Celecoxib im selben Maße gehemmt. Diese Resultate sprechen dafür, dass die in verschiedenen Zelllinien beobachteten radiosensitivierende Wirkung von COX-2 Inhibitoren vermutlich unabhängig von COX-2 sind. Weiter Untersuchungen mit dem COX-2 Inhibitor Rofecoxib untermauern diese These. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Celecoxib zu einer Inhibition des Zellwachstums führte, während eine Behandlung mit Rofecoxib keine Effekte zeigte (Kazanov *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2005). Eigene Ergebnisse zeigten ebenfalls eine Inhibition der Proliferation nach fraktionierter Behandlung mit Celecoxib in den Zelllinien PC-3 und Du145. Auch hier sprechen die Daten auf Grund der deutlichen Unterschiede bei der COX-2 Expression und der PGE₂-Synthese für eine COX-2 unabhängigen Wirkmechanismus. Eine COX-2 abhängige Wirkung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Studien belegen, dass Celecoxib neben der Inhibition von COX-2 auch regulatorische Proteine des Zellzyklus beeinflusst. Betroffen davon sind Proteine, die den Übergang von der G1- in die S-Phase regulieren, wie Cyclin D1, die Cycline A und B, die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21^{WAF1/cip1} und p27^{KIP1}, pRb oder der Transkriptionsfaktor E2F1/DP1-Komplex.

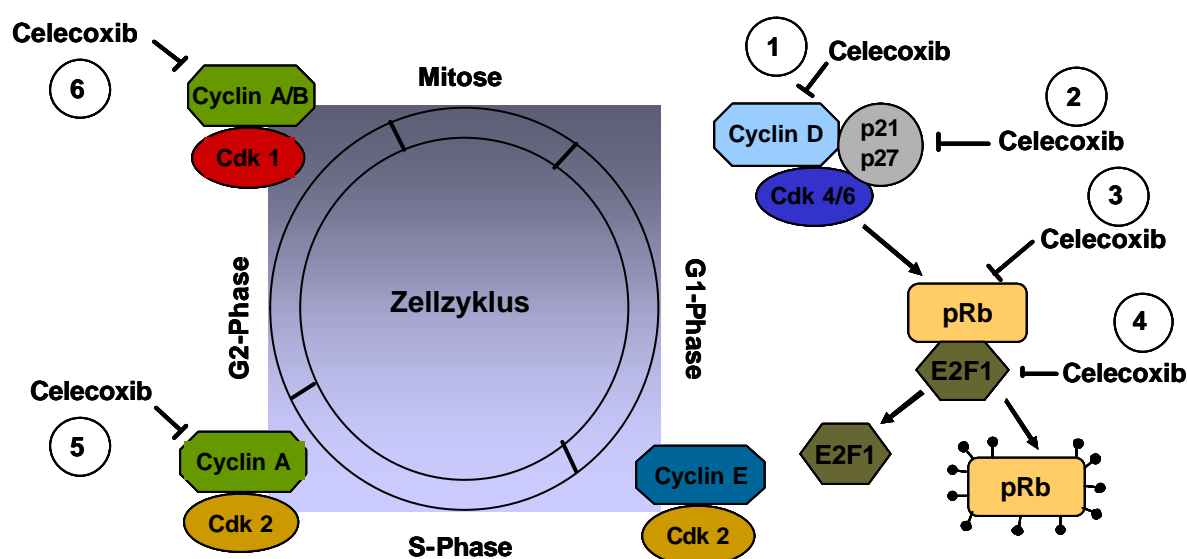


Abb. 12: Schematische Darstellung des Zellzyklus.

Einfluss von Celecoxib auf Zellzyklus-regulierende Proteine nach Takada *et al.*, Patel *et al.* (1), Han *et al.* (2), Cui *et al.* (3,4), and Kardosch *et al.* (5,6)

So kann die für die Progression der G1-Phase verantwortliche Cyclin D1 durch Behandlung mit Celecoxib und verschiedenen anderen COX-2 Inhibitoren gehemmt werden. Weiter wurde beschrieben, dass Cyclin-abhängige Kinasen gehemmt und die Expression von Cyclin A und B in PC-3 Prostatakarzinomzellen inhibiert werden können. Ebenso wird die Phosphorylierung des pRb, welche für die Regulation des Transkriptionsfaktor E2F1 verantwortlich ist durch Celecoxib gehemmt. E2F1 reguliert die Transkription S-Phase relevanter Proteine. Im Gegenzug wird die Expression Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitoren, wie p21^{WAF1/cip1} und p27^{KIP1} nach Celecoxib-Behandlung verstärkt (Cui *et al.*, 2005; Grosch *et al.*, 2001; Kardosh *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2005; Takada *et al.*, 2004). Somit können sowohl COX-2 abhängige als auch COX-2 unabhängige Faktoren die Celecoxib vermittelte Inhibition der Zellproliferation beeinflussen. Eigene Zellzyklusuntersuchungen in der Zelllinie PC-3 zeigten nach Behandlung mit Celecoxib in Konzentrationen von 10 und 75 μM keine Veränderungen der Zellzyklusverteilung. Diese Ergebnisse entsprechen einer Studie mit verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien (HCT-15, Caco-2, HAT-29). In diesen Zelllinien konnten Veränderungen im Zellzyklus erst mit einer Konzentration von 100 μM nachgewiesen werden. Bei dieser hohen Konzentration zeigte sich 24 Stunden nach der Behandlung mit Celecoxib ein subG1-peak (Grosch *et al.*, 2001). Der Nachweis eines subG1-peak ist ein Indiz für apoptotische Zellen.

Die Induktion der Apoptose ist ein weiterer Anhaltspunkt für die antiproliferative Wirkung von Celecoxib auf Tumorzellen. Apoptose kann jedoch nur durch Behandlung mit hohen Dosen Celecoxib (50-100 μM) beobachtet werden. Mehrere Studien legen die Vermutung nahe, dass Celecoxib die Apoptose über verschiedene Signalwege induzieren kann. Dies kann sowohl über mitochondriale, als auch Rezeptor-vermittelte Signalwege geschehen. Die Induktion der Apoptose über mitochondriale Signalwege zeigt sich durch Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Dieser Prozess kann durch die Translokation von Bax gefördert werden, ist vermutlich aber unabhängig von bcl-2 oder bcl-XL (Hsu *et al.*, 2000; Jendrossek *et al.*, 2003; Nam *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). Zudem scheint die Celecoxib-induzierte Apoptose in C611B Cholangiokarzinomzellen COX-2 abhängig zu sein. Die Zugabe von 25 μM PGE₂ konnte die Celecoxib-induzierte Apoptose inhibieren (Zhang *et al.*, 2004). In HCC-Leberkarzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass durch Behandlung mit Celecoxib die Expression von Apoptose-vermittelnder Rezeptoren, wie CD95, TNFR1, sowie Trail-R1 und R2 induziert werden kann (Kern *et al.*,

2006). Neben der Ausschüttung von Cytochrom c und der Expression Apoptose vermittelnden Rezeptoren können in verschiedenen Zelllinien auch Caspasen aktiviert werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungen wurde in einem Zeitraum von 48 Stunden keine Induktion der Apoptose durch Behandlung mit Celecoxib nachgewiesen. Weder mit der klinisch relevanten Dosis von 10 μM noch mit der hohen Dosis von 75 μM konnte bei FACS Untersuchungen in PC-3 Prostatakarzinomzellen ein subG-peak gemessen werden. Dies widerspricht Studien, die mit hohen Dosen von Celecoxib in verschiedenen Zelllinien Apoptose induzieren konnten. So fand die Arbeitsgruppe um Jendrossek et al. in lymphoblastoiden Zellen nach Behandlung mit 100 μM Celecoxib die Induktion der Apoptose. Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass die Induktion der Apoptose abhängig von der untersuchten Zelllinien und der Dosis des verwendeten COX-2 Inhibitors ist.

Verschiedene Autoren führen die Induktion der Apoptose und die Hemmung der Proliferation durch Celecoxib nicht auf die Inhibition von COX-2, sondern auf eine Inhibition der AKT-Phosphorylierung zurück (Leng *et al.*, 2003). Die Annahme, dass die Induktion der Apoptose durch einen COX-2 unabhängigen Celecoxib-vermittelten Mechanismus eingeleitet werden kann, bestätigt eine Untersuchung von Kulp *et al.*, 2004. Die Studie kam zu dem Schluss, dass die Aktivität der Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) und somit die Phosphorylierung von AKT sowohl durch Celecoxib als auch durch das Celecoxib-Analog DMC inhibiert werden kann. Das Celecoxib-Analog DMC hemmt die COX-2 Aktivität nicht. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die Induktion der Apoptose durch die Behandlung mit Celecoxib unabhängig von der COX-2 Inhibition stattfindet. Diese Folgerung steht im Widerspruch zu Schlussfolgerungen einer Studie der Gruppe um Hsu *et al.* 2000, die ebenfalls eine Inhibition der AKT-Phosphorylierung nach Behandlung mit Celecoxib beobachteten, die Celecoxib induzierte Apoptose jedoch auf eine konstitutive COX-2 Expression in PC-3 Zellen zurückführten. Die Inhibition der AKT-Phosphorylierung durch Celecoxib, war nach Behandlung mit einer Dosis von 50 μM zu beobachten. Eigene Daten zeigten in der Zelllinie PC-3 nur eine minimale Inhibition der AKT-Phosphorylierung durch die Behandlung mit Celecoxib in klinisch relevanten Dosen (10 μM). Die Induktion der Apoptose konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, jedoch eine Inhibition der Proliferation. Dieses Ergebnis korreliert mit Daten von Hsu *et al.* 2000, welche zeigen, dass Überexpression von konstitutiv aktivem AKT die Celecoxib induzierte Apoptose in PC-3 Zellen hemmt. Die gezeigten Daten

in der hier vorliegenden Arbeit führen zu dem Schluss, dass die Induktion der Apoptose und die Inhibition der Proliferation durch Behandlung mit spezifischen COX-2 Inhibitoren abhängig von den untersuchten Zelllinien und der verwendeten Inhibitoren ist.

4.2 COX-2 - Signalinduktion und Signalwege

Die COX-2 Expression kann in verschiedenen Geweben durch unterschiedliche Stimulansien induziert werden. Für die Induktion und die anschließenden Signaltransduktion sind verschiedene Wege bekannt. Die Signalwege, welche zur COX-2 Expression nach Induktion durch ionisierende Strahlung führen, wurden bisher nicht genau beschrieben. Die Induktion von COX-2 durch ionisierende Strahlung ist von besonderer Bedeutung, da das COX-2-synthetisierte PGE₂ vermutlich radioprotektive Wirkung in Tumoren hat und dadurch die Strahlentherapie negativ beeinflusst. Viele beschriebene Signalwege, an deren Ende die Expression von COX-2 steht, haben ihren Ursprung in einem Signalweg der MAPK-Signalwegfamilie.

Um potentielle Signalwege zu identifizieren an deren Ende die durch ionisierende Strahlung induzierte COX-2 Expression steht, wurden die Zelllinien PC-3 und MDA-MB231 mit verschiedenen spezifischen Kinase-Inhibitoren behandelt. Die Inhibitoren richteten sich gegen die PI3-Kinase, P38 MAPK, MEK und PKC δ . Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem spezifischen PI3-Kinase Inhibitor LY294002 die strahleninduzierte sowie die durch den Wachstumsfaktor EGF-induzierte COX-2 Expression effektiv gehemmt wurde. Die bedeutende Rolle des PI3-Kinase Signalweges bei der COX-2 Expression wird auch durch verschiedene Arbeiten unterstrichen. Unter entzündlichen Bedingungen, durch die Behandlung mit Lipopolysacchariden in Kombination mit Interferon- γ kann in Mesangialzellen über die PI3-kinase, AKT und den Transkriptionsfaktor NF- κ B die Expression von COX-2 induziert werden (Sheu *et al.*, 2005). Dass der PI3-Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle bei der COX-2 Expression spielt zeigt ebenfalls eine Arbeit von Jang *et al.*, 2004. Durch Behandlung mit Catalase wurden in Makrophagen verschiedene Signalwege der MAPK-Signalwegfamilie aktiviert. Die Induktion der COX-2 Expression verlief über den PI3-Kinase Signalweg während die Aktivierung des ERK-, JNK- und P38 MAPK-Signalweges keinen Einfluss hatten.

Kontroverse Daten bezüglich der Rolle der PI3-Kinase bei der COX-2 Expression stammen dagegen von Liu *et al.*, 2003. In einer von ihnen durchgeführten Studie wurde in HT-29 Kolonkarzinomzellen ein Anstieg der IL-1 β induzierten COX-2 Expression nach Inhibition der PI3-Kinase durch Wortmannin festgestellt. Dieses Ergebnis führte sie zu dem Schluss, dass die PI3-Kinase die COX-2 Expression über die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B negativ regulieren kann. Die hier vorliegende Arbeit, sowie auch verschiedene andere Arbeiten in unterschiedlichen Systemen konnten diese Theorie jedoch nicht bestätigen (Ashida *et al.*, 2003; Di Popolo *et al.*, 2000; Kim & Kim, 2004). Nach Analyse der AKT-Phosphorylierung (Ser472/473) in PC-3 und MDA-MB231 Zellen stellt sich die Frage nach der Rolle von AKT in der strahleninduzierten COX-2 Expression. In MDA-MB231 konnte durch Bestrahlung keine Induktion der Phosphorylierung von AKT erreicht werden. Die PC-3 Zellen zeigten eine konstitutive Phosphorylierung von AKT, die durch Bestrahlung nicht weiter erhöht wurde. Die Behandlung mit LY294002 führte zu einer Inhibition der AKT-Phosphorylierung. In beiden Zelllinien wurde unabhängig von der Phosphorylierung von AKT durch die Inhibition der PI3-Kinase die strahleninduzierte COX-2 Expression gehemmt. Dies spricht dafür, dass die strahleninduzierte COX-2 Expression über einen Signalweg, der von der PI3-Kinase ausgeht, AKT unabhängig reguliert wird.

In den untersuchten Zelllinien der hier vorliegenden Arbeit, der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 und der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB231, konnte die durch ionisierende Strahlung induzierte Expression von COX-2 durch verschiedene Signalwege vermittelt werden. Neben der Inhibition der PI3-Kinase führte auch die Behandlung mit spezifischen P38 MAPK Inhibitoren zu einer Hemmung der COX-2 Expression. Die Untersuchungen mit dem spezifischen P38 MAPK-Inhibitor SB203580 ergaben für beide Zelllinien eine deutliche Reduktion der COX-2 Expression sowohl nach Induktion durch ionisierende Strahlung, als auch nach Induktion durch EGF. Eine Analyse der Phosphorylierung von P38 MAPK nach Bestrahlung alleine und in Kombination mit SB203580 zeigte einen deutlichen Anstieg nach Behandlung mit SB203580, während nach Bestrahlung nur ein moderater Anstieg zu verzeichnen war. Ebenso wurde ein Anstieg der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor ATF-2, einem downstream target von P38 MAPK, beobachtet. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu Publikationen in denen eine Inhibition der Phosphorylierung durch SB203580 beschrieben wird (Chang *et al.*, 2005). Ein Anstieg der Phosphorylierung nach Behandlung mit SB203580 kann nach Informationen des Herstellers in seltenen Ausnahmen der Fall sein. Der Anstieg soll durch eine negative Rückkopplung erfolgen, welche die

Phosphorylierung von P38 MAPK fördert. Die Kinase-Aktivität des Enzyms ist jedoch durch die Bindung des Inhibitors am aktiven Zentrum von P38 MAPK gehemmt. Die Phosphorylierung von ATF-2 ist die Folge einer Aktivierung durch JNK (persönliche Information Dr. Traunstein, Merck-Calbiochem). ATF-2 kann durch beide Signalwege, den P38 MAPK- sowie den JNK-Signalweg phosphoryliert werden (Chun *et al.*, 2004; Dent *et al.*, 2003b; Gupta *et al.*, 1995). Zum Nachweis der Inhibition von P38 MAPK wurde in dieser Arbeit die Phosphorylierung von ATF-2 nach Behandlung mit SB203580 und dem JNK-Inhibitor SP600125 untersucht. Nach Behandlung mit beiden Inhibitoren konnte eine Reduktion der ATF-2-Phosphorylierung nachgewiesen werden; ein Indiz für die Inhibition der Kinase-Aktivität von P38 MAPK durch SB203580.

Dass P38 MAPK Einfluss auf die COX-2 Expression haben kann, wurde durch Untersuchungen verschiedener anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Eine Untersuchung von Liu *et al.*, 2003 konnte zeigen, dass durch die Behandlung mit IL-1 β die COX-2 Expression in HT-29 Magenkrebszellen über den JNK-, ERK1/2, sowie den PI3-Kinase-Signalweg induziert werden kann. Ebenso wurde nachgewiesen, dass die Inhibition von P38 MAPK die COX-2 Expression unterdrückt. Die Induktion über den P38 MAPK-Signalweg wurde jedoch nicht auf die Behandlung der Zellen mit IL-1 β , sondern auf eine konstitutive Expression von P38 MAPK zurückgeführt. Über die Rolle von P38 MAPK bei der COX-2 Expression gibt es widersprüchliche Ergebnisse. In einer Studie von Chang *et al.*, 2005 an A549 Lungenkarzinomzellen hatte P38 MAPK keinen Einfluss auf die COX-2 Expression nach Induktion durch PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). Der von Chang *et al.* beschriebene Weg der PMA-induzierten COX-2 Expression verläuft über einen Signalweg, der von PKC ausgehend die Aktivierung von Ras, Raf-1, MEK und ERK1/2 nach sich zieht und bei dem Transkriptionsfaktor NF- κ B endet. Dagegen kommt eine Arbeit von Chun *et al.*, 2004 zu dem Ergebnis, dass durch Behandlung mit dem Phorbolster TPA eine Induktion von COX-2 über den P38 MAPK-Signalweg in der Haut von Mäusen möglich ist. In dieser Studie stand am Ende die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Der Einfluss des P38 MAPK-Signalweges auf die COX-2 Expression scheint abhängig von der Art der Stimulation, sowie des untersuchten Gewebes zu sein. Dass nach Bestrahlung mit UVB verschiedene Signalwege der MAPK-Signalwegfamilie eine Rolle spielen können, zeigt eine Veröffentlichung von Ashida *et al.*, 2003. Die UVB-Bestrahlung induzierte neben ERK und PI3-Kinase auch die Aktivierung des P38 MAPK-Signalweges in der immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT. Die UV-induzierte Aktivierung dieser Signalwege sowie die Expression konnte durch

Inhibition des EGF-Rezeptors unterbunden werden. Die Expression von COX-2 über den P38 MAPK-Signalweg kann jedoch nicht nur durch UV-Bestrahlung, sondern auch durch Bestrahlung mit ionisierender Strahlung aktiviert werden (Tessner *et al.*, 2004).

Die Inhibition von ERK1/2 durch den spezifischen MEK-Inhibitor PD98059 hatte in den beiden untersuchten Zelllinien unterschiedliche Auswirkung auf die strahleninduzierte COX-2 Expression. In MDA-MB231 Mammakarzinomzellen bewirkte die Präinkubation mit PD98059 eine eindeutige Inhibition der strahleninduzierten COX-2 Expression. Diese war in PC-3 Prostatakarzinomzellen nicht nachzuweisen. Bei Untersuchungen beider Zelllinien, PC-3 und MDA-MB231, bei denen die Expression von COX-2 durch EGF induziert wurde, führte die Behandlung mit PD98059 in PC-3 Zellen ebenfalls zu einer Inhibition der COX-2 Expression. Diese Resultate sprechen dafür, dass in Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben nach Bestrahlung unterschiedliche Signalwege aktiviert werden können. Zudem scheint die Aktivierung eines Signalweges in abhängig von der Art der Stimulation zu sein. Die Untersuchung der Phosphorylierung von ERK1/2 sowohl nach Induktion durch Bestrahlung, als auch durch EGF ergab, dass in PC-3 Zellen die Aktivierung durch Bestrahlung nicht möglich war. In der unbehandelten Kontrolle konnte ebenfalls keine Phosphorylierung nachgewiesen werden, während die Behandlung mit EGF eine deutliche Phosphorylierung ergab. Dieses Resultat war nicht zu erwarten, da beide Zelllinien eine Mutation in K-Ras besitzen (Gilhooly & Rose, 1999; Rajesh *et al.*, 1999; Toulany *et al.*, 2005). Diese Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivität von K-Ras. Konstitutiv aktives Ras kann zu einer Aktivierung von ERK1/2 über den Ras/Raf/MEK/ERK1/2 Signalweg führen (Gupta *et al.*, 2000). Eine basale Phosphorylierung von ERK1/2 in PC-3 Zellen wäre zu erwarten gewesen. Dem zu Folge spielt die Mutation in K-Ras bei der strahleninduzierten COX-2 Expression in PC-3 Prostatakarzinomzellen keine Rolle.

Die Arbeitsgruppe um Chang *et al.*, 2005 konnte zeigen, dass durch PMA induziertes COX-2 über PKC und den Ras/Raf-1/MEK/ERK1/2/NF- κ B reguliert werden kann. Die Hemmung von PKC durch den spezifischen Inhibitor Rottlerin führte auch in den untersuchten Zelllinien PC-3 und MDA-MB231 zu einer Blockierung der strahleninduzierten Expression von COX-2. Die Daten aus den Untersuchungen in der Zelllinie PC-3 geben einen Hinweis darauf, dass über PKC noch mindestens ein weiterer Signalweg aktiviert werden kann. Es wird vermutet, dass auch der P38 MAPK Signalweg über PKC aktiviert werden kann (Rahman *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2003).

Nach Präinkubation mit dem P38 MAPK Inhibitor SB203580, dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 und dem PKC Inhibitor Rottlerin zeigten beide untersuchten Zelllinien PC-3 und MDA-MB231 eine nahezu vollständige Inhibition der strahleninduzierten COX-2 Expression. Dies legt die Vermutung nahe, dass es bei der Regulation der strahleninduzierten Expression von COX-2 eine Interaktion der verschiedenen Signalwege gibt. Eine Analyse der strahleninduzierten AKT-Phosphorylierung nach Behandlung mit dem P38 MAPK-Inhibitor SB203580 in PC-3 Zellen ergab keine Veränderung. Im umgekehrten Fall kam es zum Anstieg der Phosphorylierung von P38 MAPK nach Behandlung mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 sowohl nach Gabe des Inhibitors alleine als auch in Kombination mit Bestrahlung. Auch die Inkubation mit Rottlerin führte nicht zu einer Reduktion der P38 MAPK-Phosphorylierung, wie es bei einer Interaktion der Signalwege, die zu einer Inhibition von COX-2 führt zu erwarten gewesen wäre, sondern zeigte ebenfalls einen Anstieg. Der beobachtete Anstieg der Phosphorylierung nach Behandlung mit SB203580 und LY294002 kann aktuell nicht erklärt werden. Er spricht jedoch mehr dafür, dass die untersuchten Signalwege unabhängig voneinander die strahleninduzierte COX-2 Expression regulieren. Eine Gemeinsamkeit die alle hier untersuchten Signalwege haben, ist dass in ihrem Verlauf am Ende die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und/oder AP-1 aktiviert werden können (Chang *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2004; Dent *et al.*, 2003a; Ma *et al.*, 1998; Sheu *et al.*, 2005; Valles *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 spielen neben anderen bei der Expression von COX-2 eine wichtige Rolle. Sie kommen als regulatorische Elemente in der Promotor-Region von COX-2 vor (Nie *et al.*, 2003; Inoue & Tanabe, 1998; Subbaramaiah *et al.*, 2001).

Die hier untersuchten Signalwege gehören alle zur MAPK-Signalwegfamilie und können durch Bestrahlung über den EGF-Rezeptor (EGFR) induziert werden. Der EGFR wird nach Bestrahlung autophosphoryliert und kann so die verschiedenen MAPK-Signalwege aktivieren, so auch in der Zelllinie MDA-MB231. Die EGFR-vermittelte Signalübertragung kann durch verschiedene Inhibitoren blockiert werden (Dent *et al.*, 2003b; Schmidt-Ulrich *et al.*, 2003; Toulany *et al.*, 2005). In der hier vorliegenden Arbeit hatte die Behandlung mit EGFR Inhibitoren jedoch keinen Einfluss auf die strahleninduzierte COX-2 Expression. Auch die EGF-induzierte COX-2 Expression konnte durch Behandlung mit dem spezifischen EGFR-Inhibitor BIBX1382BS nicht inhibiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Induktion der COX-2 Expression in den untersuchten Zelllinien unabhängig von EGFR ist. Dieses Resultat wird durch eine Arbeit von Ashida *et al.*, 2003 untermauert. So konnte in der

immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT nach Behandlung mit dem spezifischen EGFR-Inhibitor AG825 ein Anstieg der durch UVB-Bestrahlung induzierten COX-2 Expression gemessen werden. Der EGFR ist jedoch nur ein Mitglied einer Rezeptorfamilie und es ist zu vermuten, dass andere Mitglieder an der strahleninduzierten, Rezeptorvermittelten COX-2 Expression beteiligt sind. Weiter muss auch in Betracht gezogen werden, dass verschiedene andere Rezeptoren durch Bestrahlung aktiviert werden können bzw. die Bestrahlung direkten Einfluss auf eine Kinase einer für die COX-2 Expression relevanten Signalkaskade hat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass COX-2 aufgrund seiner Überexpression in einer Vielzahl von Tumoren und der Synthese potentiell radioprotektiv wirkender Prostaglandine als molekulares „Target“ in der Strahlentherapie angesehen werden muss. Die Wirkung von spezifischen COX-2 Inhibitoren in Bezug auf eine Radiosensitivierung ist jedoch stark abhängig von der Zelllinie bzw. des betreffenden Gewebes und des eingesetzten Inhibitors. Die an der COX-2 Expression beteiligten Signalwege sind ebenfalls stark abhängig von der Art der Stimulation und der Zelllinie. Eine herausragende Rolle bei der COX-2 Expression spielen jedoch die MAPK-Signalwege, der PI3-Kinase-, der P38 MAPK- und ERK1/2-Signalweg.

5. Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind weltweit ein Problem und die Zahl der Neuerkrankungen steigt stetig. Chirurgische Eingriffe, Strahlentherapie und Chemotherapie sind die maßgeblichen Behandlungsformen bei Tumorerkrankungen. Neue Entwicklungen in der Strahlentherapie machen Bestrahlung alleine oder in Kombination mit Chemotherapie zu einer wichtigen Behandlungsmethode, die heute weiterhin an Bedeutung gewinnt. Der Erfolg einer Behandlung ist oftmals abhängig vom genetischen Profil eines Tumors. Damit wird die Untersuchung der molekularen Abläufe in Zellen nach Bestrahlung zu einem wichtigen Aspekt der Strahlentherapie um effektive Strategien zur Tumorbehandlung zu entwickeln.

COX-2 ist in vielen Tumoren überexprimiert und korreliert mit einem schlechten Verlauf der Krankheit. Zudem kann COX-2 durch ionisierende Strahlung induziert werden. Das macht COX-2 zu einem interessanten molekularen „Target“ für die Strahlentherapie und die Tumorthherapie im Allgemeinen. Studien mit spezifischen COX-2 Inhibitoren haben in verschiedenen Zelllinien jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt.

Die Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit bezogen sich hauptsächlich auf das Überleben und das Wachstum von Prostatakarzinomzelllinien nach Bestrahlung alleine und in Kombination mit dem spezifischen COX-2 Inhibitor Celecoxib sowie die Analyse von Signalwegen über welche die strahleninduzierte COX-2 Expression verläuft.

Dies sind die wichtigsten Resultate:

1. Die Behandlung mit Celecoxib hat keinen Einfluss auf die Strahlensensitivität der untersuchten Prostatakarzinomzelllinien.
2. Die Proliferation der untersuchten Zelllinien wurde durch die Behandlung mit Celecoxib gehemmt.
3. Die Inhibition der Proliferation durch Celecoxib scheint unabhängig vom COX-2 Niveau.
4. Apoptose kann in den untersuchten Zelllinien durch Behandlung mit Celecoxib in klinisch relevanten Dosen nicht induziert werden.
5. Die Induktion der COX-2 Expression durch ionisierende Strahlung ist abhängig von der Zelllinie.
6. Bei der Induktion der COX-2 Expression spielen die Signalwege der MAPK-Signalwegfamilie eine maßgebliche Rolle.

Die erzielten Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass COX-2 ein wichtiges molekulares „Target“ in der Strahlentherapie sein kann. Dies ist jedoch abhängig von der zu behandelten Tumorentität. Ebenso sind die Signalwege die zu einer strahleninduzierten COX-2 Expression führen, für jeden Tumor individuell verschieden. So kann auch die Anwendung von Celecoxib in der Strahlentherapie für Behandlung bestimmter Tumore positiv sein.

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP1	Activator protein 1
APS	Amoniumpersulfat
BSA	Ovine serum albumin
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	Cyclic APM response element binding protein
DMEM	Dublecco´s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribunucleic acid
DTT	Dithioreitol
ECL	Enhanced chemilominescence
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extra-cellular signal regulated kinase
FCS	Fetal calf serum
Gy	Gray
H ₂ O _{dd}	Zweifach-destilliertes deionisiertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-Ethansulfonic acid
H-ras	Harvey ras
IgG	Immunoglobulin
IR	Ionizing radiation
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
KGF	Keranocyte growth factor
K-ras	Kirsten ras
MAPK	Mitogen activated potein kinase
MEK	MAP kinase / Erk kinase
NF?B	Nuclear factor ?B
PBS	Phosphate-buffered saline
PG	Prostaglandin
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase

Raf	Homologue to v-raf (murine sarcoma viral oncogene)
Ras	Homologue to v-raS (rat sarcoma viral oncogene)
RNA	Ribonucleic acid
RT	Room temperature
SD	Standard deviation
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SE	Standard error
SF	Survival fraction
TEMED	N,N,N',N'- Tetarmethylethylenediamine
TGF β	Transforming growth factor β
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

7. Literaturverzeichnis

- Arico, S., Pattingre, S., Bauvy, C., Gane, P., Barbat, A., Codogno, P. & Ogier-Denis, E. (2002).** Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* **277**, 27613-27621.
- Asano, K., Nakamura, H., Lilly, C. M., Klagsbrun, M. & Drazen, J. M. (1997).** Interferon gamma induces prostaglandin G/H synthase-2 through an autocrine loop via the epidermal growth factor receptor in human bronchial epithelial cells. *J Clin Invest* **99**, 1057-1063.
- Ashida, M., Bito, T., Budiyo, A., Ichihashi, M. & Ueda, M. (2003).** Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB. *Exp Dermatol* **12**, 445-452.
- Balch, C. M., Dougherty, P. A., Cloud, G. A. & Tilden, A. B. (1984).** Prostaglandin E2-mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients. *Surgery* **95**, 71-77.
- Basu, G. D., Pathangey, L. B., Tinder, T. L., Gendler, S. J. & Mukherjee, P. (2005).** Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **7**, R422-435.
- Baumann, M., Krause, M., Zips, D., Petersen, C., Dittmann, K., Dorr, W. & Rodemann, H. P. (2004).** Molecular targeting in radiotherapy of lung cancer. *Lung Cancer* **45 Suppl 2**, S187-197.
- Bradbury, D. A., Newton, R., Zhu, Y. M., El-Haroun, H., Corbett, L. & Knox, A. J. (2003).** Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in human pulmonary artery smooth muscle cells is mediated by the cyclic AMP response element through a novel autocrine loop involving endogenous prostaglandin E2, E-prostanoid 2 (EP2), and EP4 receptors. *J Biol Chem* **278**, 49954-49964.
- Brodie, A. M., Lu, Q., Long, B. J. & other authors (2001).** Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* **79**, 41-47.
- Buchanan, F. G., Wang, D., Bargiacchi, F. & DuBois, R. N. (2003).** Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **278**, 35451-35457.
- Buckman, S. Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J. & Pentland, A. P. (1998).** COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* **19**, 723-729.
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S. & Simmons, D. L. (2002).** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13926-13931.

- Chang, M. S., Chen, B. C., Yu, M. T., Sheu, J. R., Chen, T. F. & Lin, C. H. (2005).** Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways. *Cell Signal* **17**, 299-310.
- Choudhary, S., Wadhwa, S., Raisz, L. G., Alander, C. & Pilbeam, C. C. (2003).** Extracellular calcium is a potent inducer of cyclo-oxygenase-2 in murine osteoblasts through an ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res* **18**, 1813-1824.
- Choy, H. & Milas, L. (2003).** Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst* **95**, 1440-1452.
- Chun, K. S., Kim, S. H., Song, Y. S. & Surh, Y. J. (2004).** Celecoxib inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of AP-1 and p38 MAP kinase in mouse skin. *Carcinogenesis* **25**, 713-722.
- Cui, W., Yu, C. H. & Hu, K. Q. (2005).** In vitro and in vivo effects and mechanisms of celecoxib-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **11**, 8213-8221.
- Cummings, J., Ward, T. H., Ranson, M. & Dive, C. (2004).** Apoptosis pathway-targeted drugs--from the bench to the clinic. *Biochim Biophys Acta* **1705**, 53-66.
- Daniel, T. O., Liu, H., Morrow, J. D., Crews, B. C. & Marnett, L. J. (1999).** Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* **59**, 4574-4577.
- Davis, R. J. (1999).** Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* **64**, 1-12.
- Davis, T. W., O'Neal, J. M., Pagel, M. D., Zweifel, B. S., Mehta, P. P., Heuvelman, D. M. & Masferrer, J. L. (2004).** Synergy between celecoxib and radiotherapy results from inhibition of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2, a survival factor for tumor and associated vasculature. *Cancer Res* **64**, 279-285.
- Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P. & Grant, S. (2003).** MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* **22**, 5885-5896.
- Di Popolo, A., Memoli, A., Apicella, A., Tuccillo, C., di Palma, A., Ricchi, P., Acquaviva, A. M. & Zarrilli, R. (2000).** IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. *Oncogene* **19**, 5517-5524.
- Folkman, J. (1995).** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**, 27-31.
- Gilhooly, E. M. & Rose, D. P. (1999).** The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines. *Int J Oncol* **15**, 267-270.

Grosch, S., Tegeder, I., Niederberger, E., Brautigam, L. & Geisslinger, G. (2001). COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J* **15**, 2742-2744.

Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D. G. & Mukhtar, H. (2000). Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* **42**, 73-78.

Han, C., Leng, J., Demetris, A. J. & Wu, T. (2004). Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res* **64**, 1369-1376.

Han, S. & Roman, J. (2006). COX-2 inhibitors suppress lung cancer cell growth by inducing p21 via COX-2 independent signals. *Lung Cancer* **51**, 283-296.

Hata, A. N. & Breyer, R. M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* **103**, 147-166.

Herschman, H. R. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* **1299**, 125-140.

Hida, T., Kozaki, K., Muramatsu, H., Masuda, A., Shimizu, S., Mitsudomi, T., Sugiura, T., Ogawa, M. & Takahashi, T. (2000). Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **6**, 2006-2011.

Hiraga, T., Myoui, A., Choi, M. E., Yoshikawa, H. & Yoneda, T. (2006). Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* **66**, 2067-2073.

Huh, Y. H., Kim, S. H., Kim, S. J. & Chun, J. S. (2003). Differentiation status-dependent regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by epidermal growth factor via mitogen-activated protein kinase in articular chondrocytes. *J Biol Chem* **278**, 9691-9697.

Inoue, H. & Tanabe, T. (1998). Transcriptional role of the nuclear factor kappa B site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 143-148.

Jabbour, H. N., Sales, K. J., Boddy, S. C., Anderson, R. A. & Williams, A. R. (2005). A positive feedback loop that regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin F2alpha synthesis via the F-series-prostanoid receptor and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. *Endocrinology* **146**, 4657-4664.

Juretic, N., Santibanez, J. F., Hurtado, C. & Martinez, J. (2001). ERK 1,2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line. *J Cell Biochem* **83**, 92-98.

Kambayashi, T., Alexander, H. R., Fong, M. & Strassmann, G. (1995). Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol* **154**, 3383-3390.

- Kardosh, A., Blumenthal, M., Wang, W. J., Chen, T. C. & Schonthal, A. H. (2004).** Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther* **3**, 55-62.
- Kim, S. J., Ju, J. W., Oh, C. D. & other authors (2002a).** ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J Biol Chem* **277**, 1332-1339.
- Kim, Y. B., Kim, G. E., Cho, N. H. & other authors (2002b).** Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* **95**, 531-539.
- Kishi, K., Petersen, S., Petersen, C., Hunter, N., Mason, K., Masferrer, J. L., Tofilon, P. J. & Milas, L. (2000).** Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* **60**, 1326-1331.
- Kitano, M., Hla, T., Sekiguchi, M., Kawahito, Y., Yoshimura, R., Miyazawa, K., Iwasaki, T. & Sano, H. (2006).** Sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in rheumatoid synovium: regulation of synovial proliferation and inflammatory gene expression. *Arthritis Rheum* **54**, 742-753.
- Klenke, F. M., Gebhard, M. M., Ewerbeck, V., Abdollahi, A., Huber, P. E. & Sckell, A. (2006).** The selective Cox-2 inhibitor Celecoxib suppresses angiogenesis and growth of secondary bone tumors: an intravital microscopy study in mice. *BMC Cancer* **6**, 9.
- Kulp, S. K., Yang, Y. T., Hung, C. C., Chen, K. F., Lai, J. P., Tseng, P. H., Fowble, J. W., Ward, P. J. & Chen, C. S. (2004).** 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**, 1444-1451.
- Leng, J., Han, C., Demetris, A. J., Michalopoulos, G. K. & Wu, T. (2003).** Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* **38**, 756-768.
- Levy, G. N. (1997).** Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *Faseb J* **11**, 234-247.
- Li, M., Lotan, R., Levin, B., Tahara, E., Lippman, S. M. & Xu, X. C. (2000).** Aspirin induction of apoptosis in esophageal cancer: a potential for chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 545-549.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F. X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G. L. & Karin, M. (1995).** Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* **268**, 286-290.
- Liu, B., Fang, M., Lu, Y., Mills, G. B. & Fan, Z. (2001).** Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells. *Br J Cancer* **85**, 303-311.

- Liu, W., Reinmuth, N., Stoeltzing, O. & other authors (2003).** Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res* **63**, 3632-3636.
- Ma, W. Y., Huang, C. & Dong, Z. (1998).** Inhibition of ultraviolet C irradiation-induced AP-1 activity by aspirin is through inhibition of JNKs but not erk5 or P38 MAP kinase. *Int J Oncol* **12**, 565-568.
- Ma, X., Kundu, N., Rifat, S., Walser, T. & Fulton, A. M. (2006).** Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res* **66**, 2923-2927.
- Mahns, A., Wolber, R., Stab, F., Klotz, L. O. & Sies, H. (2004).** Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 257-262.
- Marme, D. (1996).** Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol* **14**, 166-174.
- Martey, C. A., Pollock, S. J., Turner, C. K., O'Reilly, K. M., Baglole, C. J., Phipps, R. P. & Sime, P. J. (2004).** Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L981-991.
- Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T. & other authors (2000).** Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* **60**, 1306-1311.
- Min, S. Y., Hwang, S. Y., Jung, Y. O., Jeong, J., Park, S. H., Cho, C. S., Kim, H. Y. & Kim, W. U. (2004).** Increase of cyclooxygenase-2 expression by interleukin 15 in rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol* **31**, 875-883.
- Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J. & Vane, J. R. (1993).** Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11693-11697.
- Mitsunari, M., Yoshida, S., Shoji, T., Tsukihara, S., Iwabe, T., Harada, T. & Terakawa, N. (2006).** Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J Reprod Immunol*.
- Nakata, E., Mason, K. A., Hunter, N., Husain, A., Raju, U., Liao, Z., Ang, K. K. & Milas, L. (2004).** Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 369-375.
- Nam, D. H., Park, K., Park, C. & other authors (2004).** Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Oncol Rep* **11**, 263-268.
- Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F. & Taketo, M. M. (1996).** Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **87**, 803-809.
- Park, Y. G., Kang, S. K., Kim, W. J., Lee, Y. C. & Kim, C. H. (2004).** Effects of TGF-beta, TNF-alpha, IL-beta and IL-6 alone or in combination, and tyrosine kinase inhibitor on

cyclooxygenase expression, prostaglandin E2 production and bone resorption in mouse calvarial bone cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2270-2280.

Patel, M. I., Subbaramaiah, K., Du, B., Chang, M., Yang, P., Newman, R. A., Cordon-Cardo, C., Thaler, H. T. & Dannenberg, A. J. (2005). Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res* **11**, 1999-2007.

Petersen, C., Petersen, S., Milas, L., Lang, F. F. & Tofilon, P. J. (2000). Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Cancer Res* **6**, 2513-2520.

Rahman, A., Anwar, K. N., Uddin, S., Xu, N., Ye, R. D., Platanias, L. C. & Malik, A. B. (2001). Protein kinase C-delta regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **21**, 5554-5565.

Rajesh, D., Schell, K. & Verma, A. K. (1999). Ras mutation, irrespective of cell type and p53 status, determines a cell's destiny to undergo apoptosis by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A. *Mol Pharmacol* **56**, 515-525.

Raju, U., Ariga, H., Dittmann, K., Nakata, E., Ang, K. K. & Milas, L. (2005). Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**, 520-528.

Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C. M., Blendy, J. A. & Ginty, D. D. (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286**, 2358-2361.

Riehl, T. E., Newberry, R. D., Lorenz, R. G. & Stenson, W. F. (2004). TNFR1 mediates the radioprotective effects of lipopolysaccharide in the mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G166-173.

Riley, P. A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* **65**, 27-33.

Rodriguez-Mora, O. G., LaHair, M. M., McCubrey, J. A. & Franklin, R. A. (2005). Calcium/calmodulin-dependent kinase I and calcium/calmodulin-dependent kinase kinase participate in the control of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* **65**, 5408-5416.

Rosch, S., Ramer, R., Brune, K. & Hinz, B. (2005). Prostaglandin E(2) induces cyclooxygenase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells through activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1171-1178.

Schmidt-Ulrich, R. K., Contessa, J. N., Lammering, G., Amorino, G. & Lin, P.-S. (2003). ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* **22**, 5855-5865.

- Sengupta, S., Sellers, L. A., Cindrova, T., Skepper, J., Gherardi, E., Sasisekharan, R. & Fan, T. P. (2003).** Cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit hepatocyte growth factor/scatter factor-induced angiogenesis. *Cancer Res* **63**, 8351-8359.
- Sheu, M. L., Chao, K. F., Sung, Y. J., Lin, W. W., Lin-Shiau, S. Y. & Liu, S. H. (2005).** Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells. *Cell Signal* **17**, 975-984.
- Shin, V. Y., Wu, W. K., Chu, K. M., Wong, H. P., Lam, E. K., Tai, E. K., Koo, M. W. & Cho, C. H. (2005a).** Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer. *Mol Cancer Res* **3**, 607-615.
- Shin, Y. K., Park, J. S., Kim, H. S., Jun, H. J., Kim, G. E., Suh, C. O., Yun, Y. S. & Pyo, H. (2005b).** Radiosensitivity enhancement by celecoxib, a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor, via COX-2-dependent cell cycle regulation on human cancer cells expressing differential COX-2 levels. *Cancer Res* **65**, 9501-9509.
- Slice, L. W., Hodikian, R. & Zhukova, E. (2003).** Gastrin and EGF synergistically induce cyclooxygenase-2 expression in Swiss 3T3 fibroblasts that express the CCK2 receptor. *J Cell Physiol* **196**, 454-463.
- Smith, M. L., Hawcroft, G. & Hull, M. A. (2000a).** The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer* **36**, 664-674.
- Smith, W. L., Garavito, R. M. & DeWitt, D. L. (1996).** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**, 33157-33160.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L. & Garavito, R. M. (2000b).** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145-182.
- Soslow, R. A., Dannenberg, A. J., Rush, D., Woerner, B. M., Khan, K. N., Masferrer, J. & Koki, A. T. (2000).** COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* **89**, 2637-2645.
- Srinath, P., Rao, P. N., Knaus, E. E. & Suresh, M. R. (2003).** Effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors on prostate cancer cell proliferation. *Anticancer Res* **23**, 3923-3928.
- Steinauer, K. K., Gibbs, I., Ning, S., French, J. N., Armstrong, J. & Knox, S. J. (2000).** Radiation induces upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in PC-3 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**, 325-328.
- Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K. & other authors (2000).** The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **342**, 1946-1952.
- Subbaramaiah, K., Lin, D. T., Hart, J. C. & Dannenberg, A. J. (2001).** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* **276**, 12440-12448.

Subbaramaiah, K., Norton, L., Gerald, W. & Dannenberg, A. J. (2002). Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* **277**, 18649-18657.

Takada, Y., Bhardwaj, A., Potdar, P. & Aggarwal, B. B. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* **23**, 9247-9258.

Tamura, M., Sebastian, S., Yang, S., Gurates, B., Ferrer, K., Sasano, H., Okamura, K. & Bulun, S. E. (2002). Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin synthesis in endometrial stromal cells by malignant endometrial epithelial cells. A paracrine effect mediated by prostaglandin E2 and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* **277**, 26208-26216.

Tang, X., Sun, Y. J., Half, E., Kuo, M. T. & Sinicrope, F. (2002). Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Res* **62**, 4903-4908.

Tanji, N., Kikugawa, T. & Yokoyama, M. (2000). Immunohistochemical study of cyclooxygenases in prostatic adenocarcinoma; relationship to apoptosis and Bcl-2 protein expression. *Anticancer Res* **20**, 2313-2319.

Thun, M. J., Namboodiri, M. M. & Heath, C. W., Jr. (1991). Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* **325**, 1593-1596.

Timoshenko, A. V., Chakraborty, C., Wagner, G. F. & Lala, P. K. (2006). COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *Br J Cancer* **94**, 1154-1163.

Tjiu, J. W., Liao, Y. H., Lin, S. J., Huang, Y. L., Tsai, W. L., Chu, C. Y., Kuo, M. L. & Jee, S. H. (2006). Cyclooxygenase-2 overexpression in human basal cell carcinoma cell line increases antiapoptosis, angiogenesis, and tumorigenesis. *J Invest Dermatol* **126**, 1143-1151.

Toulany, M., Dittmann, K., Kruger, M., Baumann, M. & Rodemann, H. P. (2005). Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. *Radiother Oncol* **76**, 143-150.

Tsujii, M., Kawano, S. & DuBois, R. N. (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3336-3340.

Uotila, P., Valve, E., Martikainen, P., Nevalainen, M., Nurmi, M. & Harkonen, P. (2001). Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. *Urol Res* **29**, 23-28.

Valles, S. L., Blanco, A. M., Pascual, M. & Guerri, C. (2004). Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol* **14**, 365-371.

Wang, D. & DuBois, R. N. (2004). Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 415-416.

Wang, D., Mann, J. R. & DuBois, R. N. (2005). The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **128**, 1445-1461.

Wang, X., McGowan, C. H., Zhao, M., He, L., Downey, J. S., Fearn, C., Wang, Y., Huang, S. & Han, J. (2000). Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **20**, 4543-4552.

Ward, J. F. (1995). Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat Res* **142**, 362-368.

Weitzman, S. A. & Gordon, L. I. (1990). Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* **76**, 655-663.

Wikstrom, K., Ohd, J. F. & Sjolander, A. (2003). Regulation of leukotriene-dependent induction of cyclooxygenase-2 and Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 330-335.

Wu, G., Luo, J., Rana, J. S., Laham, R., Sellke, F. W. & Li, J. (2006). Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **69**, 512-519.

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

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

Yan, X., Wu Xiao, C., Sun, M., Tsang, B. K. & Gibb, W. (2002). Nuclear factor kappa B activation and regulation of cyclooxygenase type-2 expression in human amnion mesenchymal cells by interleukin-1beta. *Biol Reprod* **66**, 1667-1671.

Yang, S. H., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. & Sharrocks, A. D. (1998). Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Embo J* **17**, 1740-1749.

Yao, M., Lam, E. C., Kelly, C. R., Zhou, W. & Wolfe, M. M. (2004). Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* **90**, 712-719.

Yosimichi, G., Nakanishi, T., Nishida, T., Hattori, T., Takano-Yamamoto, T. & Takigawa, M. (2001). CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). *Eur J Biochem* **268**, 6058-6065.

Zhang, Z., Lai, G. H. & Sirica, A. E. (2004). Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* **39**, 1028-1037.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Guido Klaus Krebiehl

Geboren am 7. September in Pforzheim

Promotion und Studium

- 2003 – 2006 Promotion in der Sektion Strahlenbiologie und molekulare
Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen
Thema: Analyse relevanter Signalwege der strahleninduzierten COX-2
Expression in Tumorzellen
Betreuer: Prof. Dr. H.-P. Rodemann, Dr. P. Ohneseit
- 1994 – 2002 Studium der Biologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Parasitologie
Thema: Analyse potentieller Protein-Protein Interaktionen von p21^{Cip1/WAF1}
und E2F1 im Zellzyklus
Abschluss: Diplom
Betreuer: Prof. Dr. A. Preiss, Dr. K.-H. Herzog
- 1993 – 1994 Maschinenbaustudium an der Universität Karlsruhe

Schulbildung

- 1984 – 1993 Kepler Gymnasium Pforzheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1980 – 1984 Karl-Friedrich Grund- und Hauptschule Pforzheim

Wehrdienst

- 1995 – 1996 2./ABC Abw. BTL 750 Bruchsal

Pforzheim, 25.11.06