

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Kopf- und Neurozentrum
Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Direktor: Prof. Dr. med. R. Knecht

Untersuchungen zur potentiellen Bedeutung von PGE₂ als Tumormarker

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Johannes Andreas Schmitt
geb. in Heidelberg

Hamburg, 2010

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.10.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: *Prof. Dr. R. Knecht*

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: *Prof. Dr. M. Hess*

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: *PD Dr. A. Block*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie	1
1.2. Ätiologie	3
1.3. Etablierte Therapien von Kopf-Hals-Tumoren.....	3
1.4. Neue Therapieansätze.....	6
1.5. Serummarker in der Tumordiagnostik.....	8
1.6. COX2-Hemmer und deren Wirkung auf Tumoren/Tumorzellen	9
1.7. Einflüsse von COX2 und PGE2 auf Tumoren/Tumorzellen	11
1.8. PGE2 – Herkunft und Funktion	13
1.9. PGE2-Serumlevel als diagnostischer Parameter? - Fragestellung	14
1.10. Studiendesign	15
2. Material und Methode.....	16
2.1. Materialien	16
2.1.1. Laborgeräte.....	16
2.1.2. Chemikalien	16
2.1.3. Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.3. Medium	17
2.2. Methoden.....	17
2.2.1. Humanes Serum	17
2.2.1.1. Patientengut und Kontrollen (Serum gesunder Probanden).....	17
2.2.1.2. PGE2-Messung	18
2.2.1.2.1. Probenvorbereitung.....	18
2.2.1.2.2. Umkehrphasenchromatographie	18
2.2.1.2.3. PGE2 High Sensitivity ELISA	19
2.2.2. Zellkultur.....	21
2.2.2.1. Zelllinien	21
2.2.2.2. Kultivierung	22
2.2.2.3. Probenentnahme und PGE2-Messung.....	22
2.2.3. Kontrollgruppen	22
2.2.4. Statistik.....	23

3. Ergebnisse	24
3.1. PGE2-Serumspiegel bei Kopf-Hals-Tumorpatienten und gesunden Spendern	24
3.2. PGE2-Sekretion von Plattenepithelkarzinomzelllinien	27
4. Diskussion	30
4.1. Ergebnisse dieser Arbeit und deren Bedeutung	30
4.2. Zur Herkunft des PGE2 im Serum	31
4.3. Verwendung der PGE2-Serumkonzentration als diagnostischer Parameter.....	32
4.4. Bedeutung von PGE2 in der Prävention von Tumorerkrankungen.....	33
4.5. Bedeutung von PGE2 in der Tumorthherapie	33
5. Zusammenfassung	35
6. Abkürzungsverzeichnis	36
7. Abbildungsverzeichnis.....	38
8. Tabellenverzeichnis.....	39
9. Literaturverzeichnis	40
10. Danksagung	49
11. Lebenslauf.....	50
12. Eidesstattliche Versicherung	51

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Die geschätzte Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2002 betrug laut Robert-Koch-Institut [3] 424.250. Malignome des Kopf-Hals-Bereichs lagen mit 7.800 bei Männern an siebter und mit 2.800 bei Frauen an fünfzehnter Stelle, wobei 85 % der Malignome Plattenepithelkarzinome sind. Der prozentuale Anteil der Krebssterbefälle bei Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs betrug bei Männern 3,4 %. Die mittlere relative Überlebensrate für fünf Jahre wird mit 46 % bei Männern und 60 % bei Frauen angegeben [3]. Das Tumorregister München (TRM), eine Dokumentation der Untersuchungsergebnisse und Therapieverläufe bei Kopf-Hals-Tumoren von vier HNO-Kliniken und einer Mund-Kiefer-Gesichtschirurgischen Klinik [30, 80] in einem Zeitraum von 1978 bis 2002 an 7.633 Patienten im Raum München, zeigte Überlebensraten bei T1-Befunden in Abhängigkeit von der Lokalisation von 56-93 % nach fünf Jahren. Der Mittelwert aller Stadien wird mit 29-88 % angegeben [Tab. 1].

Lokalisation	overall			relativ		T1 overall		USA rel
	5 Jahre %	10 Jahre %	(*)	5 Jahre %	10 Jahre %	5 Jahre %	10 Jahre %	5 Jahre %
Zunge	43	31	(+/- 4)	47	36	68	51	24
Lippe	76	57	(+/- 9)	88	78	82	68	
Speicheldrüse	56	43	(+/- 6)	63	55	84	71	69
Mundhöhle	45	31	(+/- 3)	49	37	72	53	38
Larynx	57	39	(+/- 3)	64	51	82	65	
Oropharynx	39	24	(+/- 3)	42	29	65	41	
Nasopharynx	48	36	(+/- 8)	51	42	60	60	47
Hypopharynx	27	16	(+/- 3)	29	19	56	37	22
Nase und Nasennebenhöhlen	45	27	(+/- 6)	52	35	93	74	
Äußeres Ohr	46	34	(+/- 9)	63	57	61	46	

Tabelle 1: Tumorregister München (TRM) Jahresbericht seit 1998 [80] und SEER-Daten der USA, bevölkerungsbezogene Neuerkrankungs- und Survivaldaten der USA bis 1996 [67] (rechte Spalte)
Überlebensraten abhängig von der Lokalisation.

Dabei ist der Kehlkopf die am häufigsten betroffene Region, gefolgt von Regionen des oberen Aerodigestivtraktes (Larynx, Mundhöhle, Zunge, Oro- und Hypopharynx). Dies spiegelt auch die wesentliche Rolle von Tabak- und Alkoholkonsum bei der Kanzerogenese wider. Wie in Tab. 2 zu sehen, ist der hohe Anteil an T1- und T2-Befunden bei Zunge, Mundhöhle etc. durch das häufig frühe Auftreten von Symptomen wie Heiserkeit, Fremdkörpergefühl, Schwellungen

und Funktionsstörungen zu erklären, was die Patienten zu einem frühzeitigen Arztbesuch bewegt. Malignome des Hypopharynx hingegen wurden meist im T3- oder T4-Stadium diagnostiziert. Aufgrund der topographisch-anatomischen Lage besitzen diese Malignome auch eine hohe Metastasierungstendenz, was die Prognose weiter verschlechtert.

Lokalisation	pT				Anteil N+				N+	M1
	pT1 %	pT2 %	pT3 %	pT4 %	pT1 %	pT2 %	pT3 %	pT4 %	%	%
Zunge	43	43	8	6	15	44	60	79	37	1
Lippe	65	27	6	2	8	9	63	100	14	0
Speicheldrüse	29	31	22	18	20	34	30	44	33	5
Mundhöhle	44	33	6	17	22	40	57	54	38	2
Larynx	39	20	21	20	6	22	31	57	27	1
Oropharynx	26	35	19	20	54	64	77	79	68	3
Nasopharynx	27	34	18	21	92	67	50	75	79	3
Hypopharynx	15	25	18	42	66	79	81	83	81	4
Nase und Nasennebenhöhlen	19	19	15	47	0	12	5	13	11	1
Äußeres Ohr	48	31	7	14	7	11	0	29	11	0

Tabelle 2: Tumorregister München, Jahresbericht seit 1998 [80]

pT-Verteilung und Anteil der lymphknotenpositiven Primärbefunde abhängig von den pT-Stadien sowie insgesamt.

1.2. Ätiologie

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Malignomen im Kopf-Hals-Bereich stellen Tabakkonsum und Alkoholabusus dar, vor allem bei kombiniertem Auftreten beider Risikofaktoren. Für weitere exogene Noxen wie Asbest und Teer sowie verschiedene HPV-Typen konnte ein Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen werden. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit einer genetischen Prädisposition. 10 % aller Tumoren haben eine streng erbliche Komponente [69]. In verschiedenen ethnischen Gruppen konnte eine Häufung oraler Tumoren festgestellt werden. Ebenso wurde ein erhöhtes Krebsrisiko in der Verwandtschaft von Tumorpatienten beobachtet [69]. Durch ihre funktionelle Bedeutung stellen der Entgiftungsstoffwechsel für tabakassoziierte Karzinogene, Alkoholabbau, DNA-Reparaturmechanismen und das Immunsystem weitere Möglichkeiten für endogene Einflüsse auf die Karzinogenese dar [44].

1.3. Etablierte Therapien von Kopf-Hals-Tumoren

Wie in anderen onkologischen Disziplinen auch, bestehen die Therapiemöglichkeiten bei Kopf-Hals-Karzinomen aus chirurgischer Exzision, Radiatio, Chemotherapie sowie Kombinationen der genannten Therapieformen. Chemotherapie wird im Allgemeinen als adjuvante Therapie angewandt, die alleinige Chemotherapie hat rein palliativen Charakter [10, 81]. Patienten mit T1- und T2-Tumoren werden in der Regel durch chirurgische Entfernung oder im Falle des Glottiskarzinoms durch Strahlentherapie unter kurativer Absicht behandelt, was bei T1-Tumoren in 80 % und bei T2-Tumoren in 60 % der Fälle zum Erfolg führt. Patienten mit T3- und T4-Tumoren haben wesentlich schlechtere Prognosen und werden ausgedehnten chirurgischen Resektionen und Radiatio in mehreren Sitzungen unterzogen, bis ein akzeptables Ergebnis erzielt wird oder die chirurgischen Möglichkeiten erschöpft sind. Bei diesem Patientengut können nur 30 % geheilt werden [81]. Da aufgrund der Topographie bei Kopf-Hals-Tumoren sehr schnell funktionelle Strukturen betroffen sind, gehen derartige chirurgisch-resektionsorientierte Eingriffe rasch mit entsprechenden gravierenden funktionellen Einbußen einher. Verlust der Stimme, Schluckstörungen etc. bedeuten einen erheblichen Verlust an Lebensqualität. Trotz heutiger Methoden

plastischer Rekonstruktionschirurgie sind die Ergebnisse meist nicht zufriedenstellend. Demnach orientieren sich moderne Therapiekonzepte auch bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich an dem Bestreben, den Tumor unter maximal möglicher Schonung der Nachbarorgane zu behandeln. Im Gegensatz zu radikalchirurgischen Resektionen stehen hierbei präoperative Chemotherapie und Radiatio mehr im Vordergrund. Hierdurch wird eine Remission der Tumorausdehnung (sog. Downstaging) mit nachfolgender besserer Operabilität oder im besten Falle eine vollständige Elimination des Tumorgewebes angestrebt. Als effektive Strategien haben sich die neoadjuvante Chemotherapie sowie simultane Radiochemotherapie herausgestellt [4, 33, 34, 53]. Im Bereich mikroinvasiver Chirurgie stellt u. a. der Laser eine neue Therapiealternative zum klassischen Skalpell dar [75, 76].

Bei der neoadjuvanten Chemotherapie wird das bereits erwähnte Downstaging angestrebt. Nach Chemotherapie, in der Regel mit Cis-Platin, übrige Tumormassen werden anschließend mit Bestrahlung oder chirurgischer Entfernung behandelt. Diese Folgetherapie wird auf Basis des Ansprechverhaltens auf die Chemotherapie individuell angepasst [33]. Während Cis-Platin als Standardchemotherapeutikum Bedeutung hat, konnte durch Addition von Taxanen wie Docetaxel die Ansprechrate auf 71-100 % gesteigert werden [53]. Studien konnten einen Erhalt des Larynx von 42-64 % ohne Verschlechterung der Fünf-Jahres-Überlebensrate zeigen. Außerdem ermöglicht der Einsatz von Chemotherapie eine Reduktion des Risikos der Bildung von Fernmetastasen [12, 53]. Das Konzept der Radiochemotherapie basiert auf der simultanen Behandlung mit Radiatio und Chemotherapeutika (Carboplatin). Auch für diese Strategie konnte in vergleichenden Studien ein signifikanter Vorteil in Bezug auf Organerhaltung bei gleicher Überlebensrate festgestellt werden [53]. Bei bereits weit fortgeschrittenen Malignomen stellt die Kombination beider Methoden eine unter Umständen organerhaltende Therapieoption dar [14, 53].

Im Bereich der chirurgischen Techniken zur Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen hat der Laser inzwischen seinen festen Platz gewonnen. Während früher Laserexzisionen von Malignomen aufgrund der schlechten bis unmöglichen histologischen Beurteilung des Gewebes abgelehnt wurden, stellt der Laser heute ein wichtiges, vor allem mikrochirurgisches Instrumentarium dar. Der Laser kann in niedrigen Tumorstadien (T1, u. U. T2) zur primären, vollständigen Resektion des Karzinoms mit Organerhalt verwendet werden. Weiterhin kommt

Laser in Kombination mit der bereits beschriebenen neoadjuvanten Chemotherapie sowie zur Rezidivkontrolle zum Einsatz [54, 75, 76].

Moderne, organerhaltend orientierte Therapiekonzepte bei Kopf-Hals-Karzinomen ermöglichen somit eine wesentliche Verbesserung der Funktion im Vergleich zur klassischen, radikalchirurgischen Resektion, einhergehend mit einer signifikant höheren Lebensqualität. Obwohl derartige Therapieformen bereits vielversprechende Ergebnisse liefern, kann jedoch nicht jeder Patient einer solchen Therapie zugeführt werden. Die *American Society of Clinical Oncology* gibt in Bezug auf die Erhaltung des Larynx folgende Empfehlung [52]: T1- und T2-Primärtumoren sollten organerhaltend behandelt werden. Bestrahlung oder organschonende chirurgische Entfernung sind die Mittel der Wahl, eine Kombination wird aufgrund schlechterer funktioneller Ergebnisse nicht empfohlen. Bei einem Rezidiv (nach Radiatio) kann eine chirurgische Intervention möglich sein, bei einem Großteil, vor allem bei T2-Tumoren, wird jedoch die Laryngektomie indiziert sein.

Im Stadium III sowie T2 N+ ist simultane Radiochemotherapie die empfohlene Therapie bei organerhaltender Intention. Im Falle fortgeschrittener Stadien (T3, T4) bieten organerhaltende Maßnahmen keinen Vorteil in Bezug auf die Überlebensrate. Spezielle chirurgische Prozeduren, wie eine partielle, supracricoidale Laryngektomie, sowie simultane Radiochemotherapie stellen für eine Minderheit der Patienten alternative Therapien zur totalen Laryngektomie dar. Neoadjuvante Chemotherapie ist gegenwärtig nur im Rahmen klinischer Studien anzuwenden [52]. Letztlich muss jedoch nach wie vor von Fall zu Fall die Indikation individuell gestellt werden. Außerdem unterscheiden sich Therapiekombinationen und Therapieschwerpunkte je nach Art und topographischer Lage des Malignoms [50, 81]. Eine weitere, meist notwendige, chirurgische Begleittherapie ist die Entfernung eines Teils der Halslymphknoten und -Eingeweide. Die 1906 von Crile geforderte radikale Entfernung der Halseingeweide („radikale Neck-dissection“) [7] wurde 1972 von Lindbergh durch eine nach funktionellen Aspekten ausgerichtete selektive Neck-dissection erweitert [37]. Im weiteren Verlauf wurde unter Berücksichtigung anatomischer und operationstechnischer Grundlagen eine Klassifikation erarbeitet, welche die Grundlage der heute durchgeführten Neck-dissection bildet [55, 58]. Die enge topographische Beziehung des Kopf-Hals-Bereichs zu benachbarten Lymphknoten und deren hohe Dichte führt zu einer raschen Metastasierung in die lokoregio-

nären Lymphknoten. Remmert et al. [55] konnten bei 450 Patienten in 50 % aller Fälle zum Zeitpunkt der Operation Metastasen in den lokoregionären Lymphknoten feststellen. Das Auftreten von Metastasen korrelierte ebenfalls mit der Progredienz des Primärtumors. Die Entscheidung, ob und in welchem Ausmaß eine Neck-dissection erfolgen sollte, richtet sich nach den entsprechenden Lymphabflusswegen des Primärtumors, der präoperativen Diagnostik, dem T-Stadium, dem Differenzierungsgrad und der Kenntnis bevorzugter Metastasierungswege.

In Kombination mit simultaner Radiochemotherapie wird der Stellenwert einer Neck-dissection bereits wieder kontrovers diskutiert [13]. Publierte Vorschläge zur Indikationsstellung haben sich jedoch zurzeit noch nicht in offiziellen Empfehlungen und Richtlinien etabliert.

Trotz weiter fortschreitender Verfeinerung der beschriebenen Therapietechniken und Optimierung der Kombination etablierter Therapieformen liegt die relative Überlebensrate nach fünf Jahren je nach Lokalisation bei 29-64 % sowie nach zehn Jahren bei 19-57 %. Lediglich Tumoren der Lippe weisen eine höhere relative Überlebensrate von 88 % nach fünf und 78 % nach zehn Jahren auf [80] [Tab.1]. Dies zeigt zum einen die Notwendigkeit neuer Therapieansätze. Zum anderen wäre es wünschenswert, aufgrund des Zusammenhangs eines hohen Anteils von im Anfangsstadium diagnostizierten Tumoren und einer höheren Überlebensrate bessere Untersuchungs- und Screeningmethoden zur Verfügung zu haben.

1.4. Neue Therapieansätze

Die raschen Fortschritte im Bereich der molekularmedizinischen Forschung haben eine stetige Zunahme des Verständnisses der Kanzerogenese zur Folge. Dadurch bedingt eröffnen sich auch neue diagnostische und therapeutische Wege. Der Bedarf ist groß, konnte doch trotz beschriebener Optimierung der etablierten Therapieschemata die Prognose für vor allem Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren nicht wesentlich verbessert werden [51, 56]. Einen vielversprechenden Ansatzpunkt stellt die Familie der EGF-Rezeptoren (= HER), vor allem EGFR (= HER1), dar [51, 56]. EGFR ist für die Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Überleben mitverantwortlich. Eine Störung der Regulation hat entsprechende kanzerogene Effekte. So konnte bei 90-

100 % der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen eine Überexpression von EGFR festgestellt werden [56].

Eine Dysregulation des EGFR konnte auch mit weiteren Malignomen (Lunge, Brust, Colorektalkarzinome und Prostata) assoziiert werden [6, 56].

Die vielversprechendsten Therapieansätze mit EGFR als Ziel stellen Monoklonale Antikörper (MABs) sowie Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) dar.

MABs gegen EGFR können die EGFR-Kaskade sowohl durch Inhibition der Rezeptoraktivierung als auch durch Aktivierung einer zellvermittelten Zytotoxizität und einer Komplementreaktion blockieren [6, 56]. MABs wurden ursprünglich von immortalisierten B-Zellen der Maus abgeleitet, welche durch Fusion von B-Zellen und Myelomzellen hergestellt wurden. Diese MABs besitzen jedoch eine starke Antigenität und können zu massiven allergischen Nebenwirkungen führen. Eine Weiterentwicklung stellen chimäre MABs und, mit Hilfe von transgenetischen Mäusen hergestellte, vollständig humanisierte MABs dar. Dadurch konnten die allergenen Nebenwirkungen wesentlich reduziert werden [26]. Vorteile der MABs sind unter anderem eine hohe Spezifität, günstige Pharmakokinetik und hohe Serumhalbwertszeiten. Nebenwirkungen bei monoklonalen Antikörpern wie auch bei den nachfolgend beschriebenen Tyrosinkinaseinhibitoren sind vor allem akneartige Dermatosen [6, 26, 51, 56]. EGF-Rezeptoren gehören zur Familie der Tyrosinkinasen. Niedrigmolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) hemmen kompetitiv die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinasedomäne der EGFR [6]. Während MABs extrazellulär angreifen, erfolgt die Rezeptorblockade durch TKIs auf intrazellulärem Weg. Es existieren sowohl hochspezifische TKIs wie Gefitinib als auch weniger spezifische TKIs (Erlotinib). Die Vorteile der EGFR-Inhibition sowohl durch MABs als auch durch TKIs konnten in mehreren klinischen Studien verifiziert werden. Dabei wurde eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate bei allgemein guter Verträglichkeit festgestellt. Ebenso konnte eine Verringerung der Toxizität bei Kombination mit Chemotherapie oder Radiatio erzielt werden. Die Kombination von MABs und TKIs liefert in Studien noch widersprüchliche Ergebnisse [6, 26, 51, 56].

Einen dritten, äußerst vielversprechenden Ansatzpunkt stellen die Cyclooxygenasen, vor allem COX2, dar. In vielen Tumoren konnte eine enge Korrelation zwischen Überexpression von COX2 bzw. nachfolgend PGE2 und dem Tumorwachstum nachgewiesen werden. Als Hauptmechanismen für die Förderung der Karzinogenese durch COX2 konnten Verhinderung der Apoptose, För-

derung der Angiogenese, Steigerung der Invasivität, Immunmodulation und Konvertierung von Prokarzinogenen in Karzinogene identifiziert werden [9]. Daher liegt es nahe, die Hemmung der Cyclooxygenase zur Prävention und Tumorthherapie zu nutzen.

1.5. Serummarker in der Tumordiagnostik

Serologische Tumormarker sind in Körperflüssigkeiten zirkulierende Substanzen, in der Regel Proteine mit Kohlenhydrat- oder Lipidresten, deren Erscheinen oder Änderung der Konzentration im Serum nachweisbar ist und mit dem Vorhandensein eines malignen Geschehens in Verbindung gebracht werden kann [11, 85]. Tumormarker können in zelluläre und humorale Tumormarker unterteilt werden. Unter zellulären Tumormarkern versteht man (membranständige) Antigene, Rezeptoren oder Moleküle, die eine vermehrte Expression von Onkogenen aufzeigen. Humorale Marker hingegen sind Substanzen, die entweder durch eine Reaktion des Organismus vermehrt gebildet, vom Tumor sezerniert oder bei dessen Zerfall freigesetzt werden. Aufgrund der einfachen und schnellen Zugänglichkeit scheinen Tumormarker für eine optimale Diagnostik und Möglichkeit der Früherkennung geeignet zu sein. Ein idealer Tumormarker, d.h. 100 % Spezifität (kein Nachweis bei Gesunden) und 100 % Sensitivität (Nachweis auch in Frühstadien) konnte jedoch bis dato noch nicht identifiziert werden [85]. Außerdem kann die Konzentration der Tumormarker durch Entzündungen, benigne Tumoren und weitere Störgrößen beeinflusst werden. Letztlich gibt es physiologische interindividuelle Schwankungen, was die Festlegung von charakteristischen Schwellenwerten erschwert [85].

Die heute bekannten Tumormarker sind demnach bis auf wenige Ausnahmen als Screeningparameter ungeeignet. Sie eignen sich jedoch gut zur Verlaufs- und Therapiekontrolle maligner Erkrankungen. Als Ausnahmen sind PSA zur Diagnostik eines Prostatakarzinoms [15], β -HCG bei Hodentumoren und Bence-Jones-Proteine beim Plasmozytom zu nennen.

In der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (HNO) dienen Tumormarker einer möglichen Einordnung des histologischen Typs sowie der Therapiekontrolle und zur Prognosebestimmung. Hierbei erfüllten SCC (Squamosa Cell Carcinoma Antigen), CEA (karzinomembryonales Antigen), CYFRA 21.1 und vor allem die Kombination von SCC und CEA unter den bisher bekannten Markern die meis-

ten Voraussetzungen [85]. Derartige Diagnostik ist jedoch derzeit noch kein Routineverfahren.

Screening-geeignete Marker sind in der HNO und in Bezug auf Plattenepithelkarzinome allgemein nicht bekannt. Die Ermittlung eines solchen Markers würde eine wesentliche Verbesserung der Früherkennung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich bedeuten. Durch die frühere Diagnosestellung und die dadurch zeitiger beginnende Therapie würde eine höhere Überlebensrate der Patienten sowie ein besseres, funktionelles Endergebnis durch den möglichen Einsatz organerhaltender Maßnahmen bedeuten. Auch zur Kontrolle nach erfolgter Therapie wäre es wünschenswert, einen geeigneten Tumormarker zu besitzen, der eine frühzeitige Erkennung eines Rezidivs ermöglicht.

1.6. COX2-Hemmer und deren Wirkung auf Tumoren/Tumorzellen

In den letzten Jahren wurden COX2-Hemmer zunehmend auf ihr Potential, das Wachstum solider Tumoren zu hemmen, hin untersucht. Einige Studien lieferten Beweise, dass COX2-Hemmer das Tumorzellwachstum beachtlich reduzieren [20, 57, 62, 89, 90]. Untersuchungen an Mäusen und Menschen mit Colorektalkarzinomen zeigten Verminderung des Tumorwachstums und des metastatischen Potentials nach Therapie mit Ibuprofen [89]. Schroeder et al. konnten eine Wachstumshemmung bei Plattenepithelkarzinomzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich durch den selektiven COX2-Hemmer Celecoxib feststellen [62]. Die tumorhemmende und präventive Wirkung von Genistein konnte ebenso auf die Herabregulierung der PGE₂-Synthese bzw. Hemmung der COX2-Expression zurückgeführt werden. Prinzipiell geht die Hemmung der COX mit der Reduktion proneoplastischer Effekte und Einflüsse des COX-induzierten Stoffwechsels, insbesondere der Expression von PGE₂, einher. Die genauen Mechanismen der tumorhemmenden Wirkung von NSAIDs sind jedoch nicht vollständig bekannt. Die Induktion der Apoptose sowie die Verminderung der Angiogenese in Tumoren spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorsuppression durch NSAIDs. Die Induktion der Apoptose als einer der Hauptfaktoren [8] scheint auf einem COX2-abhängigen Weg wie auch auf einem COX-unabhängigen Weg zu erfolgen. Der COX2-abhängige Weg wird jedoch noch

kontrovers diskutiert. Letztlich gibt es noch keinen definitiven Beweis für eine direkte Beeinflussung der Apoptose durch PGE₂. Eine Untergruppe der PPARs, intrazelluläre Steroidrezeptoren, können die Apoptose verschiedener Zelltypen modulieren. Möglicherweise sind Produkte des COX₂-Stoffwechsels physiologische Liganden der PPARs. Es wurde gezeigt, dass ein Rückgang des Tumorwachstums bei Magenkarzinomen durch PPAR γ -Agonisten erzielt werden konnte. Gleichzeitig konnte ein Rückgang der COX₂-Expression beobachtet werden. Daher scheint ein gemeinsamer Stoffwechselweg wahrscheinlich [28, 32]. Lehmann et al. konnten obendrein eine direkte, agonistische Wirkung von NSAIDs auf PPAR γ feststellen [44]. Durch die Hemmung der COX fällt vermehrt Arachidonsäure in der Zelle an. Aufgrund dieser Akkumulation wird die Bildung von Ceramiden durch eine Sphingomyelinase stimuliert. (Ebenso sind TNF α , Fas sowie ionisierende Strahlung Stimulatoren des Sphingomyelinstoffwechsels). Ceramid induziert schließlich als second messenger über Kaskaden von Kinasen und Transkriptionsfaktoren die Apoptose der Zelle [18, 21, 27]. Letztlich gibt es Anhaltspunkte einer Induktion der Apoptose durch weitere Stoffwechselprodukte der Arachidonsäure, die bei Beschreiten alternativer Stoffwechselwege aufgrund der Blockade des Cyclooxygenasewegs entstehen, sowie durch Arachidonsäure direkt [5, 66, 86]. Neben den beschriebenen Wirkungsweisen scheinen NSAIDs weitere, von der Hemmung der COX unabhängige, hemmende Einflüsse auf das Wachstum von Tumoren zu besitzen. Die Annahme eines solchen COX₂-unabhängigen, antineoplastischen Effekts durch Apoptoseregulation ist in der Beobachtung begründet, dass NSAIDs Apoptose in Zellen induzieren können, welche keine COX₂ exprimieren [23]. Eine konsekutive Überexpression des Transkriptionsfaktors NF κ B konnte in Tumorzellen nachgewiesen werden, einhergehend mit einer gesteigerten Expression der COX. Lim et al. konnten eine durch oben genannte Faktoren gesteigerte Expression der DNA-Reparatursysteme Ku70 und Ku80 in Magenkarzinomzellen nachweisen, welche eine Steigerung der Proliferation zur Folge hatte. Lim konnte weiterhin bestätigen, dass NSAIDs zu einer Hemmung der Expression von Ku70 und Ku80 und damit zu Regression des Tumorwachstums führen [35, 36]. In weiteren Studien konnte auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen Expression der Proteinkinase C β und dem Überleben von Tumorzellen festgestellt werden. Dabei wurde durch COX-Hemmer, unabhängig von der Inhibition der Cyclooxygenase, eine Herabregulierung der Expression der PKC β erzielt,

die wiederum eine Induktion der Apoptose zur Folge hatte [22]. Neben der Regulation der Apoptose greifen COX-Hemmer in die Angiogenese von Tumorgewebe ein. COX2 besitzt ein direkt förderndes Potential, die Angiogenese in Tumoren, ein essentielles Kriterium für deren Progression, zu verstärken. Masferrer et al. [43] konnten in über 150 humanen Tumorarten einen signifikanten Zusammenhang zwischen COX2-Expression und Angiogenese nachweisen. Durch COX-Hemmer reduzierte sich die Expression von angiogenetischen Faktoren, vor allem von VEGF und FGF. Hierbei haben unspezifische COX-Hemmer auch in Tumorgewebe, die keine Cyclooxygenase exprimieren, durch Hemmung der COX1 in Gefäßendothelzellen einen antineoplastischen Effekt [60].

Die zahlreichen Einflüsse von PGE2 auf die Kanzerogenese scheinen eine vielversprechende Möglichkeit zur Chemoprävention durch COX-Hemmung zu eröffnen. In epidemiologischen Studien konnte ein signifikanter Rückgang von Colorektalkarzinomen und deren Mortalität bei Einnahme von NSAID im Vergleich zu anderen Gruppen festgestellt werden [2]. Der Ansatz zur Chemoprävention mit NSAID dient einigen Pilotstudien mit Patienten mit Bronchialkarzinomen als Basis [42]. Nicht zuletzt stellt auch die große Verfügbarkeit von NSAID einen großen Vorteil beim Einsatz in der Chemoprävention dar. Viele der möglichen Einflüsse und Mechanismen sind jedoch en detail noch unklar. Hier besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf.

1.7. Einflüsse von COX2 und PGE2 auf Tumoren/Tumorzellen

Die Einflüsse von PGE2 auf Tumorzellen und Kanzerogenese sind vielfältig. Letzten Endes sind noch nicht alle Mechanismen der Beeinflussung bekannt. In vielen Studien konnte jedoch die Verbindung zwischen PGE2 und Aggressivität und Progression zweifelsfrei bestätigt werden. Dies geschah sowohl auf Basis von Untersuchungen von Therapien mit COX-Hemmern, in Zellkulturversuchen als auch in Studien über Wirkung von direkt injiziertem PGE2 im Tiermodell [25]. PGE2 verstärkt die COX2-Expression in soliden Tumoren durch Phosphorylierung des cAMP-response-element-bindingprotein und Aktivierung des Transkriptionsfaktor 1. Obendrein steigert PGE2 den cAMP-Spiegel der Tumorzelle über Aktivierung der Adenylylcyclase [24, 87]. Ketoconazol stellte sich hierbei als wirkungsvoller Hemmstoff dieser Autoamplifikation dar [24]. Die He-

rabregulation der Apoptose konnte mit der Überexpression von PGE2 in Verbindung gebracht werden [49], ebenso aktiviert PGE2 den RAS-Signalpfad, welcher über MAP essentiell für Zellwachstum und Proliferation ist. Diese Verstärkung wird durch die antagonistische Wechselbeziehung der PGE2-Rezeptoren EP3 und EP4 bei der Regulation des durch PGE2 gesteigerten cAMP-Levels induziert, welche beide in Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden konnten [88]. Ein weiterer proliferativer Effekt besteht in der Aktivierung des Erk-Signalwegs, was über MAP-Kinase zu einem mitogenen Stimulus führt [29]. Die Steigerung der Expression von NR4A2, einem nukleären Wachstumsfaktorenrezeptor, durch PGE2 über die cAMP/Proteinkinase-A-Kaskade führte bei Mäusen mit Adenomen zu einem Schutz vor Apoptose und Steigerung der Progressivität der Tumorzellen [16]. Eine weitere Beeinflussung der Regulation des PGE2-Stoffwechsels besteht durch EGF. EGF spielt als Kompetenzfaktor eine wichtige Rolle bei dem Übergang der Zelle von der G0- in die G1-Phase. Die Produktion von PGE2 wird durch EGF (Epidermal Growth Factor) [59] vergrößert. Der EGF-Rezeptor (EGFR), ein Rezeptor der Tyrosinkinasefamilie, wird umgekehrt von PGE2 aktiviert [48]. Dies geschieht durch eine Aktivierung des EP1-Rezeptors durch PGE2. Dadurch werden Proliferation, Wachstum und Invasivität gesteigert [17]. Auch dem EP2-Rezeptor kommt eine Rolle in der Entstehung von Tumoren zu. An transgenen EP2-Mäusen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Überexpression des EP2-Rezeptors und einer erhöhten Zahl, Progressivität und Vaskularisierung von Hauttumoren festgestellt werden [77]. PGE2 beeinflusst auch das Immunsystem. CD4+- und CD25+-Zellen spielen hierbei im Zuge der sog. Selbsttoleranz eine zentrale Rolle. Eine gesteigerte Aktivität dieser Zellen, bedingt durch eine Überexpression von PGE2 in Tumorgeweben, geht mit der Steigerung der Tumorgenese einher. Hierbei scheinen der EP4- und der EP2-Rezeptor eine wichtige Rolle zu spielen [68]. Weiterhin induziert PGE2 einen CA²⁺-Einstrom durch die Steigerung des cGMP-Gehalts der Zelle [47]. An Leberkarzinomzellen konnte auch ein Einfluss auf die Zellmigration von PGE2 nachgewiesen werden. Die Steigerung der Migration und Adhäsion von HCC-Zellen basiert auf der Änderung des Integrinstoffwechsels durch PGE2 [45]. Die PGE2-Expression und COX2-Aktivität ist mit tumorbedingter Kachexie, maligne, humorale Hyperkalziämie (HHM) und Tumorangiogenese verknüpft [40, 71, 78, 79, 82]. Es konnte gezeigt werden, dass in Tumoren die PGE2-Sekretion erhöht ist und der Prozess der Karzino-

genese dadurch verstärkt wird. Jedoch kann auch eine erhöhte PGE₂-Sekretion zur Entstehung von Malignomen führen. Dies konnte unter anderem bei der Entstehung eines HCV-induzierten Leberzellkarzinoms beobachtet werden [83]. Aufgrund der wichtigen Rolle, die COX2 und PGE₂ in der Kanzerogenese spielen, eröffnen sich mehrere Ansätze in puncto Diagnostik und Therapie.

1.8. PGE₂ – Herkunft und Funktion

PGE₂ ist das wichtigste Prostaglandin und zählt zu der Gruppe der Eikosanoide. Es wird mit Hilfe der Cyclooxygenase I und II aus Arachidonat synthetisiert, welches aus arachidonsäurehaltigen Membranphospholipiden abgespalten wird. Durch die COX wird aus Arachidonat zunächst PGH₂ hergestellt. Aus diesem „Ur-Prostaglandin“ wird durch PGE-Synthetase PGE₂ synthetisiert:

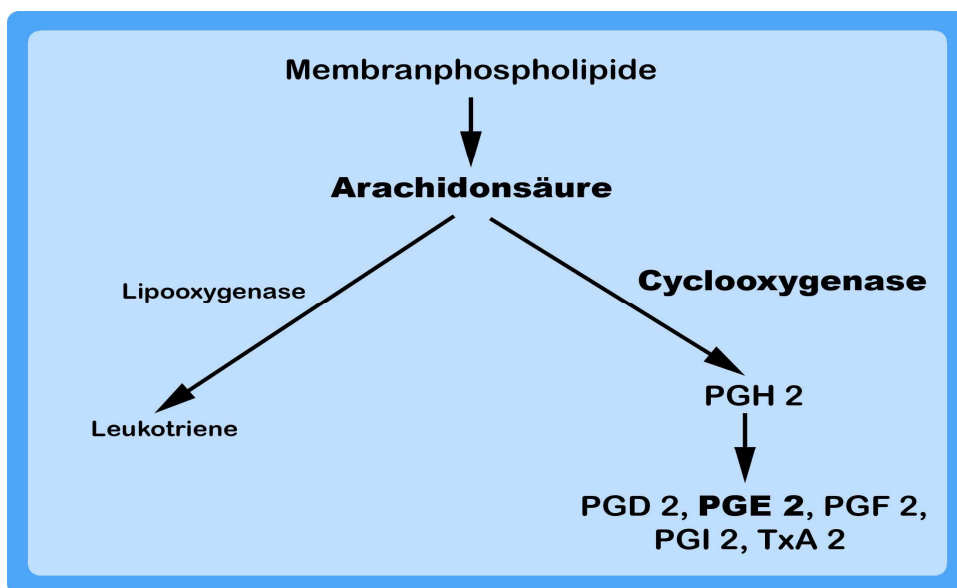


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Arachidonsäurestoffwechsels und PGE₂-Synthese

Prostaglandine besitzen hormonähnliche Wirkung und werden unter anderem den Gewebshormonen zugeordnet. Sämtliche Rezeptoren sind membranständig und an ein G-Protein gekoppelt. Die Rezeptoren für PGE₂ sind die EP-Rezeptoren, von denen vier Subtypen bekannt sind. Die Rezeptoren haben unterschiedliche Wirkungen, so steigert der EP₁-Rezeptor den cAMP-Spiegel, wohingegen der EP₂-Rezeptor über eine IP₃-Kaskade seine Wirkung entfaltet. PGE₂ kann jedoch auch über IP- und DP-Rezeptoren wirken. PGE₂ ist ein Entzündungsmediator und bewirkt eine Broncho- und Vasodilatation. Weiterhin

führt es durch Erhöhung des cAMP-Spiegels zu einer Muskelrelaxierung. Im Magen ist PGE₂ für eine Hemmung der CL-Sekretion sowie eine Steigerung der Schleimproduktion verantwortlich. Es hat hier demnach eine Schutzfunktion. In der Niere steigert PGE₂ den renalen Blutfluss und erhöht die Natrium- und Wasserausscheidung. Überdies hat PGE₂ nach Insulin die stärkste antilipolytische Wirkung.

COX kommt in zwei Isoformen im menschlichen Körper vor, der COX1 und COX2. COX kommt nahezu in allen Zellen vor, wird dort konstitutiv exprimiert und ist ständig aktiv. Besonders wichtig ist COX1 im Gastrointestinaltrakt und in der Niere. COX2 wird vor allem durch Endotoxine, Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert und kommt nur in wenigen Zellen, hauptsächlich Leukozyten und Makrophagen, vor. COX2 spielt durch die Produktion von Prostaglandinen bei der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle und ist für Schmerz und Fieber verantwortlich [19, 38, 39].

1.9. PGE₂-Serumlevel als diagnostischer Parameter? - Fragestellung

Es konnte schon früher gezeigt werden, dass das PGE₂-Serumlevel in Tumor tragenden Mäusen [78] genauso wie in Patienten mit soliden Tumoren ansteigt [74]. Dabei trat unter anderem eine durch den tumorbedingten erhöhten PGE₂-Spiegel induzierte Hyperkalzämie auf [79]. Malachi et al. konnten bei 78 Patientinnen mit benignen und malignen Mammakarzinomen einen erhöhten PGE₂-Plasmaspiegel messen. Zwar konnten zwei Gruppen mit verschiedenen hohen Plasmaspiegeln gebildet werden, jedoch konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Unterschieden der Plasmaspiegel und dem klinischen Bild, der histologischen Klassifizierung und der Überlebensrate festgestellt werden [41]. Alles in allem konnten bis dahin keine Beweise für eine klinische Relevanz des erhöhten PGE₂-Plasmaspiegels bei Tumorpatienten erbracht werden. COX2-Überexpression prognostiziert jedoch eine kürzere Überlebenszeit bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. Ebenso korreliert das PGE₂-Level mit der Vaskularisierung des Tumors und der VEGF-Expression und steigert überdies die Zellmotilität und Invasivität [70]. Folglich kamen wir zu der Annahme, dass

PGE2 streng für die Aggressivität und, speziell bei Kopf-Hals-Tumoren des Frühstadiums, zur Förderung von Invasivität und Angiogenese erforderlich ist. Die strenge Korrelation zwischen PGE2 und Tumorprogression könnte eine Möglichkeit der Diagnostik im Sinne eines Screeningverfahrens darstellen. Die vorliegende Studie dient dem Nachweis der Tauglichkeit von PGE2 als Tumormarker zur Therapieverlaufskontrolle und frühzeitiger Rezidiv-erkennung.

1.10. Studiendesign

Wir analysierten das PGE2-Serumlevel von 100 Patienten [Tab.4] mit Kopf-Hals-Tumoren verschiedener Stadien vor und ein Jahr nach Therapie und verglichen die Resultate mit dem Serumlevel von 40 gesunden Spendern.

Die Werte der Analyse wurden zusätzlich mit den Sekretionsprofilen von acht verschiedenen Plattenepithelkarzinomen verglichen.

T-Stadium	Patientenzahl
1	25
2	25
3	25
4	25

Tumorstadium (UICC)	Patientenzahl
I	28
II	30
III	33
IV	9

Tabelle 3: Verteilung der Patienten auf die Versuchsgruppen anhand des T-Stadiums sowie Tumorstadiums nach UICC

2. Material und Methode

2.1. Materialien

2.1.1. Laborgeräte

Gerät	Hersteller
MR5000/MR7000 Plattenlesegerät	DPC Biermann
Sterile Werkbank Modell: 50724/1	Nunc GmbH
CO2 - Brutschrank „Binder“ Gerätetyp CB 150 Artikelnummer: 9140-0001	Binder GmbH
Vakuum-Gerät VTR 5036	Heraeus
Pipetierhilfe: 8-Kanal-Pipette 30 – 300µl Eppendorf „Research“	Eppendorf

2.1.2. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Indomethacin, 5g, Best.Nr.: 57413	Fluka
2 N HCl, Best.Nr.: A 2533.1000	AppliChem
Ethanol 100 % und 15 % Best.Nr.: 1.00983.1011	Merck
n-Hexan, Best.Nr.: A 1620.1000	AppliChem
Aquadest	Deltaselect
Ethylacetat , Best.Nr.: A 0859.1000	AppliChem
Prostaglandin E 2-Kit (PGE 2) Best.Nr.: DE 2100	R&D System

2.1.3. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
SEP Columns 200 mg Y – 1000.0050	Bachem
Greiner-Röhrchen 15 ml, Kat. Nr.: 188271	Greiner bio-one
Greiner-Cryoröhrchen, 1,5 ml	Greiner bio-one
pH-Fix Indikatorstäbchen (0 – 14) FB 33003	Fischerbrand

2.1.3. Medium

Als Medium wurde für die Tumorzellkulturen „Complete Medium for Tumor Cells-Quantum 263“ (PAA-Laboratorys, Best.-Nr.: U15 - 815) verwendet. Complete Medium for Epithelial Cells-Quantum 263 (PAA-Laboratorys, Best.-Nr.: U15 - 818) diente als Medium der Fibroblastenkultur.

2.2. Methoden

2.2.1. Humanes Serum

2.2.1.1. Patientengut und Kontrollen (Serum gesunder Probanden)

100 Patienten mit diagnostizierten Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich wurden um die Erlaubnis gefragt, Blutproben vor und ein Jahr nach Therapie des Tumors entnehmen zu lassen. So wurden jeweils 10 ml Serum eines jeden Patienten zum entsprechenden Zeitpunkt gesammelt. Dabei wurden je 25 Patienten eines jeden T-Stadiums nach UICC-Klassifikation ausgewählt. Weiterhin wurden 40 gesunde Probanden mit verschiedenen Risikoprofilen (18 Raucher und 22 Nichtraucher) in verschiedenem Alter (21-59) nach dem Einverständnis für die Teilnahme an der Studie gefragt. Auch hier wurden 10 ml eines jeden Spenders entnommen.

2.2.1.2. PGE2-Messung

2.2.1.2.1. Probenvorbereitung

Zur Bestimmung des PGE2-Gehalts mittels ELISA mussten die Proben zunächst durch Applikation verschiedener Reagenzien vorbereitet werden.

Den Serumproben wurde der Prostaglandinsynthetaseinhibitor Indomethacin in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt. Indomethacin ist ein Essigsäurederivat mit stark hemmender Wirkung auf COX1 und COX2. Danach wurden je 100 µl der Proben mit 900 µl ED1-Puffer 10-fach verdünnt. Nach Ansäuerung mit 2 mol (50µl) HCL auf pH 3,5 (Kontrolle mit pH-Fix Indikatorstäbchen; Fischerbrand) erfolgte eine 15-minütige Inkubation der Proben bei 2-8° Celsius. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 150.000 rpm zentrifugiert, um entstandene Präzipitate zu entfernen. 1 ml der Probe wurde abpipettiert und der Umkehrphasenchromatographie zugeführt.

2.2.1.2.2. Umkehrphasenchromatographie

Zur Umkehrphasenchromatographie verwendeten wir eine 200-mg-C18-Säule der Firma Bachem. Die Umkehrphasensäule wurde zunächst mit 1 ml 100 %igem Ethanol und 1 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Danach wurde 1 ml der Probe in die Säule gegeben und mit einer Flussrate von 5 ml/min durchlaufen gelassen. Die Säule wurde erneut mit 1 ml deionisiertem Eiswasser, 1 ml Ethanol und 1 ml Hexan gewaschen. Danach erfolgte die Elution des PGE2 mit 1 ml Ethylacetat. Anschließend wurde die eluierte Probe über Nacht im Vakuum getrocknet. Durch Zentrifugieren der Säule während des Auswaschvorgangs mit Ethylacetat wurde eine Ansammlung des PGE2 am Boden des Röhrchens nach Trocknung erzielt. Zur weiteren Verarbeitung wurde der Bodensatz in 250 µl ED1-Puffer durch Rütteln mit dem Vortex wieder gelöst.

2.2.1.2.3. PGE2 High Sensitivity ELISA

Zur Messung der PGE2-Konzentration wurde das *PGE2 High Sensitivity ELISA Kit* der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Es handelt sich hier um einen kompetitiven Sandwich-ELISA. Das PGE2 der Proben konkurriert mit einer festgelegten Menge an mit einer alkalischen Phosphatase markierten PGE um Bindungsplätze von monoklonalen Mausantikörpern. Die entstandenen Präzipitate binden nun an einen auf den Mikrotiterplatten fixierten Anti-Maus-Antikörper. Nach Waschen und Entfernen des ungebundenen Substrats wird die Konzentration des gebundenen markierten PGE2 durch eine enzymatische Reaktion der Phosphatase mit einem entsprechenden Substrat farblich sichtbar gemacht. Die Intensität der Farbe ist somit umgekehrt proportional zur PGE2-Konzentration der Proben.

Zur Kalibrierung wurde zunächst eine PGE2-Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden 980 μL ED1-Puffer in das erste Röhrchen gegeben, in die übrigen sieben Röhrchen je 500 μL . Danach wurden 20 μL der 50.000-pg/ml-Stammlösung in das erste Röhrchen pipettiert. Abb. 2 zeigt das weitere Pipetierschema und die Konzentrationen der Verdünnungsreihe.

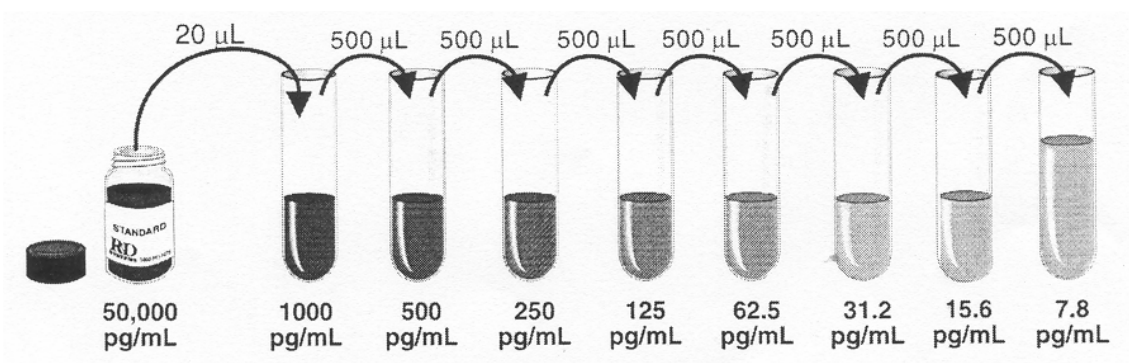


Abbildung 2: Verdünnungsreihe zur Herstellung eines Eichstandards [PGE2 High Sensitivity ELISA Kit, R&D System]

Die vorbereiteten Proben wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten des ELISA-Kits gegeben. Alle Fächer wurden doppelt angelegt. (Abb. 3 zeigt die entsprechende Fächeraufteilung). 150 μL ED1-Puffer wurden in die NSB(Non-Specific-Binding)-Fächer und 100 μL ED1 in die B0(Maximum Binding/Nullstandard)-Fächer gegeben. Danach wurden je 100 μL der Standardlösungen und der vorbereiteten

Proben in das entsprechende Fach gegeben. Die Fächer für TA (Total Activity) und SB (Substrat Blank) wurden freigelassen. In jedes Fach außer TA und SB wurden anschließend 50 µl PGE2-HS-Konjugat gegeben. Danach wurden alle Fächer außer NSB, TA und SB mit 50 µl PGE2-HS-Antikörperlösung beschickt und für 18 h bei 2-8°C inkubiert. Nach abgelaufener Zeit wurde die Flüssigkeit entfernt und die Fächer mit je 400 µl Waschpuffer (Verdünnung 1:10) gewaschen. Der Puffer wurde nach dem Waschvorgang komplett entfernt. Je 5 µl PGE2-HS-Konjugat wurden in die TA-Fächer gegeben. In sämtliche Fächer wurden 200 µl pNPP-Substrat pipettiert. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden 50 µl Stopplösung hinzugegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NSB	S4	S8	1	5	9	13	17	21	25	29	33
B	NSB	S4	S8	1	5	9	13	17	21	25	29	33
C	B0	S5	S9	2	6	10	14	18	22	26	30	34
D	B0	S5	S9	2	6	10	14	18	22	26	30	34
E	S2	S6	TA	3	7	11	15	19	23	27	31	35
F	S2	S6	TA	3	7	11	15	19	23	27	31	35
G	S3	S7	SB	4	8	12	16	20	24	28	32	36
H	S3	S7	SB	4	8	12	16	20	24	28	32	36

Abbildung 3: Verteilungsschema der 96-Well-Mikrotiterplatten

Im Anschluss wurde die optische Dichte mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (MR 5000, DPS Biermann) mit einer Wellenlänge von 410 nm gemessen und die entsprechende PGE2-Konzentration der Proben bestimmt.

2.2.2. Zellkultur

Es wurden Zellkulturen von sieben adhärennten HNO-Plattenepithelkarzinomen und Fibroblasten angelegt.

2.2.2.1. Zelllinien

Nr.	Name	Art	Herkunft	Hersteller
1	Detroit 562	Tumor	Pharynx	Cell lines Service
2	A 431	Tumor	Epidermis	Cell lines Service
3	UM – SCC 10 B	Tumor	Larynx	Dr. Thomas E. Carey, Ph.D., Director, Laboratory of Head and Neck Cancer Biology The University of Michigan USA
4	UM – SCC 33	Tumor	Pharynx	Dr. Thomas E. Carey, Ph.D., Director, Laboratory of Head and Neck Cancer Biology The University of Michigan USA
5	UM – SCC 5	Tumor	Pharynx	Dr. Thomas E. Carey, Ph.D., Director, Laboratory of Head and Neck Cancer Biology The University of Michigan USA
6	UM – SCC 24	Tumor	Larynx	Dr. Thomas E. Carey, Ph.D., Director, Laboratory of Head and Neck Cancer Biology The University of Michigan USA
7	CRL-1624	Tumor	Squamouscell, Tongue	ATCC
8	Fibroblasten 46	Normal	Präputium Kind von neun Jahren	Hautklinik, Universitätskli- nikum, Frankfurt am Main

2.2.2.2. Kultivierung

Zum Anlegen der entsprechenden Zellkulturen wurden nach Entfernen des Mediums aus den Zellkulturflaschen diese mit PBS (Phosphate Buffered Saline, PAA-Laboratorys) gewaschen. Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurden 10 ml Accutase und 30 ml Medium hinzugefügt. Accutase (PAA-Laboratorys) besitzt sowohl proteolytische als auch kollagenolytische Eigenschaften. Nach 5-10 min wurde die Zellsuspension in ein 50-ml-Greiner-Röhrchen gegeben.

Mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Menge von 10.000 Zellen einer jeden Zelllinie bestimmt und mit 100 µl Medium auf eine 96-Well-Platte gegeben. Die Zellkulturen wurden 24 h bei 37° C und 5 % CO₂-Atmosphäre bebrütet.

2.2.2.3. Probenentnahme und PGE₂-Messung

Nach 24, 72, 96 und 120 h wurden je 50 µl Zellkultur-Überstand entnommen und zu 450 µl ED1-Puffer gegeben. Die Probe wurde mit 5 µg Indomethacin (10 µg/ml) versetzt und durch Zugabe von HCL bis pH 3,5 angesäuert. Die pH-Kontrolle erfolgte mit pH-Fix-Indikatorstäbchen (Fischerbrand). Die weitere Bearbeitung und anschließende PGE₂-Bestimmung erfolgte analog zu der Untersuchung und Konzentrationsbestimmung der Serumproben.

2.2.3. Kontrollgruppen

Als Kontrollgruppe diente im Falle der Untersuchung des humanen Serums das Serum der gesunden Probanden. Bei den Zellkulturversuchen dienten normale Zellkultur (Fibroblasten) sowie reines Medium und fetales Kälberserum als Kontrolle. Obendrein erfolgte die Kalibrierung der Messung mittels Standardkurve.

2.2.4. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der SPSS-Software v 9.0 (SPSS, Chicago, Illinois) durchgeführt. Zur Analyse der Daten wurden der Kruskal-Wallis-, der Wilcoxon- und Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Eine Signifikanz wurde bei einem p-Wert unter 0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. PGE2-Serumspiegel bei Kopf-Hals-Tumorpatienten und gesunden Spendern

Zu Beginn der Diagnostik war der PGE2-Serumspiegel bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren signifikant höher als der PGE2-Serumspiegel der gesunden Spender ($p < 0,001$). Ein Jahr nach Behandlung war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Serumspiegel der Patienten und der gesunden Spender festzustellen ($p > 0,56$). Die PGE2-Konzentration lag sogar unter der Konzentration der Kontrollgruppe (Abb. 4).

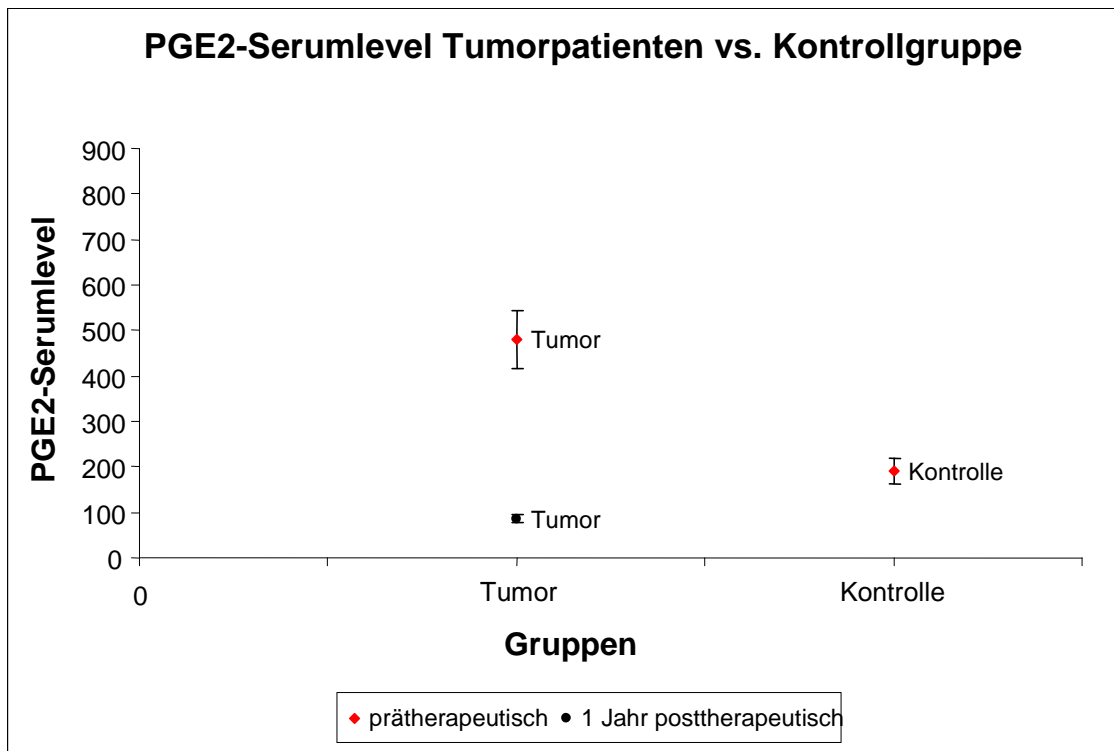


Abbildung 4: Die Grafik zeigt unabhängig vom T-Stadium einen signifikant erhöhten PGE2-Serumspiegel der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen im Vergleich zu den gesunden Spendern ($p < 0,001$). Posttherapeutisch ist kein signifikanter Unterschied zu sehen ($p > 0,56$).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Gesamtmenge des Serum-PGE2 von T1-Stadien bis T4-Stadien abnahm. Zu Beginn der Diagnostik war der PGE2-Spiegel von Patienten mit T1-Tumoren signifikant höher als bei Patienten mit T2-, T3-, oder T4-Tumoren. Ebenso war der PGE2-Serumspiegel von Patienten mit T2- und T3-Tumoren signifikant höher als bei Patienten mit T4-Tumoren und der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Der PGE2-Serumspiegel von Patienten mit T4-Tumoren unterschied sich jedoch nicht signifikant im Vergleich zu dem der Kontrollgruppe ($p < 0,34$). Ein Jahr postoperativ konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den PGE2-Serumspiegeln der verschiedenen T-Stadien des prätherapeutischen Befunds festgestellt werden (Abb. 5).

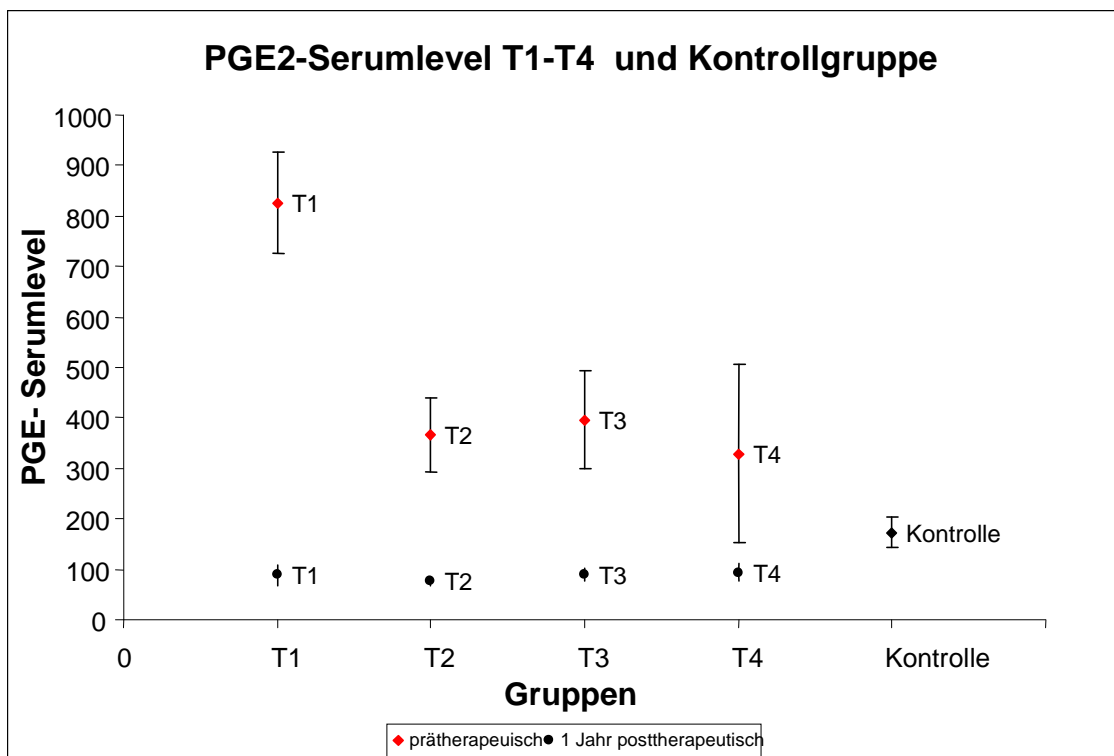


Abbildung 5: Patienten mit T1-Tumoren zeigen einen signifikant erhöhten Serumspiegel im Vergleich zu T2-, T3- und T4-Befunden ($p < 0,001$). Die Gruppe der T4-Patienten unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,34$).

Eine Gruppeneinteilung nach UICC-Stadien zeigt annähernd gleiche Ergebnisse (Abb. 6). Es zeigte sich eine signifikant höhere PGE2-Konzentration bei Klasse-I-Tumoren im Vergleich zu Klasse II-, III- oder IV-Befunden. Das Serumlevel von Patienten mit Stadium-IV-Tumoren zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollgruppen ($p > 0,06$).

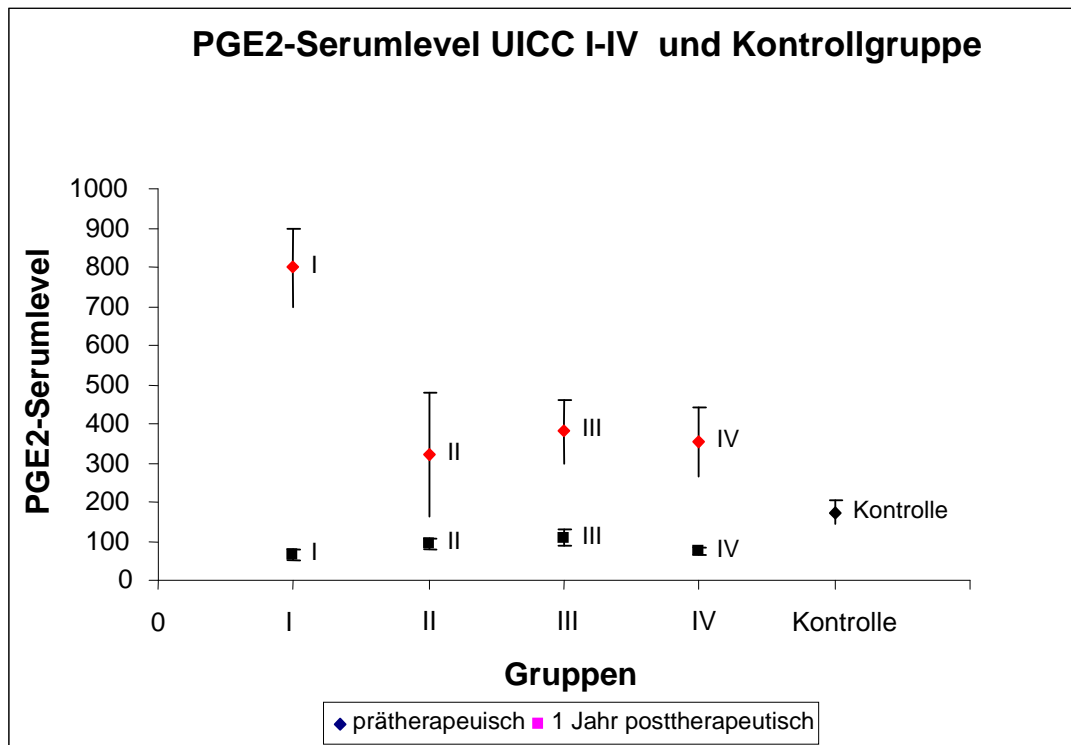


Abbildung 6: Unterteilung in UICC-Stadien: Patienten mit Tumoren des Stadiums I zeigen einen signifikant erhöhten Serumspiegel im Vergleich zu II-, III- und IV-Befunden ($p < 0,003$).

3.2. PGE2-Sekretion von Plattenepithelkarzinomzelllinien

10.000 Zellen von jeder Zelllinie wurden in einen mit Medium gefüllten Glaskolben gegeben. Nach 24, 72, 96 und 120 Stunden wurde das Medium gewechselt und der PGE2-Gehalt des Überstandes analysiert. Fibroblasten, reines Medium und fetales Kälberserum dienten als Kontrollgruppen. Dabei zeigte sich, dass zu Beginn der Proliferation sowie während der exponentiellen Wachstumsphase (nach 24 und 72 Stunden) die PGE2-Sekretion am größten war. Am Ende (nach 96 und 120 Stunden), sobald sich ein lückenloser Zellrasen gebildet hatte, war die PGE2-Sekretion am geringsten (Abb. 7).

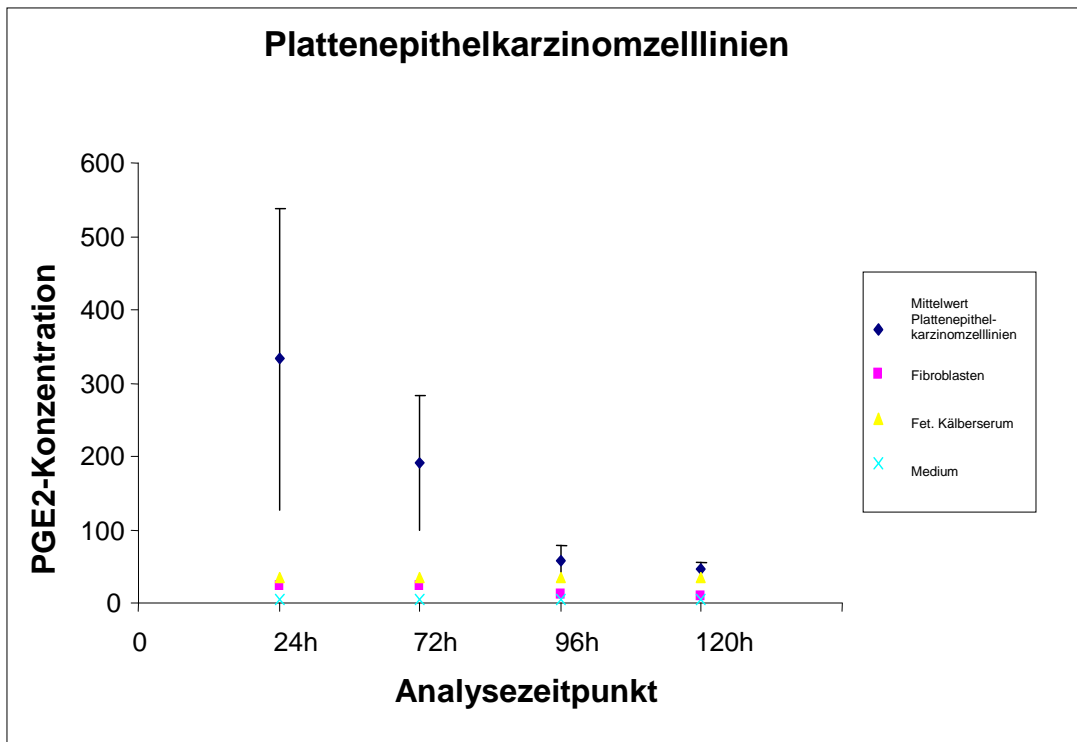


Abbildung 7: Die Grafik stellt die PGE2-Sekretion der Plattenepithelkarzinomzelllinien als Mittelwert in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Bestimmung dar. Die Sekretion nimmt von 24-120 h signifikant ab ($p < 0,001$).

Eine Einzeldarstellung der Plattenepithelkarzinomzelllinien zeigt Abb. 8.

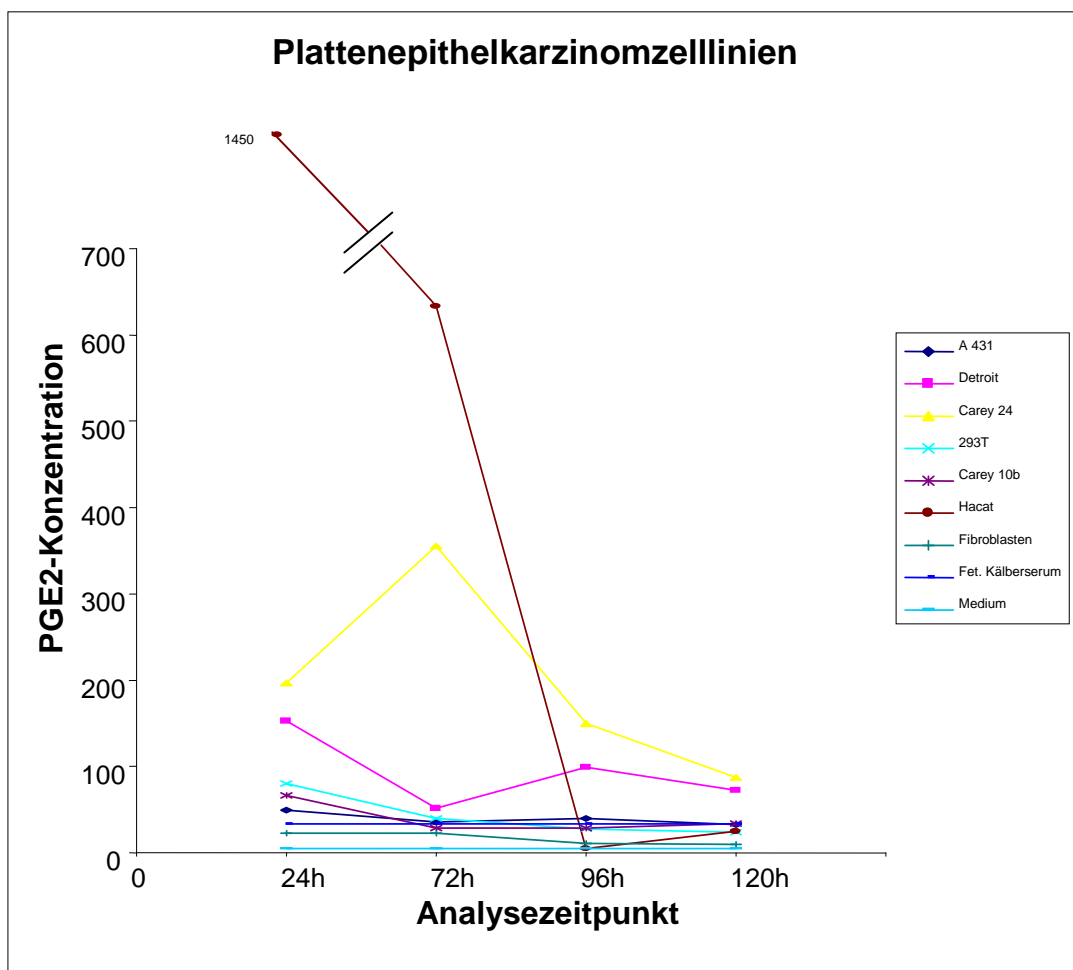


Abbildung 8: Die Grafik stellt die PGE2-Sekretion der Plattenepithelkarzinomzelllinien als Einzelauflistung in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Bestimmung dar.

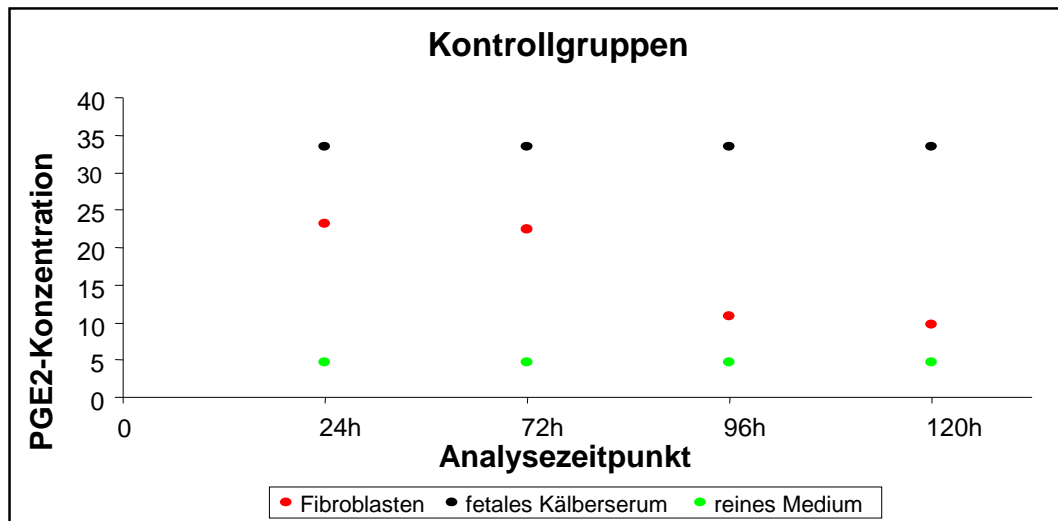


Abbildung 9: Aufgrund der besseren Darstellung durch einen anderen Maßstab wurden die Kontrollgruppen nochmals einzeln grafisch dargestellt. Das Sekretionsprofil der Fibroblasten zeigt eine signifikant niedrigere PGE2-Sekretion als die Karzinomzellkulturen ($p < 0,001$). Weiterhin kann eine nur schwache Abnahme der Sekretion im Verlauf der Entnahmezeitpunkte beobachtet werden. Das reine Medium und das fetale Kälberserum weisen keine Schwankungen auf.

Im Unterschied zu den Plattenepithelkarzinomzelllinien zeigt die Kontrollgruppe der Fibroblasten eine signifikant schwächere Sekretion sowie Sekretionsabnahme im Verlauf der vier Entnahmezeitpunkte ($p < 0,001$). Die weiteren Kontrollgruppen, fetales Kälberserum und reines Medium, zeigten erwartungsgemäß keinerlei Schwankungen der PGE2-Konzentration (Abb. 9).

4. Diskussion

Tumore im Kopf-Hals-Bereich stellen einen erheblichen Teil der Krebserkrankungen in Deutschland dar. Trotz großer Anstrengung, die bereits etablierten und bewährten Therapieprotokolle zu verbessern, sind die Überlebensraten nach erfolgter Therapie nicht zufriedenstellend. Eine genauere Betrachtung der statistischen Daten zeigt, dass eine späte Diagnose mit entsprechend fortgeschrittenem Tumorstadium eine wesentlich geringere Überlebensrate zur Folge hat als bei frühem Diagnosezeitpunkt. Dies zeigt sich insbesondere bei statistischer Betrachtung von Tumoren in topographisch bedingt schlecht einsehbaren Regionen, wie zum Beispiel Hypopharynx. Solche Tumore werden meist erst durch funktionelle Störungen entdeckt. Ein Tumormarker, der ermöglichen würde, Tumoren im Kopf-Hals-Bereich durch Screening frühzeitig zu entdecken, würde die Therapieprognosen deutlich verbessern.

4.1. Ergebnisse dieser Arbeit und deren Bedeutung

Der starke Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von PGE2 und Kanzerogenese bietet nicht nur Möglichkeiten neuer Therapien, sondern legt die mögliche Verwendung von PGE2 als Tumormarker nahe. Die Untersuchung des PGE2-Serumlevels von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zeigte eine signifikant höhere Konzentration vor allem im Frühstadium (T1) der Karzinogenese, während bei fortgeschrittenen Tumoren die Sekretion deutlich geringer war und bei T4-Karzinomen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Serumlevel gesunder Spender aufwies. Eine Unterteilung der Versuchspersonen in Gruppen nach UICC-Stadien zeigt den gleichen signifikanten Abfall der PGE2-Konzentration von Klasse-I-Befunden im Vergleich zu Klasse II-, III- und IV-Tumoren. Die Ergebnisse der Zellkulturuntersuchungen bestätigen den umgekehrten Zusammenhang zwischen PGE2-Sekretion und Tumorgröße. Auch hier findet die massivste PGE2-Sekretion am Anfang des Wachstums der Zellkolonien statt. Dies zeigt, dass die Überproduktion von PGE2 in der frühen Wachstumsphase von Malignomen eine zentrale Rolle zu spielen scheint. Vor allem die Förderung der Neoangiogenese, Apoptoseunterdrückung und Verstärkung der Proliferationsrate durch PGE2 stellen ausschlaggebende Faktoren für die Invasivität und Aggressivität des Wachs-

tums dar. Die Messung des PGE₂-Spiegels ein Jahr posttherapeutisch ergab keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe. Die Serumkonzentration sank sogar unter das Niveau der Kontrollgruppe. Daraus erschließt sich die Hypothese, dass ein derartiger Anstieg der PGE₂-Serumkonzentration von der Präsenz eines Tumors abhängig ist und PGE₂ sich als Tumormarker von Karzinomen im Frühstadien eignen könnte. Betrachtet man PGE₂ als generellen Tumormarker, so ist dies jedoch kritisch zu beurteilen. Interindividuelle, physiologische Schwankungen sowie erhöhte PGE₂-Serumkonzentration durch Entzündungen schränken die Verwendung von PGE₂ als Screeningparameter allgemein ein. PGE₂ könnte sich jedoch als Screeningparameter in der posttherapeutischen Nachsorge von Tumorpatienten eignen. Vor allem die signifikante Reduktion der PGE₂-Konzentration nach erfolgter Therapie könnte das Festlegen patientenbezogener Normalbereiche des PGE₂-Serumlevels ermöglichen, welche als Basis für die Verwendung dieses Parameters zur Verlaufskontrolle in der Nachsorge dient.

4.2. Zur Herkunft des PGE₂ im Serum

Eine genaue Bestimmung der Herkunft des im Serum gemessenen PGE₂ stellt sich als äußerst schwierig dar. Frühere Studien von Snyderman et al. konnten entgegen unseren Ergebnissen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen PGE₂-Sekretion und dem Tumorstadium erkennen. Auch wurde ein Anstieg der PGE₂-Konzentration in Verbindung mit zweijähriger Rezidivfreiheit festgestellt. Daraus wurde unter anderem auch geschlussfolgert, dass der Anstieg der Konzentration des PGE₂ mehr durch eine Immunantwort als durch Sekretion des Tumorgewebes bedingt sei [46, 64, 65, 72, 73]. Im Gegensatz zu unseren Studien wurde von Snyderman et al. jedoch nicht die Serumkonzentration, sondern die Gewebekonzentration bestimmt. Da bedingt durch die komplexen Wechselwirkungen zwischen lokaler Immunreaktion und dem Stoffwechsel des Tumors andere Bedingungen bestehen, sind diese Ergebnisse nicht mit den unseren vergleichbar. Weiterhin wäre die Bestimmung der Gewebekonzentration für die Diagnostik im Sinne eines Screenings wenig von Bedeutung, da sie mit der Entnahme einer Gewebeprobe einhergeht und auch die Bestimmung einer sinnvollen Entnahmestelle bei Patienten ohne Restbefund in der Nachsorge nur unzureichend möglich ist. Unsere Untersuchungen der Zellkulturen unter-

mauern obendrein den inversen Zusammenhang zwischen der Tumorgröße und der PGE2-Sekretion. Die Bedingungen in-vitro können zwar nicht den komplizierten Vorgängen und Wechselspielen im lebenden Organismus gerecht werden; die Versuche sind jedoch auch eine Bestätigung für Tumorzelle als Ursprung des im Serum gemessenen PGE2. Schuon et al. [63] konnten ebenfalls bei Messungen des intrazellulären PGE2-Gehalts von Tumorzellen und Zellen des umgebenden Gewebes eine von den Tumorzellen ausgehende Bildung von PGE2 bestätigen. Weiterhin wurde festgestellt, dass das PGE2 der Tumorzellen die Zellen des umgebenden Gewebes ihrerseits zur Produktion von PGE2 stimulieren. Auch dies erhärtet die These vom Tumorgewebe als Quelle des erhöhten PGE2-Serumspiegels und würde die Abhängigkeit einer hohen PGE2-Serumkonzentration vom Vorhandensein von Tumormassen bestätigen. Eine vergleichende Studie zwischen PGE2-Serumkonzentration und PGE2-Gewebekonzentration bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wäre hier sinnvoll.

4.3. Verwendung der PGE2-Serumkonzentration als diagnostischer Parameter

Im Falle eines Rezidivs nach erfolgreicher Therapie ist insbesondere bei modernen organerhaltenden Therapieansätzen erneut der Zeitpunkt der Entdeckung im Rahmen einer regelmäßigen Nachkontrolle von herausragender Bedeutung. Durch Screening mit Hilfe der Bestimmung der PGE2-Konzentration könnten Rezidive durch den erneuten Anstieg des PGE2-Serumlevels über einen zuvor festgelegten individuellen Normalbereich frühzeitig erkannt und mit entsprechenden Interventionen behandelt werden. Die signifikant niedrigere PGE2-Konzentration nach erfolgreicher Therapie legt weiterhin nahe, die PGE2-Serumkonzentration möglicherweise zur Verlaufskontrolle während einer Therapie und als Parameter für deren Wirksamkeit heranziehen zu können. Zur Verifizierung des Nutzens der PGE2-Serumkonzentration als diagnostischer Marker in der Tumorthherapie und Nachsorge werden daher weitere klinische Studien benötigt. Zum einen ist es notwendig, die PGE2-Serumkonzentration sowohl während eines Therapieverlaufs zu analysieren als auch Daten über einen längeren postoperativen Zeitraum zu sammeln. Gerade die Bestimmung der Serumkonzentration von Patienten mit Rezidivdiagnosen wäre wichtig, um die zeitliche Korrelation zwischen einer Diagnosemöglichkeit durch Anstieg des

PGE2-Serumspiegels und der Diagnose mittels konventioneller Inspektion durch visuelle und bildgebende Verfahren zu untersuchen. Möglicherweise könnten Tumorrezidive mittels PGE2-Bestimmung in noch früheren Stadien zu erkennen sein als mit den derzeit aktuellen Befundungsprotokollen.

Auch wäre es wichtig, das Probandengut auf Patienten, bei denen nur ein Teilerfolg oder Misserfolg erreicht wurde, sowie auf unterschiedliche Therapieprotokolle auszudehnen, um somit das Gesamtverständnis für die Veränderungen der PGE2-Serumkonzentration bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zu verbessern.

4.4. Bedeutung von PGE2 in der Prävention von Tumorerkrankungen

Wie schon frühere Studien zeigten, kann nicht nur ein vorhandener Tumor zur Überexpression von PGE2 führen, sondern eine Überexpression von PGE2 auch zum Entstehen von Malignomen beitragen. Eine genetisch bedingt hohe PGE2-Expression könnte daher ein erhöhtes Risiko darstellen, an Tumoren zu erkranken. Dies sollte zunächst mittels statistischer Studien, welche die Anzahl der Krebserkrankung selektierter Gruppen mit dem erwähnten Risikofaktor ermitteln, untersucht werden. Im Falle einer Bestätigung dieser Hypothese könnte das PGE2-Serumlevel daher auch als einfach zu erhebender Screeningparameter zum Identifizieren von Patienten mit einem derartigen Risikoprofil und deren präventiver Überwachung dienen. Bei der Beobachtung solcher Risikopatienten über einen längeren Zeitraum könnte ein massiver Anstieg der PGE2-Konzentration einen Hinweis auf einen kanzerogenen Prozess darstellen und weitere diagnostische Maßnahmen einleiten.

4.5. Bedeutung von PGE2 in der Tumorthherapie

Unabhängig von der Bedeutung des PGE2-Serumlevels in der Diagnostik bestätigen unsere Ergebnisse die Bedeutung der COX-Hemmung in der Tumorthherapie und Prävention. Die gesamte Kaskade der PGE2-Expression bis hin zu den verschiedenen proneoplastischen Wirkmechanismen bietet somit Ansatzpunkte zu neuen Therapiemöglichkeiten. Das Wissen um die Bedeutung von PGE2 in der Kanzerogenese legt weiterhin prophylaktische Maßnahmen, vor

allem durch Hemmung der COX, nahe. Nicht zuletzt die hohe und kostengünstige Verfügbarkeit von COX-Hemmern machen derartige Protokolle äußerst interessant. Bezugnehmend auf das PGE₂-Serumlevel als diagnostischer Parameter könnte dies wiederum zum Selektieren geeigneter Empfänger für solche Therapien dienen.

5. Zusammenfassung

Malignome im Kopf-Hals-Bereich stellen einen beträchtlichen Teil der Krebsneuerkrankungen pro Jahr, insbesondere bei Männern, dar. Die mittlere Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt 46-60 %. Die Therapieprognose ist dabei stark vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und dem entsprechendem T-Stadium abhängig. Ein erhöhter PGE2-Serumspiegel konnte bereits sowohl im Tumortiermodell als auch an betroffenen Patienten mit Malignomen nachgewiesen werden. Aufgrund der vielfältigen Einflussmöglichkeiten von PGE2 auf die Kanzerogenese kamen wir zu der Hypothese, dass PGE2 für ein aggressives und invasives Tumorwachstum obligat ist. Wir untersuchten das PGE2-Serumlevel von 100 Patienten mit Kopf-Hals-Malignomen und 40 gesunden Spendern. Zusätzlich verglichen wird die Ergebnisse mit den PGE2-Sekretionsprofilen von sieben verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien und Fibroblasten. Unsere Untersuchungen zeigten einen statistisch signifikanten, inversen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und PGE2-Serumspiegel. Auch die Zellkulturanalyse ergab einen inversen Zusammenhang zwischen PGE2-Sekretion und Proliferationsphase. Weiterhin konnten wir eine signifikante Reduktion des Serumlevels nach erfolgter Therapie beobachten.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass ein erhöhter PGE2-Serumspiegel einen Indikator für Kopf-Hals-Tumoren im Frühstadium darstellt. PGE2 könnte sich somit als Tumormarker vor allem im Rahmen posttherapeutischer Nachsorge und Rezidivdiagnostik eignen.

6. Abkürzungsverzeichnis

β-HCG	humanes Choriongonadotropin β
ATP	Adenosintriphosphat
B0	Nullstandard
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD4+	cluster of differentiation 4+
CD25+	cluster of differentiation
CEA	karzinomembryonales Antigen
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CYFRA 21.1	Cytokeratin-19-Fragment
DP	Prostaglandin-D-Rezeptor
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immuno adsorbent assay
EP	Prostaglandin-E2-Rezeptor
Erk	extracellular signal regulated kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fas	Fas-Protein
FGF	fibroblast growth factor
HCC	hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis-C-Virus
HER	human epidermal growth factor receptor
HMM	humorale Hyperkalzämie
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HPV	humanes Papillomavirus
IP	Prostaglandin-I-Rezeptor
IP3	Inositoltriphosphat
Ku70	Untereinheit der DNA-Polymerase
Ku80	Untereinheit der DNA-Polymerase
MAB	monoclonal antibody
MAP	mitogene activating protein
NFκB	nuclear factor κB

NR4A2	nuclear receptor 4A2
NSAID	nonsteroidal antiinflammatory drug
NSB	non specific binding
PGD2	Prostaglandin D 2
PGE2	Prostaglandin E 2
PGF2	Prostaglandin F 2
PGH2	Prostaglandin H2
PGI2	Prostaglandin I 2
PKC β	Proteinkinase C β
PPAR	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor
PSA	prostataspezifisches Antigen
RAS	(rat-sarcoma) = Protoonkogen
RKI	Robert-Koch-Institut
SCC	squamosacellcarcinoma
TA	total activity
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TxA2	Thromboxan 2
VEGF	vascular endothelial growth factor
UICC	Union International Contre le Cancer

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Arachidonsäurestoffwechsels und PGE2-Synthese.....	17
Abbildung 2: Verdünnungsreihe zur Herstellung eines Eichstandards [PGE2 High Sensitivity ELISA Kit, R&D System].....	19
Abbildung 3: Verteilungsschema der 96-Well-Mikrotiterplatten	20
Abbildung 4: Die Grafik zeigt unabhängig vom T-Stadium einen signifikant erhöhten PGE2-Serumspiegel der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen im Vergleich zu den gesunden Spendern ($p < 0,001$). Posttherapeutisch ist kein signifikanter Unterschied zu sehen ($p > 0,56$).	24
Abbildung 5: Patienten mit T1-Tumoren zeigen einen signifikant erhöhten Serumspiegel im Vergleich zu T2-, T3- und T4-Befunden ($p < 0,001$). Die Gruppe der T4-Patienten unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,34$).....	25
Abbildung 6: Unterteilung in UICC-Stadien: Patienten mit Tumoren des Stadiums I zeigen einen signifikant erhöhten Serumspiegel im Vergleich zu II-, III- und IV-Befunden ($p < 0,003$).....	26
Abbildung 7: Die Grafik stellt die PGE2-Sekretion der Plattenepithelkarzinomzelllinien als Mittelwert in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Bestimmung dar. Die Sekretion nimmt von 24-120 h signifikant ab ($p < 0,001$).....	27
Abbildung 8: Die Grafik stellt die PGE2-Sekretion der Plattenepithelkarzinomzelllinien als Einzelauflistung in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Bestimmung dar.....	28
Abbildung 9: Aufgrund der besseren Darstellung durch einen anderen Maßstab wurden die Kontrollgruppen nochmals einzeln grafisch dargestellt. Das Sekretionsprofil der Fibroblasten zeigt eine signifikant niedrigere PGE2-Sekretion als die Karzinomzellkulturen ($p < 0,001$). Weiterhin kann eine nur schwache Abnahme der Sekretion im Verlauf der Entnahmezeitpunkte beobachtet werden. Das reine Medium und das fetale Kälberserum weisen keine Schwankungen auf.	29

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorregister München (TRM) Jahresbericht seit 1998 [74] und SEER-Daten der USA, bevölkerungsbezogene Neuerkrankungs- und Survivaldaten der USA bis 1996 [63] (rechte Spalte)	1
Tabelle 2: Tumorregister München, Jahresbericht seit 1998 [80] pT-Verteilung und Anteil der lymphknotenpositiven Primärbefunde abhängig von den pT-Stadien sowie insgesamt].....	2
Tabelle 3: Verteilung der Patienten auf die Versuchsgruppen anhand des T-Stadiums sowie Tumorstadiums nach UICC	15

9. Literaturverzeichnis

1. Arens C; Frühdiagnostik des Larynxkarzinoms; *Laryngo-Rhino-Otol* 2004, Vol. 83: 768-770.
2. Backlund MG, Mann JR, Dubois RN; Mechanisms for the prevention of gastrointestinal cancer: the role of prostaglandin E2; *Oncology*. 2005; Vol. 69 Suppl 1: 28-32 Epub 2005 Sep 19.
3. Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H; Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends; *RKI, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.*
4. Bourhis J, Lefebvre JL, Temam S, Lusinchi A, Janot F, Wibault P, Pignon JP; Larynx preservation: nonsurgical approaches; *Cancer Radiother.* 2004 Nov; Vol. 8.
5. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM; Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis; *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; Vol. 97: 11280-11285.
6. Cohenuram M, Wasif Saif M; Epidermal Growth Faktor Receptor Inhibition Strategies in Pancreatic Cancer: Past, Present and the Future; *Journal of the Pancreas* 2007 Jan 1; Vol. 8.
7. Crile GW; Excision of cancer of the head and neck with a special reference to the plan of dissection based upon one hundred thirty-two operations; *J Amer Med Assn* 1906; Vol. 47: 1780±1786.
8. Dai Y, Wang WH; Non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of gastric cancer; *World J Gastroenterol* 2006 May 14; Vol. 12(18): 2884-2889.
9. Demke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ; Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?; *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001 Jul; Vol. 127(7): 411-7.
10. Dietz A, Weber A, Dollner R, Hildebrand G ; nicht resektable Kopf-Hals Tumoren und deren Therapie; *Laryngo-Rhino-Otol* 2005, Vol. 84: 200-206.
11. Fiebiger W, Wiltschke CH; Übersicht Tumormarker; *Acta Medica Austriaca* 2001 May; Vol. 28(2).

12. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Chao C, Peters G, Lee DJ, Leaf A, Ensley J, Cooper J; Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy for Organ Preservation in Advanced Laryngeal Cancer; *NEJM* 2003 Nov 27; Vol. 349(22): 2091-2098.
13. Goguen LA, Posner MR, Tishler RB, Wirth LJ, Norris CM, Annino DJ, Sullivan CA, Li Y, Haddad RI; Examining the need for neck dissection in the era of chemoradiation therapy for advanced head and neck cancer; *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 May; Vol. 132(5).
14. Guadagnolo BA, Haddad RI, Posner MR, Weeks L, Wirth LJ, Norris CM, Sullivan CA, Goguen L, Busse PM, Tishler R; Organ preservation and treatment toxicity with induction chemotherapy followed by radiation therapy or chemoradiation for advanced laryngeal cancer; *Am J Clin Oncol.* 2005 Aug; Vol. 28(4): 371-8.
15. Haese A, Graefen M, Palisaar J, Huland E, Huland H; Serummarker in der Früherkennung und dem Staging des Prostatakarzinoms; *Der Urologe* Vol. 42(9): 1172-1187.
16. Holla VR, Mann JR, Shi Q, DuBois RN; Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer; *J Biol Chem.* 2006 Feb 3; Vol. 281(5): 2676-82; Epub 2005 Nov 17.
17. Han C, Wu T; Cyclooxygenase-2-derived Prostaglandin E2 Promotes Human Cholangiocarcinoma Cell Growth and Invasion through EP1 Receptor-mediated Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor and Akt; *J. Biol. Chem.* 2005 Jun 24; Vol. 280(25): 24053-24063.
18. Hannun YA; Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress; *Science* 1996; Vol. 274: 1855-1859.
19. Horn F; Eikosanoide; *Horn, Biochemie des Menschen, 2. Auflage, 414-418.*
20. Hung WC, Chang HC; Methanolic extract of adlay seed suppresses COX-2 expression of human lung cancer cells via inhibition of gene transcription; *J Agric Food Chem* 2003; Vol. 51(25): 7333-7.
21. Jayadev S, Hayter HL, Andrieu N, Gamard CJ, Liu B, Balu R, Hayakawa M, Ito F, Hannun YA; Phospholipase A2 is necessary for tumor necrosis factor alpha-induced ceramide generation in L929 cells; *J Biol Chem* 1997; Vol. 272: 17196-17203.

22. Jiang XH, Lam SK, Lin MC, Jiang SH, Kung HF, Slosberg ED, Soh JW, Weinstein IB, Wong BC; Novel target for induction of apoptosis by cyclo-oxygenase-2 inhibitor SC-236 through a protein kinase C-beta(1)-dependent pathway; *Oncogene* 2002 Sep; Vol. 21 (39): 6113-6122.
23. Jiang XH, Wong BC; Cyclooxygenase-2 inhibition and gastric cancer; *Curr Pharm Dez* 2003; Vol. 9: 2281-2288.
24. Kanda N, Watanabe S; Ketoconazole suppresses prostaglandin E(2)-induced cyclooxygenase-2 expression in human epidermoid carcinoma A-431 cells; *J Invest Dermatol* 2002; Vol. 119(1): 174-81.
25. Kawamori T, Uchiya N, Sugimura T, Wakabayashi K; Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration; *Carcinogenesis* 2003 Vol. 24(5): 985±990.
26. Ki Young Chung, Saltz LB; Antibody-Based Therapies for Colorectal Cancer; *The Oncologist* 2005; Vol. 10: 701-709.
27. Kolesnick RN, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z; The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation; *Biochem Cell Biol* 1994; Vol. 72: 471-474.
28. Konturek PC, Konturek SJ, Bielanski W, Kania J, Zuchowicz M, Hartwich A, Rehfeld JF, Hahn EG; Influence of COX-2 inhibition by rofecoxib on serum and tumor progastrin and gastrin levels and expression of PPARgamma and apoptosis-related proteins in gastric cancer patients; *Dig Dis Sci* 2003; Vol. 48: 2005-2017.
29. Krysan K, Reckamp KL, Dalwadi H, Sharma S, Rozengurt E, Dohadwala M, Dubinett SM; Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner; *Cancer Res.* 2005 Jul 15; Vol. 65(14): 6275-81.
30. Lang S, Wollenberg B, Dellian M, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E, Ehrenfeld M, Arnold W, Kastenbauer E, Hölzel D; Klinische und Epidemiologische Daten zu Malignomen im Kopf-Hals-Bereich *Laryngo-Rhino-Otol* 2002; Vol. 81: 499-508.

31. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliwer SA; Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs; *J Biol Chem* 1997; Vol. 272: 3406-3410.
32. Leung WK, Bai AH, Chan VY, Yu J, Chan MW, To KF, Wu JR, Chan KK, Fu YG, Chan FK, Sung JJ; Effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma ligands on growth and gene expression profiles of gastric cancer cells; *Gut* 2004; Vol. 53: 331-338.
33. Levebvre JL; Laryngeal preservation in head and neck cancer: multidisciplinary approach; *Lancet Oncol.* 2006 Sept; Vol. 7.
34. Levebvre JL, Calais G; Larynx preservation, state of the art; *Cancer Radiother.* 2005 Feb; Vol. 9(1): 37-41.
35. Lim JW, Kim H, Kim KH; Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NFκB and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells; *J Biol Chem* 2002; Vol. 277: 46093-46100.
36. Lim JW, Kim H, Kim KH; Nuclear factor kappa B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells; *Lab Invest* 2001; Vol. 81: 349-360.
37. Lindberg R; Distribution of cervical lymph node metastasis from squamous cell carcinoma of the upper respiratory tracts; *Cancer* 1972; Vol. 29: 1446±1449.
38. Löffler G; Stoffwechsel der Lipide; *Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie* 6. Auflage, 441-444.
39. Löffler G; Endokrine Gewebe, Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen; *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* 6. Auflage, 763-783.
40. Maeda Y, Sasaki T, Mochizuki M, Koike M; Esophageal carcinoma with hypercalcemia that appeared to be caused by prostaglandin E2 produced by the tumor cells; *Gan No Rinsho* 1990 Nov; Vol. 36(14): 2445-9.
41. Malachi T, Chaimoff C, Feller N, Halbrecht I; Prostaglandin E2 and cyclic AMP in tumor and plasma of breast cancer patients; *J Cancer Res Clin Oncol.* 1981; 102(1): 71-9.

42. Mao JT, Cui X, Reckamp K, Lei M, Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, Hazra S, Strieter R, Gardner B, Dubinett SM; Chemoprevention strategies with cyclooxygenase-2 inhibitors for lung cancer; *Clin Lung Cancer*. 2005 Jul; Vol. 7(1): 30-9.
43. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K; Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors; *Cancer Res* 2000; Vol. 60: 1306-1311.
44. Matthias C; Genetische Aspekte von Kopf-Hals Tumoren; *Laryngo-Rhino-Otol* 2002; Vol. 81: 778-779.
45. Mayoral R, Fernández-Martínez A, Boscá L, Martín-Sanz P; Prostaglandin E2 promotes migration and adhesion in hepatocellular carcinoma cells; *Carcinogenesis* 2005 Apr; Vol. 26(4): 753-761.
46. Milanovich MR, Snyderman CH, Wagner R, Johnson JT; Prognostic significance of PGE2 production by mononuclear cells and tumor cells in squamous cell carcinomas of the head and neck; *Laryngoscope* 1995; 105: 61-65.
47. Miwa N, Sugino H, Ueno R, Hayaishi O; Prostaglandin induces Ca²⁺ influx and cyclic GMP formation in mouse neuroblastoma X rat glioma hybrid NG108-15 cells in culture; *J Neurochem* 1988; Vol. 50(5): 1418-24.
48. Moran AE, Hunt DH, Javid SH, Redston M, Carothers AM, Bertagnolli MM; Apc deficiency is associated with increased Egfr activity in the intestinal enterocytes and adenomas of C57BL/6J-Min/+ mice; *J Biol Chem* 2004; Vol. 279(41): 43261-72.
49. Papa F, Scacco S, Vergari R, De Benedittis M, Petrucci M, Lo Muzio L, Serpico R; Expression and subcellular distribution of Bcl-2 and BAX proteins in serum-starved human keratinocytes and mouth carcinoma epidermoid cultures; *Life Sci* 2003; Vol. 73(22): 2865-72.
50. Perez CA ; Carcinoma of the Nasopharynx; *Principles and Practice of radiation oncology 2nd ed.* JB Lippincott 1992; 617-44.

51. Perez-Soler R; HER1/EGFR Targeting: Refining the Strategy; *The Oncologist 2004; Vol. 9: 58-67.*
52. Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, Clayman GL, Fisher SG, Forastiere AA, Harrison LB, Lefebvre JL, Leupold N, List MA, O'Malley BO, Patel S, Posner MR, Schwartz MA, Wolf GT; American Society of Clinical Oncology; Clinical Practice Guideline for the Use of Larynx-Preservation Strategies in the Treatment of Laryngeal Cancer; *Journal of Clin. Onc.; Vol. 24(22).*
53. Posner MR; Paradigm Shift in the Treatment of Head and Neck Cancer: The Role of Neoadjuvant Chemotherapy; *Oncologist 2005; Vol. 10: 11-19.*
54. Pradier O, Christiansen H, Schmidberger H, Martin A, Jackel MC, Steiner W, Ambrosch P, Kahler E, Hess CF; Adjuvant radiotherapy after transoral laser microsurgery for advanced squamous carcinoma of the head and neck; *Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Dec 1; Vol. 63(5): 1368-77.*
55. Remmert S, Rottman M, Reichenbach M, Sommer K, Friedrich HJ; Lymphknotenmetastasierung bei Kopf-Hals-Tumoren Laryngo-Rhino-Otol 2001; *Vol. 80: 27-35.*
56. Reuter CWM, Morgan MA, Eckhardt A; Targeting EGF-receptor-signalling in SCCHN; *British Journal of Cancer 2007; Vol. 96: 408-416.*
57. Richter M, Weiss M, Weinberger I, Furstenberger G, Marian B; Growth inhibition and induction of apoptosis in colorectal tumor cells by cyclooxygenase inhibitors; *Carcinogenesis 2001; Vol. 22(1): 17-25.*
58. Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW; Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for the Head and Neck Surgery and Oncology; *Arch Otolaryngol 1991; Vol. 117: 601±605.*
59. Sato T, Nakajima H, Fujio K, Mori Y; Enhancement of prostaglandin E2 production by epidermal growth factor requires the coordinate activation of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 in human squamous carcinoma A431 cells; *Prostaglandins 1997; Vol. 53(5): 355-69.*

60. Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M; Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo; *Lab Invest* 1999; Vol. 79: 1469-1477.
61. Schantz SP; Tumors of the Nasal Cavity and Paranasal Sinus, Nasopharynx, Oral Cavity and Oropharynx; *DeVita V., Cancer - Principles and Practice of Onkologie 5th ed.* 797-799.
62. Schroeder CP, Yang P, Newman RA, Lotan R; Eicosanoid metabolism in squamous cell carcinoma cell lines derived from primary and metastatic head and neck cancer and its modulation by Celecoxib; *Cancer Biol Ther* 2004; Vol. 3(9): 847-52.
63. Schuon R, Brieger J, Franke RL, Jakob R, Mann WJ; Increased PGE2 levels in non-malignant mucosa adjacent to squamous cell carcinoma of the head and neck; *ORL J Otorhinolaryngil Relat Spec* 2005; 67 (2): 96-100.
64. Scioscia KA, Snyderman CH, Rueger R; Role of arachidonic acid metabolites in tumor growth inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs; *Am J Otolaryngol* 1997; 18: 1-8.
65. Scioscia KA, Snyderman CH, D'Amico F, Comsa S, Rueger R, Light B; Effects of arachidonic acid metabolites in a murine model of squamous cell carcinoma; *Head Neck* 2000; 22: 149-155.
66. Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P; Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor-alpha apoptotic signalling; *J Biol Chem* 2001; Vol. 276: 12035-12040.
67. SEER. Bevölkerungsbezogene Neuerkrankungs- und Survivaldaten der USA bis 1996. <http://www-seer.ims.nci.nih.gov>.
68. Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM; Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer; *Cancer Res.* 2005 Jun 15; Vol. 65(12): 5211-20.
69. Sidransky D, Molekular Biology of Head and Neck Tumor, *DeVita V, Cancer-principles an practice of Onkology 5th ed.* 789.

70. Singh B, Berry JA, Shoher A, Ramakrishnan V, Lucci A; COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells; *Int J Oncol* 2005 May; Vol. 26(5): 1393-9.
71. Smith KL, Tisdale MJ; Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia; *Br J Cancer* 1993 Aug; Vol. 68(2): 314-8.
72. Snyderman CH, Klapan I, Milanovich M; Comparison of in vivo and in vitro prostaglandin E2 production by squamous cell carcinoma of the head and neck; *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111(3Pt1): 189-196.
73. Snyderman CH, Milanovich M, Wagner RL, Johnson JT; Prognostic significance of prostaglandin E2 production in fresh tissues of head and neck cancer patients; *Head Neck* 1995; 17: 108-113.
74. Starczewski M, Voigtmann R, Peskar BA, Peskar BM; Plasma levels of 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin E2 in patients with bronchogenic carcinoma; *Prostaglandins Leukot Med* 1984 Mar; Vol. 13(3): 249-58.
75. Steiner W, Fierek O, Ambrosch P, Hommerich CP, Kron M; Transoral laser microsurgery for squamous cell carcinoma of the base of the tongue.; *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Jan; Vol. 129(1): 36-43.
76. Steiner W, Vogt P, Ambrosch P, Kron M; Transoral carbon dioxide laser microsurgery for recurrent glottic carcinoma after radiotherapy.; *Head Neck.* 2004 Jun; Vol. 26(6): 477-84.
77. Sung YM, He G, Hwang DH, Fischer SM; Overexpression of the prostaglandin E2 receptor EP2 results in enhanced skin tumor development; *Oncogene.* 2006 Apr 10; Vol. 25(40): 5507-16.
78. Takeuchi T, Takeuchi H, Hoshino R, Ohmi K; Rhabdomyosarcoma-induced hypercalcemia in a nude mouse; *Cancer* 1982 Jul 1; Vol. 50(1): 94-6.
79. Todo S, Imashuku S, Inoda H, Yamanaka H, Hibi S, Tsunamoto K, Esumi N, Fujiwara F, Shimizu Y, Morioka Y; Hypercalcemia in a case of childhood acute lymphoblastic leukaemia; *Jpn J Clin Oncol* 1987 Dec; Vol. 17(4): 357-62.
80. Tumorregister München, Jahresbericht seit 1998. *München: Zuckschwerdtverlag.*

81. Vocks EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK; Head and Neck Cancer; *NEJM* 1993 Jan 21; Vol. 328: 184-194.
82. Wang W, Andersson M, Lonroth C, Svanberg E, Lundholm K; Prostaglandin E and prostacyclin receptor expression in tumor and host tissues from MCG 101-bearing mice: a model with prostanoid-related cachexia; *Int J Cancer* 2005 Jul; Vol. 115(4): 582-90.
83. Waris G, Siddiqui A; Hepatitis C Virus Stimulates the Expression of Cyclooxygenase-2 via Oxidative Stress: Role of Prostaglandin E2 in RNA Replication; 2005 Aug; Vol. 79(15): 9725-9734.
84. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH; *TNM Atlas, 5. Auflage; 2005.*
85. Wollenberg B, Breinl P, Stieber P; Stellenwert von Tumormarkern bei primären und rezidivierenden Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs; *Manual Kopf-Hals-Malignome 2003.*
86. Wong BC, Wang WP, Cho CH, Fan XM, Lin MC, Kung HF, Lam SK; 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells; *Carcinogenesis* 2001; Vol. 22: 1349-1354.
87. Wu YY, Lin MC; Induction of differentiation in v-Ha-ras-transformed MDCK cells by prostaglandin E2 and 8-bromo-cyclic AMP is associated with a decrease in steady-state level of inositol 1,4,5-trisphosphate; *Mol Cell Biol* 1990; Vol. 10(1): 57-67.
88. Yano T, Zissel G, Muller-Qernheim J, Jae Shin S, Satoh H, Ichikawa T; Prostaglandin E2 reinforces the activation of Ras signal pathway in lung adenocarcinoma cells via EP3; *FEBS Lett* 2002; Vol. 518(1-3): 154-8.
89. Yao M, Zhou W, Sangha S, Albert A, Chang AJ, Liu TC, Wolfe MM; Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer; *Clin Cancer Res* 2005; Vol. 11(4): 1618-28.
90. Ye F, Wu J, Dunn T, Yi J, Tong X, Zhang D; Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein; *Cancer Lett* 2004; Vol. 211(1): 39-46.

10. Danksagung

Prof. Rainald Knecht möchte ich für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung, sowie die kollegialen Diskussionen, den fairen Umgang und eine angenehme Korrespondenz danken.

PD Dr. Markus Hambek danke ich für die Auswahl des Themas, sowie für die kompetente und kollegiale Betreuung und Unterstützung.

Ich danke Helena Baumann für die Einführung in die Methodik und Unterstützung bei den laboranalytischen Untersuchungen.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Frankfurt a. M., welche die Durchführung und Umsetzung der Untersuchungen ermöglicht haben.

Frau Edda Lommatzsch danke ich für den netten und hilfsbereiten Umgang.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für fachlichen Rat, Motivation und moralische Unterstützung danken.

11. Lebenslauf

Persönliches

Johannes Schmitt

Geb. am 26.05.1981 in Heidelberg

Mühlbergstr. 5c

64625 Bensheim

Berufserfahrung

- Angestellter Zahnarzt seit 01.11.09 in Praxis Dr. H.J. Schmitt, Bensheim
- Vorbereitungsassistent vom 01.11.07 bis 31.10.09 in Gemeinschaftspraxis und Klinik für Zahnheilkunde Dres. Dinkelacker und Brendel, Sindelfingen
- Vorbereitungsassistent vom 01.02.07 bis 31.10.07 in Praxis Dr. H.J. Schmitt, Bensheim

Ausbildung

- Approbation als Zahnarzt am 09.12.06
- Staatsexamen Zahnmedizin am 08.12.06, Gesamtnote -sehr gut- mit Auszeichnung als Jahrgangsbester
- Beginn der Dissertation „Untersuchungen zur potentiellen Bedeutung von PGE2 als Tumormarker“ 2005
- Beginn des Studiums der Zahnmedizin Okt. 2001
- Zivildienst in der „Seebergschule-Schule für praktisch Bildbare“ von 01.08. 2000 bis 30.06.2001
- Abitur am Goethegymnasium Bensheim am 06.06.2000

Fortbildungen (Auswahl)

- Beginn Curriculum Endodontie/ Weiterbildung zum Spezialisten für Endodontie, Prof. Trope UPenn / TEC2 Memmingen 2010
- Curriculum Implantologie der Akademie für Zahnärztliche Fortbildung, Karlsruhe
- Curriculum Zahnärztliche Hypnose, Dr. A. Schmieger, Stuttgart
- Fortbildungsreihe Parodontale Mikrochirurgie „PAR I –PAR IV“ im IPI-München (Wachtel, Bolz, Hürzeler, Zuhr)

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werks kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....