

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Rody

**Zusammenhang von
Vitamin D- und Prostaglandin-Metabolismus
beim Mammakarzinom**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Kathrin Penelope Reichert
aus Münster

Lübeck 2016

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Marc Thill
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Tilman Laubert

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.09.2016

Promotionskommission der Sektion Medizin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom - Epidemiologie	1
1.1.1 Ätiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren	2
1.1.3 Prognose und Prädiktion	2
1.1.4 Therapie	3
1.2 Vitamin D	4
1.2.1 Vitamin D ₃ -Metabolismus.....	4
1.2.2 Wirkungen von Calcitriol	5
1.2.3 Vitamin D und Mammakarzinom.....	5
1.2.4 Der Vitamin D-Rezeptor.....	7
1.2.5 Die 1 α -Hydroxylase	7
1.2.6 Die 24-Hydroxylase	7
1.2.7 Vitamin D-Analoga.....	7
1.3 Prostaglandine	8
1.3.1 Prostaglandin-Metabolismus	9
1.3.2 Prostaglandinrezeptoren.....	9
1.3.3 Die Cyclooxygenasen	9
1.3.3.1 Die Bedeutung von COX-2 für die Karzinogenese	10
1.3.3.2 COX-2-Inhibition und Mammakarzinom	11
1.3.4 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase.....	11
1.4 Verbindung zwischen Vitamin D- und Prostaglandin-Metabolismus	12
1.5 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Zelllinien	15
2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze.....	15
2.1.3 Zellkulturzubehör	15
2.1.4 Geräte.....	15

2.1.5	Allgemeine Labormaterialien	16
2.1.6	Assays	16
2.1.7	Westernblot Zubehör	17
2.1.8	Polymerase-Kettenreaktion Zubehör	17
2.1.9	Agarose-Gelelektrophorese Zubehör.....	17
2.1.10	Chemikalien	18
2.1.11	Testsubstanzen	19
2.1.12	Antikörper im Westernblot	19
2.1.13	PCR-Primer	20
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Kultivieren der Zellen	20
2.2.2	Passagieren der Zellen.....	20
2.2.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	21
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer.....	21
2.2.5	Wachstumsversuche	22
2.2.6	Bestimmung der Zellproliferation	22
2.2.6.1	MTT-Assay.....	22
2.2.6.2	BrdU-ELISA.....	23
2.2.7	Vergleich der Proteinexpression nach Behandlung der Zellen	23
2.2.7.1	Behandlung der Zellen zur Bestimmung der Proteinmenge	23
2.2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
2.2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.2.7.4	Westernblot.....	25
2.2.7.5	Immundetektion der Proteine	25
2.2.8	Vergleich der mRNA-Expression nach Behandlung der Zellen	27
2.2.8.1	Behandlung der Zellen zur mRNA-Bestimmung.....	27
2.2.8.2	RNA-Isolierung	27
2.2.8.3	RNA-Quantifizierung	28
2.2.8.4	Reverse Transkription	28
2.2.8.5	Real-Time quantitative PCR.....	29
2.2.8.6	Auswertung der qPCR	30
2.2.8.7	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung des qPCR-Produktes	31
2.2.9	Statistik	31

3.	Ergebnisse	32
3.1	Einfluss von Vitamin D und Vitamin D-Analoga auf das Zellwachstum.....	32
3.1.1	Einfluss von Calcitriol auf die Zellproliferation im BrdU-ELISA	32
3.1.2	Einfluss von Calcitriol auf das Zellwachstum im MTT-Assay	33
3.1.3	Einfluss von Calcipotriol auf das Zellwachstum im MTT-Assay	34
3.2	Einfluss von selektiven und nicht-selektiven COX-2-Inhibitoren auf das Zellwachstum im MTT-Assay	35
3.2.1	Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib auf das Zellwachstum im MTT-Assay.....	35
3.2.2	Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 auf das Zellwachstum im MTT-Assay.....	36
3.2.3	Einfluss des nicht-selektiven COX-2-Inhibitors Naproxen auf das Zellwachstum im MTT-Assay.....	37
3.3	Einfluss der Kombination von Calcitriol und Celecoxib auf das Zellwachstum im MTT-Assay.....	38
3.3.1	Kombination von 1 µM Calcitriol und Celecoxib bei der Zelllinie MCF-7	38
3.3.2	Kombination von 10 µM Calcitriol und Celecoxib bei der Zelllinie MCF-7	39
3.3.3	Kombination von 10 µM Celecoxib und Calcitriol bei der Zelllinie MDA-MB-231	40
3.4	Einfluss von Calcitriol und Celecoxib auf die Proteinexpression im Westernblot.....	41
3.4.1	Einfluss auf die Expression von Prostaglandinstoffwechselproteinen41	
3.4.1.1	Einfluss auf die COX-2-Proteinexpression.....	41
3.4.1.2	Einfluss auf die 15-PGDH-Proteinexpression	42
3.4.2	Einfluss auf die Expression von Proteinen des Vitamin D- Stoffwechsels.....	43
3.4.2.1	Einfluss auf die 24-Hydroxylase-Proteinexpression.....	43
3.4.2.2	Einfluss auf die 1α-Hydroxylase- und VDR-Proteinexpression ..	44
3.5	Einfluss von Calcitriol und Celecoxib auf die cox-2-mRNA-Expression in der qPCR	45
4.	Diskussion.....	47

4.1	Wird das Wachstum von Mammakarzinomzellen durch Calcitriol, das Vitamin D-Analogon Calcipotriol, die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und NS-398, oder durch den nicht-selektiven COX-2-Inhibitor Naproxen beeinflusst?	47
4.2	Führt eine Kombinationsbehandlung mit Calcitriol und einem COX-2-Inhibitor im Vergleich zu den Einzelbehandlungen zu einer verstärkten Wachstumsinhibition von Mammakarzinomzellen?	53
4.3	Interagieren Calcitriol und COX-2-Inhibitoren, jeweils einzeln und in Kombination, mit den Enzymen des jeweils anderen Stoffwechselweges?	55
5.	Zusammenfassung.....	63
6.	Literaturverzeichnis	64
7.	Anhang.....	81
8.	Danksagungen	84
9.	Lebenslauf.....	85

Abkürzungsverzeichnis

Im Duden zu findende Abkürzungen sind in diesem Verzeichnis nicht aufgeführt.

ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCA Assay	Bicinchoninic acid Assay
Bcl-2	B-cell lymphoma Protein 2
bp	Basenpaar
BRCA1	Brustkrebsgen 1
BRCA2	Brustkrebsgen 2
BrdU	Bromdesoxyuridin
cDNA	komplementäre DNA
COX	Cyclooxygenase
CP	Crossing Point
d	Tag
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	Prostaglandin E-Rezeptor
ER	Östrogenrezeptor
FBS	Fetales bovines Serum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
hprt1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1

HRP	Horseradish Peroxidase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IL-β	Interleukin-β
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
miRNA	microRNA
MPEB	Mammalian Protein Extraction Buffer
mRNA	messenger RNA
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
15-PGDH	15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase
PGI ₂	Prostacyclin
PSA	Prostataspezifisches Antigen
qPCR	real-time quantitative PCR
R	Ratio
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS-T	Tris-Buffered saline und Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TxA ₂	Thromboxan A ₂
U	Umdrehungen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VDR	Vitamin D-Rezeptor

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom - Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der weiblichen Bevölkerung in Deutschland, es macht 31 % aller Karzinomerkrankungen bei Frauen aus. Etwa jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Im Jahre 2012 waren in Deutschland 69 550 Frauen betroffen, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren lag. Ein Drittel der Frauen erkrankte bereits vor ihrem 55. Lebensjahr. Für das Jahr 2016 prognostiziert das Robert-Koch-Institut 65 500 Mammakarzinomneuerkrankungen in der weiblichen Bevölkerung [135]. Die altersstandardisierte Erkrankungsrate lag im Jahre 2012 nach dem Europastandard bei 117/100 000 Frauen [135] und hat sich damit seit 1980 verdoppelt. Hierbei spielt sicherlich auch das 2005 eingeführte Mammographie-Screening eine Rolle, wodurch das Mammakarzinom häufiger und in einem früheren Stadium erkannt wurde [134]. Etwa jede 115. Mammakarzinomerkrankung betrifft Männer. Im Jahre 2012 erkrankten in Deutschland 620 Männer. Die altersstandardisierte Mortalität lag 2012 nach dem Europastandard bei 24/100 000 Frauen und sinkt damit seit 1990 stetig [135]. In der westlichen Welt ist das Mammakarzinom bei den 35- bis 55-jährigen Frauen die häufigste Todesursache [148], wobei die relative 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland 2011/2012 bei 88 % lag [135].

1.1.1 Ätiologie

Nach aktuellem Wissensstand erfolgt die Tumorgenese über ein Mehrstufenmodell. Prämaligne Vorläuferläsionen können zunächst *in-situ*-Karzinome bilden, welche schließlich in ein invasives Karzinom übergehen können. Man unterscheidet die lobuläre Neoplasie und das duktales Carcinoma in situ (DCIS). Mit etwa 85 % sind ein Großteil der invasiven Mammakarzinome duktales Karzinome, ca. 15 % sind lobuläre Karzinome [25, 53]. Die Tumorentstehung resultiert meist aus defekten Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, die konsekutiv eine antiapoptotische und proliferationssteigernde Wirkung haben [137].

Etwa 5 % der Mammakarzinomerkrankungen sind genetisch bedingt, hierbei handelt es sich in 90 % der Fälle um Mutationen der Brustkrebsgene 1 (BRCA1) und BRCA2 [25].

1.1.2 Risikofaktoren

Es gibt diverse Faktoren, die das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, erhöhen. Generelle Risiken sind Mammaläsionen in der Eigenanamnese, eine positive Familienanamnese für Karzinome, Strahlenbelastung, Bewegungsmangel, Übergewicht, Alkohol sowie eine fettreiche und vitaminarme Ernährung [135, 192]. Ferner sind eine frühe Menarche, eine späte Menopause, Nulliparität, fehlendes Stillen sowie späte Mutterschaft als Risikofaktoren zu nennen [107]. Weiterhin erhöht eine Hormonersatztherapie mit Östrogenen und Gestagenen in der Postmenopause das Mammakarzinomrisiko [37]. Durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva wird das Mammakarzinomrisiko leicht erhöht, dieser Effekt verschwindet jedoch 5 – 10 Jahre nach Beendigung der Einnahme [39]. Nicht zuletzt tragen auch Faktoren wie die Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 zu einem erhöhten Mammakarzinomrisiko bei. Für Träger eines Gendefekts in BRCA1 besteht ein Lebenszeitrisko von etwa 57 – 65 % für die Entstehung eines Mammakarzinoms, bei Trägern von BRCA2 beträgt das Lebenszeitrisko etwa 45 – 49 % [8, 35]. Aktuell wird über einen Vitamin D₃-Mangel als weitere Ursache eines erhöhten Mammakarzinomrisikos diskutiert [45, 67, 162].

1.1.3 Prognose und Prädiktion

Bestimmte klinisch-pathologische Tumorcharakteristika sind wichtige Prognoseparameter beim Mammakarzinom. Zu nennen sind TNM-Status (siehe Anhang), Grading, histologischer Typ und Rezeptorstatus sowie Alter und Menopausenstatus der Patientin¹ [177, 192]. Dem Rezeptorstatus fällt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der individuellen Therapie zu. So sind der Östrogenrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor sowie der human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu) wichtige molekulare Marker, die bei Expression des jeweiligen Rezeptors als Zielstruktur für eine antihormonelle bzw. HER2/neu-gerichtete Therapie verwendet werden können [122]. Zusammenfassend bestimmen diese

¹ In dieser Arbeit wird aufgrund der Häufigkeitsverteilung von „Patientin“ gesprochen, es ist jedoch sowohl das weibliche als auch das männliche Geschlecht gemeint.

Marker die Biologie des Tumors, damit die Zugehörigkeit zu sogenannten intrinsischen Subgruppen und konsekutiv die Therapieentscheidung [146]. Sobald eine Fernmetastasierung vorliegt, gilt die Erkrankung als nicht mehr kurativ behandelbar, sodass bei der Therapie vor allem die Lebensqualität im Vordergrund steht. Da der Rezeptorstatus von Primärtumor und Metastase in bis zu 40% der Fälle diskordant sein kann, ist es wichtig, den Rezeptorstatus bei vorliegender Metastasierung erneut durch eine Biopsie der Metastase zu bestimmen [4].

1.1.4 Therapie

Für jede Patientin sollte eine möglichst individuelle Therapie gewählt werden. Diese wird durch die Zuordnung zu einer entsprechenden Subgruppe des Mammakarzinoms, das jeweilige Tumorstadium sowie unter Berücksichtigung des Alters und der Belastbarkeit der Patientinnen bestimmt. Aktuelle Therapieempfehlungen und Leitlinien werden durch die Deutsche Krebsgesellschaft [192] und die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, Organgruppe Mamma, publiziert [193].

Im Vordergrund der Therapie eines Mammakarzinoms steht die operative Entfernung des Tumors, wenn möglich unter Erhaltung der Brust. Die operative Therapie schließt die Biopsie bzw. Entfernung der axillären Lymphknoten – ob als Sentinel-Node-Technik oder Axilladisektion – mit in das Konzept ein. Postoperativ wird fast regelhaft eine Radiotherapie angeschlossen. Zusätzlich zu der lokalen, besteht außerdem die Möglichkeit einer systemischen Therapie. Zum Einsatz kommen Chemotherapie, antihormonelle und Antikörpertherapie. Palliativ stehen zusätzlich weitere molekulare Therapieoptionen, wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Inhibitoren, zur Verfügung [53, 192].

Vor dem Hintergrund der hohen Anzahl der Neuerkrankungen kommt der Suche nach weitergehenden Präventions- und Therapieansätzen des Mammakarzinoms eine große Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit werden mit Calcitriol und Cyclooxygenase (COX)-Inhibitoren potentielle Therapiemaßnahmen näher betrachtet.

1.2 Vitamin D

Vitamin D kommt als pflanzliches Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und als tierisches Vitamin D₃ (Cholecalciferol) vor. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Vitamin D₃. Es ist ein Secosteroid und kommt in hohen Konzentrationen z. B. in Lebertran und verschiedenen Fischarten vor [82]. Etwa die Hälfte des Vitamin D₃-Vorkommens synthetisiert der Mensch aus Zwischenprodukten der Cholesterinbiosynthese [131].

1.2.1 Vitamin D₃-Metabolismus

Der Stoffwechsel des Vitamin D₃ findet in verschiedenen Organen des Körpers statt. Zunächst wird das Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterin) in der Leber aus Squalen, einem Stoffwechselzwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese, synthetisiert. In der Haut wird durch Einwirkung von UV-Licht der B-Ring des Ste-

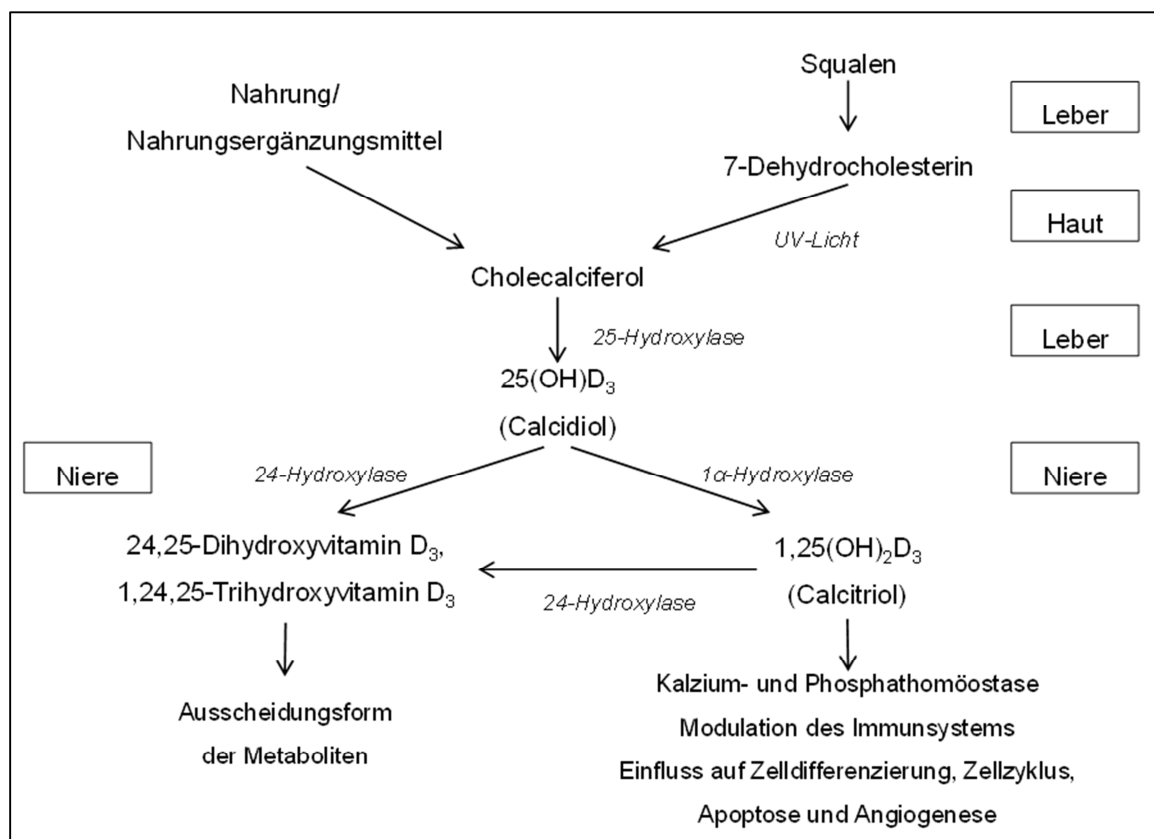


Abbildung 1. Der Vitamin D₃-Metabolismus

rangerüsts von Provitamin D₃ gespalten, woraus das biologisch inaktive Vitamin D₃ (Cholecalciferol) resultiert [82]. In der Leber ist die Metabolisierung zu 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) lokalisiert. Dieses wird in der Niere durch das

Enzym 1 α -Hydroxylase zum biologisch aktiven 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) hydroxyliert. 25-Hydroxycholecalciferol und 1,25-Dihydroxycholecalciferol werden durch die 24-Hydroxylase in der Niere zu den Ausscheidungs-metaboliten hydroxyliert [105, 131]. Vitamin D wird nachfolgend synonym für Vitamin D₃ verwendet.

1.2.2 Wirkungen von Calcitriol

Calcitriol hat vielfältige Wirkungen, die sich in verschiedenen Organsystemen manifestieren. Als Wichtigste ist die Regulierung der Kalzium- und Phosphat-homöostase zu nennen. Sinkt der Serumkalziumspiegel, so wird Parathormon aus den Nebenschilddrüsen sezerniert [28]. Parathormon stimuliert die 1 α -Hydroxylase [26] und somit die Calcitriolproduktion. Calcitriol wiederum inhibiert über negative Rückkopplung die Expression der 1 α -Hydroxylase sowie des Parathormons [73, 143]. Durch Calcitriol wird sowohl die Kalzium- und Phosphatresorption im Intestinaltrakt als auch die Kalziumresorption in den Nieren gefördert [105]. Ferner unterstützt es im Knochen den Aufbau der Matrix und die Kalzifizierung; durch Osteoklastenaktivierung fördert es jedoch zusätzlich die Mobilisation von Kalzium aus dem Knochen [105]. Insgesamt betrachtet erhöht Calcitriol folglich über verschiedene Organsysteme den Serumkalziumspiegel, eine Hypervitaminose kann u. a. zu Urolithiasis führen [105, 131]. Außerdem scheint Calcitriol einen modulierenden Einfluss auf das Immunsystem zu haben, da ein Vitamin D-Mangel in diversen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt [5, 110, 155]. Ferner wird ein Vitamin D-Mangel mit Diabetes mellitus Typ II und über einen Einfluss auf das Renin-Angiotensin-System mit einem Hypertonus in Verbindung gebracht [104, 110]. Interessanterweise ist ein Vitamin D-Mangel auch mit diversen Karzinom-erkrankungen, wie dem Kolon- und Prostatakarzinom, assoziiert [65, 67, 152]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinflusst es Zellzyklus, Apoptose, Zelldifferenzierung, Angiogenese sowie Metastasierung [16, 93].

1.2.3 Vitamin D und Mammakarzinom

Auch im Hinblick auf das Mammakarzinom wurden antikanzerogene Wirkungen von Vitamin D nachgewiesen [6, 34, 71].

Die aussagekräftigste Kenngröße des Vitamin D-Haushalts ist der Calcidiol (25(OH)D₃)-Spiegel [82]. Ein Calcidiolspiegel von >33 ng/ml wird als ausreichend hoch betrachtet [72] und scheint das Mammakarzinomrisiko bei Frauen aller Altersklassen zu reduzieren [1, 19, 34, 60, 68] und die Mortalität bei Mammakarzinompatientinnen zu senken [90]. Ferner bestätigen mehrere Studien, dass eine Mammakarzinomerkrankung oft mit einem erniedrigten Calcidiolspiegel verbunden ist [42, 45, 123, 162], der wiederum mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [159, 172]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Sonnenlichtexposition das Mammakarzinomrisiko reduziert [69, 87]. Somit stellt sich die Frage, ob die Einnahme von Vitamin D als Nahrungsergänzungsmittel eine protektive Wirkung zeigt, hierzu ist die Datenlage allerdings inkonsistent. Einige Studien zeigten eine Risikoreduktion in Bezug auf das Mammakarzinom [6, 34, 87], andere hingegen konnten keine Korrelation zwischen einer Vitamin D-Einnahme und dem Mammakarzinomrisiko feststellen [36, 58]. Aktuell empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. eine tägliche Vitamin D-Substitution von 800 IE für alle Personen mit unzureichender endogener Vitamin D-Synthese, für Säuglinge unter 12 Monaten wird eine Substitution von 400 IE/d empfohlen [50]. Einige Studien wiesen eine Risikoreduktion einer Mammakarzinomerkrankung durch eine Vitamin D-Substitution von ≥400 IE/d auf [6, 71]. Andere Studien hingegen empfehlen 1000 - 2000 IE/d, um ausreichend hohe Calcidiolspiegel zu erhalten, wobei ältere Personen höhere Dosen als Jüngere einnehmen sollten [83, 176]. Bei Mammakarzinompatientinnen wird ein normales Niveau des Calcidiolspiegels laut Peppone *et al.* erst durch eine Einnahme von >50 000 IE in der Woche erreicht [123]. Dies zeigt, dass weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der optimalen Dosierung einer Vitamin D-Substitution besteht.

Therapeutisch zeigte Calcitriol sowohl *in vitro* bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7, als auch *in vivo* am Mausmodell eine deutliche Wachstumsreduktion des Mammakarzinoms bzw. der Mammakarzinomzellen [29, 153, 160, 186]. Das Wachstum der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-231 konnte *in vitro* jedoch nicht durch Calcitriol beeinflusst werden [29, 160]. Auch in einer klinischen Studie an Patientinnen mit Mammakarzinom wurde Vitamin D bereits eingesetzt und lieferte vielversprechende Ergebnisse [188]. Insgesamt betrachtet wird Calcitriol ein positiver Einfluss in Hinsicht auf das Mammakarzinom zugeschrieben.

1.2.4 Der Vitamin D-Rezeptor

Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) befindet sich als Transkriptionsfaktor im Zellkern. Vitamin D diffundiert in den Zellkern, bindet dort an den VDR und initiiert eine Kaskade, an deren Ende die Transkription bestimmter Zielgene aktiviert bzw. inhibiert wird [105]. An VDR-knock-out-Mäusen mit Mammakarzinom zeigten sowohl Calcitriol als auch Vitamin D-Analoga keinen Einfluss auf das Tumorwachstum, obwohl sie an Mäusen mit vorhandenem VDR eine deutliche Wachstumsinhibition induzierten [191]. Zusätzlich gibt es einige VDR-unabhängige antiproliferative Eigenschaften von Calcitriol und Vitamin D-Analoga [43, 94, 141].

1.2.5 Die 1 α -Hydroxylase

Die 1 α -Hydroxylase in der Niere führt zu der Aktivierung von Calcidiol zu Calcitriol. Sie wird durch das Gen *cyp27b1* kodiert und ihre Expression wird durch Parathormon induziert sowie durch Calcium, Phosphat und Calcitriol reduziert [22, 105, 118]. Zusätzlich konnte die 1 α -Hydroxylase in extrarenalen Geweben nachgewiesen werden, hier wird ihre Expression durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert [57]. In Mammakarzinomgewebe zeigten Cordes *et al.* im Vergleich zu benignem Gewebe eine verringerte Expression der 1 α -Hydroxylase [44].

1.2.6 Die 24-Hydroxylase

Die 24-Hydroxylase wird durch das Gen *cyp24a1* kodiert. Sie hydroxyliert sowohl Calcidiol als auch Calcitriol in der Niere zu den Ausscheidungsformen 24,25-Dihydroxyvitamin D und 1,24,25-Trihydroxyvitamin D [157]. Die Expression der 24-Hydroxylase wird durch Calcitriol erhöht [41] und durch Parathormon reduziert [48]. In der Literatur gibt es kontroverse Daten zu der 24-Hydroxylase-Expression in Karzinomen. Einige Studien wiesen eine erhöhte Expression der 24-Hydroxylase in malignem gegenüber benignem Gewebe nach, andere jedoch eine erniedrigte Expression [44, 62, 64, 106, 168].

1.2.7 Vitamin D-Analoga

Um unerwünschte Nebenwirkungen durch Calcitriol [74], wie z. B. eine Hyperkalzämie, zu reduzieren, wurden Vitamin D-Analoga eingesetzt, die ihre Wirkung über den VDR entfalten [30, 101]. Diverse Vitamin D-Analoga, wie z. B. Calcipo-

triol, wiesen sowohl im Mausmodell als auch bei der malignen Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 antiproliferative und proapoptotische Effekte auf, ohne eine Hyperkalzämie hervorzurufen [17, 40].

1.3 Prostaglandine

Prostaglandine (PG) gehören zu der Gruppe der Eikosanoide und sind Derivate der Arachidonsäure. Nahezu alle Gewebe sind zur Synthese von Prostaglandinen befähigt [105, 131]. Prostaglandine haben eine Vielzahl von Wirkungen, so regulieren sie neben dem Tonus der autonomen Muskulatur auch die Säure- und Schleimproduktion des Magens. Ferner sind sie an inflammatorischen Prozessen beteiligt [105]. Prostaglandine wirken als lokale Hormone, deren Halbwertszeit nur im Bereich einiger Sekunden bis zu wenigen Minuten liegt. Sie werden nur bei Bedarf produziert und in die interstitielle Flüssigkeit sezerniert [120], wobei ihre Wirkstoffkonzentrationen sehr gering ($10^{-10} - 10^{-8}$ mol/l) sind [105].

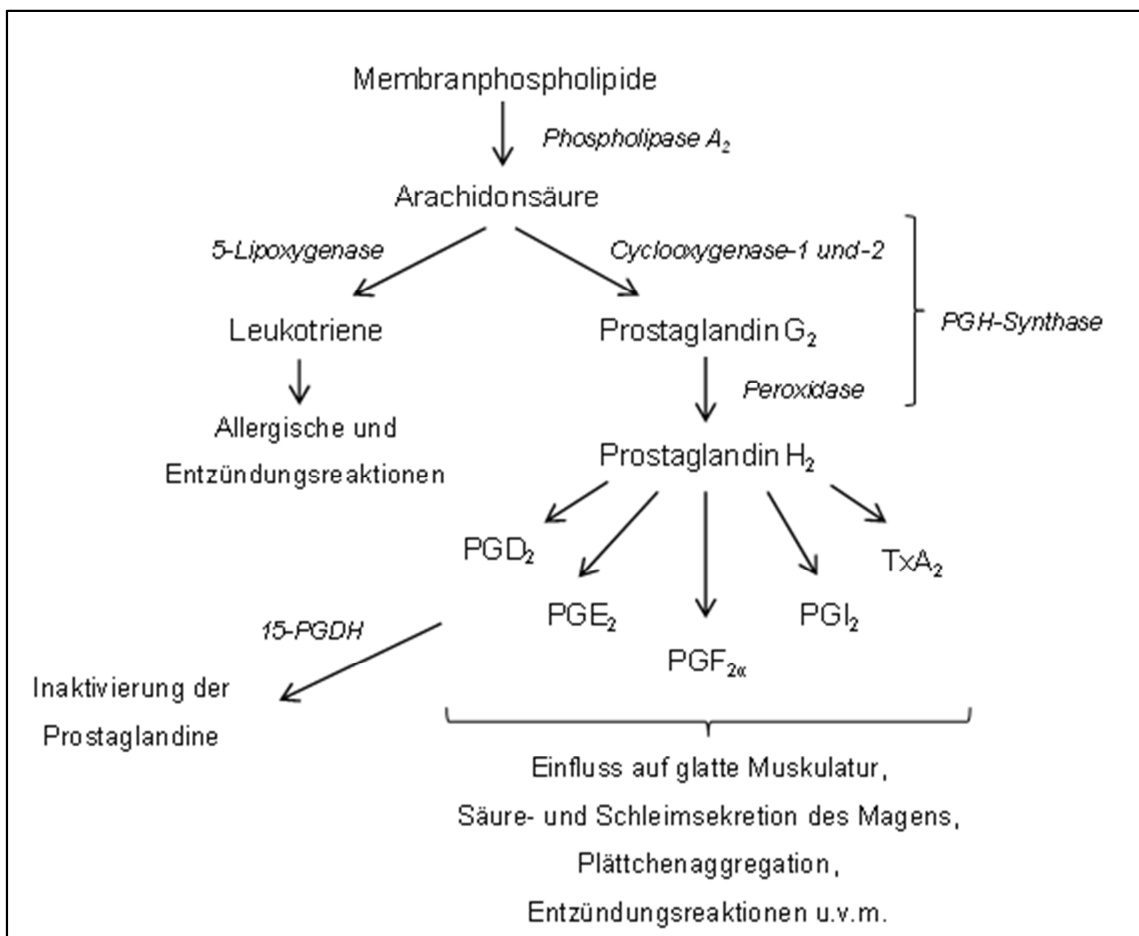


Abbildung 2. Vereinfachte Darstellung des Prostaglandin-Metabolismus

1.3.1 Prostaglandin-Metabolismus

Die Arachidonsäure wird durch die Phospholipase A₂ aus Membranphospholipiden freigesetzt. Sie wird einerseits durch die Prostaglandin H-Synthase (PGH-Synthase) zu Prostaglandinen, Resolvinen, Protectinen und Thromboxan A₂ (TxA₂), andererseits durch die 5-Lipoxygenase in Mastzellen, Granulozyten und Makrophagen zu Leukotrienen und Lipoxinen metabolisiert. Die PGH-Synthase ist ein bifunktionelles Enzym und untergliedert sich in die Aktivitäten der Cyclooxygenase (COX) und der Peroxidase. Die COX produziert Prostaglandin G₂ (PGG₂), die Peroxidase reduziert PGG₂ zu PGH₂, aus welchem TxA₂ und verschiedene Prostaglandine wie z. B. PGD₂, -E₂, -F_{2α} und Prostacyclin (PGI₂) synthetisiert werden [131, 139]. Die Inaktivierung der Prostaglandine erfolgt durch die 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (15-PGDH) [156].

1.3.2 Prostaglandinrezeptoren

Die heterogenen Wirkungen der Prostaglandine hängen hauptsächlich von dem jeweiligen Prostaglandinrezeptor ab. Es gibt sowohl membranständige als auch intrazelluläre Rezeptoren [187]. PGE₂, der Hauptmetabolit von COX-2, wirkt über die G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Domänen Prostaglandin E-Rezeptoren (EP)₁₋₄, worüber kanzerogene Wirkungen wie z. B. eine erhöhte Tumorzellproliferation und eine Induktion der Metastasierung in verschiedenen Karzinomen vermittelt werden [111, 119, 181].

1.3.3 Die Cyclooxygenasen

Für die COX sind drei verschiedene Isoformen bekannt. Die COX-1 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert. Sie wirkt über die Produktion von PGE₂ u. a. protektiv auf die Magenschleimhaut und vermittelt über das PGI₂ eine verminderte Thrombozytenaggregation [105].

Die COX-2 wird nur im Zentralnervensystem und in den Nieren dauerhaft exprimiert, in den übrigen Geweben wird die Expression durch Stress und Entzündung induziert. Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor-α erhöhen die Expression der COX-2, während Glucocorticoide und antiinflammatorische Zytokine diese reduzieren. Die Aufgaben der durch die COX-2 synthetisierten Prostaglandine sind sehr vielfältig:

Über die Einnistung und Entwicklung des Embryos, Lipolyse, Blutdruckregulation und Nierenfunktion bis hin zu Entzündungsmerkmalen wie Fieber und Schmerzen [105].

Als dritte Isoform wird die COX-3 als Splicevariante der COX-1 in Gehirn und Rückenmark exprimiert, ihre Funktion ist allerdings noch unzureichend erforscht [145].

1.3.3.1 Die Bedeutung von COX-2 für die Karzinogenese

Die Bedeutung der COX-2 für die Karzinogenese hängt auf der einen Seite mit ihrem Beitrag zur Schaffung eines entzündlichen Milieus zusammen, welches mit der Entstehung von Karzinomen verknüpft ist [170], auf der anderen Seite mit ihren antiapoptotischen und proangiogenen Eigenschaften. So wurde gezeigt, dass eine COX-2-Überexpression mit einer erhöhten Expression des antiapoptotischen B-cell lymphoma Proteins 2 (Bcl-2) und einer verminderten Expression des proapoptotischen Bcl-2-assoziierten-x-Protein assoziiert ist [102]. Die proangiogene Wirkung von COX-2 wurde durch eine positive Korrelation einer COX-2-Überexpression mit einer VEGF-Überexpression und einer erhöhten Dichte an kleinen Gefäßen nachgewiesen [75]. Viele Studien konnten eine COX-2-Überexpression in verschiedenen Karzinomen wie z. B. Prostata- [61], Kolon- [189] und Lungenkarzinomen [84] nachweisen. Zusammenfassend scheint der COX-2 eine Bedeutung in der Entstehung, Progression und Prognose von Karzinomen zuzukommen [31, 84, 89].

Auch ein Zusammenhang zwischen der COX-2 und dem Mammakarzinom wird beschrieben. So wird vermutet, dass die COX-2 eine Rolle in der Entwicklung vom DCIS zu einem invasiven Karzinom spielt [85]. Die Datenlage von immunhistochemischen Studien zur COX-2-Expression beim Mammakarzinom ist inkonsistent, insgesamt betrachtet weisen invasive Karzinome häufig eine COX-2-Überexpression auf. Die COX-2-Überexpression ist wiederum mit einem größeren Tumolvolumen, schlechterem histologischen Grading, Neoangiogenese und Lymphknotenmetastasierung assoziiert. Außerdem besteht teilweise eine Korrelation mit einer ER-Negativität. Diese Faktoren summieren sich zu einer insgesamt schlechteren Prognose bei einer COX-2-Überexpression in Mammakarzinomen [49, 133, 190].

1.3.3.2 COX-2-Inhibition und Mammakarzinom

Aufgrund der schlechteren Prognose bei einer COX-2-Überexpression in Mammakarzinomen entwickelte sich die Idee, die COX-2 zu inhibieren. Die Inhibition der COX-2 kann nicht-selektiv durch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) oder selektiv durch COX-2-Inhibitoren erfolgen. Beide wirken durch die Hemmung der PGE₂-Synthese analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch [105], zusätzlich werden ihnen antikanzerogene Wirkungen zugesprochen [10, 81].

Die Datenlage hinsichtlich der protektiven Wirkung von COX-2-Inhibitoren im Sinne einer Korrelation zwischen der Einnahme von COX-2-Inhibitoren und einer Karzinomentwicklung ist inkonsistent [59, 80, 81]. Aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen durch eine dauerhafte Einnahme von NSAR, wie z. B. gastrointestinale Ulzera [21], entwickelte sich die Idee, selektive COX-2-Inhibitoren wie Celecoxib und Rofecoxib einzusetzen. Diese erhalten die protektiven Effekte der durch die COX-1 synthetisierten Substanzen. Erfreulicherweise zeigte Celecoxib in mehreren Studien eine deutliche Risikoreduktion für eine Mammakarzinom-erkrankung, welche nochmals stärker als die der NSAR ausgeprägt war [10, 79]. Auch als Therapeutikum von Karzinomzellen weist Celecoxib in zahlreichen *in vitro* Studien antikanzerogene Effekte auf. So bewirkte es eine zeit- und dosis-abhängige Wachstumsreduktion von Mammakarzinomzelllinien [12, 23, 46, 174]. Auch *in vivo* reduzierte Celecoxib die Inzidenz und das Tumolvolumen von Mammakarzinomen im Mausmodell signifikant [3, 13, 46, 184].

Insgesamt betrachtet zeigt der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer präventiven und therapeutischen Wirkung auf das Mammakarzinom.

1.3.4 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase

Die 15-PGDH ist für die Inaktivierung der Prostaglandine verantwortlich [156]. In verschiedenen Malignomen wie Lungen- und Kolonkarzinomen wurde im Vergleich zu benignem Gewebe eine verminderte Expression der 15-PGDH gefunden [54, 183]. Beim Mammakarzinom ist die Datenlage kontrovers. So wurde in Mammakarzinomgewebe sowohl eine verringerte [178], als auch eine erhöhte 15-PGDH-Expression gefunden [99, 162]. Bei malignen Mammakarzinomzelllinien zeigten die ER-positiven MCF-7 Zellen eine höhere 15-PGDH-Protein- und

mRNA-Expression als die ER-negativen MDA-MB-231 Zellen [164, 178]. Eine Hochregulation der 15-PGDH resultierte in vermindertem Zellwachstum. Insgesamt betrachtet wird der 15-PGDH eine Tumorsuppressoraktivität zugeschrieben [178, 183].

1.4 Verbindung zwischen Vitamin D- und Prostaglandin-Metabolismus

Jeweils einzeln betrachtet scheinen Calcitriol und COX-2-Inhibitoren antikanzerogene Wirkstoffe in Hinblick auf Prävention und Therapie von Mammakarzinom-erkrankungen zu sein. Darüber hinaus ist das geringe Nebenwirkungsspektrum durch eine vergleichsweise sanfte Wirkungsweise ein weiterer Vorteil. So entwickelte sich die Idee, ob die beiden Substanzen kombiniert eine verstärkt wachstumshemmende, gemeinsame Wirkung aufweisen könnten. An Prostatakarzinomzellen lieferten diverse Studien bereits vielversprechende Ergebnisse [70, 117]. So bewirkte eine kombinierte Behandlung mit Calcitriol und dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 sowie eine Kombination aus Calcitriol und nicht-selektiven COX-2-Inhibitoren eine synergistische Wachstumshemmung an malignen Prostatakarzinomzellen [70, 117]. Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, dass die jeweilige Substanz bei kombinierter Anwendung für den gleichen Effekt geringer dosiert werden kann [70, 117]. Zudem wurde bereits eine klinische Studie mit der Kombination aus Calcitriol und dem nicht-selektiven COX-2-Inhibitor Naproxen an Patienten mit Prostatakarzinomrezidiv durchgeführt. Durch die kombinierte Behandlung konnte ein verlangsamter Anstieg des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) gezeigt werden [147]. Zusätzlich konnten Moreno *et al.* einen direkten Einfluss von Calcitriol auf den Prostaglandin-Metabolismus nachweisen. So inhibierte Calcitriol an Prostatakarzinomzellen die Expression der COX-2 und regulierte die 15-PGDH-Expression hoch. Außerdem verminderte Calcitriol die Sekretion von PGE₂ sowie die Expression der Prostaglandin E (EP₂)- und F-Rezeptoren [117]. Auch bei *in vitro* Enzymassays konnte eine selektive Inhibition der COX-2 durch Calcitriol gezeigt werden, die COX-1 hingegen wurde nicht inhibiert [9]. Auch die inaktive Vorstufe des Vitamin D, Cholecalciferol, zeigte einen Einfluss auf den Prostaglandin-Metabolismus. Erhielten gesunde Frauen einen Monat lang 2000 IE Cholecalciferol täglich, so reduzierte sich die PGE₂- und die COX-2-Expression im Mammagewebe [130]. Die insgesamt sehr vielversprechenden Studienergebnisse deuten eine Interaktion zwischen dem Vitamin D-

und dem Prostaglandin-Metabolismus an und führten dazu, dass auch beim Mammakarzinom bereits erste Studien zu einem potentiellen Zusammenhang zwischen den beiden Stoffwechselwegen durchgeführt wurden. So konnten Thill *et al.* beim Mammakarzinom eine Dysregulation der Enzyme der beiden Stoffwechselwege zeigen. Sowohl an malignem Mammakarzinomgewebe als auch bei den malignen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 war die Proteinexpression der COX-2 und der 15-PGDH im Vergleich zu benignem Gewebe und Zellen erhöht, die Expression des VDR war deutlich vermindert [161, 162, 164]. Zudem wurden bei Mammakarzinompatientinnen, die älter als 45 Jahre waren, im Winter im Vergleich zu gesunden Frauen signifikant geringere Calcidiol- und höhere PGE₂-Spiegel gemessen [162]. Auch beim Ovarialkarzinom konnte *in vitro* und *in vivo* eine solche Dysregulation festgestellt werden [163]. Eine derartige Befundkonstellation kann einen potentiellen Zusammenhang der beiden Stoffwechselwege andeuten.

Diese vielversprechenden Ergebnisse führten dazu, mögliche gemeinsame Wirkungen und Interaktionen von Substanzen des Vitamin D- und Prostaglandinstoffwechsels in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen.

1.5 Fragestellung

Der Entwicklung neuer präventiver und therapeutischer Therapieansätze für das Mammakarzinom kommt schon deshalb eine große Bedeutung zu, weil es die häufigste maligne Erkrankung der Frau ist. Studienergebnisse über antikanzerogene Effekte von Calcitriol und COX-2-Inhibitoren sowie eine mögliche, gegenseitige Beeinflussung beider Stoffwechselwege stellen potentielle präventive und therapeutische Behandlungsansätze in Aussicht. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Calcitriol, das Vitamin D-Analogon Calcipotriol und COX-2-Inhibitoren jeweils einzeln einen Einfluss auf das Wachstum von Mammakarzinomzellen haben und ob sie in einer Kombinationsbehandlung eine verstärkte, gemeinsame Wirkung auf das Mammakarzinomzellwachstum aufweisen. Ferner wird betrachtet, ob ein Zusammenhang zwischen den Stoffwechselwegen des Vitamin D- und des Prostaglandinhaushalts bei Mammakarzinomzellen besteht.

Für die Versuche werden die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 eingesetzt, die sich hinsichtlich ihrer Steroidrezeptorexpression und Invasivität unterscheiden. Die Zelllinien werden mit Calcitriol, dem Vitamin D-Analogon Calcipotriol, zwei selektiven und einem nicht-selektiven COX-2-Inhibitor sowie einer Kombination aus den hinsichtlich der Zellwachstumsreduktion potentesten Substanzen behandelt. Es wird der Einfluss auf das Zellwachstum und auf die Expression von Proteinen des Vitamin D- und des Prostaglandinstoffwechsels untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, folgende Fragen zu beantworten:

- Wird das Wachstum von Mammakarzinomzellen durch Calcitriol, das Vitamin D-Analogon Calcipotriol, die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und NS-398, oder durch den nicht-selektiven COX-2-Inhibitor Naproxen beeinflusst?
- Führt eine Kombinationsbehandlung mit Calcitriol und einem COX-2-Inhibitor im Vergleich zu den Einzelbehandlungen zu einer verstärkten Wachstumsinhibition von Mammakarzinomzellen?
- Interagieren Calcitriol und COX-2-Inhibitoren, jeweils einzeln und in Kombination, mit den Enzymen des jeweils anderen Stoffwechselweges?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Die Zelllinien MCF-7 (American Type Culture Collection (ATCC); Nr. HTB-22) und MDA-MB-231 (ATCC; Nr. HTB-26) wurden von der Firma LGC-Standards, Wesel bezogen.

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

RPMI 1640 Medium (L-Glutamin, 25 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES))	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, 25 mM HEPES)	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Bovines Serum (FBS), Mycoplex	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ceftazidim hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypsin-Ethylendiamintetraessig- säure (EDTA), UV behandelt	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

2.1.3 Zellkulturzubehör

Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Geräte

Autoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Biometra Thermocycler TPersonal 48	Biometra GmbH, Göttingen
Biophotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank	NuAire, Plymouth, MN, USA
DNA Engine Opticon 2 Real-Time Cycler	Biozym, Oldendorf
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Reader	Dynatech, Burlington, MA, USA

Inverses Mikroskop (Axiovert 135M)
Mikrozentrifuge Rotilabo®
Rüttler, Shaker S4

Thermomixer kompakt
Vortex (Assistent Reamix 2789)
Waage (ScaTec, SBC21)
Wasserbad
Wippschüttler, Titramax 100
Zellkulturzentrifuge
Zentrifuge (2K15)

Carl Zeiss, Göttingen
Roth, Karlsruhe
ELMI Laboratory Equipment, Riga,
Lettland
Eppendorf AG, Hamburg
Hecht-Assistent, Sondheim
Scaltec Instruments, Göttingen
Memmert, Schwabach
Heidolph, Schwabach
Hettich, Tuttlingen
Sigma, Osterode

2.1.5 Allgemeine Labormaterialien

Kryogefäße
Multipette Plus
Pasteurpipetten

Pipettenspitzen
Pipetus Akku
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)
Transferpette-8
Variable Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
6-Well-Platte
96-Well-Platte (Flat Bottom)
Zellkulturpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), Cellstar
Zellschaber
Zentrifugenröhrchen (Plastik, 15 ml, 50 ml)

Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf AG, Hamburg
Glaswarenfabrik Karl Hecht
GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön
Sarstedt, Nümbrecht
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Eppendorf AG, Hamburg
Brand, Wertheim
Eppendorf AG, Hamburg
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Greiner Bio-One, Frickenhausen
Biochrom AG, Berlin
Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.6 Assays

Bicinchoninic acid (BCA)TM Protein Assay Kit

Zellproliferations-ELISA, Bromdesoxy-
uridin (BrdU) (kolorimetrisch)

Pierce, Thermo Fisher Scientific,
Bonn

Roche, Mannheim

2.1.7 Westernblot Zubehör

Filmkassette Amersham	GE Healthcare, München
Filterpapier (Chromatographiepapier)	Whatman, GE Healthcare, München
Gelelektrophorese Blotapparatur	Biorad, München
Hyperfilm ECL Amersham	GE Healthcare, München
Immobilon Western, Chemiluminescent Horseradish-Peroxidase (HRP) Substrate	Millipore, Schwalbach
Minigelapparatur	Biorad, München
Nitrozellulosetransfermembran	Whatman, GE Healthcare, München
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Biorad, München
Tank Blot System	GE Healthcare, München

2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion Zubehör

Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Platinum [®] SYBR [®] Green real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) Super Mix UDG	Invitrogen, Karlsruhe
Qiazol [®] Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript [™] II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Ultra PURE [™] Distilled Water (DNase, RNase frei)	Invitrogen, Karlsruhe
UVette [®] , 260 – 1600 nm	Eppendorf AG, Hamburg
96-Well Multiply [®] -PCR Platte	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese Zubehör

Geldokumentationssystem	Phase GmbH, Lübeck
6x Gel loading dye blue	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Low Molecular Weight Marker	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Mini-Sub [®] Cell GT Elektrophorese-Kammer	Biorad, München

Stromgeber PowerPac 300
UV-Transilluminator TI 1

Biorad, München
Biometra GmbH, Göttingen

2.1.10 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
Agarose

Roth, Karlsruhe
Life Technologies GmbH,
Darmstadt

Ammoniumpersulfat (APS)

Biorad, München

Borsäure

Sigma-Aldrich, Steinheim

Bromphenolblau

Merck, Darmstadt

Chloroform z.A.

Th. Geyer, Renningen

Chlorwasserstoffsäure (HCl)

Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Merck, Darmstadt

Dithiothreitol

Sigma-Aldrich, Steinheim

EDTA

Sigma-Aldrich, Steinheim

Essigsäure 100 % (Eisessig)

Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid 1% (10 mg/ml)

Invitrogen, Karlsruhe

Glycerol

Merck, Darmstadt

Glycin

AppliChem GmbH, Darmstadt

Mammalian Protein Extraction Buffer (MPEB)

GE Healthcare, München

2-Mercaptoethanol

Serva Electrophoresis, Heidelberg

Methanol

Baker Chemikalien, Groß-Gerau

Milchpulver (Blotting Grade)

Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Serva Electrophoresis, Heidelberg

N,N-Dimethylformamid

Merck Schuchardt, Hohenbrunn

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)

Sigma-Aldrich, Steinheim

2-Propanol

Sigma Aldrich, Steinheim

Re-Blot Plus

Chemicon International, Hofheim

Röntgen Entwickler-Konzentrat

Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach

Röntgen Fixierer-Konzentrat

Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach

Schwefelsäure (H₂SO₄)

Baker Chemikalien, Groß-Gerau

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Tris

Roth, Karlsruhe

2.1.11 Testsubstanzen

Calcipotriol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calcitriol	IBL International, Hamburg
Celecoxib	Sigma-Aldrich, Steinheim
Naproxen	Sigma-Aldrich, Steinheim
NS-398	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.12 Antikörper im Westernblot

<i>Antikörper</i>	<i>Wirtsorganismus</i>	<i>Firma</i>
β-Aktin	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Steinheim
COX-2	Maus, monoklonal	Biomol GmbH, Hamburg; BD Transduction Laboratories™, Heidelberg
CYP24 (24-Hydroxylase)	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge
1α-Hydroxylase	Schaf, polyklonal	Antibodies-online GmbH, Aachen
15-PGDH	Kaninchen, polyklonal	Biomol GmbH, Hamburg
VDR	Ratte, monoklonal	Affinity Bio Reagents, Fisher Thermo Scientific, Bonn
ECL-anti-Mouse Immun- globulin G (IgG)-HRP	Schaf	GE Healthcare, München
ECL-anti-Rabbit IgG- HRP	Esel	GE Healthcare, München
ECL-anti-Rat IgG-HRP	Ziege	GE Healthcare, München
ECL-anti-Sheep IgG- HRP	Maus	Enzo Life Sciences, Lörrach

Tabelle 1. Verwendete Antikörper im Westernblot

2.1.13 PCR-Primer

Zielgen	Name / Primer Sequenzen	Amplikonlänge [bp]	Firma
<i>cox-2</i>	Hs_PTGS2_1_SG QuantiTect Primer Assay	68	Qiagen, Hilden
<i>Homo sapiens hypoxanthin-phosphoribosyl-transferase 1 (hprt1)</i> , House-keeping-Gen	<i>hprt1</i> forward: 5'-TCA GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG T-3' <i>hprt1</i> reverse: 5'-AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G-3'	84	Metabion, Martinsried

Tabelle 2. Verwendete Primer in der PCR. Die Amplikonlänge ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivieren der Zellen

Die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden in Zellkulturflaschen mit 15 ml Zellkulturmedium (RPMI 1640 Medium mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 µg/ml Ceftazidim) in einem Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wuchsen adhärent am 75 cm² großen Boden der Zellkulturflaschen.

2.2.2 Passagieren der Zellen

Die Zelllinien wurden passagiert, wenn sie nahezu Konfluenz erreicht hatten. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert, bis sie begannen, sich vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Die restlichen Zellen wurden abgeschlagen, die Suspension in ein Röhrchen überführt und 7 ml Zellkulturmedium mit 10 % FBS hinzugefügt, um die Trypsinaktivität durch das FBS zu stoppen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1 500 Umdrehungen (U)/min für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und anschließend wurde das Zellpellet mit 37 °C warmem Zellkulturmedium resuspendiert. Ein Drittel der Ausgangsmenge von MCF-7 bzw. ein Fünftel der Menge

von MDA-MB-231 wurde in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem, angewärmtem Zellkulturmedium ad 15 ml Zellkulturmedium überführt.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin inkubiert und pelletiert (siehe „Passagieren der Zellen“). Das Zellpellet wurde in 1,5 ml RPMI 1640 Zellmedium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Um beim Einfrieren die Kristallbildung zu vermeiden, wurde 5 % DMSO zugefügt, die Zellen zügig in ein Kryogefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

Zum schnellen Auftauen der Zellen wurde das Kryogefäß im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und der Inhalt in eine Zellkulturflasche mit 15 ml vorgelegtem, angewärmtem Zellkulturmedium überführt. Nachdem die Zellen am Boden der Zellkulturflaschen adhärent waren, wurde das Medium abgesaugt, um das DMSO zu entfernen, und 15 ml frisches, angewärmtes Zellkulturmedium zugegeben.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer

Die Neubauer Zählkammer ist ein Objektträger mit einer Vertiefung, die mit einem aufgelegten Deckglas einen Raum mit 0,1 mm Kammertiefe entstehen lässt. Am Boden der Kammer sind 4 Großquadrate mit je 16 Feldern eingeschliffen.

Die geerntete Zellsuspension wurde 1:1 mit 0,4 % Trypanblau gemischt und in diesen Raum gefüllt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur von passiven Membranen aufgenommen wird. Da tote Zellen im Gegensatz zu lebenden Zellen den blauen Farbstoff aufnehmen, können sie unter dem Lichtmikroskop von lebenden Zellen unterschieden und somit die lebenden Zellen gezählt werden. Bei einer Kammertiefe von 0,1 mm und einer Länge des Großquadrates von 1 mm beträgt das Volumen eines Großquadrates $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ } \mu\text{l}$. Um den Anteil lebender Zellen pro ml auszurechnen, wurde zunächst der Mittelwert der vier ausgezählten Großquadrate gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor 2 der Farbsuspension multipliziert. Um von dem ausgezählten Volumen von 0,1 μl auf die Zellzahl pro ml umzurechnen, multiplizierte man mit 10 000.

2.2.5 Wachstumsversuche

Für die Wachstumsversuche im MTT-Assay wurden 3 000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden (h) in Zellkulturmedium im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Zellen mit 100 µl Testsubstanzmedium behandelt, welches verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz enthielt. Die Testsubstanzen waren in DMSO gelöst und wurden 1:1 000 bzw. 1:500 mit dem RPMI 1640 Medium mit 3 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 µg/ml Ceftazidim verdünnt. Somit wurden Endkonzentrationen von 0,1 % bzw. 0,2 % DMSO bei den Testsubstanzmedien erreicht. Die jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurden mitgeführt. Bei den Wachstumsversuchen wurde mit 3 % FBS weniger FBS als in unbehandelter Zellkultur verwendet, da dieses die Effekte der Testsubstanzen überdecken könnte. Die Inkubationszeit mit den Testsubstanzen betrug 24 h für den BrdU-ELISA und 72 h für den MTT-Assay.

2.2.6 Bestimmung der Zellproliferation

2.2.6.1 MTT-Assay

Um den Einfluss einer Behandlung auf das Zellwachstum nach mehreren Tagen zu messen, wurde ein MTT-Wachstumsassay zur Bestimmung der Menge vitaler Zellen in einer Kultur durchgeführt. MTT ist ein gelbes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz, das in Zellen zu blauem, wasserunlöslichem Formazan verstoffwechselt wird. Der Anteil an umgewandeltem MTT ist somit ein indirektes Maß für die Anzahl lebender Zellen.

Für den MTT-Assay wurde das Testsubstanzmedium abgenommen und durch farbloses DMEM Medium mit MTT-Lösung (250 mg MTT in 50 ml PBS) ersetzt. Dann wurden die Zellen 4 h im Brutschrank inkubiert, bis sich sichtbare Kristalle bildeten. Anschließend wurden 100 µl MTT-Stopplösung (10 % SDS, 50 % N,N-Dimethylformamid, pH 4,7) pro Well hinzugegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Die Kristalle lösten sich und die Absorption der blauen Färbung wurde mit einem ELISA-Reader bei 560 nm und einem Referenzfilter von 650 nm photometrisch quantifiziert.

2.2.6.2 BrdU-ELISA

Der Zellproliferations-BrdU-ELISA misst die DNA-Syntheserate der Zellen und quantifiziert somit den Anteil proliferierender Zellen in einer Zellpopulation. Anstelle von Thymidin wird das Pyrimidinanalogon BrdU in die DNA eingebaut. In einer 96-Well-Platte wurden dafür 20 000 Zellen pro Well ausgesät, 24 h unter Standardbedingungen inkubiert und dann mit Calcitriol in verschiedenen Konzentrationen mit 3 % FBS im Medium behandelt. Nach 24 h wurde der BrdU-ELISA nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dies umfasste zu Anfang eine Inkubation mit BrdU für 2,5 h. Danach wurden die Zellen fixiert und denaturiert. Es wurde ein monoklonaler BrdU Antikörper zu den Zellen gegeben. Dieser Antikörper setzte ein nachfolgend hinzugefügtes Substrat um, welches an die Immunkomplexe band. Es kam zu einer Türkisfärbung. H_2SO_4 stoppte diese Reaktion und es erfolgte ein Farbumschlag nach Gelb. Die Platten wurden mit dem photometrischen ELISA-Reader bei 450 nm und einem Referenzfilter von 650 nm gemessen.

2.2.7 Vergleich der Proteinexpression nach Behandlung der Zellen

Der Westernblot ist ein Verfahren zur Darstellung und Quantifizierung von Proteinen. Dazu wurden zunächst Proteine aus den behandelten Zellen isoliert, in der Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend an eine Membran übertragen, um von dort durch Chemolumineszenz auf einem Film sichtbar gemacht zu werden.

2.2.7.1 Behandlung der Zellen zur Bestimmung der Proteinmenge

Für die Proteinextraktion aus den behandelten Zellen wurde MPEB verwendet. Dafür wurden 300 000 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte mit 1 ml Medium ausgesät, nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium durch 1 ml Stimulationsmedium ersetzt und für weitere 24 h inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen gewaschen. Zu der Zelllinie MDA-MB-231 wurden 70 μl und zu der Zelllinie MCF-7 80 μl MPEB pro Well gegeben und die Platten für mindestens 30 min bei -20°C eingefroren. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Platten schnell aufgetaut und für 30 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem Zellschaber vom Boden

abgeschabt und 20 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mehrfach auf dem Vortex geschüttelt. Die Suspension wurde für 25 min mit 15 000 U/min bei 4 °C zentrifugiert, um die Zellreste zu pelletieren. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in ein frisches Gefäß überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C eingefroren.

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde der BCA Protein Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wird Cu^{2+} durch die Proteine zu Cu^{1+} reduziert und ein bicinchoninhaltiges Reagenz hinzugefügt. Durch Bildung von Chelaten aus zwei Molekülen Bicinchoninsäure und einem Kupferion entsteht ein wasserlösliches, violett gefärbtes Produkt. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt die Farbintensität linear zu. In Doppelbestimmungen wurde eine 96-Well-Platte mit 25 µl Proteinstandards in Konzentrationen von 0 – 2 000 µg/ml und den jeweiligen Testproben (Proteine 1:10 mit aqua dest. verdünnt) befüllt. Anschließend wurden 200 µl Arbeitsreagenz pro Well hinzugegeben und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde im ELISA-Reader bei 560 nm gemessen. Mit den Extinktionswerten der Proteinstandards wurde eine Standardkurve erstellt. Aus der Formel, die die Funktion dieser Standardkurve beschreibt, konnten die Proteinkonzentrationen errechnet werden.

2.2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinlysate wurden entsprechend ihrer Konzentration mit aqua dest. verdünnt und 3:1 mit 4x Ladepuffer (125 mM TrisCl, 20 % Glycerol, 4 % SDS, 2 % 2-Mercaptoethanol, 0,001 % Bromphenolblau, pH 6,8) gemischt. Der Ansatz wurde 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Durch Anlagerung von SDS erhalten die Proteine eine gleichmäßig negative Gesamtladung, wodurch sie entsprechend ihrer Größe in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden können.

Zur geleelektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurde ein Gel hergestellt, welches aus einem Sammel- sowie einem Trenngel besteht. Das Trenngel wurde mit 10 % Acrylamid für die COX-2 und 24-Hydroxylase bzw.

12,5 % Acrylamid für die 15-PGDH, die 1 α -Hydroxylase und den VDR hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3 aufgeführt.

<i>Ingredienzien</i>	<i>Trenngel (10 %)</i>	<i>Trenngel (12,5 %)</i>	<i>Sammelgel (4 %)</i>
Acrylamid-Stammlösung (30 %)	3,33 ml	4,17 ml	335 μ l
TrisHCl 1,5 M, pH 8,8 0,5 M, pH 6,8	2,5 ml	2,5 ml	625 μ l
SDS (10 %)	100 μ l	100 μ l	25 μ l
aqua dest.	3,9 ml	3,07 ml	1,5 ml
APS (10 %)	130 μ l	130 μ l	50 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l	2,5 μ l

Tabelle 3. Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach Aushärten des Sammelgels wurden die Glasplatten mit dem Gel in eine Blotapparatur eingespannt und diese mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) gefüllt. Die Kämme wurden entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gespült. Dann wurden pro Tasche 15 μ l Proteinprobe mit einer Proteinmenge von 40 μ g aufgetragen. Eine Tasche wurde mit 3 μ l Proteinlängestandard befüllt. An die Blotapparatur wurde eine Spannung von 100 V angelegt, damit die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden konnten.

2.2.7.4 Westernblot

Mit einer Semi-Dry Blotapparatur wurden Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Drei Filterpapiere, eine Membran, das Gel und drei weitere Filterpapiere wurden übereinander geschichtet und in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) getränkt. Für 1,5 h wurde eine elektrische Spannung von 10 V an das System angelegt, sodass die Proteine aus dem Gel an die Membran migrierten.

2.2.7.5 Immundetektion der Proteine

Um freie Bindungsstellen für Antikörper auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für 1 h mit Tris-Buffered Saline mit Tween 20 (TBS-T) (100 mM Tris, 1 M

NaCl, 1 % Tween 20, 5 % Magermilchpulver) inkubiert. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in TBS-T und 5 % Magermilchpulver auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen und dann 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper auf einem Schüttler inkubiert und erneut 3 x 15 min mit TBS-T gewaschen.

Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Membran für 5 min mit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat überschichtet, welches zu gleichen Teilen aus einer Luminol- und einer Peroxidlösung besteht. Der Wirkmechanismus basiert darauf, dass Luminol durch Peroxid in Gegenwart der am zweiten Antikörper gebundenen HRP oxidiert wird und dann ein Lichtsignal emittiert. Die Lichtreaktion der Membran wurde in der Dunkelkammer für 30 s – 60 min mittels Autoradiographie auf Hyperfilm ECL abgebildet. Dieser wurde mit Fotochemikalien entwickelt, um die Banden darzustellen. Die Schwärzung des Films korrelierte mit der Menge des detektierten Proteins und wurde mit dem Computerprogramm E.A.S.Y. Win32, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, gemessen, nachdem der Film mit einem Durchlichtscanner digitalisiert wurde. Es wurde das Verhältnis der untersuchten Proteinbande zu der β -Aktinbande gebildet. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgten in 5 % Magermilchpulver in TBS-T.

<i>Protein</i>	<i>Größe [kDa]</i>	<i>Verdünnung der Primärantikörper</i>	<i>Sekundärantikörper</i>
β -Aktin	42	1:20 000 – 1:80 000	anti-Mouse-IgG-HRP
COX-2	72	1:500	anti-Mouse-IgG-HRP
15-PGDH	25	1:333 – 1:500	anti-Rabbit-IgG-HRP
VDR	54	1:20 000	anti-Rat-IgG-HRP
CYP24	59	1:500	anti-Rabbit-IgG-HRP
1 α -Hydroxylase	50	1:1 000	anti-Sheep-IgG-HRP

Tabelle 4. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper im Westernblot: Atomare Masseneinheiten in Kilodalton (kDa) der detektierten Proteine und eingesetzte Verdünnungen der Primärantikörper. Die Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:4 000 eingesetzt.

2.2.8 Vergleich der mRNA-Expression nach Behandlung der Zellen

Nach der Behandlung mit den Testsubstanzen wurde mRNA aus den Zellen extrahiert, welche durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wurde. Diese wurde in der qPCR amplifiziert, um so Rückschlüsse auf die eingesetzte mRNA-Menge ziehen zu können.

2.2.8.1 Behandlung der Zellen zur mRNA-Bestimmung

Es wurden 300 000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und 48 h in Zellkulturmedium inkubiert. Dann wurde das Medium vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und durch 1 ml Medium mit Testsubstanzen ersetzt. Die Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst und 1:1 000 in dem RPMI 1640 Medium mit 3 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 µg/ml Ceftazidim verdünnt. Die mitgeführte Kontrolle enthielt, genau wie das Medium mit den Testsubstanzen, 0,1 % DMSO. Die Inkubationszeit betrug 3 – 8 h.

2.2.8.2 RNA-Isolierung

Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen gewaschen. Pro Well wurde 1 ml Qiazol Lysisreagenz auf die Zellen gegeben, alles zügig resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, das Reaktionsgefäß wurde etwa 20 s kräftig geschüttelt, 2 min bei RT inkubiert und 15 min bei 4 °C mit 12 000 × g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden 500 µl 2-Propanol hinzugefügt, 10 min bei RT inkubiert und danach 10 min bei 4 °C mit 12 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol auf dem Vortex geschüttelt und 5 min bei 4 °C mit 7 500 × g zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 30 µl RNase freiem Wasser (Ultra Pure) resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min auf 60 °C erhitzt, um die RNA vollständig zu lösen und anschließend bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

2.2.8.3 RNA-Quantifizierung

Um die Konzentration der isolierten RNA zu ermitteln, wurden die Proben UV-spektrophotometrisch gemessen. Dazu wurde die isolierte RNA 1:20 mit TE-Puffer, pH 8,0 (10 mM Tris-Puffer, pH 8,0) verdünnt und gegen einen Leerwert mit reinem TE-Puffer, pH 8,0 gemessen. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration der RNA wurde durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Konzentration der RNA } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260\text{ nm}} \times 40\text{ }\mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Faktor 40 µg/ml ist für die Konzentrationsbestimmung einzelsträngiger RNA geeignet. Die Qualität der RNA kann durch das Verhältnis der OD von 260 nm zu 280 nm abgeschätzt werden. Für die vorliegende Arbeit wurde RNA mit einem Verhältnis von 2,1 - 2,4 verwendet.

2.2.8.4 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription, also die Herstellung von cDNA aus RNA, wurde die SuperScript™ II reverse Transkriptase verwendet. Dafür wurden 1 µg RNA, 1 µl Random Primer, 1 µl dNTP Mix und 9 µl RNase freies Wasser auf Eis pipettiert, kurz zentrifugiert, dann 5 min im Thermocycler bei 65 °C inkubiert, um die RNA zu denaturieren, und danach auf Eis gestellt. Anschließend wurden 6,5 µl eines Mastermixes, bestehend aus 4 µl 5-fach first-strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 0,5 µl SuperScript™ II reverse Transkriptase, zu den Proben gegeben und zunächst für 10 min bei 25 °C in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde 50 min bei 42 °C inkubiert. Die reverse Transkriptase benutzt die RNA als Matrize und synthetisiert eine zu der RNA komplementäre DNA (cDNA). Um eine mögliche DNA-Kontamination auszuschließen, wurde eine Kontrolle ohne die Zugabe reverser Transkriptase mitgeführt. Zum Stoppen der Reaktion wurde der Ansatz 15 min bei 70 °C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C eingefroren.

2.2.8.5 Real-Time quantitative PCR

Die qPCR ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte in mehreren Zyklen, wobei jeder Zyklus aus den Schritten Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisation besteht. Dabei wird der amplifizierte DNA-Abschnitt in mehreren Zyklen exponentiell vervielfältigt. Bei der qPCR kann die amplifizierte DNA nach jedem Amplifikationsschritt quantifiziert werden, indem fluoreszierende Signale von SYBR[®] Green gemessen werden. SYBR[®] Green ist ein Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Das fluoreszierende Signal ist proportional zu der Menge der amplifizierten DNA. Wenn das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht, lässt die Anzahl der dazu benötigten Zyklen Rückschlüsse auf die eingesetzte cDNA zu. Die Zykluszahlen werden mit einem parallel amplifizierten Housekeeping-Gen verglichen. Es wurde eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase und eine Kontrolle ohne Zugabe von cDNA mitgeführt, um Hintergrundsignale ausschließen zu können.

In der qPCR wurde das *cox-2*-Gen untersucht, als Referenzgen diente *hprt1*. Auf eine 96-Well Multiply-PCR Platte wurden pro Well 2 µl cDNA vorpipettiert. Dazu wurden je 23 µl eines Mixes mit den spezifischen Primern für *cox-2* und *hprt1* pipettiert. Für den *cox-2*-Mix wurde ein Ansatz aus 12,5 µl Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix UDG, 2,5 µl Qiagen 10 x Primer und 8 µl RNase freiem Wasser (Ultra Pure) hergestellt und vermischt. Der *hprt1*-Mix setzte sich aus 12,5 µl Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix UDG, 1 µl 10 µM Primer und 9,5 µl RNase freiem Wasser (Ultra Pure) zusammen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die 96-Well Multiply-PCR Platte wurde mit einer Folie verschlossen und für 1 min bei 1 000 U/min zentrifugiert. Dann wurde die Platte in den Real-Time Cycler gestellt und die qPCR gestartet.

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
1	Uracil-N-Glykosylase-Inaktivierung	50 °C	2 min	1
2	Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	2 min	1
3	Denaturieren der cDNA	95 °C	15 s	45
4 + 5	Primeranlagerung/Polymerisation	60 °C	30 s	45
6	Schmelzkurvenanalyse	60 °C – 90 °C	1 °C/s	1

Tabelle 5. qPCR-Programm

Die Schmelzkurvenanalyse wurde durchgeführt, um die Reinheit des Produktes zu überprüfen. Die Temperatur wurde in der Schmelzkurvenanalyse stetig erhöht. Das Produkt der qPCR, *cox-2*, weist eine spezifische Schmelztemperatur auf, bei der die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen und der interkalierende Farbstoff SYBR® Green freigesetzt wird. Dabei sollte nur ein Peak in der Schmelzkurve registriert werden, an dem das Fluoreszenzsignal abnimmt.

2.2.8.6 Auswertung der qPCR

Die in der qPCR erhaltenen Zykluszahlen wurden mit dem REST-Programm (Relative Expression Software Tool – Multiple Condition Solver, REST-MCS® - Version 2) mit der von Pfaffl beschriebenen Methode [126] ausgewertet. Die *cox-2*-Genexpression wurde zwischen den verschiedenen Proben verglichen und durch Bildung der Ratio (R) mit der Expression des Referenzgens *hprt1* normalisiert. Die Effizienz (E) gibt an, wie stark die DNA pro PCR-Zyklus vervielfältigt wurde. Eine Effizienz von 100 % bezeichnet eine Verdopplung der DNA-Menge und des Fluoreszenzsignals in einem PCR-Zyklus. Die Effizienz der qPCR für *cox-2* und *hprt1* wird mit einer Verdünnungsreihe von 1:10 verdünnten Standardproben bekannter Konzentration von cDNA durch die Formel $E = 10^{-1/m}$ (m = Steigung) errechnet. Beim Erreichen des Crossing Points (CP) übertrifft das emittierte Fluoreszenzsignal erstmals das Hintergrundsignal. Mit der Effizienz und den CP-Werten berechnet das Programm mit folgender Formel die Ratio [126].

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}} (MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}} (MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Behandlung})}}$$

In der oben genannten Formel werden, unter Einbeziehung der Effizienz, die Expressionsunterschiede der Mittelwerte (MW) der Behandlung und der Kontrolle des Zielgens ins Verhältnis zu den mittleren Expressionsunterschieden des Referenzgens *hprt1* gesetzt.

2.2.8.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung des qPCR-Produktes

Nach der qPCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese zur Verifizierung des DNA-Produktes durchgeführt. Zur Kontrolle lief ein Marker mit, der DNA-Abschnitte bekannter Größen enthielt. Für das Gel wurden unter dem Abzug 50 ml 2 % Agarose in TBE (0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,025 M EDTA) bis zum vollständigen Auflösen aufgekocht. Anschließend wurde das Gemisch auf 60 °C abgekühlt und 5 µl einer 1 % Ethidiumbromidlösung hinzugefügt. Der Ansatz wurde in die Gelgießapparatur gegossen und ein Kamm zur Bildung der Ladetaschen hineingesteckt. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden je 10 µl der DNA-Probe oder des Molekulargewichtsmarkers gemischt mit 2 µl 6x Probenpuffer in eine Tasche aufgetragen. Für 80 min wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Die aufgetrennten Banden wurden im UV-Licht dargestellt und durch ein Geldokumentationssystem erfasst.

2.2.9 Statistik

Alle Experimente wurden unabhängig voneinander dreimal wiederholt, soweit nicht anders angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Software, Version 5.03, 2009, La Jolla, CA, USA. Es wurde die einfaktorielle ANOVA als Varianzanalyse und Dunnett's Multiple Comparision Test als Post-Hoc-Test zum Vergleich der behandelten Proben jeweils mit der Kontrollgruppe durchgeführt. Beim Vergleich von lediglich zwei Datensätze wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Vitamin D und Vitamin D-Analoga auf das Zellwachstum

3.1.1 Einfluss von Calcitriol auf die Zellproliferation im BrdU-ELISA

Der Effekt von Calcitriol auf die Proliferation der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde im ELISA nach BrdU-Inkorporation im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der die Zellen nur mit dem Lösungsmittel DMSO in entsprechender Konzentration behandelt wurden, gemessen. Die Zellen wurden 24 h lang mit Calcitriolkonzentrationen von 0,001 μM bis 10 μM behandelt. Beide Zelllinien wurden signifikant und dosisabhängig in der Proliferation inhibiert. Die BrdU-Inkorporation der Zelllinie MCF-7 wurde durch 0,001 μM Calcitriol signifikant auf $0,72 \pm 0,14$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt, durch 0,01 μM signifikant auf $0,58 \pm 0,07$, durch 0,05 μM signifikant auf $0,52 \pm 0,09$, durch 0,1 μM signifikant auf $0,54 \pm 0,13$, durch 1 μM signifikant auf $0,4 \pm 0,06$ und durch 5 μM signifikant auf $0,16 \pm 0,07$ reduziert. Nach der Behandlung mit 10 μM Calcitriol konnte bei MCF-7 keine Zellteilungsaktivität mehr gemessen werden ($0,0 \pm 0,0$). Bei der Zelllinie MDA-MB-231 wurde die Proliferation durch 0,01 μM Calcitriol signifikant auf $0,81 \pm 0,05$, durch 0,05 μM signifikant auf $0,69 \pm 0,1$, durch 0,1 μM signifikant auf $0,63 \pm 0,11$, durch 1 μM signifikant auf $0,49 \pm 0,13$, durch 5 μM signifikant auf $0,28 \pm 0,14$ und durch 10 μM signifikant auf $0,29 \pm 0,1$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Eine Behandlung mit 0,001 μM Calcitriol hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation von MDA-MB-231 ($0,91 \pm 0,15$).

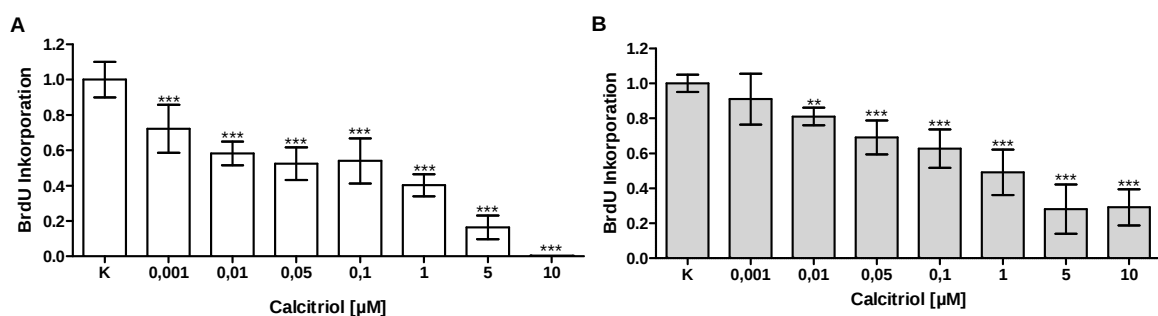


Abbildung 3. Einfluss von Calcitriol auf die Proliferation der Zelllinien MCF-7 (**A**, □) und MDA-MB-231 (**B**, □), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K). Die Zellproliferation wurde im BrdU-ELISA gemessen. Die Versuche wurden als Triplikat mit drei Wiederholungen durchgeführt, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.2 Einfluss von Calcitriol auf das Zellwachstum im MTT-Assay

Der Einfluss von Calcitriol auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde im MTT-Assay gemessen. Die Zellen wurden 72 h lang mit Calcitriolkonzentrationen von 0,001 μM bis 50 μM behandelt. Die unterschiedlichen Behandlungen wurden jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle, in der die Zellen nur mit dem Lösungsmittel DMSO in entsprechender Konzentration behandelt wurden, gesetzt. Die Zelllinie MCF-7 wurde im Wachstum durch 0,01 μM Calcitriol signifikant auf $0,92 \pm 0,1$, durch 0,1 μM signifikant auf $0,83 \pm 0,12$, durch 1 μM signifikant auf $0,77 \pm 0,09$ und durch 10 μM Calcitriol signifikant auf $0,49 \pm 0,13$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($1,0 \pm 0,1$) gehemmt. Eine Behandlung mit 0,001 μM Calcitriol hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zelllinie MCF-7 ($0,97 \pm 0,08$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Nach Behandlung mit 50 μM Calcitriol war keine Zellaktivität von MCF-7 mehr messbar ($0,02 \pm 0,03$). Das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 wurde durch die Behandlung mit Calcitriol nicht wesentlich beeinflusst. Durch 10 μM Calcitriol wurde das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nicht signifikant ($0,98 \pm 0,09$) verändert. Nach einer Behandlung mit 50 μM Calcitriol konnte keine Aktivität der Zelllinie MDA-MB-231 mehr gemessen werden ($0,004 \pm 0,005$).

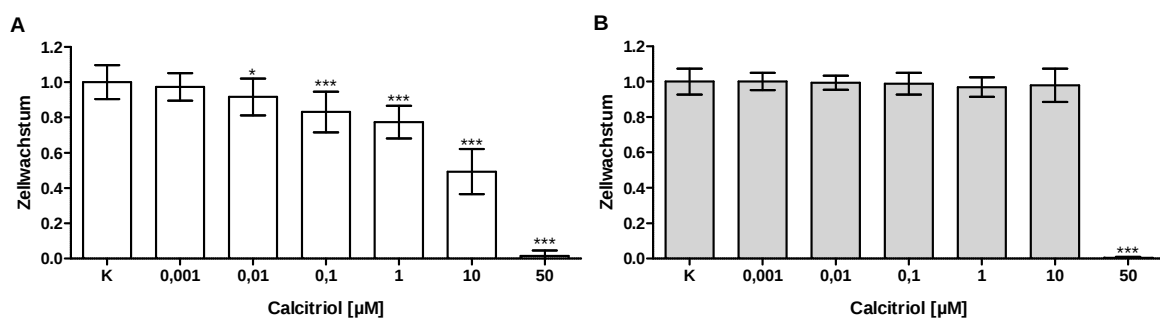


Abbildung 4. Einfluss von Calcitriol auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 (A, □) und MDA-MB-231 (B, □), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K), im MTT-Assay. Die Werte repräsentieren drei Wiederholungen der Versuche mit jeweils Anzahl (n) = 6, bzw. n = 12 für die Lösungsmittelkontrollen, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3.1.3 Einfluss von Calcipotriol auf das Zellwachstum im MTT-Assay

Der Einfluss von Calcipotriol auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde nach einer 72-stündigen Behandlung der Zellen mit Calcipotriolkonzentrationen von 0,001 μM bis 100 μM im MTT-Assay gemessen. Das Vitamin D-Analogon Calcipotriol inhibierte das Wachstum der Zelllinie MCF-7 dosisabhängig. Durch 0,01 μM Calcipotriol wurde das Zellwachstum von MCF-7 signifikant auf $0,93 \pm 0,06$, durch 0,05 μM signifikant auf $0,86 \pm 0,07$, durch 0,1 μM signifikant auf $0,85 \pm 0,08$, durch 1 μM signifikant auf $0,86 \pm 0,05$ und durch 10 μM signifikant auf $0,64 \pm 0,04$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Mit 0,001 μM Calcipotriol konnte das Zellwachstum von MCF-7 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nicht signifikant beeinflusst werden ($0,97 \pm 0,05$). Konzentrationen von 50 μM und 100 μM führten dazu, dass bei MCF-7 keine Zellaktivität mehr detektiert werden konnte ($0,07 \pm 0,06$ bzw. $0,002 \pm 0,005$). Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde bis zu einer Konzentration von 1 μM nicht wesentlich durch die Behandlung von Calcipotriol beeinflusst (durch 0,001 μM signifikant auf $1,08 \pm 0,07$ und durch 1 μM nicht signifikant auf $1,04 \pm 0,08$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle). Inkubierte man die Zelllinie MDA-MB-231 mit 10 μM Calcipotriol, so wurde das Zellwachstum signifikant auf $0,94 \pm 0,07$ reduziert. Nach Behandlung mit den Konzentrationen 50 μM und 100 μM war keine Zellaktivität bei MDA-MB-231 mehr messbar ($0,05 \pm 0,04$ bzw. $0,004 \pm 0,009$).

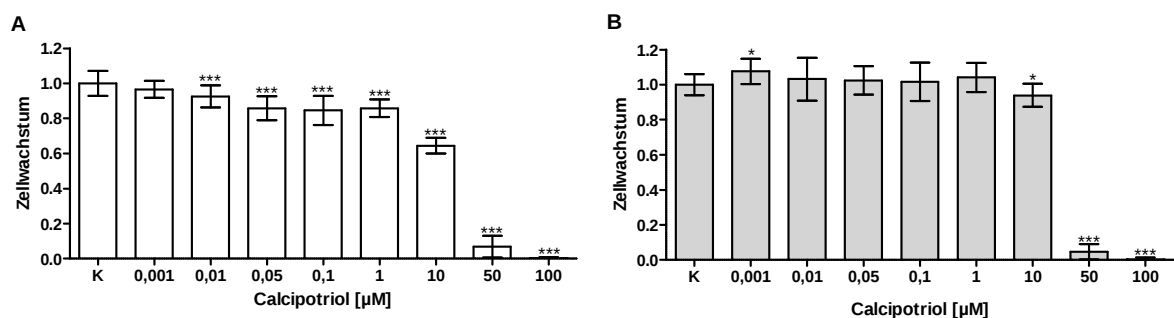


Abbildung 5. Einfluss von Calcipotriol auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 (A, □) und MDA-MB-231 (B, □), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K), im MTT-Assay. Die Werte repräsentieren drei Wiederholungen der Versuche mit jeweils $n = 6$, bzw. $n = 12$ für die Lösungsmittelkontrollen, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3.2 Einfluss von selektiven und nicht-selektiven COX-2-Inhibitoren auf das Zellwachstum im MTT-Assay

3.2.1 Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib auf das Zellwachstum im MTT-Assay

Der Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde im MTT-Assay gemessen. Dafür wurden die Zellen 72 h lang mit Celecoxibkonzentrationen von 0,001 μM bis 100 μM behandelt. Das Wachstum der Zelllinie MCF-7 wurde bis zu einer Konzentration von 1 μM nicht signifikant durch Celecoxib beeinflusst (1 μM Celecoxib: $0,95 \pm 0,14$). Durch 10 μM Celecoxib wurde das Zellwachstum von MCF-7 signifikant auf $0,81 \pm 0,09$ und durch 50 μM signifikant auf $0,22 \pm 0,11$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Nach einer Behandlung mit 100 μM Celecoxib konnte keine Zellaktivität bei MCF-7 mehr gemessen werden ($0,002 \pm 0,004$). Auch bei der Zelllinie MDA-MB-231 hatte Celecoxib bis zu einer Konzentration von 1 μM keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum (1 μM Celecoxib: $0,94 \pm 0,04$). Durch 10 μM Celecoxib wurde das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 signifikant auf $0,88 \pm 0,08$ und durch 50 μM signifikant auf $0,49 \pm 0,32$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduziert. Auch bei MDA-MB-231 konnte nach einer Behandlung mit 100 μM Celecoxib keine Zellaktivität mehr detektiert werden ($0,001 \pm 0,003$).

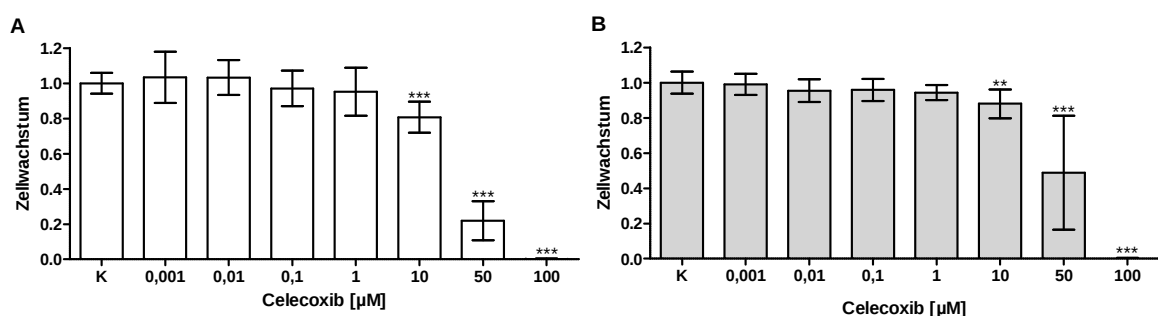


Abbildung 6. Einfluss von Celecoxib auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 (A, □) und MDA-MB-231 (B, ■), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K), im MTT-Assay. Die Werte repräsentieren drei Wiederholungen der Versuche mit jeweils $n = 6$, bzw. $n = 12$ für die Lösungsmittelkontrollen, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.2 Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 auf das Zellwachstum im MTT-Assay

Der Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde nach einer 72-stündigen Behandlung der Zellen im MTT-Assay gemessen. Es wurden NS-398-Konzentrationen von 0,001 μ M bis 100 μ M verwendet. Das Wachstum der Zelllinie MCF-7 wurde durch NS-398 in den Konzentrationen von 0,001 μ M bis 10 μ M um ca. 10 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduziert. So senkte 0,001 μ M NS-398 das Zellwachstum signifikant auf $0,88 \pm 0,07$, 0,01 μ M signifikant auf $0,91 \pm 0,07$ und 10 μ M signifikant auf $0,87 \pm 0,07$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Durch 50 μ M wurde das Zellwachstum von MCF-7 signifikant auf $0,8 \pm 0,09$ und durch 100 μ M signifikant auf $0,43 \pm 0,02$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle inhibiert. Das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 wurde erst ab einer Konzentration von 1 μ M signifikant durch NS-398 inhibiert ($0,89 \pm 0,07$). Durch 10 μ M wurde das Zellwachstum von MDA-MB-231 signifikant auf $0,87 \pm 0,11$, durch 50 μ M signifikant auf $0,78 \pm 0,21$ und durch 100 μ M signifikant auf $0,48 \pm 0,03$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Konzentrationen von 0,001 μ M bis 0,1 μ M NS-398 hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-213 (0,001 μ M NS-398: $0,95 \pm 0,04$ und 0,1 μ M NS-398: $0,95 \pm 0,05$).

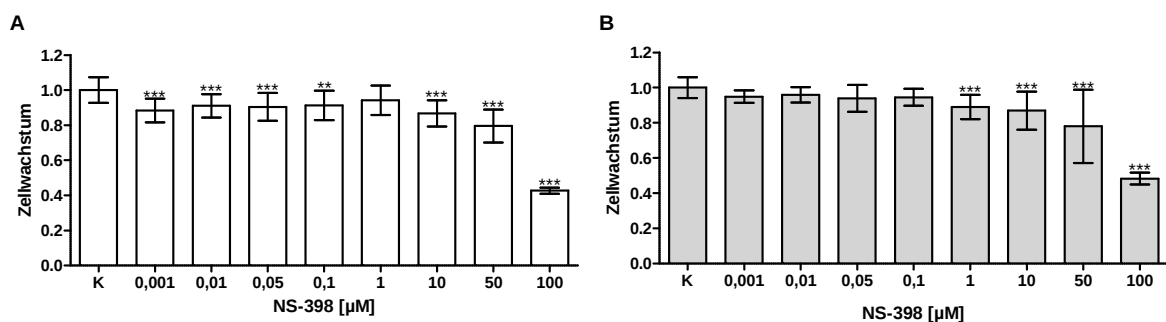


Abbildung 7. Einfluss von NS-398 auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 (A, □) und MDA-MB-231 (B, □), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K), im MTT-Assay. Die Werte repräsentieren drei Wiederholungen der Versuche mit jeweils $n = 6$, bzw. $n = 12$ für die Lösungsmittelkontrollen, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.3 Einfluss des nicht-selektiven COX-2-Inhibitors Naproxen auf das Zellwachstum im MTT-Assay

Der Einfluss des nicht-selektiven COX-2-Inhibitors Naproxen auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde nach einer 72-stündigen Behandlung der Zellen mit Naproxenkonzentrationen von 0,001 μM bis 100 μM im MTT-Assay gemessen. Das Wachstum der Zelllinie MCF-7 wurde durch 0,001 μM des nicht-selektiven COX-2 Inhibitors Naproxen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant auf $0,85 \pm 0,12$ gesenkt. Den stärksten Einfluss auf das Wachstum der Zelllinie MCF-7 hatte Naproxen bei einer Konzentration von 0,1 μM und 1 μM , bei der das Zellwachstum signifikant auf $0,77 \pm 0,08$ bzw. auf $0,77 \pm 0,12$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt wurde. Bei höheren Konzentrationen stieg das Zellwachstum signifikant leicht an. Durch 50 μM Naproxen wurde das Zellwachstum von MCF-7 signifikant auf $0,91 \pm 0,08$ und durch 100 μM signifikant auf $0,93 \pm 0,09$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduziert. Das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 wurde durch 0,001 μM Naproxen signifikant auf $0,92 \pm 0,07$ und durch 50 μM Naproxen signifikant auf $0,94 \pm 0,07$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Die übrigen Konzentrationen hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 (Durch 100 μM Naproxen: $0,95 \pm 0,1$).

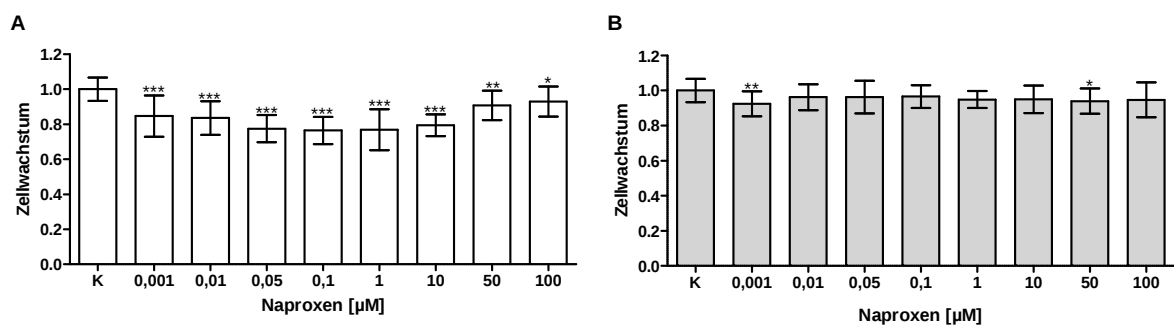


Abbildung 8. Einfluss von Naproxen auf das Wachstum der Zelllinien MCF-7 (A, □) und MDA-MB-231 (B, □), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K), im MTT-Assay. Die Werte repräsentieren drei Wiederholungen der Versuche mit jeweils $n = 6$, bzw. $n = 12$ für die Lösungsmittelkontrollen, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3 Einfluss der Kombination von Calcitriol und Celecoxib auf das Zellwachstum im MTT-Assay

3.3.1 Kombination von 1 μ M Calcitriol und Celecoxib bei der Zelllinie MCF-7

Der Einfluss von 1 μ M Calcitriol und verschiedenen Celecoxibkonzentrationen wurde, jeweils einzeln und in Kombination, auf das Zellwachstum von MCF-7 nach einer 72-stündigen Behandlung im MTT-Assay gemessen. Das Wachstum der Zelllinie MCF-7 wurde durch 1 μ M Calcitriol signifikant auf $0,93 \pm 0,08$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Durch 0,1 μ M und 1 μ M Celecoxib wurde das Zellwachstum nicht beeinflusst (mit 0,1 μ M Celecoxib nicht signifikant auf $1,03 \pm 0,07$, mit 1 μ M Celecoxib nicht signifikant auf $0,98 \pm 0,08$) und durch 10 μ M Celecoxib wurde es signifikant auf $0,74 \pm 0,06$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Die Kombination von 1 μ M Calcitriol mit 0,1 μ M Celecoxib hatte keinen Einfluss auf das Zellwachstum ($0,98 \pm 0,08$), in Kombination mit 1 μ M Celecoxib wurde das Zellwachstum signifikant auf $0,94 \pm 0,08$ und in Kombination mit 10 μ M Celecoxib signifikant auf $0,66 \pm 0,08$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt.

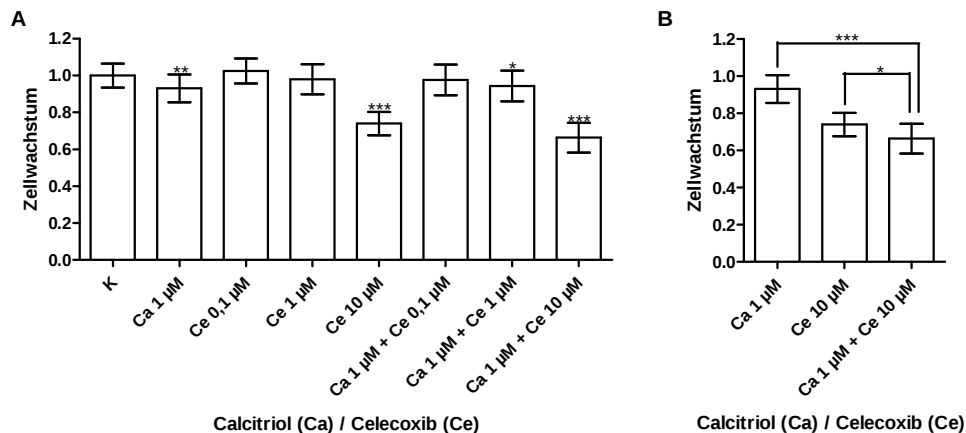


Abbildung 9. Einfluss von Calcitriol (Ca) und Celecoxib (Ce) allein und in Kombination auf das Wachstum der Zelllinie MCF-7 ($\square$), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K) im MTT-Assay (A). Die verstärkte Wachstumsinhibition der Zelllinie MCF-7 durch die Kombination von 1 μ M Calcitriol und 10 μ M Celecoxib war in Bezug auf die einzelnen Behandlungen mit 1 μ M Calcitriol und 10 μ M Celecoxib statistisch signifikant (B). Die Werte repräsentieren drei Wiederholungen der Versuche mit jeweils $n = 6$, bzw. $n = 12$ für die Lösungsmittelkontrollen, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.2 Kombination von 10 μ M Calcitriol und Celecoxib bei der Zelllinie MCF-7

Der Einfluss von 10 μ M Calcitriol und verschiedenen Celecoxibkonzentrationen wurde, jeweils einzeln und in Kombination, auf das Wachstum der Zelllinie MCF-7 nach einer 72-stündigen Behandlung im MTT-Assay gemessen. Das Wachstum der Zelllinie MCF-7 wurde durch 10 μ M Calcitriol signifikant auf $0,61 \pm 0,05$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Durch 0,1 μ M Celecoxib wurde das Zellwachstum von MCF-7 signifikant auf $0,95 \pm 0,11$, durch 1 μ M Celecoxib wurde es signifikant auf $0,9 \pm 0,08$ und durch 10 μ M Celecoxib signifikant auf $0,71 \pm 0,05$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt. Die Kombination von 10 μ M Calcitriol mit 0,1 μ M Celecoxib reduzierte das Zellwachstum von MCF-7 signifikant auf $0,56 \pm 0,03$, in Kombination mit 1 μ M Celecoxib signifikant auf $0,57 \pm 0,04$ und in Kombination mit 10 μ M Celecoxib signifikant auf $0,36 \pm 0,03$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

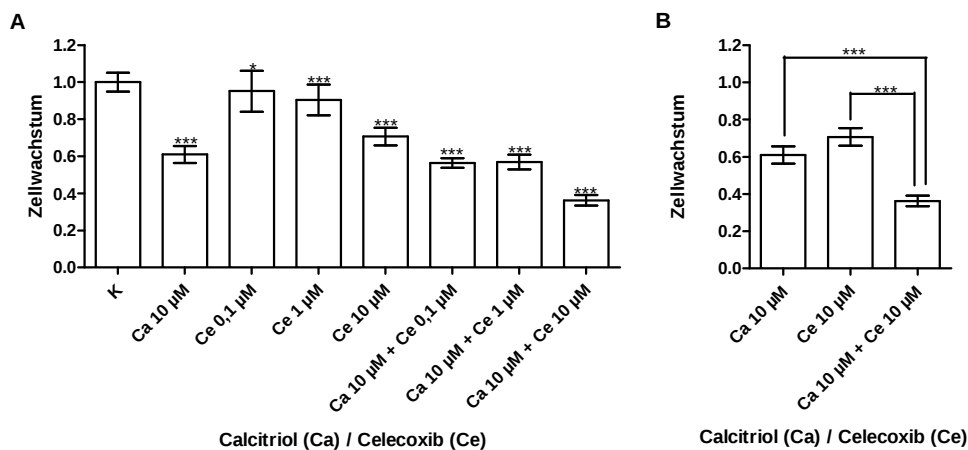


Abbildung 10. Einfluss von Calcitriol (Ca) und Celecoxib (Ce) allein und in Kombination auf das Wachstum der Zelllinie MCF-7 ($\square$), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K), im MTT-Assay (A). Die verstärkte Wachstumsinhibition der Zelllinie MCF-7 durch die Kombination von 10 μ M Calcitriol und 10 μ M Celecoxib war in Bezug auf die einzelnen Behandlungen mit 10 μ M Calcitriol und 10 μ M Celecoxib statistisch signifikant (B). Die Werte repräsentieren drei Wiederholungen der Versuche mit jeweils $n = 6$, bzw. $n = 12$ für die Lösungsmittelkontrollen, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3.3.3 Kombination von 10 μ M Celecoxib und Calcitriol bei der Zelllinie MDA-MB-231

Der Einfluss von 10 μ M Celecoxib und verschiedenen Calcitriolkonzentrationen wurde, jeweils einzeln und in Kombination, auf das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 nach einer 72-stündigen Behandlung im MTT-Assay gemessen. Das Zellwachstum von MDA-MB-231 wurde durch 10 μ M Celecoxib signifikant auf $0,88 \pm 0,04$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduziert. Durch 0,1 μ M Calcitriol wurde das Zellwachstum signifikant auf $1,09 \pm 0,07$ erhöht, durch 1 μ M Calcitriol wurde es nicht beeinflusst ($0,98 \pm 0,05$) und durch 10 μ M Calcitriol signifikant auf $0,9 \pm 0,07$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduziert. Bei den Kombinationsbehandlungen reduzierte die Kombination von 10 μ M Celecoxib mit 0,1 μ M Calcitriol das Zellwachstum von MDA-MB-231 signifikant auf $0,73 \pm 0,07$, in Kombination mit 1 μ M Calcitriol wurde das Zellwachstum signifikant auf $0,76 \pm 0,05$ und in Kombination mit 10 μ M Calcitriol signifikant auf $0,72 \pm 0,08$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt.

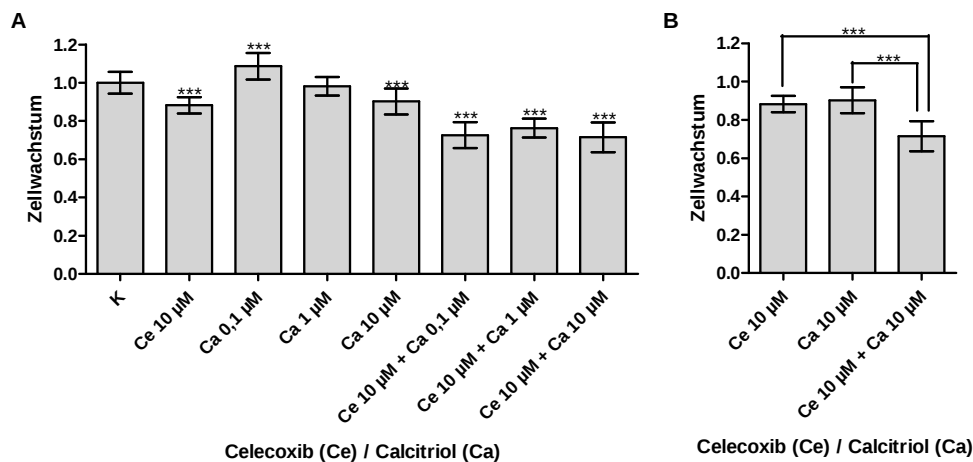


Abbildung 11. Einfluss von Calcitriol (Ca) und Celecoxib (Ce) allein und in Kombination auf das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 (□), jeweils in Bezug auf die Lösungskontrolle (K), im MTT-Assay (A). Die verstärkte Wachstumsinhibition durch die Kombination von 10 μ M Celecoxib und 10 μ M Calcitriol war in Bezug auf die einzelnen Behandlungen mit 10 μ M Celecoxib und 10 μ M Calcitriol statistisch signifikant (B). Die Werte repräsentieren drei Wiederholungen der Versuche mit jeweils $n = 6$, bzw. $n = 12$ für die Lösungsmittelkontrollen, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz: *** $p < 0,001$.

3.4 Einfluss von Calcitriol und Celecoxib auf die Proteinexpression im Westernblot

3.4.1 Einfluss auf die Expression von Prostaglandinstoffwechselproteinen

3.4.1.1 Einfluss auf die COX-2-Proteinexpression

Die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden für 24 h mit Calcitriol und Celecoxib einzeln und in Kombination inkubiert und die COX-2-Proteinexpression im Westernblot untersucht. Normalisiert mit der β -Aktin-Expression wurde die Proteinmenge von COX-2 nach der Behandlung mit der Lösungsmittelkontrollgruppe verglichen. Weder eine einzelne Behandlung mit 1 μ M Celecoxib ($1,37 \pm 0,2$) oder 1 μ M Calcitriol ($1,54 \pm 0,28$), noch die kombinierte Behandlung mit 1 μ M Calcitriol und 1 μ M Celecoxib ($2,08 \pm 0,66$) hatte einen signifikanten Einfluss auf die COX-2-Proteinexpression in der Zelllinie MDA-MB-231. Bei der Zelllinie MCF-7 konnte die COX-2-Proteinexpression im Westernblot nicht nachgewiesen werden. Auch nach einer Induktion durch Interleukin- β (IL- β) konnte keine COX-2-Proteinexpression dargestellt werden.

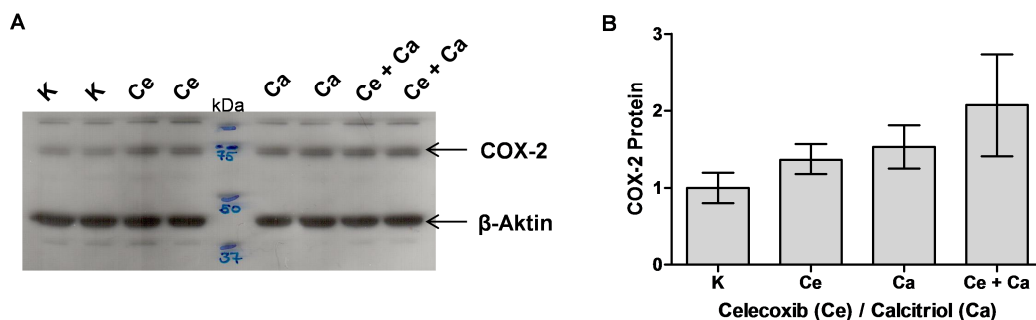


Abbildung 12. Einfluss von 1 μ M Celecoxib (Ce) und 1 μ M Calcitriol (Ca) allein und in Kombination auf die COX-2-Proteinexpression bei 72 kDa der Zelllinie MDA-MB-231 ($\square$), jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K). **A:** Proteinbanden im Westernblot. **B:** Die COX-2-Proteinexpression wurde in der computergestützten densitometrischen Analyse der Westernblots mit β -Aktin als Ladekontrolle quantifiziert. Die Versuche wurden als Duplet mit drei Wiederholungen des Westernblots durchgeführt. Es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben.

3.4.1.2 Einfluss auf die 15-PGDH-Proteinexpression

Mithilfe von Westernblots wurde der Einfluss von Calcitriol und Celecoxib einzeln und in Kombination auf die Proteinexpression der 15-PGDH in Mammakarzinomzelllinien untersucht. Bei der Zelllinie MCF-7 wurde die 15-PGDH-Proteinexpression weder durch 1 μ M Celecoxib ($0,90 \pm 0,15$), noch durch 1 μ M Calcitriol ($0,92 \pm 0,30$) oder durch deren Kombination ($0,86 \pm 0,24$) signifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle beeinflusst. Auch bei der Zelllinie MDA-MB-231 hatte weder eine Behandlung mit 1 μ M Celecoxib ($0,93 \pm 0,39$), noch mit 1 μ M Calcitriol ($0,96 \pm 0,22$) oder mit deren Kombination ($1,03 \pm 0,27$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle einen signifikanten Einfluss auf die 15-PGDH-Proteinexpression.

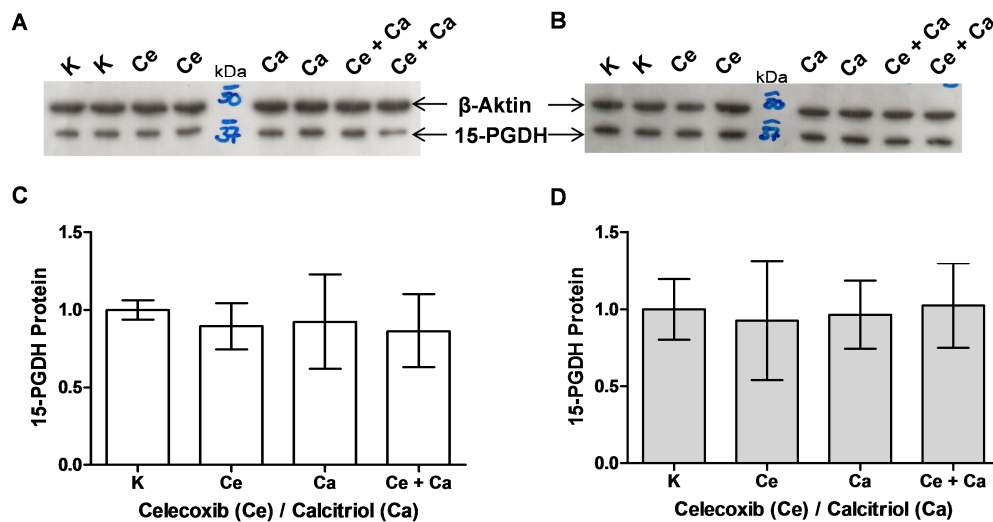


Abbildung 13. Einfluss von 1 μ M Celecoxib (Ce) und 1 μ M Calcitriol (Ca) allein und in Kombination auf die 15-PGDH-Proteinexpression bei 25 kDa der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K). Proteinbanden in den Westernblots der Zelllinien MCF-7 (**A**) und MDA-MB-231 (**B**). Die 15-PGDH-Proteinexpression wurde in der computergestützten densitometrischen Analyse der Westernblots mit β -Aktin als Ladekontrolle in den Zelllinien MCF-7 (**C**, $\square$) und MDA-MB-231 (**D**, $\square$) quantifiziert. Die Versuche wurden als Duplet mit drei Wiederholungen des Westernblots durchgeführt, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben.

3.4.2 Einfluss auf die Expression von Proteinen des Vitamin D-Stoffwechsels

3.4.2.1 Einfluss auf die 24-Hydroxylase-Proteinexpression

Der Einfluss von Calcitriol und Celecoxib einzeln und in Kombination auf die 24-Hydroxylase-Proteinexpression wurde bei beiden Zelllinien im Westernblot untersucht. Bei der Zelllinie MCF-7 ließ sich keine Proteinexpression der 24-Hydroxylase darstellen, auch nach einer Behandlung mit 1 μ M Celecoxib konnte diese nicht induziert werden. Erst nach einer Inkubation der MCF-7 Zellen mit 1 μ M Calcitriol ($1,00 \pm 0,26$) und mit der Kombination von Calcitriol und Celecoxib ($1,09 \pm 0,64$) war eine 24-Hydroxylase-Proteinexpression nachweisbar.

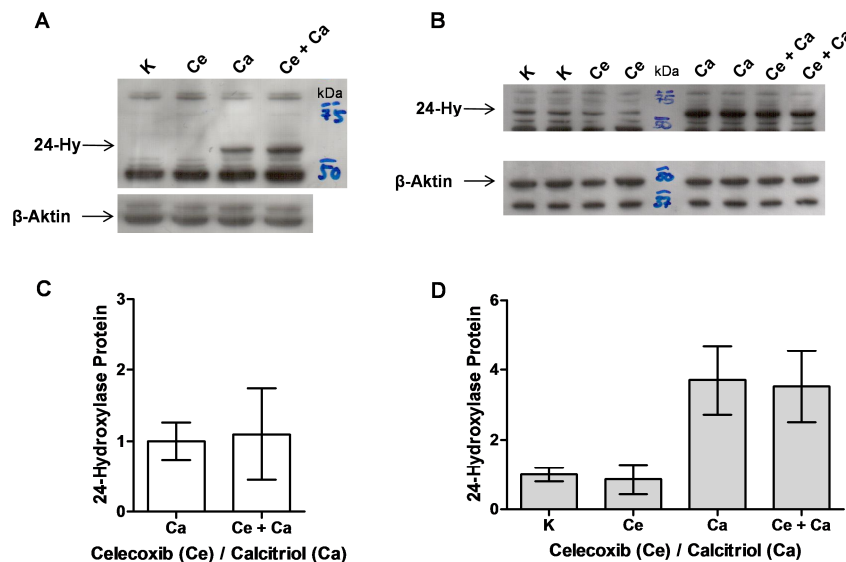


Abbildung 14. Einfluss von 1 μ M Celecoxib (Ce) und 1 μ M Calcitriol (Ca) allein und in Kombination auf die 24-Hydroxylase (24-Hy)-Proteinexpression bei 59 kDa der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, jeweils in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (K). Proteinbanden in den Westernblots der Zelllinien MCF-7 (A) und MDA-MB-231 (B). Die 24-Hydroxylase-Proteinexpression wurde in der computergestützten densitometrischen Analyse der Westernblots mit β -Aktin als Ladekontrolle in den Zelllinien MCF-7 (C, $\square$) und MDA-MB-231 (D, $\square$) quantifiziert. Die Versuche wurden als Duplet mit drei Wiederholungen des Westernblots durchgeführt, es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben.

Bei der Zelllinie MDA-MB-231 war ohne vorherige Behandlung eine 24-Hydroxylase-Proteinexpression messbar. Eine Behandlung mit 1 μ M Celecoxib ($0,86 \pm 0,43$) hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die 24-Hydroxylase-Proteinexpression der Zelllinie MDA-MB-231. Die Behandlung mit 1 μ M Calcitriol ($3,71 \pm 0,99$) und mit der Kombination von Calcitriol und Celecoxib ($3,52 \pm 1,02$) erhöhte die 24-Hydroxylase-Proteinexpression bei der Zelllinie MDA-MB-231 tendenziell im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

3.4.2.2 Einfluss auf die 1 α -Hydroxylase- und VDR-Proteinexpression

Es gelang bei beiden Zelllinien nicht, eine Proteinexpression der 1 α -Hydroxylase bei 50 kDa oder des VDR bei 54 kDa im Westernblot darzustellen. Auch nach einer Behandlung der Zellen mit Calcitriol, Celecoxib und deren Kombination ließ sich keine Proteinexpression der 1 α -Hydroxylase oder des VDR darstellen.

3.5 Einfluss von Calcitriol und Celecoxib auf die *cox-2*-mRNA-Expression in der qPCR

Die *cox-2*-mRNA-Expression der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde mittels qPCR nach 3 – 8 h Behandlung mit 1 μ M Calcitriol, 1 μ M Celecoxib und deren Kombination untersucht. Die Behandlungen wurden jeweils in Bezug zu der Lösungsmittelkontrolle gesetzt, bei der die Zellen nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden. Als Referenzgen diente *hprt1*. Die *cox-2*-mRNA-Expression der Zelllinie MCF-7 wurde durch die Behandlung mit 1 μ M Celecoxib tendenziell auf $0,78 \pm 0,29$ und durch 1 μ M Calcitriol tendenziell auf $0,59 \pm 0,42$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die Kombination von Calcitriol und Celecoxib hatte keinen signifikanten Einfluss ($0,95 \pm 0,27$) auf die *cox-2*-mRNA-Expression der Zelllinie MCF-7. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 wurde die Expression der *cox-2*-mRNA durch 1 μ M Celecoxib tendenziell auf $0,78 \pm 0,37$ und durch 1 μ M Calcitriol tendenziell auf $0,58 \pm 0,13$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gesenkt, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Eine Kombination von Calcitriol und Celecoxib hatte keinen signifikanten Einfluss auf die *cox-2*-mRNA-Expression der Zelllinie MDA-MB-231 ($1,17 \pm 0,19$).

	<i>MCF-7</i>	<i>MDA-MB-231</i>
Kontrolle	$1,00 \pm 0,34$	$1,00 \pm 0,76$
1 μ M Celecoxib	$0,78 \pm 0,29$	$0,78 \pm 0,37$
1 μ M Calcitriol	$0,59 \pm 0,42$	$0,58 \pm 0,13$
1 μ M Celecoxib + 1 μ M Calcitriol	$0,95 \pm 0,27$	$1,17 \pm 0,19$

Tabelle 6. *cox-2*-mRNA-Expression der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 nach Behandlung mit Calcitriol, Celecoxib sowie deren Kombination im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Die Versuche wurden als Duplikat zweimal durchgeführt.

Die Grundexpression von *cox-2* ist bei MDA-MB-231 vermutlich wesentlich höher als bei MCF-7, da im Vergleich der Lösungsmittelkontrollen zwischen *hprt1* und der *cox-2* bei der Zelllinie MCF-7 (*hprt1*: 18,3 Ct; *cox-2*: 31,9 Ct) ein ungefähr um

zehn Zyklen größerer Abstand gefunden wurde als bei MDA-MB-231 (*hprt1*: 19,1 Ct; *cox-2*: 21,5 Ct).

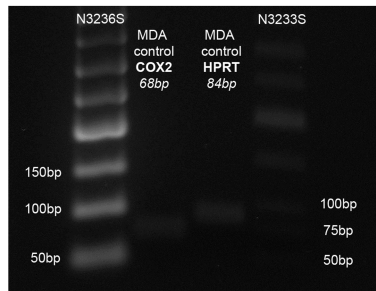


Abbildung 15. Agarose-Gelelektrophorese zur Verifizierung des PCR-Produktes. Die Bande der *cox-2* ist bei 68 bp sichtbar, es sind keine Verunreinigungen abgebildet. Die Bande von *hprt1* ist bei 84 bp sichtbar, es sind keine Verunreinigungen abgebildet.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Calcitriol, Calcipotriol und COX-2-Inhibitoren sowie der Kombination von Calcitriol mit dem selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib auf das Zellwachstum zweier Mammakarzinomzelllinien untersucht. Außerdem wurde der Einfluss von Calcitriol, Celecoxib und deren Kombination auf die Expression von Proteinen aus dem Vitamin D- und dem Prostaglandinstoffwechsel sowie auf die *cox-2*-mRNA-Expression betrachtet. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den beiden Stoffwechselwegen gelegt. Die Gliederung der Diskussion erfolgt anhand der in dem Kapitel „Fragestellung“ erhobenen Fragen.

4.1 Wird das Wachstum von Mammakarzinomzellen durch Calcitriol, das Vitamin D-Analogon Calcipotriol, die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und NS-398, oder durch den nicht-selektiven COX-2-Inhibitor Naproxen beeinflusst?

Calcitriol inhibierte in der vorliegenden Arbeit die Zellproliferation der beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 signifikant, wobei die ER-positive Zelllinie MCF-7 deutlich stärker als die ER-negative Zelllinie MDA-MB-231 beeinflusst wurde. Im BrdU-ELISA, der den Anteil der proliferierenden Zellen in einer Zellpopulation quantifiziert, wurde nach 24 Stunden eine signifikante Hemmung der Zellproliferation bei MCF-7 bereits durch 0,001 μ M Calcitriol und bei MDA-MB-231 durch 0,01 μ M Calcitriol gemessen. Ähnliche Ergebnisse zeigten Thill *et al.*, die im BrdU-ELISA, wie in der vorliegenden Arbeit, durch 0,001 μ M Calcitriol eine signifikante Reduktion der Zellproliferation von MCF-7 nach 72 Stunden detektierten. Bei MDA-MB-231 konnten Thill *et al.*, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, auch durch 0,01 μ M Calcitriol keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation zeigen [160]. Im MTT-Assay wird die Menge vitaler Zellen in einer Zellkultur bestimmt. Hier zeigte Calcitriol nach einer 72-stündigen Inkubation in dieser Arbeit bei MCF-7 ab 0,01 μ M eine signifikante Reduktion der Zellmenge. Bei MDA-MB-231 hingegen wirkte es nicht signifikant, hier zeigte sich ab 50 μ M eine zelltoxische Dosis. Yuan *et al.* konnten im MTT-Assay bereits durch 0,001 μ M Calcitriol eine signifikante Wachstumsinhibition von

MCF-7 zeigen. Die Inkubationszeiten betrugen hier 24, 48 und 72 Stunden [186]. Andere Studien zeigten bei MCF-7 ähnliche Ergebnisse und konnten bei MDA-MB-231, genau wie in der vorliegenden Arbeit, keinen Einfluss durch Calcitriol auf das Zellwachstum zeigen [27, 29, 51, 132]. Ein Erklärungsansatz für die deutlich stärkere Wirkung von Calcitriol auf die ER-positive Zelllinie MCF-7 im Vergleich zu der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-231 könnte durch eine von Krishnan *et al.* publizierte Studie geliefert werden. Dort bewirkte Calcitriol *in vitro* und *in vivo* eine Reduktion der Expression des östrogensynthetisierenden Enzyms Aromatase und des nukleären ER-alpha, wodurch die wachstumsfördernde Wirkung der Östrogene abgeschwächt wird [94, 95, 151, 154]. Ein anderer Grund für die stärker ausgeprägte Wachstumsinhibition von MCF-7 im Vergleich zu MDA-MB-231 könnte dadurch bedingt sein, dass MDA-MB-231 schneller als MCF-7 proliferiert. Dadurch könnte MDA-MB-231 eine gesättigte Zelldichte am Versuchsende des MTT-Assays gehabt haben, sodass ein Einfluss auf die Menge vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger sensitiv erfasst werden konnte. In der Literatur wurden die antiproliferativen Wirkungen von Calcitriol u. a. durch einen Arrest des Zellzyklus in der G0- und G1-Phase erklärt. Dies konnte sowohl bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7 als auch an anderen Zellentitäten gezeigt werden [76, 92, 186]. Außerdem wurde Calcitriol eine proapoptotische [86, 141] und eine antiangiogene Wirkung zugeschrieben [18, 108]. Somit wurden bereits vielfältige wachstumsinhibierende, auch VDR-unabhängige, Wirkmechanismen von Calcitriol erforscht. In der vorliegenden Arbeit zeigte Calcitriol vor allem auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wachstumsinhibierende Effekte, wobei die Proliferation im BrdU-ELISA auch bei der Zelllinie MDA-MB-231 signifikant reduziert wurde. In dieser Arbeit erfolgte die Behandlung der Zellen für den BrdU-ELISA für 24 Stunden und für den MTT-Assay für 72 Stunden, da der Einfluss auf die DNA-Syntheserate im BrdU-ELISA schneller erfasst werden kann als die Veränderung der Menge der vitalen Zellen. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich im BrdU-ELISA deutlich stärkere wachstumsinhibierende Effekte durch Calcitriol als im MTT-Assay. Zu diskutieren ist, ob eine Inkubationszeit von 72 Stunden für den MTT-Assay eventuell zu lang ist, da der Einfluss von Calcitriol auf die Veränderung der vitalen Zellmenge gegen Ende dieses Zeitraumes bereits wieder nachgelassen haben könnte. Da sich die Ergebnisse zumindest für MCF-7 ausreichend gut mit dem MTT-Assay darstellen ließen, wurde in der vorliegenden

Arbeit aus monetären Gründen und durch weniger systematische Fehlermöglichkeiten aufgrund der einfachen Routinehandhabung in den nachfolgenden Versuchen der Einfluss der verschiedenen Substanzen im MTT-Assay untersucht.

Die antiproliferativen Wirkungen von Calcitriol wurden in der Literatur auch im Mausmodell untersucht. Swami *et al.* zeigten, dass bei Mäusen, denen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 xenotransplantiert worden war, das Tumorumfang durch Calcitriol halbiert wurde [153]. Auch in klinischen Studien wurde Calcitriol bereits eingesetzt. Zeichner *et al.* untersuchten den Einfluss von Vitamin D an 308 Patientinnen mit nicht-metastasiertem, HER2/neu-positivem Mammakarzinom, die eine gezielte Therapie mit dem HER2/neu-Antikörper Trastuzumab sowie zusätzlich eine antihormonelle bzw. Chemotherapie erhielten. In der Patientengruppe, welcher zusätzlich Vitamin D substituiert wurde, zeigte sich eine signifikant verringerte Rezidivrate nach 5 Jahren, wobei das Gesamtüberleben nicht beeinflusst wurde [188]. Bei Patienten mit Prostatakarzinom wurden mehrere klinische Studien mit Calcitriol durchgeführt. In der ASCENT I Studie wurde bei 250 Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom das Zytostatikum Docetaxel mit einer einmal wöchentlichen Gabe von 45 µg Calcitriol (DN-101) bzw. einem Placebo kombiniert. Der primäre Endpunkt der Studie, ein verlangsamter PSA-Anstieg, wurde nicht erreicht, allerdings wiesen die Patienten der Calcitriolgruppe ein verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zu der Placebogruppe auf [14, 15]. Die Folgestudie (ASCENT II) mit 953 an Prostatakarzinom erkrankten Patienten wurde vorzeitig abgebrochen, da in der Calcitriolgruppe eine erhöhte Zahl an Todesfällen registriert wurde, für die jedoch ein veraltetes, in dieser Gruppe benutztes Docetaxelschema verantwortlich gewesen sein könnte [140]. In weiteren klinischen Studien zum metastasierten Prostatakarzinom wurde Calcitriol in Kombination mit Wirkstoffen wie Mitoxantron, Docetaxel bzw. Dexamethason therapeutisch eingesetzt. Zwar war die jeweilige Kombination mit Calcitriol gut tolerabel, zeigte jedoch im Vergleich zu der Kontrollgruppe keinen wesentlichen Einfluss auf den PSA-Abfall [32, 125, 169]. Krishnan *et al.* kritisieren jedoch, dass der Studienaufbau von klinischen Studien mit Calcitriol bisher nicht optimal gewesen sei und Verbesserungsbedarf bestehe [96]. So ist es definitiv notwendig, weitere klinische Studien mit Calcitriol durchzuführen, um die Wirksamkeit zu validieren und die optimale Dosierung zu finden.

Da der Einsatz von Calcitriol *in vivo* unerwünschte Nebenwirkungen, wie eine Hyperkalzämie und Hyperkalzurie mit den resultierenden Symptomen, z. B. einer Urolithiasis [169], hervorrufen kann, wurden zunehmend Studien mit Vitamin D-Analoga wie Calcipotriol durchgeführt. Diese zeigten *in vitro* sowie im Mausmodell ähnliche antikanzerogene Eigenschaften wie Calcitriol, ohne jedoch unerwünschte Nebenwirkungen zu verursachen [40, 115]. In der vorliegenden Arbeit inhibierte Calcipotriol das Zellwachstum von MCF-7 ab einer Konzentration von 0,01 μM signifikant und zeigte damit eine ähnliche Wirkung wie Calcitriol. In höheren Konzentrationen war Calcitriol in seiner wachstumsinhibierenden Wirkung auf MCF-7 dem Analogon Calcipotriol jedoch deutlich überlegen. Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde ab einer Calcipotriolkonzentration von 10 μM signifikant in ihrem Zellwachstum inhibiert. Bei MDA-MB-231 zeigte sich Calcipotriol gegenüber Calcitriol minimal wirksamer, wobei Calcipotriol in geringeren Konzentrationen zu einer tendenziellen Wachstumsstimulation führte. In klinischen Studien wurden bei topischer Anwendung von Calcipotriol bei lokal fortgeschrittenem Mammakarzinom bzw. kutanen Metastasen von Mammakarzinompatientinnen inkonsistente Ergebnisse gefunden [24, 121]. Klinische Studien mit systemischer Anwendung von Calcipotriol wurden bisher nicht an Mammakarzinompatientinnen durchgeführt, sollten aber bei vielversprechenden *in vitro* und *in vivo* am Mausmodell generierten Ergebnissen geplant werden.

COX-2 ist an der Prostaglandinsynthese beteiligt und trägt über inflammatorische Prozesse mutmaßlich zu einer Karzinomentstehung und -progression bei. Eine COX-2-Überexpression in Karzinomen ist mit einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert und damit als therapeutischer Angriffspunkt sehr interessant [49, 114, 133]. Die Datenlage zu einer präventiven Wirkung im Sinne einer Reduktion des Mammakarzinomrisikos durch eine Behandlung mit selektiven und nicht-selektiven COX-2-Inhibitoren ist inkonsistent [10, 78–81, 97]. Einerseits konnte durch eine regelmäßige, langjährige Einnahme von NSAR wie z. B. Aspirin oder Ibuprofen eine Risikoreduktion des Mammakarzinoms von bis zu 40 % erzielt werden, wobei eine längere Einnahmedauer der NSAR mit einer stärker protektiven Wirkung korrelierte [80, 81]. Andererseits konnte in der Nurses' Health Study keine Risikoreduktion einer Mammakarzinomerkrankung durch eine regelmäßige NSAR-Einnahme belegt werden [59]. Eine dauerhafte Einnahme von

NSAR hat den Nachteil, dass durch die nicht-selektive Inhibition des COX-Systems in bis zu 35 % der Fälle gastrointestinale Ulzera entstehen [21]. Dies führte dazu, dass zunehmend selektive COX-2-Inhibitoren eingesetzt wurden, da die protektiven Effekte der durch die COX-1 synthetisierten Substanzen erhalten bleiben, wodurch die Magenschleimhaut geschont wird. Selektive COX-2-Inhibitoren sind z. B. Celecoxib und Rofecoxib, wobei Rofecoxib wegen eines erhöhten kardiovaskulären Risikos 2004 vom Markt genommen wurde [144]. In einer Metaanalyse konnte Harris für Celecoxib kein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen nachweisen [78]. Celecoxib zeigte mit einer Risikoreduktion von bis zu 71 % für das Mammakarzinom eine stärkere protektive Wirkung als NSAR [10, 79] und liefert somit sehr vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen präventiven Wirkung.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl zwei selektive als auch ein nicht-selektiver COX-2-Inhibitor hinsichtlich ihrer Wirkung als Therapeutikum von Karzinomzellen betrachtet. Der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib hemmte ab einer Dosis von 10 μ M nach einer 72-stündigen Inkubation das Wachstum beider Mammakarzinomzelllinien signifikant. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten von Dai *et al.* überein, welche außerdem einen Zellzyklusarrest bei MCF-7 durch Celecoxib beschrieben [46]. Basu *et al.* fanden erst durch 40 μ M Celecoxib nach einer 96-stündigen Inkubation eine signifikante Wachstumsinhibition von MDA-MB-231. Die Autoren wiesen im Zusammenhang mit der antikanzerogenen Wirkung von Celecoxib sowohl eine Apoptoseinduktion als auch eine Reduktion von VEGF nach [12]. Auch in anderen Studien konnte eine signifikante Wachstumsreduktion der beiden Zelllinien durch Celecoxib nachgewiesen werden [23, 174]. Nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zeigte Celecoxib vielversprechende Ergebnisse. So halbierte Celecoxib, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, das Tumorstadium in Mäusen, denen zuvor die malignen Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 xenotransplantiert worden waren [11, 179]. Darüber hinaus verminderte Celecoxib in Mausmodellen die Mammakarzinominzidenz und das Tumorstadium nach Induktion durch das sehr potente Kanzerogen 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen. Außerdem reduzierte es über eine verminderte Expression von VEGF die Neoangiogenese und führte zu einem Zellzyklusarrest sowie zu einer erhöhten Apoptoserate [3, 12, 13, 23, 46,

174, 184]. Insgesamt betrachtet wurden durch Celecoxib in der Literatur folglich sehr potente antikanzerogene Wirkungen nachgewiesen.

NS-398, ein weiterer selektiver COX-2-Inhibitor, hemmte das Wachstum bei MCF-7 in dieser Arbeit bereits ab Konzentrationen von 0,001 μM und bei MDA-MB-231 ab 1 μM signifikant. In höheren Konzentrationen von 50 μM und 100 μM hatte es jedoch einen geringeren wachstumsinhibierenden Einfluss auf die beiden Zelllinien als Celecoxib. Die Literatur zeigt inkonsistente Daten für NS-398, so fanden Larkins *et al.* eine signifikante Wachstumsreduktion bei MDA-MB-231 durch 0,1 μM NS-398 nach einer 24-stündigen Inkubation, bei MCF-7 konnte jedoch kein Einfluss durch NS-398 gesehen werden [98]. Studien von Silva *et al.* und Roberts *et al.* hingegen fanden durch NS-398 eine signifikante Wachstumsreduktion bei MCF-7 Zellen, nicht jedoch bei MDA-MB-231 [136, 142]. *In vivo* verminderte NS-398 im Mausmodell Tumorwachstum, Invasivität und Neoangiogenese [138]. Dennoch ist die Datenlage zu NS-398 insgesamt betrachtet in der Literatur inkonsistent.

Der nicht-selektive COX-2-Inhibitor Naproxen reduzierte das Wachstum beider Zelllinien in dieser Arbeit ab einer Konzentration von 0,001 μM signifikant, der wachstumsinhibierende Effekt ließ jedoch bei höheren Naproxenkonzentrationen von maximal 100 μM nach. Durch eine weitere, deutliche Dosiserhöhung wurde in der Literatur erneut eine signifikante Wachstumsinhibition gefunden. So zeigten Deb *et al.* durch Naproxen in einer Konzentration von 1000 μM bei MCF-7 und 3000 μM bei MDA-MB-231 eine signifikante Wachstumsinhibition im MTT-Assay [47].

Insgesamt betrachtet hatten die eingesetzten COX-2-Inhibitoren in der vorliegenden Arbeit auf die MCF-7 Zellen einen stärkeren wachstumsinhibierenden Einfluss als auf die MDA-MB-231 Zellen. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass sowohl selektive COX-2-Inhibitoren als auch NSAR die Aromataseexpression *in vitro* reduzieren [23, 52], wodurch eine verminderte Östrogensynthese und nachfolgend eine verminderte Wachstumsstimulation der ER-positiven Zelllinie MCF-7 resultieren könnte. Außerdem könnte die stärkere Proliferation von MDA-MB-231 im Vergleich zu MCF-7, wie oben bereits erwähnt, eine gesättigte Zelldichte am Versuchsende bewirkt haben. Dadurch könnten die wachstumsinhibierenden Wirkungen im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger sensitiv erfasst worden sein.

Der Einsatz von COX-2-Inhibitoren erfolgte bereits in klinischen Studien. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom wurde Celecoxib begleitend zu einer Chemo- bzw. Radiotherapie eingesetzt und war insgesamt sehr gut verträglich [38, 55, 124, 185]. Zusätzlich zu den protektiven und therapeutischen Wirkungen der NSAR und selektiven COX-2-Inhibitoren konnte auch die Rezidivrate bei Mammakarzinomerkrankungen durch die Einnahme des NSAR Ibuprofen alleine oder in Kombination mit einem anderen NSAR wie Naproxen oder Sulindac vermindert werden [97]. Bei Patienten mit Prostatakarzinomrezidiv bewirkte Celecoxib erfreulicherweise eine Verlangsamung des PSA-Anstiegs [129]. Jedoch konnte bei Patienten mit Prostatakarzinom durch eine neoadjuvante Therapie mit Celecoxib im Vergleich zum Placebo kein Einfluss auf die Expression von Prostaglandinen, COX-1 und COX-2 sowie von Zellzyklusregulationsproteinen im Tumorgewebe erreicht werden [7].

Insgesamt betrachtet kann die Frage, ob die Proliferation von Mammakarzinomzellen durch einzelne Substanzen, wie Calcitriol, Calcipotriol und die beiden selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und NS-398, beeinflussbar ist, positiv beantwortet werden, da sie eine signifikante, dosisabhängig wachstumsinhibierende Wirkung auf die untersuchten Mammakarzinomzellen zeigten. Einzig durch den nicht-selektiven COX-2-Inhibitor Naproxen konnte keine eindeutig dosisabhängige, wachstumsreduzierende Wirkung nachgewiesen werden. Insgesamt betrachtet zeigte die ER-positive Zelllinie MCF-7 eine stärkere Sensitivität auf die Behandlung durch die verschiedenen Substanzen als die ER-negative Zelllinie MDA-MB-231. Weiterführende Studien sollten untersuchen, ob die in der vorliegenden Arbeit erzielten Wirkungen auch auf Mammakarzinome *in vivo* mit dem entsprechenden Rezeptorstatus übertragbar sind, da sich die beiden Zelllinien seit einigen Jahren in Kultur befinden und nicht garantiert werden kann, dass sie sich wie maligne körpereigene Zellen verhalten.

4.2 Führt eine Kombinationsbehandlung mit Calcitriol und einem COX-2-Inhibitor im Vergleich zu den Einzelbehandlungen zu einer verstärkten Wachstumsinhibition von Mammakarzinomzellen?

Eine präventive und therapeutische Wirkung von Einzelbehandlungen mit Calcitriol oder Celecoxib wurde hinsichtlich einer Mammakarzinomerkrankung bereits

mehrfach nachgewiesen [1, 6, 10, 42, 79]. Als Nächstes stellte sich die Frage, ob sich die wachstumshemmenden Wirkungen der beiden Substanzgruppen in Kombination ergänzen. Die Kombinationsversuche wurden in dieser Arbeit mit Calcitriol und Celecoxib durchgeführt, da diese beiden Substanzen stärkere wachstumsinhibierende Wirkungen in den Einzelversuchen zeigten als Calcipotriol bzw. NS-398 oder Naproxen. In den Kombinationsversuchen wurden Calcitriol und Celecoxib in Konzentrationen eingesetzt, die jeweils zu einer moderaten Wachstumsinhibition in den Einzelversuchen führten.

Die Kombination von Calcitriol und Celecoxib inhibierte das Wachstum beider Mammakarzinomzelllinien in der vorliegenden Arbeit signifikant stärker als eine Behandlung mit den jeweils einzelnen Substanzen. Auch geringere Konzentrationen, die in den Einzelversuchen keine signifikante Wachstumsinhibition zeigten, konnten die Zellproliferation in der Kombinationsbehandlung signifikant reduzieren. Insgesamt wurde das Wachstum der Zelllinie MCF-7 durch eine Kombination aus Calcitriol und Celecoxib stärker inhibiert als das der Zelllinie MDA-MB-231. Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein deutlich verstärkter wachstumsinhibierender Effekt durch die Kombination von Calcitriol und Celecoxib auf Mammakarzinomzellen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen gezeigt werden. Parallel dazu gelang es unserer Arbeitsgruppe, eine verstärkte Wachstumsinhibition mit dieser Kombination auch an Ovarialkarzinomzelllinien zu zeigen [166]. Moreno *et al.* und Gavrilov *et al.* fanden an Prostatakarzinomzellen durch eine Kombination aus Calcitriol mit NS-398, Naproxen bzw. Ibuprofen eine verstärkte Wachstumsinhibition im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit einer der jeweiligen Substanzen, wobei auch hier bereits geringere Dosierungen als in den Einzelbehandlungen für eine vergleichbare Wirkung ausreichten [70, 117]. Eine Kombinationsbehandlung bewirkte auch *in vivo* eine verstärkte Wachstumsinhibition. So verhinderte eine Therapie mit einer Kombination aus Calcitriol, Aspirin und Calcium im Mausmodell eine Lungenkarzinomentwicklung nach Induktion mit Karzinogenen [127]. Im Mausmodell konnte die Inzidenz UV-Strahleninduzierter Hauttumore durch eine topische Anwendung der Kombination von Diclofenac und Calcipotriol im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden [128]. Klinische Studien mit der Kombinationstherapie von Calcitriol und einem NSAR wurden bisher nur bei Prostatakarzinompatienten durchgeführt. In einer Studie von Srinivas und Feldman erhielten Patienten mit rezidiviertem Prostata-

karzinom ein Jahr lang einmal wöchentlich 45 µg Calcitriol (DN-101) und zweimal täglich 375 mg Naproxen. Als Maß für die therapeutische Wirksamkeit wurde die Verdopplungszeit des PSA-Wertes verwendet. Die Therapie wurde insgesamt gut vertragen. Die Studie wurde allerdings wegen der erhöhten Todesfallrate in der Calcitriolgruppe der ASCENT II Studie vorzeitig gestoppt. Dennoch konnte gesehen werden, dass durch die Kombinationstherapie bei 14 von 20 Patienten unter der Therapie mit Calcitriol und Naproxen eine verlängerte PSA-Verdopplungszeit auftrat [140, 147].

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann nun auch die Frage nach einer verstärkten Wachstumsinhibition von Mammakarzinomzelllinien durch eine Kombination aus Calcitriol und Celecoxib positiv beantwortet werden, da die Kombination der beiden Stoffe die antiproliferative Wirkung der Einzelapplikationen deutlich verbesserte. Dies ist ein sehr vielversprechendes Ergebnis und wurde in dieser Konstellation an Mammakarzinomzelllinien zum ersten Mal gezeigt. Es sollten weitere, auch klinische Studien mit der Kombination von Calcitriol und Celecoxib mit dem Ziel der Validierung der Wirksamkeit und der optimalen Dosisfindung durchgeführt werden, um durch geringere Einzeldosen potentielle Nebenwirkungen zu reduzieren.

4.3 Interagieren Calcitriol und COX-2-Inhibitoren, jeweils einzeln und in Kombination, mit den Enzymen des jeweils anderen Stoffwechselweges?

Die vielversprechenden Ergebnisse der Kombinationsbehandlung mit Calcitriol und Celecoxib im Sinne einer deutlich verstärkten Wachstumsinhibition von Mammakarzinomzellen führten zu der Frage, ob ein Einfluss der Substanzen untereinander besteht. In der Literatur wurde interessanterweise ein Einfluss von Calcitriol auf den Prostaglandinstoffwechsel beschrieben. So führte Calcitriol sowohl an Mammakarzinom- als auch an Prostatakarzinomzelllinien zu einer Reduktion der COX-2- und einer Erhöhung der 15-PGDH-Expression [95, 117] sowie zu einer Verminderung der PGE₂-Sekretion [95, 117, 186]. An Prostatakarzinomzellen kam es außerdem zu einer Reduktion der Prostaglandinrezeptor-Expression [117]. Insgesamt betrachtet kann eine Interaktion zwischen den beiden Stoffwechselwegen vermutet werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Calcitriol und Celecoxib sowie von deren Kombination auf die Proteinexpression

von Stoffwechselenzymen des Vitamin D- und des Prostaglandin-Metabolismus untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine COX-2-Proteinexpression lediglich in der Zelllinie MDA-MB-231, nicht jedoch bei MCF-7, nachgewiesen werden. Einige Studien bestätigten dieses Ergebnis [77, 98, 103], andere Studien konnten jedoch auch in der Zelllinie MCF-7 eine COX-2-Proteinexpression nachweisen [175, 186]. Während Dudás *et al.* durch Zugabe des Entzündungsmediators IL- β die COX-2-Proteinexpression in MCF-7 induzieren konnten [56], gelang dies in der vorliegenden Arbeit nicht. Aufgrund der nicht nachzuweisenden COX-2-Proteinexpression in der Zelllinie MCF-7 wurde die *cox-2*-mRNA-Expression untersucht. Auf mRNA-Ebene gelang es in der vorliegenden Arbeit, eine *cox-2*-Expression in beiden Zelllinien darzustellen. Beim Vergleich zu der nur mit Lösungsmittel behandelten mRNA der beiden Zelllinien konnte bei MDA-MB-231 eine deutlich höhere *cox-2*-mRNA-Expression angenommen werden als bei MCF-7. Dies könnte eine Begründung für den mangelnden Nachweis einer COX-2-Proteinexpression in MCF-7 im Westernblot sein. Eine weitere mögliche Erklärung der Diskrepanz zwischen der *cox-2*-mRNA- und der COX-2-Proteinexpression bei der Zelllinie MCF-7 könnte eine posttranskriptionale und posttranslationale Modifikation der COX-2, u. a. durch microRNA (miRNAs), sein [112]. Wie in der vorliegenden Arbeit fanden Yuan *et al.* und Dai *et al.* auch in MCF-7 eine *cox-2*-mRNA-Expression [46, 186], andere Studien jedoch konnten nur bei der Zelllinie MDA-MB-231 eine *cox-2*-mRNA-Expression zeigen, bei MCF-7 hingegen nicht [103, 167].

Um einen Hinweis auf einen möglichen Einfluss von Calcitriol auf den Prostaglandin-Metabolismus zu erhalten, wurde die COX-2-Proteinmenge in dieser Arbeit nach Behandlung der Zellen mit Calcitriol untersucht. Im Gegensatz zu veröffentlichten Daten [95] konnte hier keine signifikante Veränderung der COX-2-Proteinexpression in der Zelllinie MDA-MB-231 festgestellt werden. Tendenziell führte Calcitriol, wie auch Celecoxib und deren Kombination, zu einer Erhöhung der COX-2-Proteinexpression. In Betrachtung der *cox-2*-mRNA-Expression führten die Einzelbehandlungen mit Calcitriol und Celecoxib in der vorliegenden Arbeit in keiner der beiden Zelllinien zu einer signifikanten Veränderung der *cox-2*-mRNA-Expression, sondern lediglich zu einer tendenziellen Reduktion, die nach der

Kombinationsbehandlung mit Calcitriol und Celecoxib nicht mehr gemessen wurde. Der Einfluss einer kombinierten Gabe von Calcitriol und Celecoxib auf die COX-2-Protein- und die *cox-2*-mRNA-Expression wurde erstmals in dieser Arbeit untersucht, zeigte allerdings keine signifikante, gemeinsame Wirkung.

Auf Ebene der mRNA konnten die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der Auswirkung von Calcitriol auf die *cox-2*-Expression die bereits veröffentlichten Daten in der Tendenz bestätigen [95, 160, 186]. So fanden Krishnan *et al.* nach einer 24-stündigen Inkubation mit 10 nM Calcitriol bei MCF-7 bzw. 100 nM Calcitriol bei MDA-MB-231 eine signifikante Reduktion der *cox-2*-mRNA in beiden Zelllinien [95]. Yuan *et al.* zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion der *cox-2*-mRNA bei MCF-7 nach einer 72-stündigen Inkubation mit 100 nM Calcitriol [186]. Thill *et al.* fanden nach einer 72-stündigen Inkubation mit 1 nM Calcitriol eine signifikante Reduktion der *cox-2*-mRNA-Expression lediglich bei MDA-MB-231, bei MCF-7 hatte 1 nM Calcitriol jedoch keinen Einfluss auf die *cox-2*-mRNA-Expression [160]. Auch eine *in vivo* Studie zeigte eine verminderte *cox-2*-mRNA-Expression nach einer Therapie mit Calcitriol im Mammakarzinomgewebe im Mausmodell [153]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen für 6 Stunden mit 1 μ M Calcitriol behandelt und somit eine kürzere Inkubationsdauer und eine höhere Konzentration als in der Literatur verwendet. Die nicht erreichte Signifikanz in der vorliegenden Arbeit könnte durch eine kleine Fallzahl oder durch die kurze Inkubationsdauer bedingt sein, wobei angenommen werden kann, dass ein Einfluss auf die Genexpression innerhalb dieser Zeitperiode nachweisbar sein sollte. Auch unterschiedliche Zellpassagen und Kulturbedingungen könnten einen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Bei der Messung der COX-2-Proteinexpression nach einer Behandlung mit Calcitriol konnte bei der Zelllinie MDA-MB-231 in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zur Literatur eine tendenzielle Erhöhung der Expression gefunden werden [95, 186]. So zeigten Krishnan *et al.* bei der Zelllinie MDA-MB-231 und Yuan *et al.* bei Zelllinie MCF-7 durch eine Behandlung mit 100 nM Calcitriol für 48 bzw. 72 Stunden eine Reduktion der COX-2-Proteinexpression [95, 186]. Thill *et al.* fanden durch eine Behandlung mit 1 nM Calcitriol für 72 Stunden keinen signifikanten Einfluss auf die COX-2-Proteinexpression bei MCF-7 und MDA-MB-231 [160]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit 24 Stunden eine kürzere Inkubationsdauer und mit 1 μ M eine höhere Calcitriolkonzentration als in der Literatur

verwendet, da angenommen wurde, dass ein Einfluss auf die Proteinexpression innerhalb von 24 Stunden sichtbar wird. In nachfolgenden Versuchen könnte eine längere Inkubationsdauer verwendet werden, da 24 Stunden eventuell nicht ausreichend lange für eine nachweisliche Beeinflussung auf Proteinebene ist. Eine Bestätigung der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der durch Calcitriol erniedrigten COX-2-Proteinexpression konnte im weiteren Verlauf von unserer Arbeitsgruppe gefunden und veröffentlicht werden [165]. Allerdings werden hier nur Ergebnisse dargestellt, die im Rahmen der Versuche zur vorliegenden Arbeit erhoben wurden.

Eine Behandlung mit Celecoxib bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine tendenzielle Erhöhung der cox-2-Proteinexpression und bestätigte damit einige der bereits veröffentlichten Daten in der Tendenz. So fanden Basu *et al.* durch Celecoxib eine tendenziell erhöhte COX-2-Proteinexpression bei der Zelllinie MDA-MB-231. Sie verwendeten mit 60 µM Celecoxib eine höhere Konzentration und mit einer 72-stündigen Behandlung eine längere Behandlungsdauer als in der vorliegenden Arbeit [12], in der die Zellen 24 Stunden lang mit 1 µM Celecoxib behandelt wurden. An anderen Zellentitäten hingegen zeigten sich hinsichtlich des Einflusses von Celecoxib auf die COX-2-Proteinexpression inkonsistente Ergebnisse [91, 100, 171, 173, 180]. In klinischen Studien zeigte eine 14-tägige, präoperative Gabe von Celecoxib bei Patientinnen mit Mammakarzinom keine signifikante Veränderung der COX-2-Expression in dem operativ entfernten Mammakarzinomgewebe [109, 158]. Eine Erklärung für eine erhöhte COX-2-Proteinexpression nach Behandlung mit Celecoxib könnte durch eine von Meade *et al.* veröffentlichte Studie geliefert werden. Sie zeigten nach einer 10 – 12-stündigen Behandlung der Zellen mit 100 µM des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398, sowie nach Behandlung mit nicht-selektiven COX-2-Inhibitoren, wie z. B. mit 500 µM bzw. 1000 µM Ibuprofen, eine Induktion der COX-2-Proteinexpression bei benignen Mammaepithel- sowie bei Kolonkarzinomzelllinien und eine Induktion der cox-2-mRNA-Expression bei der Kolonkarzinomzelllinie. Sie beschrieben ein Peroxisom proliferator response element im COX-2-Promoter, den sie für die Erhöhung der COX-2-Transkription durch COX-2-Inhibitoren verantwortlich machten [113]. Basu *et al.* hingegen beschrieben, dass der Mechanismus, über den Celecoxib die COX-2-Proteinexpression erhöht, unklar bleibt. Sie vermuteten jedoch, dass durch Inhibition der COX-2 auch ein Produkt der COX-2 reduziert

wird, welches normalerweise über eine negative Rückkopplung die COX-2-Expression vermindert. Durch den Wegfall dieser negativen Rückkopplung könnte es zu einer erhöhten COX-2-Proteinexpression nach Behandlung mit dem selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib kommen [12].

Hinsichtlich der *cox-2*-mRNA-Expression nach Behandlung mit Celecoxib bestätigte die vorliegende Arbeit in der Tendenz die bereits veröffentlichten Daten, die eine Reduktion der *cox-2*-mRNA-Expression durch Celecoxib bei den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zeigten [46, 174]. Auch an anderen Zelllinien und an Mammakarzinomgeweben im Mausmodell reduzierte Celecoxib die *cox-2*-mRNA-Expression [88, 173, 184]. Vio *et al.* hingegen fanden nach Behandlung mit Celecoxib eine gesteigerte *cox-2*-mRNA-Expression [171], was durch die Hypothese von Meade *et al.* unterstützt werden würde [113].

Aufgrund der Diskrepanz zwischen dem Einfluss von Celecoxib auf die COX-2-Protein- und *cox-2*-mRNA-Expression stellt sich die Frage nach einer funktionellen COX-2-Inhibition durch Celecoxib. Diese kann durch Messung der PGE₂-Sekretion der Zellen beantwortet werden, die bei Abnahme der COX-2-Aktivität sinken sollte. Dai *et al.* zeigten durch 10 µM, 20 µM und 40 µM Celecoxib eine signifikante Reduktion der PGE₂-Sekretion bei der Zelllinie MCF-7. Sie konnten durch Celecoxib in den oben genannten Konzentrationen auch eine signifikante Reduktion der *cox-2*-mRNA-Expression bei MCF-7 und MDA-MB-231 nachweisen [46]. Basu *et al.* konnten ebenso durch 20 µM, 40 µM und 60 µM Celecoxib eine signifikante Reduktion der PGE₂-Sekretion bei der Zelllinie MDA-MB-231 nachweisen, wobei sie interessanterweise durch 20 µM und 40 µM Celecoxib keinen Einfluss auf die COX-2-Proteinexpression in MDA-MB-231 nachweisen konnten und die COX-2-Proteinexpression durch 60 µM Celecoxib sogar erhöht wurde [12]. Auch Ko *et al.* zeigten an oralen Plattenepithelkarzinomzellen, dass 50 µM Celecoxib die COX-2-Proteinexpression erhöhte, während die PGE₂-Sekretion deutlich erniedrigt wurde [91]. Trotz der erhöhten COX-2-Proteinexpression durch Celecoxib lassen diese Ergebnisse durch eine Verminderung des PGE₂, eines Produktes der COX-2, eine reduzierte Aktivität der COX-2 nach Behandlung mit Celecoxib vermuten.

Die 15-PGDH ist das Prostaglandin-inaktivierende Enzym, als Gegenspieler der COX-2 wird der 15-PGDH eine Rolle als Tumorsuppressorgen zugeschrieben. So wurde bei der Zelllinie MCF-7 eine vermehrte Zellproliferation gesehen, nachdem

die 15-PGDH-Expression durch small interfering RNA reduziert wurde [178]. Bei 15-PGDH-knock-out-Mäusen kam zu einer deutlich erhöhten Kolonkarzinominzidenz im Vergleich zu Mäusen mit vorhandener 15-PGDH-Expression [182]. Wurde eine in Kolonkarzinomen festgestellte verminderte 15-PGDH-Expression mittels Gentransfektion wieder hergestellt, so verloren die Zellen die Fähigkeit, Tumore zu bilden [183]. Aufgrund dieser vielversprechenden Wirkungen der 15-PGDH wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Calcitriol, Celecoxib sowie von deren Kombination auf die 15-PGDH-Expression bei beiden Zelllinien untersucht. Es konnte bei beiden Zelllinien keine signifikante Änderungen der 15-PGDH-Proteinexpression nach einer Zellbehandlung gemessen werden. In der Literatur wurde bei der Zelllinie MDA-MB-231 durch eine 72-stündige Behandlung mit 1 nM Calcitriol die 15-PGDH-Proteinexpression tendenziell leicht erhöht. Bei der Zelllinie MCF-7 zeigte Calcitriol keinen Effekt auf die 15-PGDH-Proteinexpression [160]. Im Vergleich dazu wurde in der vorliegenden Arbeit mit 1 μ M Calcitriol eine höhere Konzentration und mit 24 Stunden eine kürzere Inkubationsdauer benutzt. Weitere Studien an Mammakarzinomzellen konnten zu diesem Themenbereich in der Literatur nicht gefunden werden. Bei Prostatakarzinomzellen fanden Moreno *et al.* durch Calcitriol eine dosisabhängige Steigerung der 15-PGDH-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle [117]. *In vivo* zeigte Celecoxib nach einer 14-tägigen Behandlung bei Mäusen mit Kolonkarzinom keinen Einfluss auf die 15-PGDH-Proteinexpression in der Kolonmukosa [182]. Theoretisch wäre wegen der möglichen tumorsuppressiven Eigenschaften der 15-PGDH eine Steigerung der Expression durch Behandlung mit Calcitriol bzw. Celecoxib sinnvoll, praktisch konnte dies aber in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden und die entsprechenden Literaturdaten sind inkonsistent, sodass weiterer Klärungsbedarf besteht.

Nach den Enzymen des Prostaglandin-Metabolismus werden in den folgenden Abschnitten Substanzen des Vitamin D-Stoffwechsels mit der 24-Hydroxylase, der 1 α -Hydroxylase und dem VDR näher betrachtet.

Die 24-Hydroxylase ist das Calcitriol-inaktivierende Enzym. In der vorliegenden Arbeit konnte die 24-Hydroxylase-Proteinexpression in der Zelllinie MCF-7 erst nach Behandlung mit Calcitriol detektiert werden. Eine kombinierte Behandlung mit Calcitriol und Celecoxib veränderte die 24-Hydroxylase-Expression im Ver-

gleich zu einer alleinigen Behandlung mit Calcitriol nicht. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 hatte eine Behandlung mit Calcitriol, Celecoxib und deren Kombination keinen signifikanten Einfluss auf die 24-Hydroxylase-Proteinexpression, wobei Calcitriol und die Kombination aus Calcitriol und Celecoxib die Proteinexpression tendenziell gleichwertig erhöhten. Die erhobenen Ergebnisse legen nahe, dass Celecoxib keinen Einfluss auf die 24-Hydroxylase-Proteinexpression hat, auch in der Literatur gibt es bisher keine Daten darüber. Eine Darstellung der 24-Hydroxylase-Proteinexpression gelang in der vorliegenden Arbeit bei unbehandelten MCF-7 Zellen nicht, jedoch gibt es Beispiele in der Literatur, in denen eine geringe 24-Hydroxylase-Proteinexpression sowohl bei MDA-MB-231 als auch bei MCF-7 Zellen beschrieben wurde [42, 164]. Suetani *et al.* zeigten, dass eine 24-stündige Behandlung mit 100 nM Calcitriol die sehr geringe Proteinexpression der 24-Hydroxylase in gesundem Mammagewebe deutlich erhöhte [149]. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit eine tendenziell erhöhte 24-Hydroxylase-Proteinexpression nach Behandlung mit Calcitriol in beiden Zelllinien gezeigt. Diese Ergebnisse lassen sich durch die Calcitriol-induzierte Gentranskription der 24-Hydroxylase durch Vitamin D-responsive elements erklären [33].

Die 1 α -Hydroxylase ist das Calcitriol-aktivierende Enzym. Cordes *et al.* fanden in Mammakarzinomgewebe eine verminderte Expression der 1 α -Hydroxylase im Vergleich zu benignem Mammagewebe [44]. Einige Studien konnten eine 1 α -Hydroxylase-Proteinexpression bei MCF-7 und MDA-MB-231 nachweisen [42, 164]. In der vorliegenden Arbeit gelang dies nicht. Neben Fehlerquellen wie einer zu gering aufgetragenen Proteinmenge im Westernblot könnte die 1 α -Hydroxylase-Proteinexpression in den untersuchten Zellen unterhalb der Nachweisgrenze im Westernblot liegen. In der Literatur sind Splice-Varianten der 1 α -Hydroxylase bei der Zelllinie MCF-7 beschrieben, wodurch die Expression der einzelnen Banden verringert sein könnte, sodass diese nicht mehr im Westernblot darstellbar sind [63]. In Mammakarzinomzelllinien konnte bei Thill *et al.* durch Behandlung mit 1 nM Calcitriol für 72 Stunden die Proteinexpression der 1 α -Hydroxylase nicht beeinflusst werden [160]. Zu einem Einfluss von Celecoxib auf die 1 α -Hydroxylase-Proteinexpression konnten keine Daten in der Literatur gefunden werden.

Viele antiproliferative Aktivitäten von Calcitriol werden über den VDR vermittelt [20, 76]. In Mamma- und Ovarialkarzinomgewebe konnte eine deutlich verringerte VDR-Proteinexpression gegenüber benignem Gewebe gefunden werden [106, 162, 163]. In ER-positiven Mammakarzinomzelllinien und -geweben war die VDR-Proteinexpression höher als in ER-negativen [2, 106], was mit einer besseren Prognose der ER-positiven Mammakarzinomerkrankungen korreliert. In der Literatur wurde sowohl bei MCF-7 als auch bei MDA-MB-231 eine sehr geringe VDR-Proteinexpression beschrieben, wobei je nach Studie eine der beiden Größenvarianten des VDR-Proteins, entweder 48 kDa oder 54 kDa [150], untersucht wurde [2, 51, 161, 164]. In der vorliegenden Arbeit gelang es nicht, eine VDR-Proteinexpression bei 54 kDa mittels Westernblot zu detektieren. Dies könnte durch einen ungeeigneten Antikörper oder andere Fehlerquellen, wie z. B. einer zu gering aufgetragenen Proteinmenge, bedingt gewesen sein. Außerdem könnte es daran liegen, dass die VDR-Proteinexpression in den untersuchten Zellen unterhalb der Nachweisgrenze im Westernblot lag. Mohri *et al.* machten miRNAs dafür verantwortlich, dass die VDR-Proteinexpression häufig geringer als die *vdr*-mRNA-Expression ist [116]. Der Einfluss von Calcitriol auf die VDR-Proteinexpression von Mammakarzinomzelllinien wird in der Literatur nicht einheitlich beschrieben [66]. Studien zum Einfluss von Celecoxib oder der Kombination der beiden Wirkstoffe auf die VDR-Proteinexpression konnten nicht gefunden werden.

Zusammenfassend betrachtet konnte in der vorliegenden Arbeit weder durch Calcitriol, noch durch Celecoxib ein signifikanter Einfluss auf die Enzyme des jeweils anderen Stoffwechselweges gefunden werden. Calcitriol führte in der vorliegenden Arbeit zu einer tendenziellen Reduktion der *cox-2*-mRNA, sowie zu einer tendenziellen Erhöhung der COX-2-Proteinexpression.

Die Kombination von Calcitriol und Celecoxib zeigte in der vorliegenden Arbeit eine deutlich verstärkte, signifikante Wachstumsinhibition beider maligner Mammakarzinomzelllinien. Jedoch konnte sowohl in der Veränderung der Proteins als auch der mRNA-Expression bei beiden Zelllinien in dieser Arbeit keine signifikante, gegenseitige Verstärkung der Wirkung durch die Kombination von Calcitriol und Celecoxib beobachtet werden.

5. Zusammenfassung

Der Entwicklung präventiver und therapeutischer Behandlungsansätze für das Mammakarzinom als häufigste maligne Erkrankung der Frau kommt eine hohe Bedeutung zu. Die COX-2 ist als Schlüsselenzym des Prostaglandinstoffwechsels in vielen Karzinomen überexprimiert, was wiederum mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Weiterhin wird bei vielen Malignomen eine Dysregulation des Vitamin D-Haushalts vorgefunden. Calcitriol als die aktive Form des Vitamin D hat unter anderem antiinflammatorische und antiproliferative Wirkungen. Die antikanzerogenen Wirkungen von Calcitriol und COX-2-Inhibitoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Ferner stand ein potentieller Zusammenhang zwischen dem Vitamin D- und dem Prostaglandinstoffwechsel im Fokus.

Calcitriol, das Vitamin D-Analogon Calcipotriol und die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und NS-398 zeigten in dieser Arbeit bei den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 eine signifikante, dosisabhängige Wachstumsinhibition. Der unselektive COX-2-Inhibitor Naproxen hatte keine dosisabhängig wachstumsreduzierende Wirkung. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine deutlich verstärkte Wachstumsinhibition der beiden Mammakarzinomzelllinien durch die Kombination von Calcitriol und Celecoxib gezeigt werden. Durch eine Behandlung mit Calcitriol, Celecoxib oder deren Kombination war kein signifikanter Einfluss auf die Protein- und mRNA-Expression von Enzymen des Vitamin D- und Prostaglandinstoffwechsels nachweisbar.

Im Ergebnis kann die deutlich verstärkte Wachstumsinhibition durch die Kombination von Calcitriol und Celecoxib als sehr vielversprechend gewertet werden, da sie eine potentielle Therapieoption beim Mammakarzinom darstellen könnte. Dieses interessante Resultat lässt weitere, vertiefende Studien lohnend erscheinen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abbas S, Linseisen J, Slanger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D, Chang-Claude J (2008) Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer--results of a large case-control study. *Carcinogenesis* 29:93–99.
2. Alimirah F, Vaishnav A, McCormick M, Echchgadda I, Chatterjee B, Mehta RG, Peng X (2010) Functionality of unliganded VDR in breast cancer cells: repressive action on CYP24 basal transcription. *Mol Cell Biochem* 342:143–150.
3. Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, Harris RE (2000) Chemotherapeutic evaluation of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model. *Oncol Rep* 7:1377–1381.
4. Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, Kassam F, Simmons C, Oldfield M, Dranitsaris G, Tomlinson G, Laupacis A, Tannock IF, Clemons M (2012) Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 30:587–592.
5. Amital H, Szekanecz Z, Szücs G, Dankó K, Nagy E, Csépany T, Kiss E, Rovinsky J, Tuchynova A, Kozakova D, Doria A, Corocher N, Agmon-Levin N, Barak V, Orbach H, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y (2010) Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis* 69:1155–1157.
6. Anderson LN, Cotterchio M, Vieth R, Knight JA (2010) Vitamin D and calcium intakes and breast cancer risk in pre- and postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 91:1699–1707.
7. Antonarakis ES, Heath EI, Walczak JR, Nelson WG, Fedor H, De Marzo AM, Zahurak ML, Piantadosi S, Dannenberg AJ, Gurganus RT, Baker SD, Parnes HL, DeWeese TL, Partin AW, Carducci MA (2009) Phase II, randomized, placebo-controlled trial of neoadjuvant celecoxib in men with clinically localized prostate cancer: evaluation of drug-specific biomarkers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 27:4986–4993.
8. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi O-P, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72:1117–1130.

9. Aparna R, Subhashini J, Roy KR, Reddy GS, Robinson M, Uskokovic MR, Venkateswara Reddy G, Reddanna P (2008) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by 1 α ,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D₃, a less calcemic vitamin D analog. *J Cell Biochem* 104:1832–1842.
10. Ashok V, Dash C, Rohan TE, Sprafka JM, Terry PD (2011) Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and breast cancer risk. *Breast Edinb Scotl* 20:66–70.
11. Barnes NLP, Warnberg F, Farnie G, White D, Jiang W, Anderson E, Bundred NJ (2007) Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *Br J Cancer* 96:575–582.
12. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P (2005) Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res BCR* 7:R422–435.
13. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ, Mukherjee P (2004) Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res MCR* 2:632–642.
14. Beer TM, Ryan CW, Venner PM, Petrylak DP, Chatta GS, Ruether JD, Chi KN, Young J, Henner WD (2008) Intermittent chemotherapy in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer: results from ASCENT, a double-blinded, randomized comparison of high-dose calcitriol plus docetaxel with placebo plus docetaxel. *Cancer* 112:326–330.
15. Beer TM, Ryan CW, Venner PM, Petrylak DP, Chatta GS, Ruether JD, Redfern CH, Fehrenbacher L, Saleh MN, Waterhouse DM, Carducci MA, Vicario D, Dreicer R, Higano CS, Ahmann FR, Chi KN, Henner WD, Arroyo A, Clow FW (2007) Double-blinded randomized study of high-dose calcitriol plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel in androgen-independent prostate cancer: a report from the ASCENT Investigators. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 25:669–674.
16. van den Bemd GJCM, Chang GTG (2002) Vitamin D and vitamin D analogs in cancer treatment. *Curr Drug Targets* 3:85–94.
17. Berkovich L, Ben-Shabat S, Sintov AC (2010) Induction of apoptosis and inhibition of prostate and breast cancer growth by BGP-15, a new calcipotriene-derived vitamin D₃ analog. *Anticancer Drugs* 21:609–618.
18. Bernardi RJ, Johnson CS, Modzelewski RA, Trump DL (2002) Antiproliferative effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology* 143:2508–2514.
19. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE (2005) Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark*

20. Bettoun DJ, Buck DW 2nd, Lu J, Khalifa B, Chin WW, Nagpal S (2002) A vitamin D receptor-Ser/Thr phosphatase-p70 S6 kinase complex and modulation of its enzymatic activities by the ligand. *J Biol Chem* 277:24847–24850.
21. Bjarnason I (2013) Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int J Clin Pract Suppl* 37–42.
22. Bland R, Zehnder D, Hughes SV, Ronco PM, Stewart PM, Hewison M (2001) Regulation of vitamin D-1alpha-hydroxylase in a human cortical collecting duct cell line. *Kidney Int* 60:1277–1286.
23. Bocca C, Bozzo F, Bassignana A, Miglietta A (2011) Antiproliferative effects of COX-2 inhibitor celecoxib on human breast cancer cell lines. *Mol Cell Biochem* 350:59–70.
24. Bower M, Colston KW, Stein RC, Hedley A, Gazet JC, Ford HT, Combes RC (1991) Topical calcipotriol treatment in advanced breast cancer. *Lancet Lond Engl* 337:701–702.
25. Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A (Hrsg.), (2008): Gynäkologie und Geburtshilfe: 117 Tabellen. Kapitel: Erkrankungen der Mamma, 238–260, Kaufmann M, Pfeleiderer A (Autoren). 5. Auflage, Thieme, Stuttgart; New York, NY.
26. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, Suda T, DeLuca HF (1998) Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1387–1391.
27. Brosseau CM, Pirianov G, Colston KW (2010) Involvement of stress activated protein kinases (JNK and p38) in 1,25 dihydroxyvitamin D3-induced breast cell death. *Steroids* 75:1082–1088.
28. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366:575–580.
29. Buras RR, Schumaker LM, Davoodi F, Brenner RV, Shabahang M, Nauta RJ, Evans SR (1994) Vitamin D receptors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 31:191–202.
30. Bury Y, Ruf D, Hansen CM, Kissmeyer AM, Binderup L, Carlberg C (2001) Molecular evaluation of vitamin D3 receptor agonists designed for topical treatment of skin diseases. *J Invest Dermatol* 116:785–792.
31. Cao QJ, Einstein MH, Anderson PS, Runowicz CD, Balan R, Jones JG (2002) Expression of COX-2, Ki-67, cyclin D1, and P21 in endometrial

endometrioid carcinomas. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol* 21:147–154.

32. Chan JS, Beer TM, Quinn DI, Pinski JK, Garzotto M, Sokoloff M, Dehaze DR, Ryan CW (2008) A phase II study of high-dose calcitriol combined with mitoxantrone and prednisone for androgen-independent prostate cancer. *BJU Int* 102:1601–1606.
33. Chen KS, DeLuca HF (1995) Cloning of the human 1 α ,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta* 1263:1–9.
34. Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, Wang H (2010) Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 121:469–477.
35. Chen S, Parmigiani G (2007) Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 25:1329–1333.
36. Chlebowski RT (2013) Vitamin d and breast cancer incidence and outcome. *Anticancer Agents Med Chem* 13:98–106.
37. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, Lane DS, Aragaki AK, Kuller LH, Manson JE, Stefanick ML, Ockene J, Sarto GE, Johnson KC, Wactawski-Wende J, Ravdin PM, Schenken R, Hendrix SL, Rajkovic A, Rohan TE, Yasmeeen S, Prentice RL (2010) Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA J Am Med Assoc* 304:1684–1692.
38. Chow LWC, Tung SY, Ng T-Y, Im S-A, Lee M-H, Yip AYS, Toi M, Glück S (2013) Concurrent celecoxib with 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel for stages II - III invasive breast cancer: the OOTR-N001 study. *Expert Opin Investig Drugs* 22:299–307.
39. Cibula D, Gompel A, Mueck AO, La Vecchia C, Hannaford PC, Skouby SO, Zikan M, Dusek L (2010) Hormonal contraception and risk of cancer. *Hum Reprod Update* 16:631–650.
40. Colston KW, Chander SK, Mackay AG, Coombes RC (1992) Effects of synthetic vitamin D analogues on breast cancer cell proliferation in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* 44:693–702.
41. Colston KW, Evans IM, Spelsberg TC, MacIntyre I (1977) Feedback regulation of vitamin D metabolism by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochem J* 164:83–89.
42. Colston KW, Lowe LC, Mansi JL, Campbell MJ (2006) Vitamin D status and breast cancer risk. *Anticancer Res* 26:2573–2580.
43. Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA, Dusso A (2002) 1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell

membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 277:38965–38971.

44. Cordes T, Fischer D, Thill M, Becker S, Friedrich M, Salehin D (2010) Vitamin D-1 α -hydroxylase and vitamin D-24-hydroxylase in benign and malign breast tissue. *Eur J Gynaecol Oncol* 31:151–155.
45. Crew KD, Shane E, Cremers S, McMahon DJ, Irani D, Hershman DL (2009) High prevalence of vitamin D deficiency despite supplementation in premenopausal women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 27:2151–2156.
46. Dai Z-J, Ma X-B, Kang H-F, Gao J, Min W-L, Guan H-T, Diao Y, Lu W-F, Wang X-J (2012) Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Cell Int* 12:53.
47. Deb J, Majumder J, Bhattacharyya S, Jana SS (2014) A novel naproxen derivative capable of displaying anti-cancer and anti-migratory properties against human breast cancer cells. *BMC Cancer* 14:567.
48. De Luca HF (1976) Recent advances in our understanding of the vitamin D endocrine system. *J Lab Clin Med* 87:7–26.
49. Denkert C, Winzer K-J, Müller B-M, Weichert W, Pest S, Köbel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S (2003) Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97:2978–2987.
50. Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (2012) Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau-Verl., Frankfurt am Main.
51. Dhawan P, Wieder R, Weider R, Christakos S (2009) CCAAT enhancer-binding protein alpha is a molecular target of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 284:3086–3095.
52. Díaz-Cruz ES, Shapiro CL, Brueggemeier RW (2005) Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression and activity in breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2563–2570.
53. Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Shneider K, Weiss J (Hrsg.), (2007): *Gynäkologie und Geburtshilfe. Kapitel: Gut- und bösartige gynäkologische Tumoren*, 211–298, Jonat W, Bauerschlag D, Schem C, Maass-Poppenhusen K, Maass N, Löning M, Friedrich M, Lehmann-Willenbrock E, Banatz G, Pfisterer J, Schollmeyer T, Kiechle M (Autoren). 2. Auflage, Berlin.
54. Ding Y, Tong M, Liu S, Moscow JA, Tai H-H (2005) NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) behaves as a tumor suppressor in lung cancer. *Carcinogenesis* 26:65–72.

55. Dirix LY, Ignacio J, Nag S, Bapsy P, Gomez H, Raghunadharao D, Paridaens R, Jones S, Falcon S, Carpentieri M, Abbattista A, Lobelle J-P (2008) Treatment of advanced hormone-sensitive breast cancer in postmenopausal women with exemestane alone or in combination with celecoxib. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 26:1253–1259.
56. Dudás J, Fullár A, Bitsche M, Schartinger V, Kovalszky I, Sprinzl GM, Riechelmann H (2011) Tumor-produced, active interleukin-1 β regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts. *Exp Cell Res* 317:2222–2229.
57. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005) Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F8–28.
58. Edvardsen K, Veierød MB, Brustad M, Braaten T, Engelsen O, Lund E (2011) Vitamin D-effective solar UV radiation, dietary vitamin D and breast cancer risk. *Int J Cancer J Int Cancer* 128:1425–1433.
59. Egan KM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Rosner BA, Colditz GA (1996) Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 88:988–993.
60. Engel P, Fagherazzi G, Boutten A, Dupré T, Mesrine S, Boutron-Ruault M-C, Clavel-Chapelon F (2010) Serum 25(OH) vitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study from the French E3N cohort. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 19:2341–2350.
61. Fernández-Martínez AB, Carmena MJ, Arenas MI, Bajo AM, Prieto JC, Sánchez-Chapado M (2012) Overexpression of vasoactive intestinal peptide receptors and cyclooxygenase-2 in human prostate cancer. Analysis of potential prognostic relevance. *Histol Histopathol* 27:1093–1101.
62. Fischer D, Becker S, Cordes T, Bucker B, Diedrich K, Friedrich M, Salehin D, Thill M (2009) Vitamin D-24-hydroxylase in benign and malignant breast tissue and cell lines. *Anticancer Res* 29:3641–3645.
63. Fischer D, Seifert M, Becker S, Ludders D, Cordes T, Reichrath J, Friedrich M (2007) 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase splice variants in breast cell lines MCF-7 and MCF-10. *Cancer Genomics Proteomics* 4:295–300.
64. Friedrich M, Rafi L, Mitschele T, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J (2003) Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Prog Dans Rech Sur Cancer* 164:239–246.
65. Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Sneyd MJ, Mullie P, Autier P (2011) Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. *Int J Cancer J Int Cancer* 128:1414–1424.

66. García-Quiroz J, García-Becerra R, Barrera D, Santos N, Avila E, Ordaz-Rosado D, Rivas-Suárez M, Halhali A, Rodríguez P, Gamboa-Domínguez A, Medina-Franco H, Camacho J, Larrea F, Díaz L (2012) Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy. *PloS One* 7:e45063.
67. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC (2009) Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 19:468–483.
68. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, Lipkin M, Newmark H, Holick MF, Garland FC (2007) Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:708–711.
69. Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF (1990) Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 19:614–622.
70. Gavrilov V, Steiner M, Shany S (2005) The combined treatment of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and a non-steroid anti-inflammatory drug is highly effective in suppressing prostate cancer cell line (LNCaP) growth. *Anticancer Res* 25:3425–3429.
71. Gissel T, Rejnmark L, Mosekilde L, Vestergaard P (2008) Intake of vitamin D and risk of breast cancer--a meta-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 111:195–199.
72. Grant WB, Holick MF (2005) Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev J Clin Ther* 10:94–111.
73. Gray RW, Omdahl JL, Ghazarian JG, DeLuca HF (1972) 25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: Subcellular location and properties. *J Biol Chem* 247:7528–7532.
74. Gross C, Stamey T, Hancock S, Feldman D (1998) Treatment of early recurrent prostate cancer with 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Urol* 159:2035–2039; discussion 2039–2040.
75. Guo G-L, Yang G-L, Li Z-Y, You J, Yang K, Huang D-P, Hu X-Q, Zhang X-H (2008) [The effect of cyclooxygenase-2 on lymphangiogenesis in breast cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 46:132–135.
76. Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J (2001) 1,25(OH)₂ vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 121:103–109.
77. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA (2002) Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62:1676–1681.

78. Harris RE (2009) Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* 17:55–67.
79. Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA (2006) Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer* 6:27.
80. Harris RE, Chlebowski RT, Jackson RD, Frid DJ, Ascenseo JL, Anderson G, Loar A, Rodabough RJ, White E, McTiernan A (2003) Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative. *Cancer Res* 63:6096–6101.
81. Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB (1996) Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer. *Epidemiol Camb Mass* 7:203–205.
82. Holick MF (2004) Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79:362–371.
83. Holick MF (2013) Vitamin d, sunlight and cancer connection. *Anticancer Agents Med Chem* 13:70–82.
84. Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, Nakajima R, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A (2000) Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer Amst Neth* 30:73–81.
85. Hu M, Peluffo G, Chen H, Gelman R, Schnitt S, Polyak K (2009) Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3372–3377.
86. Huynh H, Pollak M, Zhang JC (1998) Regulation of insulin-like growth factor (IGF) II and IGF binding protein 3 autocrine loop in human PC-3 prostate cancer cells by vitamin D metabolite 1,25(OH)₂D₃ and its analog EB1089. *Int J Oncol* 13:137–143.
87. John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J (1999) Vitamin D and breast cancer risk: the NHANES I Epidemiologic follow-up study, 1971-1975 to 1992. National Health and Nutrition Examination Survey. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 8:399–406.
88. Katkoori V, Manne K, Vital-Reyes V, Rodríguez-Burford C, Shanmugam C, Sthanam M, Manne U, Chatla C, Abdulkadir S, Grizzle W (2013) Selective COX-2 inhibitor (celecoxib) decreases cellular growth in prostate cancer cell lines independent of p53. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm* 88:38–46.
89. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM, Feng L, Hong WK, Xu XC (2001) Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 7:861–867.

90. Kim Y, Je Y (2014) Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer* 110:2772–2784.
91. Ko S-H, Choi GJ, Lee JH, Han YA, Lim S-J, Kim SH (2008) Differential effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inhibiting proliferation and induction of apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 19:425–433.
92. Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D (2003) Inhibition of prostate cancer growth by vitamin D: Regulation of target gene expression. *J Cell Biochem* 88:363–371.
93. Krishnan AV, Swami S, Feldman D (2010) Vitamin D and breast cancer: inhibition of estrogen synthesis and signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:343–348.
94. Krishnan AV, Swami S, Feldman D (2012) The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 153:2576–2587.
95. Krishnan AV, Swami S, Peng L, Wang J, Moreno J, Feldman D (2010) Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology* 151:32–42.
96. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D (2012) The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Rheum Dis Clin North Am* 38:161–178.
97. Kwan ML, Habel LA, Slattery ML, Caan B (2007) NSAIDs and breast cancer recurrence in a prospective cohort study. *Cancer Causes Control CCC* 18:613–620.
98. Larkins TL, Nowell M, Singh S, Sanford GL (2006) Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer* 6:181.
99. Lehtinen L, Vainio P, Wikman H, Reemts J, Hilvo M, Issa R, Pollari S, Brandt B, Oresic M, Pantel K, Kallioniemi O, Iljin K (2012) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase associates with poor prognosis in breast cancer, induces epithelial-mesenchymal transition, and promotes cell migration in cultured breast cancer cells. *J Pathol* 226:674–686.
100. Levitt RJ, Buckley J, Blouin M-J, Schaub B, Triche TJ, Pollak M (2004) Growth inhibition of breast epithelial cells by celecoxib is associated with upregulation of insulin-like growth factor binding protein-3 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 316:421–428.
101. Leyssens C, Verlinden L, Verstuyf A (2014) The future of vitamin D analogs. *Front Physiol* 5:122.

102. Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T (2001) Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 276:18563–18569.
103. Liu XH, Rose DP (1996) Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56:5125–5127.
104. Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z-F, Liu SQ, Cao L-P (2002) 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 110:229–238.
105. Löffler G, Petrides P, Heinrich P (Hrsg.), (2007): *Biochemie und Pathobiochemie*. Kapitel: Vitamine, 680–712, Löffler G, Brigelius-Flohé R (Autoren). *Stoffwechsel von Triacylglycerinen und Fettsäuren*, 398–426, Löffler G (Autor). 8. Auflage, Springer, Heidelberg.
106. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D, Veronese LA, Milanezi F, Paredes J, Costa JL, Schmitt F (2010) Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* 10:483.
107. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G (2006) Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res BCR* 8:R43.
108. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE (2000) 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 87:214–220.
109. Martin L-A, Davies GLS, Weigel MT, Betambeau N, Hills MJ, Salter J, Walsh G, A'Hern R, Dowsett M (2010) Pre-surgical study of the biological effects of the selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 123:829–836.
110. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R (2005) Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 48:1247–1257.
111. Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM (2006) Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res* 66:2923–2927.
112. Mbonye UR, Song I (2009) Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. *BMB Rep* 42:552–560.
113. Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1999) Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 274:8328–8334.
114. Miglietta A, Toselli M, Ravarino N, Vencia W, Chiecchio A, Bozzo F, Motta M, Torchio B, Bocca C (2010) COX-2 expression in human breast

carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Expert Opin Ther Targets* 14:655–664.

115. Milczarek M, Chodyński M, Filip-Psurska B, Martowicz A, Krupa M, Krajewski K, Kutner A, Wietrzyk J (2013) Synthesis and Biological Activity of Diastereomeric and Geometric Analogs of Calcipotriol, PRI-2202 and PRI-2205, Against Human HL-60 Leukemia and MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancers* 5:1355–1378.
116. Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T (2009) MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer J Int Cancer* 125:1328–1333.
117. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, Nonn L, Peehl DM, Feldman D (2005) Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res* 65:7917–7925.
118. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Hosoya T, Kato S (1998) The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 alpha,25(OH)2D3. *Biochem Biophys Res Commun* 249:11–16.
119. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193–1226.
120. Nelson DL, Cox MM (Hrsg.), (2008): *Lehninger Biochemie: mit 131 Tabellen. Kapitel: Hormonelle Regulation und Integration des Stoffwechsels von Säugetieren*, 1187–1250. 4. Auflage, Springer, Berlin; Heidelberg.
121. O'Brien ME, Talbot D, MacLennan K, Smith IE (1993) Inefficacy of calcipotriol in skin metastases from breast cancer. *Lancet Lond Engl* 342:994.
122. Pakkiri P, Lakhani SR, Smart CE (2009) Current and future approach to the pathologist's assessment for targeted therapy in breast cancer. *Pathology (Phila)* 41:89–99.
123. Peppone LJ, Huston AJ, Reid ME, Rosier RN, Zakharia Y, Trump DL, Mustian KM, Janelins MC, Purnell JQ, Morrow GR (2011) The effect of various vitamin D supplementation regimens in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 127:171–177.
124. Perroud HA, Rico MJ, Alasino CM, Queralt F, Mainetti LE, Pezzotto SM, Rozados VR, Scharovsky OG (2013) Safety and therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib in advanced breast cancer patients. *Future Oncol Lond Engl* 9:451–462.
125. Petrioli R, Pascucci A, Francini E, Marsili S, Sciandivasci A, De Rubertis G, Barbanti G, Manganeli A, Salvestrini F, Francini G (2007) Weekly high-dose calcitriol and docetaxel in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer previously exposed to docetaxel. *BJU Int* 100:775–779.

126. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
127. Pommergaard H-C, Burcharth J, Rosenberg J, Raskov H (2013) Chemoprevention with acetylsalicylic acid, vitamin D and calcium reduces risk of carcinogen-induced lung tumors. *Anticancer Res* 33:4767–4770.
128. Pommergaard H-C, Burcharth J, Rosenberg J, Raskov H (2013) Combination chemoprevention with diclofenac, calcipotriol and difluoromethylornithine inhibits development of non-melanoma skin cancer in mice. *Anticancer Res* 33:3033–3039.
129. Pruthi RS, Derksen JE, Moore D, Carson CC, Grigson G, Watkins C, Wallen E (2006) Phase II trial of celecoxib in prostate-specific antigen recurrent prostate cancer after definitive radiation therapy or radical prostatectomy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 12:2172–2177.
130. Qin W, Smith C, Jensen M, Holick MF, Sauter ER (2013) Vitamin D favorably alters the cancer promoting prostaglandin cascade. *Anticancer Res* 33:3861–3866.
131. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, (2008): *Biochemie: 50 Tabellen*. Kapitel: Vitamine, 272–305, Hauser K (Autor). *Mediatoren*, 627–644, Deutzmann R (Autor). 2. Auflage, Thieme, Stuttgart.
132. Richards SE, Weierstahl KA, Kelts JL (2015) Vitamin D effect on growth and vitamin D metabolizing enzymes in triple-negative breast cancer. *Anticancer Res* 35:805–810.
133. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J (2002) Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62:632–635.
134. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2012) *Krebs in Deutschland 2007/2008*, 8. Auflage, Berlin.
135. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2015) *Krebs in Deutschland 2011/2012*, 10. Auflage, Berlin.
136. Roberts EG, Vona-Davis L, Riggs DR, Jackson BJ, Hohseni H, Kandzari SJ, McFadden DW (2004) COX-2 inhibition and cancer: experimental findings and clinical correlates. *W V Med J* 100:96–101.
137. Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK (Hrsg.), (2008): *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie*. Kapitel: Tumoren (Neoplasien), 203–256, Roessner A, Müller-Hermelink HK (Autoren). 11. Auflage, Urban & Fischer in Elsevier, München.

138. Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK (2001) Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer J Int Cancer* 93:497–506.
139. Scharl M, Gessler M, von Eckardstein A (Hrsg.), (2009): *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Kapitel: Lipidstoffwechsel: Einführung, Acylfette und Triglyceride, 207–234. 1. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer, München.
140. Scher HI, Jia X, Chi K, de Wit R, Berry WR, Albers P, Henick B, Waterhouse D, Ruether DJ, Rosen PJ, Meluch AA, Nordquist LT, Venner PM, Heidenreich A, Chu L, Heller G (2011) Randomized, open-label phase III trial of docetaxel plus high-dose calcitriol versus docetaxel plus prednisone for patients with castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 29:2191–2198.
141. Sergeev IN (2004) Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:419–425.
142. Silva HC, Alves V, Nogueira LAM, Rosa MS, Carvalho L, Regateiro F (2012) Impairment of breast cancer cell invasion by COX-2-specific inhibitor NS398: roles of CXCR4 and of uPA system. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 29:1468–1476.
143. Silver J, Naveh-Manny T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM (1986) Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J Clin Invest* 78:1296–1301.
144. Simon LS, White WB (2005) COX-2 selective inhibitors and heart health. *Postgrad Med* 117:7–20.
145. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M (2010) The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol* 2010:215158.
146. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869–10874.
147. Srinivas S, Feldman D (2009) A phase II trial of calcitriol and naproxen in recurrent prostate cancer. *Anticancer Res* 29:3605–3610.
148. Stauber M, Weyerstahl T (2007): *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Kapitel: Erkrankungen der Mamma, Maligne Tumoren, 371–397, Weyerstahl T, Genz T (Autoren). 3. Auflage, Thieme, Stuttgart.
149. Suetani RJ, Ho K, Jindal S, Manavis J, Neilsen PM, Pishas KI, Rippey E, Bochner M, Kollias J, Gill PG, Morris HA, Callen DF (2012) A comparison of vitamin D activity in paired non-malignant and malignant human breast tissues. *Mol Cell Endocrinol* 362:202–210.

150. Sunn KL, Cock TA, Crofts LA, Eisman JA, Gardiner EM (2001) Novel N-terminal variant of human VDR. *Mol Endocrinol Baltim Md* 15:1599–1609.
151. Swami S, Krishnan AV, Feldman D (2000) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 6:3371–3379.
152. Swami S, Krishnan AV, Feldman D (2011) Vitamin D metabolism and action in the prostate: implications for health and disease. *Mol Cell Endocrinol* 347:61–69.
153. Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Horst R, Albertelli MA, Feldman D (2012) Dietary vitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer. *Endocrinology* 153:2576–2587.
154. Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Peng L, Albertelli MA, Feldman D (2011) Inhibitory effects of calcitriol on the growth of MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice: selective modulation of aromatase expression in vivo. *Horm Cancer* 2:190–202.
155. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, Szegedi G, Brun JG, Gesztelyi R, Zeher M, Bodolay E (2008) The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 68:261–269.
156. Tai H-H, Cho H, Tong M, Ding Y (2006) NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structure and biological functions. *Curr Pharm Des* 12:955–962.
157. Tanaka Y, Castillo L, DeLuca HF (1977) The 24-hydroxylation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem* 252:1421–1424.
158. Tfayli A, Yang J, Kojouri K, Kesserwan C, Jafari M, Ozer H (2008) Neoadjuvant therapy with celecoxib to women with early stage breast cancer. *Neoplasma* 55:122–126.
159. Thanasitthichai S, Chaiwerawattana A, Prasitthipayong A (2015) Association of Vitamin D Level with Clinicopathological Features in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 16:4881–4883.
160. Thill M, Cordes T, Hoellen F, Becker S, Dittmer C, Kümmel S, Salehin D, Friedrich M, Diedrich K, Köster F (2012) Influence of calcitriol on prostaglandin- and vitamin D-metabolising enzymes in benign and malignant breast cell lines. *Anticancer Res* 32:359–365.
161. Thill M, Fischer D, Becker S, Cordes T, Dittmer C, Diedrich K, Salehin D, Friedrich M (2009) Prostaglandin metabolizing enzymes in correlation with vitamin D receptor in benign and malignant breast cell lines. *Anticancer Res* 29:3619–3625.

162. Thill M, Fischer D, Hoellen F, Kelling K, Dittmer C, Landt S, Salehin D, Diedrich K, Friedrich M, Becker S (2010) Prostaglandin metabolising enzymes and PGE2 are inversely correlated with vitamin D receptor and 25(OH)2D3 in breast cancer. *Anticancer Res* 30:1673–1679.
163. Thill M, Fischer D, Kelling K, Hoellen F, Dittmer C, Hornemann A, Salehin D, Diedrich K, Friedrich M, Becker S (2010) Expression of vitamin D receptor (VDR), cyclooxygenase-2 (COX-2) and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) in benign and malignant ovarian tissue and 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)2D3) and prostaglandin E2 (PGE2) serum level in ovarian cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:387–390.
164. Thill M, Hoellen F, Becker S, Dittmer C, Fischer D, Kümmel S, Salehin D, Friedrich M, Köster F, Diedrich K, Cordes T (2012) Expression of prostaglandin- and vitamin D-metabolising enzymes in benign and malignant breast cells. *Anticancer Res* 32:367–372.
165. Thill M, Reichert K, Woeste A, Polack S, Fischer D, Hoellen F, Rody A, Friedrich M, Köster F (2015) Combined treatment of breast cancer cell lines with vitamin D and COX-2 inhibitors. *Anticancer Res* 35:1189–1195.
166. Thill M, Woeste A, Reichert K, Fischer D, Rody A, Friedrich M, Köster F (2015) Vitamin D inhibits ovarian cancer cell line proliferation in combination with celecoxib and suppresses cyclooxygenase-2 expression. *Anticancer Res* 35:1197–1203.
167. Timoshenko AV, Chakraborty C, Wagner GF, Lala PK (2006) COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *Br J Cancer* 94:1154–1163.
168. Townsend K, Banwell CM, Guy M, Colston KW, Mansi JL, Stewart PM, Campbell MJ, Hewison M (2005) Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 11:3579–3586.
169. Trump DL, Potter DM, Muindi J, Brufsky A, Johnson CS (2006) Phase II trial of high-dose, intermittent calcitriol (1,25 dihydroxyvitamin D3) and dexamethasone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer* 106:2136–2142.
170. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE (2012) Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 18:3831–3852.
171. Vio CP, Quiroz-Munoz M, Cuevas CA, Cespedes C, Ferreri NR (2012) Prostaglandin E2 EP3 receptor regulates cyclooxygenase-2 expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 303:F449–457.
172. Vrieling A, Hein R, Abbas S, Schneeweiss A, Flesch-Janys D, Chang-Claude J (2011) Serum 25-hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Res BCR* 13:R74.

173. Wang H, Liu X, Yang K, Luo F, Lou J, Peng Z (2006) [Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib on expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in ovarian carcinoma cell]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37:757–760.
174. Wang L, Liu L-H, Shan B-E, Zhang C, Sang M-X, Li J (2009) [Celecoxib promotes apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231 through down-regulation of the NF-kappaB pathway]. *Ai Zheng Aizheng Chin J Cancer* 28:569–574.
175. Wang Y-X, Gao J-X, Wang X-Y, Zhang L, Liu C-M (2012) Antiproliferative effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor modulated by nimotuzumab in estrogen-dependent breast cancer cells. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 33:957–966.
176. Wimalawansa SJ (2011) Vitamin D: an essential component for skeletal health. *Ann N Y Acad Sci* 1240:E1–12.
177. Wittekind C, International Union against Cancer (2010) TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-Blackwell, Weinheim.
178. Wolf I, O’Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, Tai H-H, Karlan BY, Koeffler HP (2006) 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res* 66:7818–7823.
179. Wong TY, Li F, Lin S-M, Chan FL, Chen S, Leung LK (2014) Celecoxib increases miR-222 while deterring aromatase-expressing breast tumor growth in mice. *BMC Cancer* 14:426.
180. Xu Z, Zhang M, Lv X, Xiang D, Zhang X, Chen L (2010) The inhibitory effect of celecoxib on mouse hepatoma H22 cell line on the arachidonic acid metabolic pathway. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* 88:603–609.
181. Yang L, Huang Y, Porta R, Yanagisawa K, Gonzalez A, Segi E, Johnson DH, Narumiya S, Carbone DP (2006) Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism. *Cancer Res* 66:9665–9672.
182. Yan M, Myung S-J, Fink SP, Lawrence E, Lutterbaugh J, Yang P, Zhou X, Liu D, Rerko RM, Willis J, Dawson D, Tai H-H, Barnholtz-Sloan JS, Newman RA, Bertagnolli MM, Markowitz SD (2009) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase inactivation as a mechanism of resistance to celecoxib chemoprevention of colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9409–9413.
183. Yan M, Rerko RM, Platzer P, Dawson D, Willis J, Tong M, Lawrence E, Lutterbaugh J, Lu S, Willson JKV, Luo G, Hensold J, Tai H-H, Wilson K, Markowitz SD (2004) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17468–17473.

184. Yoshinaka R, Shibata M-A, Morimoto J, Tanigawa N, Otsuki Y (2006) COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. *Anticancer Res* 26:4245–4254.
185. Young SD, Lafrenie RM, Clemons MJ (2012) Phase ii trial of a metronomic schedule of docetaxel and capecitabine with concurrent celecoxib in patients with prior anthracycline exposure for metastatic breast cancer. *Curr Oncol Tor Ont* 19:e75–83.
186. Yuan L, Jiang R, Yang Y, Ding S, Deng H (2012) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits growth of the breast cancer cell line MCF-7 and downregulates cytochrome P4501B1 through the COX-2/PGE2 pathway. *Oncol Rep* 28:2131–2137.
187. Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270:23975–23983.
188. Zeichner SB, Koru-Sengul T, Shah N, Liu Q, Markward NJ, Montero AJ, Glück S, Silva O, Ahn ER (2015) Improved clinical outcomes associated with vitamin D supplementation during adjuvant chemotherapy in patients with HER2+ nonmetastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 15:e1–11.
189. Zhang H, Sun X-F (2002) Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 97:1037–1041.
190. Zhang X-H, Huang D-P, Guo G-L, Chen G-R, Zhang H-X, Wan L, Chen S-Y (2008) Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer* 8:4.
191. Zinser GM, McEleney K, Welsh J (2003) Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and vitamin D3 receptor knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 200:67–80.
192. (2012) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (Hrsg.), Kreienberg R, Albert U, Follmann M, Kopp I, Kühn T, Wöckel A, Zemmler T (Autoren), Berlin.
193. (2012) Leitlinie - Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V., Taufkirchen.

7. Anhang

TNM-Klassifikation

<i>Stadium</i>	<i>Tumorausdehnung</i>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Größte Tumorausdehnung $\leq 2,0$ cm
T1mi	Mikroinvasion mit Ausdehnung $\leq 0,1$ cm
T1a	Tumorausdehnung $> 0,1$ cm aber $\leq 0,5$ cm
T1b	Tumorausdehnung $> 0,5$ cm aber $\leq 1,0$ cm
T1c	Tumorausdehnung $> 1,0$ cm aber $\leq 2,0$ cm
T2	Tumorausdehnung $> 2,0$ cm aber $\leq 5,0$ cm
T3	Tumorausdehnung $> 5,0$ cm
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Brustwand/Haut
T4a	Infiltration der Brustwand
T4b	Hautödem/Ulzeration, Satellitenknötchen der Haut
T4c	T4a und T4b
T4d	Inflammatorisches Karzinom

Tabelle 7. Tumorgröße [177]

<i>Klinische Klassifikation</i>		<i>Pathologische Klassifikation</i>	
NX	Lymphknoten können nicht beurteilt werden	pNX	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasen	pN0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Nicht fixierte Lymphknotenmetastasen der ipsilateralen Axilla in Level I und II	pN1mi	Mikrometastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
N2a	Fixierte Lymphknotenmetastasen der ipsilateralen Axilla in Level I und II	pN1a	Metastasen $> 0,2$ mm in 1-3 ipsilateralen axillären Metastasen

N2b	Klinisch erkennbare/ verdächtige Lymphknoten entlang der A. mammaria interna	pN1b	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axil- läre Lymphknotenmetastasen
N3a	Lymphknotenmetastasen in ipsilateralen infraclaviculären Lymphknoten	pN1c	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und ipsilateralen Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. mammaria interna
N3b	Lymphknotenmetastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna und axilläre Lymph- knotenmetastasen	pN2a	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten
N3c	Lymphknotenmetastasen in ipsilateralen supraclaviculären Lymphknoten	pN2b	Metastasen in 4-9 ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axil- läre Lymphknotenmetastasen
		pN3a	Metastasen in > 10 ipsi- lateralen axillären Lymph- knoten oder in ipsilateralen infraclaviculären Lymphknoten
		pN3b i	Metastasen in klinisch erkenn- baren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit ≥ 1 axillären Lymphknoten- metastase
		pN3b ii	Lymphknotenmetastasen in > 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
		pN3c	Metastase in ipsilateralen supraclaviculären Lymph- knoten

Tabelle 8. Lymphknotenmetastasen [177]

Stadium	Fernmetastasierung
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 9. Fernmetastasierung [177]

<i>Stadium</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
St. 0	Tis	N0	M0
St. I A	T1mic, T1	N0	M0
St. I B	T0, T1mic, T1	N1mic	M0
St. II A	T0, T1mic, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
St. II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
St. III A	T0, T1mic, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
St. III B	T4	N0, N1, N2	M0
St. III C	Nicht relevant	N3	M0
St. IV	Nicht relevant	Nicht relevant	M1

Tabelle 10. Stadieneinteilung [177]

8. Danksagungen

Ich danke Prof. Dr. med. Achim Rody, dem Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck, und Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Klaus Diedrich, seinem Vorgänger, unter dem ich meine Dissertation begonnen habe, für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können und für das Bereitstellen des Materials.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Privatdozent Dr. med. Marc Thill, für das Überlassen des interessanten Themas und für die professionelle Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Besonders danke ich Privatdozent Dr. rer. nat. Frank Köster für die wissenschaftliche Betreuung im Labor und für seine konstruktiven Hinweise für die Überarbeitung dieser Arbeit.

Ferner danke ich Dr. rer. nat. Steffi Becker für die Hilfestellungen bei den ersten eigenen Schritten des wissenschaftlichen Arbeitens.

Für die praktische Hilfe im Labor und die nette Stimmung danke ich allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Herrn Stephan Polack und Frau Gabriele Marschner.

Meiner Doktorschwester, Alena Woeste, danke ich für ihre wertvolle Freundschaft und dafür, dass sie immer an meiner Seite war und mich bei allen auftretenden Problemen sowie an zahlreichen Wochenend- und Feiertagsschichten im Labor begleitet und unterstützt hat.

Meinem Ansgar danke ich für das Ermutigen, diese Arbeit endlich einzureichen und für seine umfassende Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht hat und mich in jeder Lebenssituation ermutigt und bedingungslos unterstützt. Vielen Dank, dass Ihr immer für mich da seid!

9. Lebenslauf

Dieser Abschnitt enthält persönliche Daten, die nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung sind.

Publikationen

- Thill M, Reichert K, Woeste A, Polack S, Fischer D, Hoellen F, Rody A, Friedrich M, Köster F (2015) Combined treatment of breast cancer cell lines with vitamin D and COX-2 inhibitors. Anticancer Res 35: 1189-95.
- Thill M, Woeste A, Reichert K, Fischer D, Rody A, Friedrich M, Köster F (2015) Vitamin D inhibits ovarian cancer cell line proliferation in combination with celecoxib and suppresses cyclooxygenase-2 expression. Anticancer Res 35: 1197-203.