Prognosefaktoren im Mammakarzinom und im Ovarialkarzinom unter besonderer Berücksichtigung der Cyclooxygenase-2

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Pathologie

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Carsten Denkert

geboren am 25.10.1969 in Hüls j. Krefeld

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: 1.10.2003

öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 21.06.2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Höfler
2. Prof. Dr. med. M. Kaufmann

Zusammenfassung

Zur Abschätzung der Prognose von Tumorerkrankungen und zur Therapieplanung können neben konventionellen klinischen Parametern auch molekulare Prognosemarker im Tumorgewebe bestimmt werden. In der vorliegenden Studie haben wir vier verschiedene potentielle molekulare Prognosefaktoren im Ovarialkarzinom und teilweise auch im Mammakarzinom untersucht: die Cyclooxygenase-2 (COX-2), das humane ELAV-ähnliche Protein HuR, das Oberflächenantigen CD24 und die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1). Dabei lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Cyclooxygenase-2 (COX-2), die sowohl in der Entzündungsreaktion als auch bei der Entstehung und Progression maligner Tumoren eine wichtige Rolle spielt. Wir konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression der COX-2 beim Ovarialkarzinom und beim Mammakarzinom signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. In Zellkulturmodellen haben wir verschiedene Strategien zur Inhibition der COX-2 angewendet, nämlich die pharmakologische Inhibition durch NS-398 sowie die spezifische Inhibition durch RNA Interferenz. Dabei ergab sich, dass COX-2 Inhibitoren neben der Wirkung auf die COX-2 auch über anderen Zielproteine die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen hemmen und zu einem Zellzyklusarrest führen. Bei weiteren Untersuchungen zur Regulation der COX-2 konnten wir zeigen, dass das RNA-stabilisierende Protein HuR mit der COX-2 Expression korreliert und ebenfalls ein Prognosefaktor für das Ovarialkarziom ist. Unsere Ergebnisse bilden eine Grundlage für klinische Studien zur Untersuchung des möglichen Effektes von COX-Inhibitoren in der Therapie maligner Tumoren.

Schlagwörter:

Cyclooxygenase-2, molekulare Prognosefaktoren, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, HuR

Abstract

Molecular prognostic markers can be determined in tumor tissue and can be used – in addition to conventional clinicopathological parameters – to estimate patient prognosis and to plan the therapy of malignant tumors. In this study we have investigated the expression of four different molecular prognostic factors in ovarian carcinoma and partially in breast carcinoma: cyclooxygenase-2 (COX-2), the human ELAV-like protein HuR, the surface antigen CD24, as well as the mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1). For further evaluation, we have focused on COX-2, which plays an important role in tumor biology and inflammation. Increased expression of COX-2 in tumor tissue was associated with poor prognosis in ovarian carcinoma and breast carcinoma. In cell culture models, we have used two different strategies for inhibition of COX-2: pharmacological inhibition and RNA interference. We found that COX-2 inhibitors act on other cellular targets in addition to COX-2 and inhibit proliferation of ovarian carcinoma cells by induction of cell cycle arrest. In further studies we could show that the RNA-stabilizing protein HuR is associated with increased COX-2 expression and is an prognostic factor in ovarian carcinoma, as well. These results provide a basis for further evaluation of COX-inhibitors in tumor therapy.

Keywords:

Cyclooxygenase-2, prognostic factors, ovarian carcinoma, breast cancer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Epidemiologische Daten zum Ovarialkarzinom und Mammakarzinom	7
1.2	Molekulare Prognosefaktoren	8
1.3	Ähnlichkeiten zwischen entzündlichem Gewebe und Tumorgewebe - die COX-2 als wichtiges Element der tumorassoziierten Entzündung	9
1.4	Tumorbiologische Bedeutung der COX-2	12
1.5	Regulation der COX-2 Expression über die mRNA Stabilität	12
2	Zielstellung	14
3	Zusammenfassung der Ergebnisse	15
3.1	Prognosefaktoren für das Ovarialkarzinom	15
3.1.1	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1)	15
3.1.2	CD24	15
3.1.3	Cyclooxygenase-2 (COX-2)	16
3.2	Expression der COX-2 als Prognosefaktor beim Mammakarzinom	17
3.3	Auswirkungen des nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikamentes NS-398 sowie von COX-2-spezifischer RNA Interferenz auf humane Ovarialkarzinomzellen	18
3.4	Assoziation zwischen zytoplasmatischer Expression des ELAV-ähnlichen Proteins HuR und erhöhter COX-2 Expression	19
4	Diskussion	21
4.1	Bestimmung von prognostischen Markern zur Abschätzung der Prognose und zur Validierung einer molekularen Tumortherapie	21
4.2	Die COX-2 als Prognosefaktor	21
4.3	Prognostische Relevanz des ELAV-ähnlichen Proteins Hur im Ovarialkarzinom	23
4.4	Mögliche Mechanismen der tumorfördernden Wirkung der COX-2	24
4.5	Therapeutische Möglichkeiten	25

Widmung

Gewidmet meinen Eltern.

Abkürzungsverzeichnis

COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
PGE2	Prostaglandin E2
MKP1	mitogen-aktivierte Proteinkinase Phosphatase 1
NSAIDs	nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente
ELAV	Embryonic lethal abnormal vision (Drosophila Protein)
ARE	AU-reiches Element
PGE2	Prostaglandin E2
siRNA	short interfering RNA
RNAi	RNA Interferenz
IL-1β	Interleukin-1β
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α

1 Einleitung

1.1 Epidemiologische Daten zum Ovarialkarzinom und Mammakarzinom

Das Ovarialkarzinom ist die fünfthäufigste maligne Erkrankung der Frau und macht 4.1% aller malignen Erkrankungen von Frauen aus. Eine von 70 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom [1]. In den USA wird für das Jahr 2003 eine Zahl von 14300 Todesfällen in Folge von Ovarialkarzinomen erwartet [2], damit ist das Ovarialkarzinom die fünfthäufigste Todesursache infolge einer Krebserkrankung bei Frauen [3]. Nach den Daten des deutschen Gemeinsamen Krebsregisters (GKR) für das Jahr 1999 wird für die ostdeutschen Bundesländer und Berlin eine Inzidenz von 19,9 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner angegeben, es ergibt sich ein Lebenszeitrisiko von 1,49% [4]. Die Prognose des Ovarialkarzinoms hängt vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose ab. Aufgrund des Fehlens eines effektiven Verfahrens zur Früherkennung von Ovarialkarzinomen werden nach Angaben des nordamerikanischen zentralen Krebsregisters nur 26 % der Fälle in einem Stadium diagnostiziert, in dem der Tumor noch auf das Ovar beschränkt ist [5]. In 53% der Fälle liegt zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Tumorausbreitung ausserhalb des Beckens oder eine Fernmetastasierung vor [5]. Das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, wird verringert durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva, die Zahl der Schwangerschaften sowie eine verlängerte Stillzeit. Aus diesen epidemiologischen Beobachtungen leitet sich die Hypothese ab, dass eine Verringerung der Zahl an Ovulationen vor Ovarialkarzinomen schützen kann.

Während das Ovarialkarzinom ein relativ seltener Tumor ist, ist die Inzidenzrate des Mammakarzinoms weit höher. Das Mammakarzinom ist in industrialisierten Ländern die häufigste bösartige Tumorerkrankung und die zweithäufigste Krebstodesursache bei Frauen [2]. In den USA erkrankt etwa eine von 7 weissen Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs [6]. Die Neuerkrankungsrate an Brustkrebs in Deutschland beträgt 121 Fälle je 100000 Einwohner [7]. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes erkrankten in Deutschland im Jahre 1998 46300 Frauen an Brustkrebs, dies entspricht einem Anteil von 26% an allen bösartigen Neubildungen bei Frauen. Gemäß den Daten des deutschen Gemeinsamen Krebsregisters (GKR) für die Jahre 1997-1999 wurden 38,4% der

Mammakarzinome im Tumorstadium I, d.h. mit einem Tumordurchmesser von kleiner 2cm und fehlenden Lymphknotenmetastasen diagnostiziert [8]. Die 5-Jahres Überlebensrate beim Mammakarzinom ist stadienabhängig und beträgt im Stadium I 88%, im Stadium IV dagegen nur noch 14% [8]. Das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, ist erhöht bei früher Menarche, später Menopause, höherem Alter bei Erstgeburt, niedriger Geburtenzahl sowie bei Adipositas [9].

1.2 Molekulare Prognosefaktoren

Zur Abschätzung der Prognose von Tumorerkrankungen werden klinisch-pathologische Parameter, wie beispielsweise die Tumorgröße, der Differenzierungsgrad und das Ausmass der Metastasierung herangezogen. Diese Parameter werden verwendet, um die für jeden einzelnen Tumor adäquate Therapie zu planen. Neben den klassischen klinisch-pathologischen Parametern können auch molekulare Prognosemarker bestimmt werden, indem die Expression von Proteinen oder von mRNAs im Tumorgewebe untersucht wird. Es ist zu erwarten, dass in Zukunft eine molekulare Tumortherapie, d.h. eine Therapie mit Medikamenten, die gezielt genau definierte Proteine im Tumorgewebe angreifen, eine zunehmende Bedeutung gewinnen wird. Zur genauen Planung dieser Therapie ist es wichtig, die Expression der Zielproteine im Tumorgewebe zu bestimmen, um die Indikation für die Therapie stellen zu können. In der klinischen Praxis wird dieses Verfahren für die Therapie des Mammakarzinoms mit Herceptin bereits angewendet. Hier wird vor Therapiebeginn die Expression des Zielproteins cErbB2 bestimmt, nur wenn eine Überexpression von cErbB2 im Tumorgewebe festgestellt wird, ist eine Herceptin Therapie sinnvoll. Die Bestimmung von molekularen Markern im Tumorgewebe ist auch unter gesundheitsökonomischen Gesichtspunkten sinnvoll, da dadurch nur geeignete und ausgewählte Patienten eine teure Tumortherapie erhalten.

In unseren Studien haben wir vier verschiedene potentielle molekulare Prognosefaktoren im Ovarialkarzinom bzw. teilweise auch im Mammakarzinom untersucht: die Cyclooxygenase-2 (COX-2), das humane ELAV-ähnliche Protein HuR, das Oberflächenantigen CD24 und die mitogen-aktivierte Proteinkinase Phosphatase-1 (MKP-1).

Die MKP-1 (auch CL100 oder DUSP-1) wird durch mitogene und inflammatorische Signale induziert. Sie ist beteiligt an der Inaktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) Signalwege, insbesondere der stress-aktivierten p38MAP Kinase und der Jun-N-terminalen Kinase (JNK). Damit ist sie ein wichtiges Element zur Kontrolle der Stress- und Entzündungsreaktion von Tumorzellen (Review: [10]).

CD24 ist ein kleines muzin-ähnliches Oberflächenmolekül, das physiologischerweise von Granulozyten, prä-B-Zellen, Keratinozyten sowie renalen Tubulusepithelzellen exprimiert wird. CD24 ist ein Ligand für das Oberflächenmolekül P-Selectin, das auf aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten gebildet wird. Daraus resultiert eine potentielle tumorbiologische Relevanz des CD24 Proteins, das an der Interaktion zwischen metastasierenden Tumorzellen und Thrombozyten sowie Endothelzellen beteiligt sein könnte (Review:[11]).

Die tumorbiologische Relevanz der COX-2 und des ELAV-ähnlichen Protein HuR wird als Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

1.3 Ähnlichkeiten zwischen entzündlichem Gewebe und Tumorgewebe - die COX-2 als wichtiges Element der tumorassoziierten Entzündung

Die Beobachtung, dass maligne Tumoren häufig im Rahmen von chronischen Entzündungen entstehen, wurde schon im Jahre 1863 von Rudolf Virchow gemacht und führte zu seiner Hypothese, dass chronische Entzündungen eine Prädisposition für Krebserkrankungen darstellen können [12]. Es bestehen viele Ähnlichkeiten zwischen Tumorgewebe und entzündlich verändertem Gewebe. Während aber die normale Entzündungsreaktion in der Regel selbstlimitierend ist, findet man im Tumorgewebe eine persistierende Entzündung. Durch eine vermehrte Angiogenese, die Produktion von Zytokinen und Chemokinen sowie von Proteasen werden im Tumorgewebe gute Bedingungen für Proliferation und Invasion der Tumorzellen geschaffen.(Review: [13]).

Auch bei der Entstehung von Ovarialkarzinomen spielt nach einer von Ness und Cottreau [14] aufgestellten Hypothese eine vermehrte entzündliche Aktivität des

ovariellen Oberflächenepithels eine Rolle. Ausgangspunkt für diese Hypothese ist, dass im Rahmen der Ovulation regelmässig eine lokale entzündliche Reaktion induziert wird, dass aber auch andere Erkrankungen mit einer lokalen inflammatorischen Reaktion, wie Endometriose und „pelvic inflammatory disease“ (PID) ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Ovarialkarzinomen mit sich bringen [15,16,17]. Mögliche Mechanismen der Entstehung von Ovarialkarzinomen im Rahmen von Entzündungsreaktionen bestehen in vermehrtem Zellschaden, oxidativem Stress sowie in der Produktion von Prostaglandinen und inflammatorischen Zytokinen.

Bereits vor über 20 Jahren wurde beobachtet, dass viele maligne Tumoren einen sehr hohen Gehalt an Prostaglandinen aufweisen. Im Jahre 1976 wurde die bovine Cyclooxygenase-1 (COX-1) erstbeschrieben [18], darauffolgend wurde im Jahre 1989 die Cyclooxygenase-2 (COX-2) beschrieben [19,20]. Diese Enzyme katalysieren den limitierenden Schritt in der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen, nämlich die Synthese von Prostaglandin G2 und die darauffolgende Umwandlung in Prostaglandin H2. (Review: [21,22,23,24]). Prostaglandin H2 ist das Ausgangsprodukt für die weitere Prostaglandinsynthese. Die verschiedenen Typen von Prostaglandinen werden durch andere Enzyme synthetisiert, die zelltyp-spezifisch exprimiert werden. So wird z.B. in Thrombozyten durch die Thromboxan-Synthase vor allem TXA2 produziert, während Endothelzellen vor allem PGI2 durch die Prostaglandin-Synthase bilden.

Beide Cyclooxygenase-Isoformen haben unterschiedliche Funktionen. Die COX-1 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert und reguliert physiologische Vorgänge wie beispielsweise den Schutz der Magenmukosa [25]. Dagegen ist die COX-2 im allgemeinen nicht konstitutiv exprimiert, sondern wird durch Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren und entzündliche Reize induziert [26,27] und produziert Prostaglandine im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Dabei hat die COX-2 eine überwiegend pro-inflammatorische Funktion, in der Spätphase der Entzündung wurde jedoch auch eine entzündungsbegrenzende Wirkung beschrieben [28]. Die Struktur der COX-1 und COX-2 ist in vielerlei Hinsicht ähnlich, ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Isoformen besteht in der größeren Substratbindungsstelle der COX-2 [29,30].

Durch Studien an knock-out Mäusen, in denen einerseits das COX-1 Gen und andererseits das COX-2 Gen durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurden, konnten weitere, teilweise überraschende Erkenntnisse über die Funktion der beiden Isoenzyme gewonnen werden [31]. So fand sich bei COX-1-Null Mäusen eine verringerte Thrombozytenaggregation und eine vermehrte perinatale Sterblichkeit bei normaler Fertilität. Jedoch zeigten COX-1-Null Mäuse keine vermehrte Rate von Magenulzera oder von gastrointestinalen Blutungen und hatten eine normale Nierenfunktion. Dieser überraschende Befund deutet darauf hin, dass andere Mechanismen bei Fehlen der COX-1 die gastroprotektive und nephroprotektive Wirkung kompensieren können.

COX-2-Null Mäuse wiesen eine schwere Nierenfunktionsstörung mit glomerulärer Sklerose auf, die sich in den ersten sechs Lebenswochen entwickelte [32,33]. Zudem zeigten sich multiple Störungen der Reproduktion, u.a. bei der Ovulation, Fertilisierung, Implantation und Dezidualisierung [34]. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die COX-2 eine wichtige Rolle bei der Funktion des Ovars spielt und sind damit ein Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen zur Expression der COX-2 im normalen Ovar sowie in Ovarialtumoren.

Die Cyclooxygenasen sind die Hauptangriffspunkte der nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikamente (NSAID) [35]. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen NSAIDs in ihrer Selektivität für die COX-1 oder die COX-2 Isoform. Während Medikamente wie Celecoxib oder Rofecoxib vor allem die COX-2 Isoform inhibieren, sind Aspirin, Ibuprofen und Indomethacin relativ unselektive COX-Inhibitoren, die beide Isoformen inhibieren können. Zusätzlich zu diesen Wirkungen auf die Cyclooxygenase wurden verschiedene andere zelluläre Zielproteine beschrieben, die durch COX-Inhibitoren beeinflusst werden können. Diese Zielproteine bilden die Gruppe der sogenannten non-COX-targets. Dazu zählen der nukleäre Rezeptor PPAR-δ, die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 sowie eine Reihe weiterer Signaltransduktionsmoleküle (Review: [36]).

1.4 Tumorbiologische Bedeutung der COX-2

Cyclooxygenasen, insbesondere die COX-2, spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression maligner Tumoren. Nach epidemiologischen Studien ist das Risiko einen malignen Tumor, z.B. ein Kolonkarzinom oder ein Mammakarzinom zu entwickeln bei langjähriger Einnahme von NSAIDs um etwa 20-50% reduziert [37,38]. In tierexperimentellen Studien konnte sowohl die Entstehung von Tumoren als auch das Wachstum bereits vorhandener Tumoren durch Therapie mit COX-2 Inhibitoren verringert werden [39,40,41,42,43]. Cyclooxygenasen sind besonders interessante potentielle Angriffspunkte für eine molekulare Tumortherapie, da gut charakterisierte Inhibitoren, die NSAIDs, zur Verfügung stehen und bereits klinisch verwendet werden. Derzeit wird Celecoxib in den USA zur Prophylaxe der Entstehung kolorektaler Adenome bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polypose (FAP) eingesetzt und führt dort zur Reduktion der Zahl an Adenomen [44,45]. Klinische Phase II oder III Studien zur Untersuchung zur Wirksamkeit von NSAIDs bei Kolonkarzinomen und Mammakarzinomen werden derzeit durchgeführt bzw. sind in Vorbereitung.

1.5 Regulation der COX-2 Expression über die mRNA Stabilität

Verschiedene Mechanismen können zur Überexpression der COX-2 im Tumorgewebe beitragen. Die Expression der COX-2 kann durch inflammatorische Reizen induziert werden, so z.B. durch Interleukin-1β, Tumor-Nekrose-Faktor-α und Lipopolysaccharid [46]. An der Regulation der COX-2 sind unter anderem der Wnt sowie der Ras Signalweg beteiligt [47,48,49].

Des weiteren spielen die Transkriptionsfaktoren NF-κB [50,51], CREB und AFT-1 [52] sowie PEA3 [53] für die Regulation der COX-2 eine wichtige Rolle. Einige Arbeiten beschreiben zudem die Hemmung der COX Transkription durch Hypermethylierung der 5'CPG Insel im COX-2 Gen [54,55].

Neben der transkriptionalen Regulation spielen auch post-transkriptionale Regulationswege der COX-2 eine wichtige Rolle. Diese werden u.a. durch die stress-aktivierte p38MAPK gesteuert [56,57]. Verschiedene neuere Arbeiten zeigen, dass an der post-transkriptionalen Regulation das Protein HuR beteiligt ist [58,59,60]. Dieses Protein gehört zur Familie der sogenannten ELAV-ähnlichen

Proteine, die auf Grund ihrer hohen Homologie zum Drosophilaprotein ELAV (embryonic lethal abnormal vision) benannt ist. Zu dieser Familie gehören die 4 Proteine HuR, Hel-N1, HuC, HuD. Während drei der Hu-Proteine (Hel-N1, HuC und HuD) überwiegend im Nervengewebe exprimiert sind, ist HuR ubiquitär vorhanden [61]. Die Funktion von HuR liegt in der Stabilisierung von mRNAs. Dabei bindet das Protein bevorzugt an solche mRNAs, die ein AU-reiches Element (ARE) im Bereich des 3' Anteiles aufweisen. Ein solches ARE findet sich auch im 3' Anteil der COX-2 mRNA und trägt zur Stabilisierung der COX-2 mRNA bei [62]. Neben der COX-2 werden auch andere mRNAs durch HuR stabilisiert, darunter die mRNAs von VEGF und IL-8 [62]. Das HuR Protein ist typischerweise nukleär lokalisiert und transloziert unter bestimmten Bedingungen ins Zytoplasma. Die zytoplasmatische Expression von HuR ist mit einer vermehrten mRNA stabilisierenden Aktivität verbunden [63].

2 Zielstellung

In den vorliegenden Studien wurde die Expression von Proteinen im Ovarialkarzinom bzw. im Mammakarzinom untersucht, die eine Rolle bei der Tumorprogression und der Metastasierung spielen könnten. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der prognostischen Bedeutung der Cyclooxygenase-2 (COX-2).

- In immunhistologischen Studien wurden zunächst die Expression der Proteine MKP-1, CD24 und COX-2 im Ovarialkarzinom bestimmt. In der statistischen Auswertung haben wir die Expression der Proteine mit klinisch-pathologischen Parametern und mit dem Überleben der Patientinnen korreliert.
- Parallel zu dem immunhistologischen Ansatz haben wir im Zellkulturmodell an humanen Ovarialkarzinomzellinien die Induktion der MKP-1 und der COX-2 durch Entzündungsmediatoren sowie – für die MKP-1 – durch Cisplatin untersucht.
- Um festzustellen, ob die COX-2 als Prognosemarker auch in anderen Tumoren eine Rolle spielt, haben wir die Expression und prognostische Bedeutung der COX-2 im Mammakarzinom untersucht.
- Die weiteren Projekte befassten sich mit der COX-2 als tumorbiologisch interessantem Zielprotein. Wir haben verschiedene Strategien zur Inhibition der COX-2 angewendet, nämlich die pharmakologische Inhibition durch NS-398 sowie die spezifische Inhibition durch RNA Interferenz. Dabei wurde die Proliferation, Apoptose und Zellzyklusregulation humaner Ovarialkarzinomzellen untersucht.
- Zudem wurde die Expression und prognostische Relevanz des mRNA-stabilisierenden Proteins HuR im Tumorgewebe bestimmt und mit der COX-2 Expression korreliert.

3 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.1 Prognosefaktoren für das Ovarialkarzinom

3.1.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1)

Literatur: Carsten Denkert, Wolfgang D. Schmitt, Stefan Berger, Angela Reles, Sören Pest, Antje Siegert, Werner Lichtenegger, Manfred Dietel, Steffen Hauptmann. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. International Journal of Cancer; 2002; 102(5):507-13, 2002 [64]

Wir haben mehrere Studien zur Evaluation potentieller Prognosemarker im Ovarialkarzinom durchgeführt. In einer ersten Studie identifizierten wir die mitogen-aktivierte Proteinkinase Phosphatase-1 (MKP-1) als Prognosemarker im Ovarialkarzinom. Eine mittelgradige bis starke Expression der MKP-1 fand sich in 58% der invasiven Ovarialkarzinome. Eine positive Expression der MKP-1 war signifikant mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert.

Parallel zu den immunhistologischen Färbungen haben wir die Regulation der Expression der MKP-1 durch inflammatorische Zytokine in der Zellkultur von humanen Ovarialkarzinomzelllinien untersucht. Hier fand sich in einigen Zellinien eine vermehrte Expression der MKP-1 mRNA im Northern Blot nach Inkubation mit inflammatorischen Zytokinen und dem Tumorpromoter TPA. Zudem wurde die Expression der MKP-1 bei der Zellinie OVCAR-3 stark durch das Chemotherapeutikum Cisplatin induziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MKP-1 eine Rolle bei der Stressreaktion von Ovarialkarzinomzellen und möglicherweise auch bei der zellulären Adaptation and Chemotherapeutika spielt.

3.1.2 CD24

Literatur: Glen Kristiansen, Carsten Denkert, Karsten Schlüns, Edgar Dahl, Christian Pilarsky, Steffen Hauptmann (2002). CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. American Journal of Pathology. 2002;161(4):1215-21 (geteilte Erstautorenschaft: G.K. und C.D.) [65]

Auch für die Expression des Oberflächenantigens CD24 fand sich eine prognostische Relevanz im Ovarialkarzinom. CD24 wird mit einem membranären

Expressionsmuster in 84% der invasiven Ovarialkarzinome exprimiert, unabhängig davon fand sich eine zytoplasmatische Expression in 59% der Ovarialkarzinome. Für die Untergruppe der invasiven Ovarialkarzinome war die zytoplasmatische, nicht aber die membranäre Expression von CD24 signifikant mit einem schlechteren Überleben assoziiert.

Normales ovarielles Oberflächenepithel negativ für CD24, in Borderline-Tumoren fand sich eine membranäre Expression in 75% der Fälle, während nur einer von 8 Fällen zytoplasmatisch positiv war.

3.1.3 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Literatur: Carsten Denkert, Martin Köbel, Sören Pest, Ines Koch, Stefan Berger , Michael Schwabe, Antje Siegert, Angela Reles, Bernd Klosterhalfen, Steffen Hauptmann. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. American Journal of Pathology; 2002; 160(3):893-903 [66]

Diese Studie befasste sich mit der Expression der COX-1 und COX-2 sowie mit der Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) in humanen Ovarialkarzinomzelllinien und in primären, humanen Ovarialkarzinomen. Immunhistologisch fand sich eine Expression der COX-2 in 36 (52%) von 86 primären Ovarialkarzinomen sowie eine Expression der COX-1 in 65 (75%) von 75 primären Ovarialkarzinomen. Auf der mRNA Ebene wurde die COX-2 mRNA in 7 von 8 primären, humanen Ovarialkarzinomen exprimiert, alle Fälle waren positiv für die COX-1. Zusätzlich zur Expression der COX-2 im Tumorgewebe fanden sich signifikant erhöhte Werte für PGE2 in Aszitespunktaten von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen. In unseren immunhistologischen Untersuchungen war die Expression der COX-2 in Ovarialkarzinomen und Borderline-Tumoren des Ovars erhöht im Vergleich zu normalem ovariellen Oberflächenepithel sowie Zystadenomen. In den invasiven Ovarialkarzinomen stellte die Expression der COX-2 einen negativen prognostischen Faktor in der univariaten und multivariaten Überlebensanalyse dar. Andere prognostische Faktoren waren – wie für Ovarialkarzinome bereits bekannt – das FIGO-Stadium, die histologische Differenzierung, das Alter der Patientinnen sowie ein undifferenzierter histologischer Typ. Zusätzlich zu den Untersuchungen an humanem

Tumorgewebe wurden in-vitro Experimente zur Expression der Cyclooxygenasen-1 und -2 an Ovarialkarzinomzellen durchgeführt. Hierbei zeigte die Zellinie OVCAR-3 eine starke Induktion der COX-2 auf mRNA und Proteinebene durch das inflammatorische Zytokin Interleukin-1β sowie eine etwas schwächere Induktion durch den Tumorpromotor und Phorbolester TPA. Dagegen war die Zellinie SKOV-3 negativ für COX-1 und COX-2 Protein. Diese Zellinien, insbesondere die Zellinie OVCAR-3, bei der die COX-2 sehr stark induzierbar ist, wurden als Zellkulturmodell für Folgestudien verwendet (vgl. 3.3).

3.2 Expression der COX-2 als Prognosefaktor beim Mammakarzinom

Literatur: Carsten Denkert, Klaus-Jürgen Winzer, Berit-Maria Müller, Wilko Weichert, Sören Pest, Martin Köbel, Glen Kristiansen, Angela Reles, Antje Siegert, Hans Guski, Steffen Hauptmann. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease-free survival and overall survival of patients with breast carcinoma. Cancer 2003, 97, 2978-2987.[67]

Carsten Denkert, Klaus-Jürgen Winzer, Steffen Hauptmann. Prognostic impact of COX-2 in breast cancer. Clinical Breast Cancer, in press.[68]

Wir haben die Expression der COX- 1 und der COX-2 in 221 primären Mammakarzinomen untersucht und sie mit anderen klinischen und pathologischen Parametern sowie mit dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben korreliert. Es zeigte sich eine Expression der COX-2 in 36% der Mammakarzinome. Die erhöhte Expression der COX-2 war signifikant mit klinischen Parametern wie einer Tumorgröße von mehr als 20mm, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, einer geringen Differenzierung sowie einer Gefäßinvasion assoziiert. Dagegen war die Cyclooxygenase-1, die in 45% der Fälle exprimiert wurde, mit einem Tumordurchmesser <20mm und mit einem negativen Nodalstatus assoziiert. In der univariaten Überlebensanalyse fand sich eine signifikante Assoziation zwischen erhöhter COX-2 Expression und vermindertem rezidiv-freien und Gesamtüberleben.

3.3 Auswirkungen des nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikamentes NS-398 sowie von COX-2-spezifischer RNA Interferenz auf humane Ovarialkarzinomzellen

Literatur: Carsten Denkert, Antje Fürstenberg, Peter T. Daniel, Ines Koch, Martin Köbel, Wilko Weichert, Antje Siegert, Steffen Hauptmann. Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2 specific RNA interference. Oncogene, in press [69].

In dieser Studie wurde im Zellkulturmodel an der COX-2 positiven Zellinie OVCAR-3 sowie der COX-2 negativen Zellinie SKOV-3 untersucht, welche Auswirkungen die Inhibition der Cyclooxygenase-2 auf die Zellproliferation hat. Dabei haben wir zwei verschiedene Inhibitionsstrategien verwendet. Zum einen den pharmakologischen Inhibitor NS-398, der vor allem die COX-2, in höheren Konzentrationen aber auch die COX-1 sowie andere Zielproteine inhibiert. Durch Verwendung dieses Inhibitors in unterschiedlichen Konzentrationen kann man abschätzen, ob ein beobachteter Effekt vorrangig durch die COX-2, die COX-1 oder durch ein weiteres, nicht bekanntes zelluläres Zielmolekül erzielt wird.

Als zweite Inhibitionsstrategie wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) gewählt. Hier wird durch Transfektion der Zellen mit 21 Basenpaaren langen, doppelsträngigen siRNAs eine zelluläre Antwort induziert, die zur selektiven Zerstörung der doppelsträngigen siRNA, aber auch eventuell vorhandener homologer zellulärer mRNAs führt. Da dieser Mechanismus sequenzspezifisch ist, kann selektiv eine einzelne mRNA in der Zelle ausgeschaltet werden. Wir haben diese Methode an der Ovarialkarzinomzellinie OVCAR-3, zunächst unter Verwendung einer Kontroll-siRNA gegen das Kernprotein Lamin A/C, getestet. Es ergab sich bei einer Transfektionseffizienz von ca. 90% eine starke Verringerung der Menge an Lamin A/C Protein. Daraufhin wurde eine spezifisch gegen die COX-2 gerichtete siRNA verwendet, die Proteinexpression der COX-2 wieder auf den Kontrollwert herunterregulierte und zu einer Verringerung der PGE2 Produktion um 60% führte. Im Proliferationsassay führte die spezifische Inhibition der COX-2 durch RNA-Interferenz nicht zu einer verminderten Zellproliferation.

Dagegen fand sich eine starke Verringerung der Proliferation durch NS-398 in Konzentrationen von 50 bis 500µM, dies ging mit einem G0/G1 Zellzyklusarrest einher. Des weiteren fiel auf, dass der Inhibitor NS-398 die Prostaglandinproduktion, und damit die Aktivität der COX-2 schon bei einer Inhibitorkonzentration von 1µM vollständig hemmt. Dies steht im Gegensatz zu den Auswirkungen auf die Zellproliferation, die erst bei relativ hohen Inhibitorkonzentrationen auftreten. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Untersuchungen schlussfolgern, dass NS-398 eine anti-proliferative Wirkung auf Ovarialkarzinomzellen hat. Im Zellkulturmodell scheint diese Wirkung jedoch nicht über die Cyclooxygenase-2 vermittelt zu sein, sondern möglicherweise durch Inhibition von weiteren zellulären Proteinen, die z.B. eine Rolle bei der Zellzyklusregulation spielen.

3.4 Assoziation zwischen zytoplasmatischer Expression des ELAV-ähnlichen Proteins HuR und erhöhter COX-2 Expression

Literatur: Carsten Denkert, Wilko Weichert, Sören Pest, Ines Koch, Dirk Licht, Martin Köbel, Angela Reles, Jalid Sehouli, Manfred Dietel, Steffen Hauptmann. Overexpression of the ELAV-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased COX-2 expression. Cancer Research, in press.[70]

Als Ursache der Überexpression der COX-2 in malignen Tumoren kommen verschiedene Mechanismen in Frage. Einer dieser Mechanismen ist die vermehrte Stabilisierung der COX-2 mRNA. Verschiedene in-vitro Studien haben gezeigt, dass das humane RNA stabilisierende Protein HuR an sogenannte AU- reiche Elemente (AREs) im nicht translatierten 3’ Anteil der COX-2 mRNA bindet und damit die mRNA stabilisieren kann. Ausgehend von diesen Studien haben wir die Expression von HuR im Ovarialkarzinom und eine mögliche Assoziation mit erhöhter COX-2 Expression untersucht. In dieser Studie wurden 83 primäre Ovarialkarzinome, 16 Borderline-Tumoren des Ovars sowie 3 normale Ovarien untersucht. Es zeigte sich eine nukleäre Expression von HuR in 81% der Ovarialkarzinome, zusätzlich trat in 45% der Ovarialkarzinome eine zytoplasmatische Expression von HuR auf. Sowohl die nukleäre als auch die

zytoplasmatische HuR Expression war im Ovarialkarzinom im Vergleich zu Borderline-Tumoren oder normalen Ovarien signifikant erhöht. Die zytoplasmatische HuR Expression war signifikant mit vermehrter COX-2 Expression sowie vermehrter mitotischer Aktivität assoziiert. In der univariaten Überlebensanalyse war die zytoplasmatische, nicht aber die nukleäre, Expression von HuR ein signifikanter prognostischer Faktor für das progressionsfreie Überleben sowie für das Gesamtüberleben. Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass möglicherweise im Tumorgewebe eine Dysregulation des mRNA stabilisierenden Proteins HuR besteht, die zu einer vermehrten Stabilisierung bestimmter mRNAs führt. Zu diesen mRNAs gehört die COX-2, aber evtl. auch die mRNAs für VEGF sowie für Zytokine und Wachstumsfaktoren. Damit bestünde die Möglichkeit über ein einzelnes mRNA-stabilisierendes Protein eine ganze Reihe von mRNAs und Proteinen im Tumor heraufzuregulieren.

4 Diskussion

4.1 Bestimmung von prognostischen Markern zur Abschätzung der Prognose und zur Validierung einer molekularen Tumortherapie

Die Bestimmung von molekularen Markern im Tumorgewebe ist aus verschiedenen Gründen interessant: Zum ersten können derartige Untersuchungen Ansatzpunkte für mögliche therapeutische Strategien aufzeigen. Wenn die Überexpression eines Proteins im Tumorgewebe mit einer schlechteren Prognose statistisch signifikant assoziiert ist, dann ist zumindest eine gewisse Wahrscheinlichkeit vorhanden, dass dieses Protein auch kausal an der Tumorprogression beteiligt ist. Damit dient die immunhistologische Untersuchung von potentiellen molekularen Markern im Tumorgewebe als hypothesengenerierendes Verfahren zur Eingrenzung möglicher tumorbiologisch relevanter Zielproteine. Um eine kausale Beteiligung der Proteine bei der Tumorprogression aufzuzeigen, können dann Zellkulturversuche und tierexperimentelle Ansätze hinzugezogen werden.

Als zweiten Punkt bietet die Bestimmung von molekularen Markern die Möglichkeit, die Prognose der Tumorerkrankung besser einzuschätzen und mögliche Therapieindikationen zu bestimmen. Dies ist vor allem bei solchen Zielproteinen interessant, für die es bereits geeignete pharmakologische Inhibitoren gibt. Die COX-2 ist hier ein gutes Beispiel, da COX-2 Inhibitoren bereits seit langem als etablierte anti-inflammatorische Medikamente zur Verfügung stehen.

Die Bestimmung von molekularen Markern im Tumorgewebe kann ferner helfen, mögliche für die Tumorprogression wichtige Signalwege zu identifizieren. Auch hier ist die immunhistologische Untersuchung ein hypothesengenerierendes Verfahren, die Ergebnisse sollten mit anderen Methoden validiert werden.

4.2 Die COX-2 als Prognosefaktor

Gemäß den vorliegenden Ergebnissen unserer und anderer Arbeitsgruppen sind sowohl bei den Mammakarzinomen als auch bei Ovarialkarzinomen ca. 40% der Tumoren COX-2 positiv. Die Gruppe der Patientinnen mit COX-2 positiven Tumoren hat dabei eine schlechtere Prognose als die Patientinnen mit COX-2

negativen Tumoren. Bemerkenswert ist hier, dass bei beiden Tumoren nur eine Untergruppe von weniger als der Hälfte der Fälle die COX-2 exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde für das Kolonkarzinom eine Expression der COX-2 in etwa 80% der Fälle beschrieben [71,72,73,74]. Auch unsere eigenen, bisher unveröffentlichten Untersuchungen ergaben diesbezüglich einen ähnlichen Prozentsatz. Epidemiologische Studien zeigen für Kolonkarzinome einen stärkeren protektiven Effekt von NSAIDs als für Mammakarzinome oder Ovarialkarzinome. Dieser stärkere protektive Effekt könnte durch den höheren Prozentsatz an COX-2 positiven Kolonkarzinomen bedingt sein.

Für das Ovarialkarzinom und das Mammakarzinom wurden auch von anderen Arbeitsgruppen Untersuchungen zur Expression und zur prognostischen Relevanz der COX-2 durchgeführt. Während sich in zwei Studien keine oder nur eine geringe Expression der COX-2 in Ovarialkarzinomen fand [75,76], wurde eine Expression der COX-2 im Ovarialkarzinom bisher in sieben Studien beschrieben [66,77,78,79,80,81,82]. In den meisten dieser Untersuchungen ergab sich eine Expression der COX-2 in ca. 30-40% der Tumorzellen. Ferrandina et al. fanden in ihrer Untersuchung von 87 primären Ovarialkarzinomen eine Korrelation zwischen erhöhter COX-2 Expression in Tumorgewebe und schlechterem Ansprechen auf die Chemotherapie [79]. In der Studie von Shigemasa et al. zeigte sich eine Expression der COX-2 in 31% der Ovarialkarzinome, jedoch keine Korrelation zwischen COX-2 Expression und dem Überleben [80]. In unserem eigenen Studienkollektiv war der prognostische Effekt für die Altersgruppe der unter 60 jährigen besonders stark. Diese Altersgruppe wurde jedoch in den anderen Studien nicht separat analysiert.

Ein inhibitorischer Effekt von NS-398 auf die Proliferation humaner Ovarialkarzinomzellen konnte neben unserer Studie auch von Wang et al. [83] und von Rodriguez-Burford et al. [84] festgestellt werden.

In Mammakarzinomen wurde die COX-2 Expression mittels Immunhistochemie in 11 verschiedenen Studien untersucht [67,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94]. In den meisten dieser Studien ergab sich eine COX-2 Expression in ca. 40% der Mammatumoren. In sechs Studien wurde die COX-2 Expression im Tumorgewebe mit dem Überleben korreliert [67,87,89,90,92,93]. In vier dieser sechs Studien

[67,87,89,90] fand sich dabei eine Korrelation zwischen COX-2 Expression und einem verminderten Gesamtüberleben bzw. rezidiv-freiem Überleben.

Auch für andere Tumoren wurde die COX-2 Expression als negativer prognostischer Parameter beschrieben, so z.B. für Adenokarzinome der Lunge [95,96], für Kolonkarzinome [97,98], Zervixkarzinome [99,100] und Adenokarzinome des Ösophagus [101], maligne Mesotheliome [102], Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich [103] und Magenkarzinome [104]. Dies deutet darauf hin, dass die COX-2 in vielen verschiedenen Tumortypen eine möglicherweise entscheidende biologische Funktion hat und dass COX-Inhibitoren auch bei anderen Tumortypen eine therapeutische Option darstellen könnten.

4.3 Prognostische Relevanz des ELAV-like Proteins HuR im Ovarialkarzinom

In unseren Untersuchungen konnten wir das COX-2 regulierende Protein HuR als Prognosefaktor im Ovarialkarzinom identifizieren. Interessanterweise reguliert HuR nicht nur die COX-2, sondern auch andere mRNAs, die eine ARE Sequenz aufweisen, wie z.B. VEGF und IL-8. Zudem konnten wir eine Assoziation zwischen der Tumorproliferation und der zytoplasmatischen HuR Expression nachweisen. Aus diesen Befunden ergibt sich die Hypothese, dass eine über HuR vermittelte Dysregulation der mRNA-Stabilität im Tumorgewebe möglicherweise zu vermehrter Angiogenese, vermehrter Proliferation und zur Modulation der tumorassoziierten Entzündung führen könnte. Da die tumorbiologische Rolle von humanen ELAV-like Proteinen bislang kaum untersucht ist, ist eine endgültige Beurteilung dieser Hypothese nur nach weiteren Studien, die derzeit durchgeführt werden, möglich.

Die Familie der humanen ELAV-like Proteine wurde erstmals im Rahmen von paraneoplastischen Syndromen identifiziert. Dabei handelt es sich um neurologische Störungen bei Tumorpatienten, die durch Kreuzreaktion von gegen den Tumor gerichteten Antikörpern mit neuralen Strukturen entstehen. Bei der Suche nach den auslösenden Antigenen wurden die Proteine HuB, HuC, HuD entdeckt und nach dem Indexpatienten benannt. Diese Proteine werden

physiologischerweise vor allem im Nervengewebe exprimiert und ektop z.B. von Lungenkarzinomen gebildet. Die gegen Hu-Proteine gerichteten Antikörper stellen zumindest eine teilweise wirksame biologische Tumorabwehr dar [105]. Dies folgt aus der klinischen Beobachtung, dass Patienten mit anti-Hu Syndrom üblicherweise nur sehr kleine, nicht progrediente Tumoren haben und klinisch die neurologische Problematik gegenüber der Tumorerkrankung im Vordergrund steht. Aus dieser klinischen Beobachtung lässt sich die Hypothese ableiten, dass Hu-Proteine möglicherweise wichtige Funktionen im Tumorgewebe haben. Es ist derzeit noch nicht absehbar, ob möglicherweise Hu-Proteine als therapeutische Zielproteine in Frage kommen. Eine wichtige Voraussetzung wäre es hier nicht ZNS-gängige Therapeutika zu entwickeln, um die neurologischen Nebenwirkungen zu minimieren.

4.4 Mögliche Mechanismen der tumorfördernden Wirkung der COX-2

In ihrem grundlegenden Review haben Hanahan und Weinberg sechs typische Veränderungen im Tumorgewebe beschrieben, die sich in praktisch allen malignen Tumoren finden [106]. Dabei werden von den Tumoren unterschiedliche zelluläre Mechanismen genutzt, die letztlich aber zu ähnlichen Ergebnissen führen.

Die „hallmarks of cancer“ sind nach Hanahan und Weinberg: Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren, Resistenz gegen wachstums-inhibierende Faktoren, Apoptose-Resistenz, unbegrenztes replikatives Potential, verstärkte Angiogenese, Invasion und Metastasierung. Für die COX-2 konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle bei der Tumorinvasion und –metastasierung [107], bei der Angiogenese [108], der Inhibition der Apoptose [109] und der Modulation der tumor-assoziierten Entzündung spielt [110]. Damit werden mehrere grundlegende Eigenschaften maligner Tumoren durch die COX-2 gesteuert. Wenngleich diese verschiedenen Mechanismen nicht in jedem Tumor gleich ablaufen, so bieten sie doch in ihrer Gesamtheit ein Modell, mit dem die prognostische Relevanz einer Überexpression der COX-2 im Tumorgewebe erklärt werden kann.

Zu diesen möglichen COX-2-abhängigen Faktoren kommen noch die COX-unabhängigen Effekte der NSAIDs, die ebenfalls tumorbiologisch relevant sein könnten. Es handelt sich hier unter anderem um die Inhibition von

Transkriptionsfaktoren, nukleären Rezeptoren sowie von apoptose-regulierenden Genen. Auch unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese sogenannten „non-COX-targets“ in Ovarialkarzinomzellinien eine Rolle spielen. Die Relevanz der „non-COX-targets“ für eine potentielle klinische Tumortherapie ist noch nicht vollständig geklärt.

Des weiteren ist es noch unklar, ob COX-2 Inhibitoren nur dann einen therapeutischen Effekt haben, wenn ihr Zielprotein, die COX-2 auch im Tumorgewebe exprimiert wird. Denn neben den anderen Zielproteinen könnte auch eine Modulation der Tumor-Wirts-Interaktion durch Einfluss auf tumor-assoziierte Entzündungszellen und auf Endothelzellen zur Wirkung der COX-Inhibitoren beitragen. So wurden in komplexeren in-vivo Systemen zusätzliche Wirkungen der COX-2 Inhibitoren beschrieben, die über eine Hemmung der COX-2 in Stromazellen vermittelt werden und in der Zellkultur nicht ohne weiteres untersucht werden können.

4.5 Therapeutische Möglichkeiten

Aus den dargestellten Ergebnissen ergibt sich die Frage, ob Patientinnen mit COX-2 positiven Tumoren von einer adjuvanten Therapie mit COX-2 Inhibitoren profitieren würden. Die COX-2 ist ein zentrales Zielprotein der NSAIDs. Für die Durchführung klinischer Studien mit COX-Inhibitoren wäre es daher sinnvoll, die Expression der COX-2 im Tumorgewebe zu bestimmen und mit dem Ansprechen der Patienten auf die Therapie zu korrelieren. Hierzu ist eine standardisierte Methode der COX-2 Bestimmung unerlässlich. Als ein mögliches Verfahren haben wir den sog. immunoreaktiven Score (IRS) verwendet, der sich aus dem Prozentsatz an positiven Zellen und der Intensität der Färbung zusammensetzt und eine gewisse Standardisierung ermöglicht. Um für die klinische Praxis eine ausreichende Vergleichbarkeit der COX-2 Bestimmung zwischen verschiedenen Zentren zu ermöglichen, ist jedoch zukünftig eine präzisere Standardisierung notwendig.

Mögliche Indikationen für COX-Inhibitoren umfassen die primäre Chemoprävention bei Patientinnen mit erhöhtem Risiko für Mammakarzinome oder Ovarialkarzinome, die adjuvante Therapie und die sekundäre Prävention zur Prophylaxe eines Rezidivs.

Literaturverzeichnis

1. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. CA Cancer J Clin. 1995;45(1):8-30.
2. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer Statistics, 2003. CA Cancer J Clin. 53: 5-26.
3. Oriel KA, Hartenbach EM, Remington PL. Trends in United States ovarian cancer mortality, 1979-1995. Obstet Gynecol. 1999; 93(1):30-3.
4. Gemeinsames Krebsregister (Hrsg.). Krebsinzidenz 1999 (Jahresbericht), Berlin 1/2002.
5. Goodman MT, Howe HL. Descriptive epidemiology of ovarian cancer in the United States, 1992-1997. Cancer. 2003; 97 (10 Suppl): 2615-2630.
6. NCI (2001). Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER), Cancer Statistics Review 1973-1998, National Cancer Institute, USA.
7. EUCAN. IARC Cancer Base, Lyon 1999.
8. Stabenow R, Eisinger B. Brustkrebs, Gemeinsames Krebsregister (Hrsg.), Berlin 1/2001.
9. Tavassoli FA, Devilee P (Eds.). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003.
10. Theodosiou A, Ashworth A.MAP kinase phosphatases. Genome Biol. 2002 Jun 26;3(7) REVIEWS3009
11. Kristinansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumorbiology-aspects of CD24, a mucin-like molecule. Histochem J., in press.
12. Virchow, R (1863) Die Krankhaften Geschwülste, 1.Band. August Hirschwald, Berlin
13. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002; 420(6917):860-7.
14. Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer J Natl Cancer Inst. 1999; 91(17):1459-67.
15. Baker TR, Piver MS. Etiology, biology, and epidemiology of ovarian cancer. Semin Surg Oncol. 1994; 10(4):242-8.
16. Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J, Bergqvist A. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 1997; 176(3):572-9.
17. Risch HA, Howe GR. Pelvic inflammatory disease and the risk of epithelial ovarian cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995; 4(5):447-51.
18. Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. J Biol. Chem. 1976; 251(9):2629-36.
19. Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86(4):1178-82.

20. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. J Biol Chem. 1991; 266(20):12866-72.
21. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). J Natl Cancer Inst. 1998; 90(20):1529-36.
22. Williams C, Shattuck-Brandt RL, DuBois RN. The role of COX-2 in intestinal cancer. Ann N Y Acad Sci. 1999; 889:72-83.
23. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2 - 10 years later. J Pharmacol Exp Ther. 2002; 300(2):367-75.
24. Parente L, Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. Biochem Pharmacol. 2003; 65(2):153-9.
25. Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? Am J Physiol. 1996; 270:G393-400.
26. Coyne DW, Nickols M, Bertrand W, Morrison AR. Regulation of mesangial cell cyclooxygenase synthesis by cytokines and glucocorticoids. Am J Physiol. 1992; 263:F97-102.
27. Geng Y, Blanco FJ, Cornelisson M, Lotz M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. J Immunol. 1995;155(2):796-801.
28. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. Nat Med. 1999;5(6):698-701.
29. Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. Nat Struct Biol. 1996;3(11):927-33.
30. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature. 1996,26;384(6610):644-8.
31. Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, et al. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. Cell. 1995 Nov 3;83(3):483-92.
32. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. Nature. 1995;378(6555):406-9.
33. Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. Cell. 1995;83(3):473-82.
34. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. Cell. 1997;91(2):197-208.

35. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol. 1971;231(25):232-5.
36. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. FASEB J. 2001;15(12):2057-72.
37. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. N Engl J Med. 1991;325(23):1593-6.
38. Khuder SA, Mutgi AB. Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis. Br J Cancer. 2001;84(9):1188-92.
39. Hial V, Horakova Z, Shaff FE, Beaven MA. Alteration of tumor growth by aspirin and indomethacin: studies with two transplantable tumors in mouse. Eur J Pharmacol. 1976; 37(2):367-76.
40. Kudo T, Narisawa T, Abo S. Antitumor activity of indomethacin on methylazoxymethanol-induced large bowel tumors in rats. Gann. 1980;71(2):260-4.
41. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, Abreu-Goris M, Newmark HL, Lipkin ML, DeCosse JJ, Bertagnolli MM. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. Cancer Res. 1996;56(11):2556-60.
42. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Takei Y, Nagano K, Hori M. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. Am J Physiol. 1998;274(6 Pt 1):G1061-7.
43. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. J Clin Invest. 1997;99(9):2254-9.
44. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med. 1993;328(18):1313-6.
45. Nugent KP, Farmer KC, Spigelman AD, Williams CB, Phillips RK. Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. Br J Surg. 1993; 80(12):1618-9.
46. Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. J Biol Chem. 1992;267(36):25934-8.
47. Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, Miura K, Harris CC. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. Cancer Res. 2003; 63(3):728-34.
48. Fan XM, Wong BC, Lin MC, Cho CH, Wang WP, Kung HF, Lam SK. Interleukin-1beta induces cyclo-oxygenase-2 expression in gastric cancer cells by the p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. J Gastroenterol Hepatol. 2001;16(10):1098-104.

49. Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, Parikh AA, Tellez C, Williams S, Jung YD, Fan F, Takeda A, Akagi M, Bar-Eli M, Gallick GE, Ellis LM. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. Cancer Res. 2003; 63(13):3632-6.

50. Nakao S, Ogata Y, Shimizu-Sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H. Activation of NFkappaB is necessary for IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. Mol Cell Biochem. 2000; 209(1-2):113-8.

51. Lim JW, Kim H, Kim KH. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. Lab Invest. 2001; 81(3):349-60.

52. Rikitake Y, Hirata K, Kawashima S, Takeuchi S, Shimokawa Y, Kojima Y, Inoue N, Yokoyama M. Signaling mechanism underlying COX-2 induction by lysophosphatidylcholine. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 281(5):1291-7.

53. Howe LR, Crawford HC, Subbaramaiah K, Hassell JA, Dannenberg AJ, Brown AM. PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2. J Biol Chem. 2001; 276(23):20108-1

54. Song SH, Jong HS, Choi HH, Inoue H, Tanabe T, Kim NK, Bang YJ. Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. Cancer Res. 2001;61(11):4628-35.

55. Yu J, Leung WK, Lee TL, Tse PC, To KF, Sung JJ. Promoter hypermethylation of cyclooxygenase-2 in gastric carcinoma. Int J Oncol. 2003; 22(5):1025-31.

56. Jang BC, Sanchez T, Schaefers HJ, Trifan OC, Liu CH, Creminon C, Huang CK, Hla T. Serum withdrawal-induced post-transcriptional stabilization of cyclooxygenase-2 mRNA in MDA-MB-231 mammary carcinoma cells requires the activity of the p38 stress-activated protein kinase. J Biol Chem. 2000; 275(50):39507-15.

57. Bachelor MA, Silvers AL, Bowden GT. The role of p38 in UVA-induced cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line, HaCaT. Oncogene. 2002;21(46):7092-9.

58. Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. J Clin Invest. 2001; 108(11):1657-65.

59. Sengupta S, Jang BC, Wu MT, Paik JH, Furneaux H, Hla T. The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2. J Biol Chem. 2003; 278(27):25227-33.

60. Subbaramaiah K, Marmao TP, Dixon DA, Dannenberg AJ. Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes. Evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2 and HuR. J Biol Chem. 2003 Jun 25 [Epub ahead of print].

61. Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. J Biol hem., 271:8144-8151, 1996.

62. Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, King PH. HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3'

untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. Cancer Res. 2001; 61(5):2154-61.

63. Fan XC, Steitz JA. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. EMBO J., 17:3448-3460, 1998.

64. Denkert C, Schmitt WD, Berger S, Reles A, Pest S, Siegert A, Lichtenegger W, Dietel M, Hauptmann S. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. Int J Cancer; 2002, 102(5):507-13, 2002.

65. Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. Am J of Pathol. 2002;161(4):1215-21 (geteilte Erstautorenschaft: G.K. und C.D.)

66. Denkert C, Köbel M, Pest S, Koch I, Berger S , Schwabe M, Siegert A, Reles A, Klosterhalfen B, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. Am J Pathol.; 2002, 160(3):893-903.

67. Denkert C, Winzer K-J, Müller B-M, Weichert W, Pest S, Köbel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S. Elevated expression of cyclooxygenase 2 is a negative prognostic factor for disease-free survival and overall survival of patients with breast carcinoma. Cancer 2003; 97, 2978-2987.

68. Denkert C, Winzer K-J, Hauptmann S. Prognostic impact of COX-2 in breast cancer. Clin Breast Cancer, in press.

69. Denkert C, Fürstenberg A, Daniel PT, Koch I, Köbel M, Weichert W, Siegert A, Hauptmann S. Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2 specific RNA interference. Oncogene, in press.

70. Denkert C, Weichert W, Pest S, Koch I, Licht D, Köbel M, Reles A, Sehouli J, Dietel M, Hauptmann S. Overexpression of the ELAV-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased COX-2 expression. Cancer Res, in press.

71. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas Gastroenterology. 1994;107(4):1183-8.

72. Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushiama M, Fujita S, Gotoda T, Yokota T, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. Jpn J Clin Oncol. 1998; 28(7):421-6.

73. Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. Cancer Res. 1995, 55(12):2556-9.

74. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. Cancer Res. 1995; 55(17):3785-9.

75. Ristimäki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. Cancer Res. 1997; 57(7):1276-80.

76. Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, DuBois RN. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. Cancer Res. 2003; 63(5):906-11.

77. Matsumoto Y, Ishiko O, Deguchi M, Nakagawa E, Ogita S. Cyclooxygenase-2 expression in normal ovaries and epithelial ovarian neoplasms. Int J Mol Med. 2001; 8(1):31-6.

75. Klimp AH, Hollema H, Kempinga C, van der Zee AG, de Vries EG, Daemen T. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. Cancer Res. 2001;61(19):7305-9.

79. Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni GF, Fagotti A, Fanfani F, Legge F, Maggiano N, Gessi M, Mancuso S, Ranelletti FO, Scambia G. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. Ann Oncol. 2002; 13(8):1205-11.

80. Shigemasa K, Tian X, Gu L, Shiroyama Y, Nagai N, Ohama K. Expression of cyclooxygenase-2 and its relationship to p53 accumulation in ovarian adenocarcinomas. Int J Oncol. 2003; 22(1):99-105.

81. Tang L, Wang M, Ma J. Relationship between cyclooxygenase-2 protein expression, prostaglandins levels and biologic behavior in ovarian carcinoma tissue Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2002; 37(11):687-90.

82. Landen CN Jr, Mathur SP, Richardson MS, Creasman WT. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. Am J Obstet Gynecol. 2003; 188(5):1174-6.

83. Wang CY, Wang M, Wang XY, Zhang SL, Wang YX, Li LK. Inhibitory effect of NS398 on the proliferation of human ovarian cancer cell lines CAOV3 and OVCAR3 in vitro. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2003; 38(7):415-418.

84. Rodriguez-Burford C, Barnes MN, Oelschlager DK, Myers RB, Talley LI, Partridge EE, Grizzle WE. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) on ovarian carcinoma cell lines: preclinical evaluation of NSAIDs as chemopreventive agents. Clin Cancer Res. 2002; 8(1):202-9.

85. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. Cancer. 2000; 89(12):2637-45.

86. Brodie AM, Lu Q, Long BJ, Fulton A, Chen T, Macpherson N, DeJong PC, Blankenstein MA, Nortier JW, Slee PH, van de Ven J, van Gorp JM, Elbers JR, Schipper ME, Blijham GH,

Thijssen JH. Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. J Steroid Biochem Mol Biol. 2001; 79(1-5):41-7.

87. Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. J Clin Pathol. 2002; 55(6):429-34.
88. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. Cancer Res. 2002; 62(6):1676-81.
89. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. Cancer Res. 2002; 62(3):632-5.
90. Spizzo G, Gastl G, Wolf D, Gunsilius E, Steurer M, Fong D, Amberger A, Margreiter R, Obrist P. Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. Br J Cancer. 2003; 88(4):574-8.
91. Davies G, Salter J, Hills M, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. Clin Cancer Res. 2003; 9(7):2651-6.
92. Lim SC. Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. Oncol Rep. 2003;10(5):1241-9.
93. Wulfing P, Diallo R, Muller C, Wulfing C, Poremba C, Heinecke A, Rody A, Greb RR, Bocker W, Kiesel L. Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: high throughput tissue microarray analysis. J Cancer Res Clin Oncol. 2003; Jul 15 [Epub ahead of print].
94. Watanabe O, Shimizu T, Imamura H, Kinoshita J, Utada Y, Okabe T, Kimura K, Hirano A, Yoshimatsu K, Aiba M, Ogawa K. Expression of cyclooxygenase-2 in malignant and benign breast tumors. Anticancer Res. 2003; 23(4):3215-21.
95. Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, Kuroishi T, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Sugiura T, Mitsudomi T, Takahashi T. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas. Clin Cancer Res. 1999; 5(5):1001-5.
96. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM, Feng L, Hong WK, Xu XC. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2001; 7(4):861-7.
97. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, Yoshimura H, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. Clin Cancer Res. 2000; 6(10):4064-8.
98. Konno H, Baba M, Shoji T, Ohta M, Suzuki S, Nakamura S. Cyclooxygenase-2 expression correlates with uPAR levels and is responsible for poor prognosis of colorectal cancer. Clin Exp Metastasis. 2002;19(6):527-34.

99. Ferrandina G, Lauriola L, Distefano MG, Zannoni GF, Gessi M, Legge F, Maggiano N, Mancuso S, Capelli A, Scambia G, Ranelletti FO. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. J Clin Oncol. 2002; 20(4):973-81.

100. Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, Park HC, Suh CO, Park TK, Kim BS. 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. 2002; 95(3):31-9..

101. Buskens CJ, Van Rees BP, Sivula A, Reitsma JB, Haglund C, Bosma PJ, Offerhaus GJ, Van Lanschot JJ, Ristimaki A. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus. Gastroenterology. 2002 ; 122(7):1800-7.

102. Edwards JG, Faux SP, Plummer SM, Abrams KR, Walker RA, Waller DA, O'Byrne KJ. Cyclooxygenase-2 expression is a novel prognostic factor in malignant mesothelioma. Clin Cancer Res. 2002; 8(6):1857-62.

103. Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma Hum Pathol. 2002; 33(7):708-14.

104. Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. World J Gastroenterol. 2003; 9(7):1421-6.

105. Keene JD. Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:5-7.

106. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer Cell. 2000; 100(1):57-70.

107. Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac. Int J Cancer. 2001 Mar 15;91(6):894-9.

108. Tsujii M, Kawao S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998, 93:705-716.

109. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. Cell, 1995, 93:705-716.

110. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: upregulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. Cancer Res. 1998, 58:1208-1216.

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Steffen Hauptmann, der mich an die wissenschaftliche Arbeit herangeführt hat und mir viele wertvolle Ratschläge gegeben hat, für die langjährige Betreuung und kontinuierliche Unterstützung der Forschungsprojekte, die Grundlage dieser Arbeit sind, danken.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel, der diese Habilitation stets unterstützt hat und an seinem Institut eine offene Atmosphäre des wissenschaftlichen Austausches und der Kooperation geschaffen hat, ohne die viele der Projekte nicht möglich gewesen wären.

Meinen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe Hauptmann danke ich für die Zusammenarbeit und die zahlreichen konstruktiven Anregungen, insbesondere: Frau Ines Koch, Herrn Dr. Wilko Weichert, Herrn Dr. Martin Köbel, Herrn Dr. Stefan Berger, Frau Martina Eickmann, Herrn Michael Schwabe, Herrn Dirk Licht, Frau Dr. Anja Leclere sowie Frau Dr. Antje Siegert.

Meinem ganz aussergewöhnlichen Team aus Doktorandinnen und Doktoranden möchte ich herzlich für ihr engagiertes und sorgfältiges wissenschaftliches Arbeiten danken. Beteiligt an Projekten der vorliegenden Arbeit waren besonders: Frau Antje Fürstenberg, Frau Berit Müller und Herr Wolfgang Schmitt.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Pathologie der Charité danke ich für die Kooperation bei Forschungsprojekten und die Beratung in wissenschaftlichen Fragestellungen. Dieser Dank gilt besonders Herrn Dr. Glen Kristiansen, Frau PD Dr. Christine Sers und Herrn Prof. Dr. Reinhold Schäfer.

Herrn Sören Pest danke ich für die kompetente Beratung bei der statistischen Auswertung.

Allen Kooperationspartnern aus Kliniken und Instituten der Charité, besonders Herrn Dr. Klaus-Jürgen Winzer, Frau PD Dr. Angela Reles, Herrn Dr. Jalid Sehouli und Herrn PD Dr. Peter Daniel danke ich für die langjährige wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Ich möchte ganz besonders meiner Familie, Tanja, Kira und Tobias, für ihr Verständnis und ihre Unterstützung danken.

Eidestattliche Erklärung gemäss Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren angemeldet oder durchgeführt wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Datum 1.10.2003 Carsten Denkert

Anhang

1) Denkert C, Schmitt WD, Berger S, Reles A, Pest S, Siegert A, Lichtenegger W, Dietel M, Hauptmann S. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. Int J Cancer; 2002, 102(5):507-13, 2002.

2) Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. Am J of Pathol. 2002;161(4):1215-21 (geteilte Erstautorenschaft: G.K. und C.D.)

3) Denkert C, Köbel M, Pest S, Koch I, Berger S , Schwabe M, Siegert A, Reles A, Klosterhalfen B, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. Am J Pathol.; 2002, 160(3):893-903.

4) Denkert C, Winzer K-J, Müller B-M, Weichert W, Pest S, Köbel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S. Elevated expression of cyclooxygenase 2 is a negative prognostic factor for disease-free survival and overall survival of patients with breast carcinoma. Cancer 2003; 97, 2978-2987.

5) Denkert C, Winzer K-J, Hauptmann S. Prognostic impact of COX-2 in breast cancer. Clinical Breast Cancer, in press.

6) Denkert C, Fürstenberg A, Daniel PT, Koch I, Köbel M, Weichert W, Siegert A, Hauptmann S. Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2 specific RNA interference, Oncogene, in press.

7) Denkert C, Weichert W, Pest S, Koch I, Licht D, Köbel M, Reles A, Sehouli J, Dietel M, Hauptmann S. Overexpression of the ELAV-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased COX-2 expression. Cancer Research, in press.