

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité-
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des VEGF im Ovarialkarzinom

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité-

Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Bremert

aus Potsdam

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Denkert
2. Prof. Dr. med. J. Sehouli
3. Prof. Dr. med. W. Weichert

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Tumor, Entzündung und Angiogenese	6
1.1.1 Tumor und Entzündung	6
1.1.2 Angiogenese	7
1.1.2.1 VEGF als Mediator der Angiogenese.....	8
1.2 Das Ovarialkarzinom und Angiogenese	11
1.3 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Zelllinien	14
2.1.2 Chemikalien und Antikörper	14
2.1.3 Lösungen, Kulturmedien	16
2.1.4 Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.5 Geräte	17
2.2 Methoden	18
2.2.1 Zellkultur	18
2.2.2 Versuchsanordnung	19
2.2.2.1 Bestimmung der Basisexpression der untersuchten Zytokine in den Ovarialkarzinomzelllinien.....	19
2.2.2.2 Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Zytokinen in den Ovarialkarzinomzelllinien.....	19
2.2.2.3 Wirkung von Hypoxie auf die Ovarialkarzinomzelllinien.....	20
2.2.3 ELISA	21
2.2.4 MTT-Test	23
2.2.5 Proliferationsassay.....	24
2.2.6 Invasionsassay	24

2.2.7 Migrationsassay	25
2.2.8 Statistik	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Basisexpressionen der Zytokine in unstimulierten Ovarialkarzinomzelllinien.....	27
3.1.1 Basisexpression von VEGF	27
3.1.2 Basisexpression von IL-8	28
3.1.3 Basisexpression von IL-6	28
3.1.4 Basisexpressionen von IL-10 und TNF-alpha.....	29
3.1.5 Zusammenfassung der Basisexpressionen der untersuchten Zytokine in den Ovarialkarzinomzelllinien.....	29
3.2 Wie wirken die Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TGF- β und TNF- α auf die VEGF-Konzentration in den Ovarialkarzinomzelllinien?	30
3.2.1 TGF- β , TNF- α und IL-6 erhöhen VEGF bei CAO-3.....	30
3.2.2 Keines der Zytokine erhöht VEGF bei OAW-42.....	32
3.2.3 IL-1 β erhöht VEGF bei OVCAR-3 um das Doppelte.....	32
3.2.4 TGF- β und IL-1 β erhöhen VEGF bei SKOV-3	34
3.2.5 Zusammenfassung der Wirkung der Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TGF- β und TNF- α auf die VEGF-Konzentration in den Ovarialkarzinomzelllinien	36
3.3 Wie wirkt VEGF auf die Konzentration der Zytokine IL-8 und IL-6 bei den Ovarialkarzinomzelllinien?	37
3.3.1 VEGF verändert die Konzentration von IL-8 bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht.....	37
3.3.2 VEGF senkt die Konzentration von IL-6 bei CAO-3 und OAW-42.....	38
3.3.3 Zusammenfassung Wirkung von VEGF auf die Zytokine IL-8 und IL-6 bei den Ovarialkarzinomzelllinien.....	40
3.4 Wie wirkt VEGF auf Proliferations-, Invasions- und Migrationsverhalten bei den Ovarialkarzinomzelllinien?	41
3.4.1 VEGF, IL-8 und IL-6 verändern das Proliferationsverhalten bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht.....	41

3.4.2 VEGF verändert das Invasionsverhalten bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht	43
3.4.3 VEGF verändert das Migrationsverhalten bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht	44
3.5 Wie wirkt Hypoxie auf die Konzentration der Zytokine VEGF, IL-8 und IL-6 bei den Ovarialkarzinomzelllinien?	46
3.5.1 Hypoxie erhöht die Konzentration von VEGF bei den Ovarialkarzinomzelllinien	46
3.5.2 Hypoxie verändert die Konzentration von IL-8 bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht...48	
3.5.3 Hypoxie senkt die Konzentration von IL-6 bei CAOV-3	50
3.5.4 Zusammenfassung Wirkung von Hypoxie auf die Konzentration der Zytokine VEGF, IL-8 und IL-6 bei den Ovarialkarzinomzelllinien	52
3.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	53
4 Diskussion.....	54
4.1 Expression der proangiogenetischen Zytokine VEGF, IL-8, IL-6, TNF- α und dem immuninhibitorischen IL-10 in Ovarialkarzinomzelllinien	54
4.2 Der Einfluss der Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TGF- β und TNF- α auf die VEGF-Expression in den Ovarialkarzinomzelllinien	55
4.3 Der Einfluss von VEGF auf die Expression der Zytokine IL-8 und IL-6 in den Ovarialkarzinomzelllinien.....	56
4.4 Der Einfluss von VEGF auf das Proliferations-, Invasions- und Migrationsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinien.....	57
4.5 Der Einfluss der Hypoxie auf die Expression von VEGF, IL-8 und IL-6 in den Ovarialkarzinomzelllinien.....	57
4.6 Zukunftsaussichten: Hemmung der Angiogenese durch VEGF-Inhibition.....	59
5 Zusammenfassung	61
6 Danksagung.....	63
7 Selbständigkeitserklärung	64
8 Lebenslauf	65
9 Literaturverzeichnis	66

1 Einleitung

1.1 Tumor, Entzündung und Angiogenese

1.1.1 Tumor und Entzündung

Entzündliche und maligne Erkrankungen stehen auf verschiedenste Weise miteinander in engem Zusammenhang. Beispielsweise tragen entzündliche Veränderungen zur Entstehung maligner Tumoren bei. Hier seien die durch Papillomaviren hervorgerufene Entzündung der Zervix mit möglicher Folge des Zervixkarzinoms, die *Helicobacter pylori*-induzierte Gastritis mit möglichem Magenkarzinom oder das chronisch entzündete Bronchialepithel bei Asbestose oder Zigarettenrauchexposition mit nachgewiesener erhöhter Karzinomrate genannt.¹ Die Reaktion des Organismus auf maligne und entzündliche Prozesse weist in vielerlei Hinsicht Parallelen auf. So sind viele Tumoren durch eine entzündliche Umgebung gekennzeichnet.² Sowohl das Stroma als auch der Tumor selbst enthalten Leukozyten, Lymphozyten oder Tumor-assoziierte Makrophagen.³ Dadurch wird eine günstige Umgebung für das Tumorwachstum geschaffen. Dies erfolgt z.B. durch die Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Proteasen und angiogenetischen Faktoren.⁴ Diese Faktoren, wie beispielsweise Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Transforming Growth Faktor- β (TGF- β), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) u.v.m. können jedoch auch von den Tumorzellen selbst gebildet werden.⁵ Das durch all diese Einflüsse geschaffene entzündliche Netzwerk in der Tumorumgebung beeinflusst Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration von Tumorzellen. Einige Zytokine können direkt proliferativ auf Tumorzellen wirken, wie es bei IL-6 und hämatologischen Malignomen⁶, bei IL-1 und Magenkarzinomen⁷ sowie myeloischer Leukämie oder bei IL-8 und Melanomen⁸ beobachtet wurde. Auch VEGF konnte in einer Studie von Price et al. die Invasivität von Mammakarzinomzellen *in vitro* erhöhen.⁹ Eine weitere Fähigkeit entzündlicher Proteine ist die Induktion von Proteasen. Diese können den Umbau von Extrazellulärmatrix (ECM) bewirken und so die Invasion von Entzündungs-, Endothel- und Tumorzellen und damit auch Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung ermöglichen.¹⁰

Ein weiterer wichtiger Mechanismus bei inflammatorischen und malignen Erkrankungen ist die Angiogenese.¹¹ Zum einen stimulieren viele der entzündlichen Zytokine wie TNF- α ¹², IL-1¹³

oder IL-6¹⁴ angiogenetische Faktoren wie VEGF, zum anderen wirken manche Zytokine selbst angiogenetisch, z.B. IL-8¹⁵ oder TGF- β .¹⁶ Außerdem ist auch der stärkste Angiogenese-Stimulus die Hypoxie, sowohl in der Umgebung von Wunden als auch von Tumoren zu finden.^{17, 18}

1.1.2 Angiogenese

Blutgefäße können durch zweierlei Mechanismen entstehen. Zum einen durch Vaskulogenese (de novo-Bildung aus Vorläuferzellen) und zum anderen durch Angiogenese (ausgehend von bestehenden Gefäßen).¹⁹ Dieser Prozess beinhaltet den lokalen Umbau von Extrazellulärmatrix (ECM) und der Basalmembran durch Proteasen, Proliferation, Migration und Gewebeeinfiltration von Endothelzellen und die Formierung zu Kapillarsystemen.^{20, 21} Außerdem kommt es während der Tumorangiogenese zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die eine Proteinextravasation ermöglicht.^{22, 23} Die Entstehung von Blutgefäßen ist ein essentieller Bestandteil von physiologischen und pathologischen Prozessen im Organismus. Physiologische Gefäßbildung findet man während der Organentwicklung und Differenzierung der Embryogenese in Form von Vaskulogenese. Beim Erwachsenen findet die Angiogenese nur noch bei wenigen physiologischen Vorgängen, wie der Wundheilung und während des weiblichen Zyklus in Uterus und Ovar statt. Pathologische Prozesse, die Angiogenese beinhalten, umfassen hingegen eine Vielzahl von Erkrankungen. Zu diesen zählen z.B. die proliferative Retinopathie, die altersbedingte Makuladegeneration (AMD), die rheumatische Arthritis, Psoriasis und schließlich die Tumorangiogenese.²⁴

Bei der Tumorangiogenese verhält sich der Tumor wie ein wachsendes Organ. Um die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen für das wachsende Gewebe zu gewährleisten, benötigt der Tumor die Fähigkeit Blutgefäße zu bilden. Ferner erhält er so die Möglichkeit, Tumorzellen in den systemischen Kreislauf zu entlassen um später Metastasen aussiedeln zu können.^{24, 25} Außerdem können über die verstärkte Vaskularisation mehr Immunzellen den Tumor erreichen, die dann wiederum selbst angiogenetische Faktoren bilden können. Zu den potentiellen Regulatoren der Angiogenese zählen u.a. Fibroblast Growth Factor (aFGF, bFGF), TGF- β , TNF- α , Prostaglandin E2 (PGE2) und IL-8.^{24, 26} Die herausragende Rolle unter all diesen Stimuli nimmt jedoch sowohl unter physiologischen, als auch pathologischen Bedingungen das VEGF ein.^{27, 28}

1.1.2.1 VEGF als Mediator der Angiogenese

Bei der Bildung neuer Blutgefäße nimmt VEGF eine zentrale Rolle ein. Seine proliferative Wirkung bezieht sich hauptsächlich auf die Endothelzellen,²⁹ obwohl auch Wirkungen auf andere Zellen beschrieben wurden. Dazu zählen Proliferationssteigerung bei Lymphozyten,³⁰ Retinapigmentepithelzellen,³¹ Schwannzellen³² und auch Effekte auf Tumorzellen wurden beschrieben. Beispielsweise kann es die Invasionsfähigkeit von Mammakarzinomzellen erhöhen⁹ und auch ein möglicher autokriner Wirkmechanismus bei VEGF- Rezeptor exprimierenden Ovariakarzinomen wurde tituliert.³³

Ferner ist VEGF essentiell für die Vaskulogenese während der Embryonalentwicklung. Der Verlust eines VEGF- Allels führt im Maus-Modell zu gravierenden Fehlentwicklungen der Gefäße und zum Tod des Embryos zwischen dem 11. und 12. Tag.^{34, 35} Bei fehlendem VEGF- Rezeptorgen sterben die Embryos bereits zwischen Tag 8,5 und 9,5.^{36, 37}

Weitere pro- angiogenetische Wirkungen des VEGF sind neben der Endothelzellproliferationssteigerung, die Induktion von Proteasen, welche die Zellmigration und damit auch die Angiogenese ermöglichen. Außerdem erhöht VEGF die Lebensdauer bestehender Gefäße³⁸ und erhöht die Gefäßpermeabilität. So wird VEGF in hohem Maße im Aszites von Aszites bildenden Tumoren gefunden.^{22, 39}

Während des Tumorwachstums ist VEGF außerdem in der Lage, die Vaskulogenese einzuleiten, indem es chemotaktisch auf Endothelprogenitorzellen im Knochenmark wirkt.^{40, 41} Über eine vermehrte Bildung von vasoaktiven Substanzen wie Stickstoffmonoxid oder Prostacyclin durch VEGF kann ferner eine Vasodilatation mit resultierendem erhöhten Blutfluss bewirkt werden.⁴² Eine weitere Eigenschaft des VEGF besteht darin, dendritische Zellen in ihrer Differenzierung zu blockieren. Daraus resultiert eine insuffiziente Antigenpräsentation von Tumorantigenen, was wiederum zu einer so genannten Immuntoleranz des Tumors führen kann.⁴³

Da, wie zuvor beschrieben, Tumoren die Bildung neuer Gefäße für ihr Wachstum benötigen, wird die VEGF- mRNA von den meisten Tumorarten überexprimiert.⁴⁴⁻⁴⁷ Verschiedene Studien haben gezeigt, dass hohe VEGF- Level mit erhöhter Tumoraggressivität, gesteigerter Metastasierung und dadurch mit schlechter Prognose einhergehen.^{48, 49}

Das VEGF- Gen und seine Proteinstruktur

Das VEGF- Gen ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert⁵⁰ und umfasst 8 exons, die ca. 14 kb

umspannen.⁵¹ Es gehört zur Platelet-derived Growth Factor (PDGF)- Superfamilie.⁵²

Durch alternatives Splicen werden nach heutiger Erkenntnis sechs Isoformen gebildet, deren Länge zwischen 121 und 206 AS variiert die sich in ihrem Bindungsverhalten und ihrer biologischen Aktivität unterscheiden.⁵¹⁻⁵⁵

Alle Isoformen bilden kovalent verbundene Homodimere von etwa 45kDa.²⁷

VEGF-Expression

Viele Zytokine und Wachstumsfaktoren besitzen die Fähigkeit VEGF- mRNA zu induzieren. Zu ihnen gehören u.a. Fibroblast Growth Factor 4 (Fgf-4), PDGF, TNF- α , TGF α/β , Keratinocyte Growth Factor (KGF), IL-1 α/β , IL-6 u.v.m..^{12-14, 56-59} Den stärksten Stimulus stellt jedoch die Hypoxie dar, wie sie oft im Bereich nekrotischer Areale maligner Tumoren zu finden ist.^{60, 61}

Alle anderen Mitglieder der VEGF- Gruppe sind nicht durch Hypoxie induzierbar, so dass anzunehmen ist, dass VEGF hauptverantwortlich für Hypoxie induzierte Neovaskularisation ist.^{62, 63} Hypoxie beeinflusst nicht nur die VEGF- Transkription, sondern auch die Stabilität der VEGF- mRNA.⁶⁴

VEGF-Splice Varianten

Bisher wurden sechs Isoformen des VEGF-Proteins beschrieben (121-206 AS).⁵¹⁻⁵⁵ Sie entstehen durch alternatives Splicen der mRNA und unterscheiden sich durch das Vorhandensein von Sequenzen der Exons 6 und 7.⁶⁵

Die am meisten vertretene Isoform VEGF 165 ist ein ca. 45 kDa Homodimer mit basischem Charakter und mäßiger Heparinaffinität. Es beinhaltet Sequenzen des Exons 7, diese fehlen bei der Isoform VEGF 121 und machen es zu einem schwach sauren, nicht Heparin- bindenden Molekül.²⁹

VEGF 121 wird von den Zellen frei sezerniert, während VEGF 165 zu großen Teilen zell- und ECM-gebunden bleibt.⁶⁶

VEGF 189 und 206 beinhalten zusätzlich Exon 6 kodierte Sequenzen und sind durch eine starke Heparin- Affinität gekennzeichnet. Diese beiden Isoformen verbleiben vollständig in der ECM bzw. zu geringen Teilen an der Zelloberfläche gebunden.^{55, 66}

VEGF-verwandte Proteine

VEGF stimmt in ca. 20% der AS-Sequenzen mit PDGF überein.⁵² Zur VEGF/PDGF-Familie gehören weiterhin Placental Growth Factor (PlGF),⁶⁷ VEGF-B, VEGF-C,⁶⁸ VEGF-D⁶⁹ und VEGF-E.⁷⁰ PlGF bindet Heparin, Neuropilin-1⁷¹ und VEGFR-1.⁷² VEGF-B bindet an VEGFR-1⁷³ und Neuropilin-1⁷⁴ und steigert die Expression von uPA und Plasminogen Inhibitor und spielt somit evtl. eine Rolle bei Matrixuntergang-, Zelladhäsions- und Migrationsvorgängen. VEGF-C und -D binden VEGFR-3 aber auch -2 und besitzen beide proliferationssteigernde Wirkungen auf Endothelzellen in vitro.^{75, 76} VEGF-C spielt hauptsächlich eine Rolle in der Entstehung von Lymphgefäßen,⁷⁷ VEGF-D könnte neben der Lymphangiogenese eine Rolle bei der Entwicklung der Lunge spielen.⁷⁸ Ebenfalls Homologien zum VEGF zeigen Proteine der sogenannten VEGF-E-Gruppe, die vom orf- Virus kodiert werden. Dieses gehört zur Gruppe der Parapox- Viren und befällt hauptsächlich Ziegen und Schafe, nur selten Menschen. Sie binden VEGFR-2 und scheinen ebenfalls sehr potente Stimuli der Endothelzellproliferation zu sein. Durch Infektion mit dem orf- Virus hervorgerufene Hautläsionen sind durch massive Endothelproliferation und Gefäßdilatation gekennzeichnet.^{70, 79}

VEGF-Rezeptoren

Die VEGF- Rezeptoren VEGFR-1 bis -3 gehören zu den Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität. Sie sind charakterisiert durch sieben extrazellulär gelegene, Immunglobulin (Ig) - ähnliche Areale, einer Membranregion und dem intrazellulären Tyrosinkinase-Area.⁸⁰⁻⁸²

Die höchste VEGF- Affinität besitzt VEGFR-1 (= Flt-1), jedoch wird durch den phosphorylierten VEGFR-1 keine direkte Wirkung auf Proliferation, Migration oder Zytoskelett erzielt.

Eine geringere Affinität zu VEGF besitzt VEGFR-2 (=KDR). Dieser Rezeptor übermittelt beinahe alle bekannten VEGF-Funktionen, wie Endothelzellproliferation, Chemotaxis u.v.m.⁸³⁻⁸⁵

VEGFR-3 (= Flt-4) befindet sich fast ausschließlich auf lymphatischen Gefäßen und bindet VEGF-C und -D, jedoch kein VEGF.^{82, 86, 87}

Ein weiterer VEGF- bindender Rezeptor ist das Neuropilin-1. Dieser spielt eine Rolle als Co-Rezeptor für VEGF 165, indem er die Bindung an VEGFR-2 und seine Bioaktivität erhöht. Bei Zellen, die nur Neuropilin-1 ohne VEGFR-2 exprimieren konnte keine VEGF 165-Wirkung beobachtet werden.⁸⁸

Einen Überblick über die verschiedenen VEGF- Rezeptoren und deren Liganden bietet folgende

Tabelle:

Rezeptor	Ligand
VEGFR-1 (flt-1)	VEGF 121, VEGF 165, VEGF-B, PlGF-1/-2
VEGFR-2 (KDR/flk-1)	VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF-C/-D/-E
VEGFR-3 (flt-4)	VEGF-C/-D
Neuropilin-1	VEGF 165, VEGF-B, PlGF-2

Tabelle 1) Überblick VEGF- Rezeptoren und Liganden

Heparin und Heparansulfatproteoglycane

Heparin und Heparansulfatproteoglycane verbessern die Bindungsfähigkeit von VEGF 165 an VEGFR-2, inhibieren jedoch die Bindung an VEGFR-1. Die Heparin bindenden VEGF- Formen können Heparansulfatproteoglycane (HSPG´s) in der ECM und an der Zelloberfläche binden und dort andere angiogenetische Faktoren wie bFGF freisetzen.⁸⁹

1.2 Das Ovarialkarzinom und Angiogenese

Das Ovarialkarzinom ist eine der häufigsten gynäkologischen Neoplasien und hat unter diesen die höchste Mortalität. Etwa zwei Drittel der Patientinnen befinden sich bei Diagnosestellung bereits in fortgeschrittenen Stadien.⁹⁰ Wie viele andere Malignome ist auch das Ovarialkarzinom meist hypervaskularisiert, die Gefäßdichte korreliert mit der Aggressivität des Tumors.⁹¹ In fortgeschrittenen Stadien bilden Ovarialkarzinome häufig große Mengen Aszites und peritoneale Metastasen.⁹² Es wird davon ausgegangen, dass dem VEGF als Faktor mit hoher angiogenetischer Potenz und Gefäßpermeabilität erhöhender Wirkung, hinsichtlich Wachstum und v.a. der Entstehung des malignen Aszites beim Ovarialkarzinom, eine besondere Rolle zukommt.⁹³⁻⁹⁷ Bereits unter physiologischen Bedingungen reguliert VEGF die Neovaskularisation des Corpus luteum im Rahmen der Follikelreifung und bildet damit eine der wenigen Situationen, bei denen Angiogenese im erwachsenen Organismus vorkommt.⁹⁸

Verschiedene Studien konnten häufiger erhöhte VEGF-Konzentrationen im Ovarialkarzinomgewebe im Vergleich zu normalen Ovarien aufzeigen. Die Überexpression von VEGF korrelierte mit einer schlechteren Prognose.^{96,99}

In einer Studie mit inhibitorischen anti-VEGF-Antikörpern an Mäusen wurden den Tieren SKOV-3-Ovarialkarzinomzelllinien subcutan bzw. intraperitoneal implantiert. Es zeigte sich, dass in der Gruppe mit subcutan implantierten Tumoren der VEGF-Antikörper das Tumorwachstum inhibieren konnte. In der Tiergruppe mit intraperitonealer Tumorentplantation konnte durch die Antikörper eine komplette Inhibition des Aszites und eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden. Nach Absetzen der Antikörpertherapie kam es bei den Tieren zu erneuter Aszitesbildung und Kachexie. Bezüglich des Tumorwachstums konnte somit nur eine partielle Inhibition erreicht werden.^{99, 100}

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine essentielle Rolle des VEGF bei der Entstehung von malignem Aszites beim Ovarialkarzinom anzunehmen ist. Für die intraperitoneale Karzinomatose müssen jedoch auch VEGF-unabhängiges Wachstum und weitere, für die Angiogenese bedeutsame Faktoren diskutiert werden.

Eine kürzlich erschienene Studie konnte zeigen, daß bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen, die nicht auf eine platinhaltige Chemotherapie angesprochen hatten, eine signifikant erhöhte VEGF-Expression im Tumorgewebe vorlag. In der Platin-sensiblen Kontrollgruppe war hingegen keine erhöhte VEGF-Bildung im Tumorgewebe nachweisbar. Somit könnte die Expression von VEGF außerdem ein Prognosefaktor für das Ansprechen auf ein Platin-haltiges Chemotherapie-Regime sein. Besonders bei den Patientinnen mit erhöhter VEGF-Bildung könnte dann eine antiangiogenetische Therapie von hohem Wert sein.¹⁰¹

Hinsichtlich der großen epidemiologischen Bedeutung und schlechten Prognose des Ovarialkarzinoms kommt dem besseren Verständnis der Angiogeneseregulation ein hoher Stellenwert zu. Vor allem aber auch die Frage nach therapeutischen Optionen mittels Angiogenesehemmung, zumindest in Form von palliativer Aszitesbekämpfung, macht ein besseres Verständnis der Angiogenesevorgänge im Ovarialkarzinom unerlässlich.

1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Zellkulturversuchen an Ovarialkarzinomzelllinien die Regulation verschiedener inflammatorischer Zytokine und des VEGF hinsichtlich Expression und gegenseitiger Wechselwirkung, sowie die Wirkung von Hypoxie auf diese Zytokine untersucht. Ferner wurde der Einfluss des VEGF auf das Proliferations-, Invasions- und Migrationsverhalten der Karzinomzellen kontrolliert.

- Welche Basisexpressionen der Zytokine VEGF, IL-8, IL-6, TNF- α und IL-10 finden sich in den unstimulierten Ovarialkarzinomzelllinien CAOV-3, OAW-42, OVCAR-3 und SKOV-3?
- Wie wirken die Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TGF- β und TNF- α auf die VEGF-Konzentration in den Ovarialkarzinomzelllinien?
- Wie wirkt VEGF auf die Konzentration der Zytokine IL-8 und IL-6 in den Ovarialkarzinomzelllinien?
- Welchen Einfluss hat VEGF auf das Proliferations-, Invasions- und Migrationsverhalten in den Ovarialkarzinomzelllinien?
- Welchen Einfluss hat Hypoxie auf die untersuchten Zytokine in den Ovarialkarzinomzelllinien?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

SKOV-3 Seröses Karzinom des Ovars	Cell Lines Service, Heidelberg
OVCAR-3 Seröses Karzinom des Ovars	Cell Lines Service, Heidelberg
OAW-42 Seröses Karzinom des Ovars	Cell Lines Service, Heidelberg
CAOV-3 Seröses Karzinom des Ovars	WAK Chemie Medical GmbH, Bad Soden

2.1.2 Chemikalien und Antikörper

Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Foetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, AU
Hypoxiegas (97% N ₂ ; 3% O ₂)	AGA Gas GmbH & Co KG, Hamburg
L-Glutamin	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Interleukin 1 β (IL-1 β), rekombinant, human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin 6 (IL-6),	R&D Systems, Wiesbaden

rekombinant, human	
Interleukin 8(IL-8), rekombinant, human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin 10 (IL-10), rekombinant, human	R&D Systems, Wiesbaden
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Monoklonaler anti-VEGF- Antikörper / biotinylierter anti- VEGF- Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden
Monoklonaler anti-IL-6 Antikörper/ biotinylierter anti- IL-6 Antikörper	Endogen, Woburn, USA
Monoklonaler anti-IL-8 Antikörper/ biotinylierter anti- IL-8 Antikörper	Endogen, Woburn, USA
Monoklonaler anti-TNF- α Antikörper/ biotinylierter anti- TNF- α Antikörper	Endogene, Woburn, USA
Monoklonaler anti-IL-10 Antikörper/ biotinylierter anti- IL-10 Antikörper	Endogen, Woburn, USA
MTT- Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Peroxidase	Roche, Mannheim

Tetramethylbenzidine (TMB) fertiglösung	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Transforming Growth Factor β (TGF- β)	R&D Systems, Wiesbaden
Trypsin / EDTA – Lösung 0,5% / 0,2% (w/v) in PBS (10-fach konzentriert)	Biochrom KG, Berlin
Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α)	R&D Systems, Wiesbaden
Tween 20	Serva, Heidelberg
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	R&D Systems, Wiesbaden
XTT- Reagenz	Roche, Mannheim

2.1.3 Lösungen, Kulturmedien

DMEM, serumhaltig:	500	ml	DMEM
	10	ml	L-Glutamin
	50	ml	FCS
DMEM, serumfrei:	500	ml	DMEM
	10	ml	L-Glutamin
10*PBS	82,3	g	Na ₂ HPO ₄
	23,5	g	NaH ₂ PO ₄
	40	g	NaCl → mit Aqua bidest. Auf 1000 ml auffüllen

10*TBS	18	g	Tris Base
	137	g	Tris HCl
	175,6	g	NaCl → mit Aqua bidest. auf 2000 ml auffüllen und auf pH 7,4 einstellen

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kulturplatten-6-well mit Transwelleinsätzen	Corning Costar, Cambridge, USA
Kulturplatten 96 well	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Maxisorp-96-well-Mikrotiterplatten	NUNC, Roskilde, Dänemark
Objektträger	CSM, Phoenix, USA
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
Petrischalen für Zellkultur	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Zellschaber	Corning Costar, Cambridge, USA

2.1.5 Geräte

Abzug	Captair, Düsseldorf
Casy-Zellzählgerät	Schärfe Systems, Reutlingen
Dampfsterilisator Varioclav	H+P Labortechnik, München
Kulturkammer für Anaerobier	Billups, Rothenburg

Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer Variomag	H+P Labortechnik, München
pH-Meter	Mettler, Schwerzenbach, Schweiz
Photometer (Mikroplate-Reader)	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reinstwasseranlage Elix 10 / MilliQ ^{Plus}	Millipore, Eschborn
Schüttler	Edmund Bühler, Tübingen Biometra, Göttingen
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waschgerät für 96-well-Platten(Immunowash)	Bio-Rad,USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zellkulturmikroskop IMT-2	Olympus Optical, Hamburg
Zellkulturbrutschrank BB 16	Heraeus, Hanau
Zellkulturwerkbank	Heraeus, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3, OAW-42 und CAO-3 wuchsen in 75 cm²-Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FCS. Die Inkubation im Zellkulturschrank erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem 5%igen Volumenanteil CO₂. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Das

Kulturmedium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Bei nahezu vollständiger Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und anschließend passagiert. Die entnommenen Zellen konnten daraufhin für Versuche verwendet werden.

2.2.2 Versuchsanordnung

2.2.2.1 Bestimmung der Basisexpression der untersuchten Zytokine in den Ovarialkarzinomzelllinien

In der nach Trypsinierung und Zentrifugation gewonnenen Zellsuspension wurde mit dem Casy-Cell Counter die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen in der Konzentration 100.000 Zellen/ ml, mit 200 µl pro well in die 96-well- Kulturschale eingesät. Am zweiten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt und anschließend 50µl Medium (serumhaltiges DMEM) in jedes well dazugegeben. Die Überstände wurden nach 24 Stunden geerntet und die Konzentrationen von VEGF, IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α wurde aus den Überständen mittels ELISA bestimmt (s.u.). Routinemäßig wurde die Zytokinkonzentration pro Milliliter Überstand gemessen.

In einem Teil der Versuche wurde zur Kontrolle, ob eventuelle Konzentrationsunterschiede auf Schwankungen in der Zellzahl zurückzuführen waren, mit den im well verbliebenen Zellen ein MTT-Test zur Zellzahlbestimmung durchgeführt (s.u.). Hier wurde die Zytokinkonzentration pro 1000 Zellen dargestellt. Bezüglich der Regulation der Zytokine ergaben sich bei beiden Versuchsreihen identische Ergebnisse.

2.2.2.2 Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Zytokinen in den Ovarialkarzinomzelllinien

Die Zelllinien wurden wie unter 2.2.2.1. beschrieben trypsiniert, gezählt und ausgesät. Am zweiten Tag erfolgte der Mediumwechsel (DMEM mit FKS) und die Zugabe von 50µl der folgenden Zytokine (Konzentration der Zytokinlösung in der Tabelle), sowie von 50µl Medium als Kontrolle:

<i>Zytokin</i>	<i>Konzentration der Lösung</i>	<i>Endkonzentration</i>
Interleukin 1 β (IL-1 β)	5 ng/ml	1 ng/ml
IL-6	500 ng/ml	100 ng/ml
IL-8	50 ng/ml	10 ng/ml
IL-10	50 ng/ml	10 ng/ml
TNF- α	50 ng/ml	10 ng/ml
TGF- β (c1)	25 ng/ml	5 ng/ml
TGF- β (c2)	2,5 ng/ml	0,5 ng/ml
VEGF	125 ng/ml	25 ng/ml

Tabelle 2) Konzentrationen der zugefügten Zytokine im Versuch zu den Wechselwirkungen zwischen den Zytokinen in den Ovarialkarzinomzelllinien

Die Überstände wurden nach 72 Stunden entnommen und mit dem ELISA die Konzentrationen von VEGF, IL-6, IL-8, TNF- α und IL-10 bestimmt.

Traten bei dieser Untersuchung signifikante Veränderungen auf, so wurden weitere Versuche durchgeführt, und die Zytokinkonzentration in einer Zeitreihe über 24, 48 und 72 Stunden gemessen.

2.2.2.3 Wirkung von Hypoxie auf die Ovarialkarzinomzelllinien

Die nach Trypsinierung und Zentrifugation gewonnenen Zellen wurden gezählt. Anschließend wurden sie mit 200 μ l pro well und einer Konzentration von 100.000 Zellen/ ml in die 96-well-Kulturschale ausgesät.

Am zweiten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt und in jedes well 50 μ l Medium hinzugefügt. Danach wurde die Schale in die Kulturkammer für Anaerobier verbracht und diese mit dem 97 % Stickstoff, 3% Sauerstoff -Hypoxiegas gefüllt.

Die Kontrollen wurden ebenso behandelt, jedoch unter Normoxie gehalten.

Das Ernten der Überstände erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden.

Die Konzentrationen von VEGF, IL-6 und IL-8 wurden aus den Überständen mittels ELISA bestimmt.

2.2.3 ELISA

Zur Bestimmung der Konzentrationen der verschiedenen Zytokine in den Überständen der betreffenden Zellkulturversuche wurde die ELISA-Technik genutzt.

Prinzip des Sandwich- ELISA's:

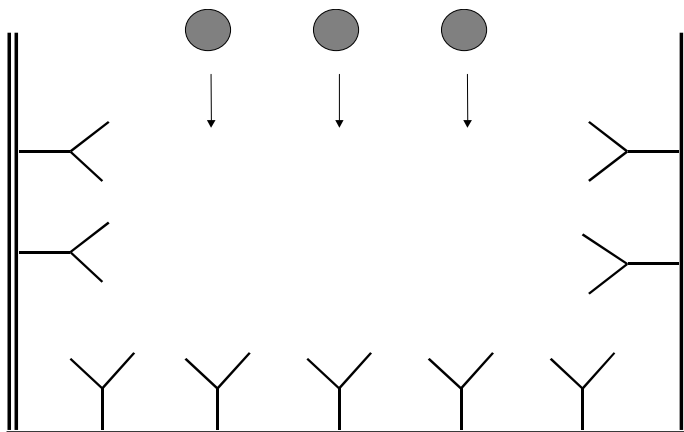


Abbildung 1a) Die spezifischen Antikörper binden an die Oberfläche der Mikrotiterplatte. Nach einer entsprechenden Inkubation wird das Substrat hinzugegeben

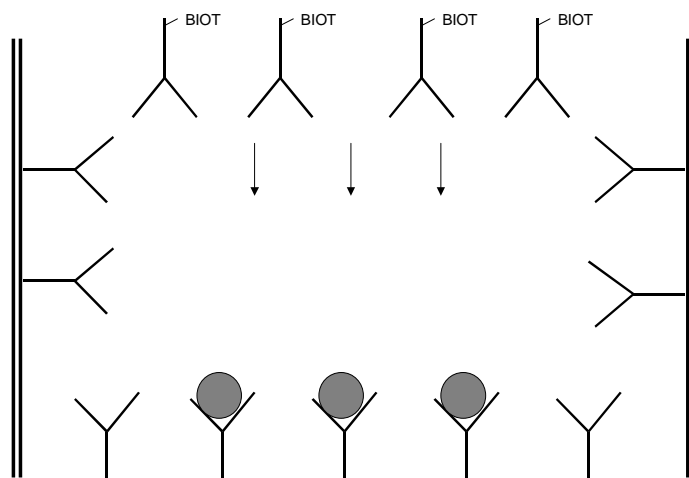


Abbildung 1b) Die biotinylierten Antikörper binden ebenfalls an das Substrat

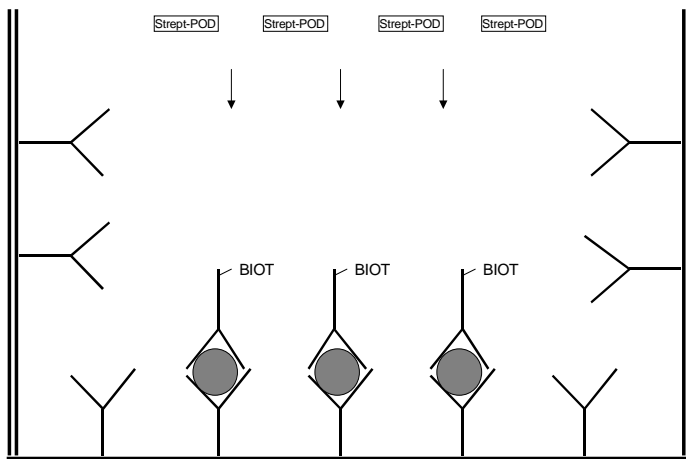


Abbildung 1c) Streptavidinperoxidase wird hinzugegeben

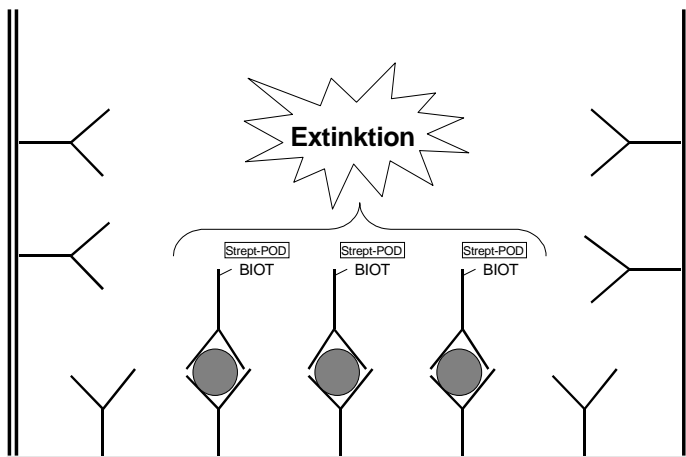


Abbildung 1d) Es bildet sich ein Komplex, dessen Extinktion nach Zugabe von TMB-Reagenz gemessen werden kann

Vorbereitung der Mikrotiterplatten:

Zu Beginn wurden Maxisorp-96-well-Mikrotiterplatten mit 100 µl pro well des jeweiligen Antikörpers (anti-VEGF (0,5- 4 µg/ml), anti-TNF-α (2- 4 µg/ml), anti-IL-6 (1- 3 µg/ml), anti-IL-8 (1- 3 µg/ml) und anti-IL-10 (2-6µg/ml), gelöst in PBS) beschichtet und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde die Antikörperlösung dekantiert und mit 200 µl PBS mit 4% BSA in jedem well blockiert. Die Inkubationszeit betrug mindestens 2 Stunden.

Anschließend wurden die Platten mit 400µl TBS mit 0,02% Tween 20 pro well gewaschen.

Durchführung des Assay`s:

Eine Standardverdünnungsreihe des jeweiligen Zytokins bekannter Konzentration wurde angelegt und die zu messenden Proben wurden mit 50 µl pro well hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen (s.o.) und die biotinylierten Detektionsantikörper in PBS mit 2% BSA (anti-VEGF (0,25-2 µg/ml), anti-TNF-α (0,25-0,75 µg/ml), anti-IL-6 (0,1-0,5 µg/ml), anti-IL-8 (0,05-0,1 µg/ml) und anti-IL-10 (0,25- 1µg/ml) mit je 100 µl pro well hinzugegeben. Es erfolgte die Inkubation von 2 Stunden und das anschließende Waschen der Platten (s.o.).

Nun wurden pro well 100µl Streptavidin-Peroxidase mit einer Verdünnung von 1:25.000 in PBS mit 2% BSA hinzugefügt, für 45 Minuten inkubiert und die Platten erneut gewaschen (s.o.).

Nach der Zugabe von 100 µl TMB- Fertiglösung pro well, trat nach etwa 10 bis 60 Minuten eine Blaufärbung der wells auf und die Reaktion wurde mit 100µl 0,5 N Schwefelsäure pro well abgestoppt.

Die Messung der Extinktion erfolgte mittels Mikroplatten-Photometer (450nm, Referenzwellenlänge 690 nm). Anhand der Standardverdünnungsreihe wurde mit Excel eine Standardkurve erstellt, mit welcher sich die Konzentration der einzelnen Proben bestimmen ließ.

2.2.4 MTT-Test

Nach dem Ernten der Überstände, wie unter 2.2.2 beschrieben, wurden jedem well 100 µl Medium hinzugefügt und für eine Stunde inkubiert.

Es erfolgte die Zugabe von 10 µl pro well der MTT-Reagenz und eine erneute Inkubation für 4 Stunden.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Überstände entfernt, jedem well 100 µl DMSO hinzugegeben und mittels Photometer bei 540 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen.

Die zu bestimmenden Zellzahlen konnten nun anhand der Extinktionen, der zuvor mit definierter Zahl ausgesäten Zellen errechnet werden.

2.2.5 Proliferationsassay

Die Zelllinien CAOV-3, OVCAR-3 und SKOV-3 wurden trypsiniert, zentrifugiert und mit einer Konzentration von 30.000 Zellen/ml in 96-well-Kulturplatten ausgesät. In jedem well befanden sich 100 µl. Die Zellen wuchsen in DMEM(serumhaltig), welches nach 24 Stunden gewechselt wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 50µl der Reagenzien mit nachfolgenden Konzentrationen b. z. w. Medium als Kontrolle.

Zytokin	Konzentration der Lösung	Endkonzentration
IL-6	500 ng/ml	166,7 ng/ml
IL-8	50 ng/ml	16,7 ng/ml
VEGF	5/ 25/ 125 ng/ml	1,67/ 8,33/ 41,7 ng/ml

Tabelle 3) Konzentrationen de den Ovarialkarzinomzelllinien zugefügten Zytokine im Proliferationsassay

Nach weiteren 72 Stunden wurde zu jedem well die XTT-Reagenz (75 µl) hinzugegeben und nach einer Reaktionszeit von 4 Stunden erfolgte die Photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 690 nm).

Die Proliferationsrate wurde in Prozent vom Kontrollwert angegeben.

2.2.6 Invasionsassay

Die Transwelleinsätze (Porengröße 8 µm, Fläche 4,7 cm) der 6-well-Kulturplatten wurden mit in serumfreiem DMEM verdünntem (1mg/ml) Matrigel (675 µl pro well) beschichtet. Dabei war auf die ständige Kühlung der Arbeitsmittel mit Eis zu achten. Anschließend wurden die Platten für mindestens 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die Membranen mit serumfreiem DMEM gespült und überschüssiges Matrigel abgesaugt.

Die Zelllinien CAOV-3, OVCAR-3 und SKOV-3 wurden trypsiniert, zentrifugiert und auf eine Konzentration von 200.000 Zellen/ ml in serumfreiem Medium eingestellt. Von dieser Suspension wurden nun 1,5 ml ins obere Kompartiment gegeben, ins untere Kompartiment 2,5 ml serumfreies Medium ohne Zellen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl VEGF-Lösung bzw. 150 µl Medium als Kontrolle in beide Kompartimente.

Nach 72 Stunden wurde in beide Kompartimente MTT-Reagenz gegeben und für 4 Stunden

inkubiert.

Nach Absaugen des Mediums wurden die invasiven Zellen an der Unterseite der Membran vorsichtig mit dem Zellschaber abgewischt, mit 200 µl DMSO gelöst und in eine 96-well-Platte überführt. Auch die nichtinvasiven Zellen im oberen Kompartiment wurden in 200 µl DMSO gelöst und in die 96-well-Platte überführt. Anschließend erfolgte die photometrische Messung mit dem Mikroplate- Reader bei 490 nm (Referenzwellenlänge 690nm).

Bei der Auswertung konnte nun die Invasionsfraktion als Verhältnis zu den nicht invasiven Zellen, sowie die Invasionssteigerung als prozentuales Verhältnis zur Kontrolle bestimmt werden.

2.2.7 Migrationsassay

Vorbereitung des Objektträgers:

Der Migrations- Objektträger wurde in eine 100mm Petrischale gestellt und in jedes well auf dem Objektträger 50µl Matrigel pipettiert.

Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurde die wells mit 1% BSA in PBS blockiert und wiederum für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gespült und auf jedes well 70 µl DMEM gegeben.

Durchführung des Assays:

Der zuvor autoklavierte und auf 4°C vorgekühlte Sedimentationsblock wurde nun vorsichtig auf den Objektträger aufgesetzt und mit einer Pipette in jedem Kanal aspiriert bis das Medium aus den wells den Rand des Kanals erreichte.

Die Zelllinien OVCAR-3 und CAOv-3 wurden trypsiniert, zentrifugiert, gezählt und auf eine Konzentration von 400 Zellen pro µl eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden nun sehr vorsichtig und langsam 10 µl in jeden Kanal pipettiert.

Die gesamte Petrischale blieb nun für eine Stunde auf Eis stehen und verblieb danach im Zellkulturschrank.

Nach 24 Stunden wurde der Sedimentationsblock heruntergenommen, jedes well abgesaugt und 64 µl Medium wieder hinzugefügt. Des Weiteren wurden zu jedem well 16 µl VEGF- Lösung (125 ng/ml → Endkonzentration 25 ng/ml) b. z .w. Medium als Kontrolle pipettiert.

Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel mit und ohne VEGF durchgeführt.

Am 7. Tag nach Zellaussaat wurde dann das Medium abgesaugt, zu jedem well 20 μ l 70% Ethanol dazugegeben und für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit Kristalviolett gefärbt und nach 30 Minuten mit Wasser gespült.

Die Messung der Migrationsgrenzen erfolgte mittels PC.

2.2.8 Statistik

Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen mit Doppelansätzen durchgeführt. Bei einigen aufwändigen Versuchen, die keine signifikanten Ergebnisse zeigten, wurde der Umfang auf zwei unabhängige Versuche mit Doppeltansätzen reduziert.

Zur Prüfung der Signifikanz wurde der Student's t-Test verwendet. Ab einem p-Wert von kleiner 0,05 wurde Signifikanz angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Basisexpressionen der Zytokine in unstimulierten Ovarialkarzinomzelllinien

In dieser Versuchsreihe wurden die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus den Überständen der unstimulierten Zelllinien nach 24 Stunden bestimmt. Die Messung der jeweiligen Konzentrationen erfolgte mittels ELISA-Technik.

3.1.1 Basisexpression von VEGF

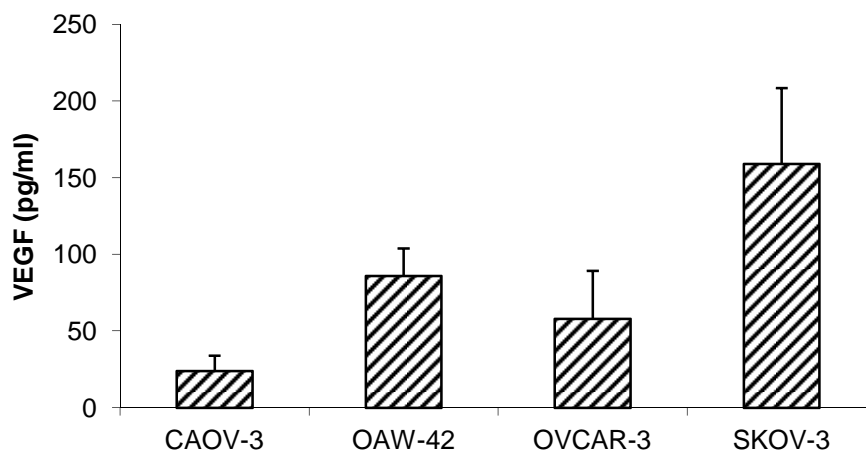


Abbildung 2) Basisexpression von VEGF in Ovarialkarzinomzelllinien (ELISA), gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

Die Nachweisgrenze für VEGF lag bei 25 pg/ml, diese wird bei CAOV-3 knapp erreicht, bei allen anderen überschritten. Unter den untersuchten Zelllinien exprimiert SKOV-3 am stärksten VEGF.

3.1.2 Basisexpression von IL-8

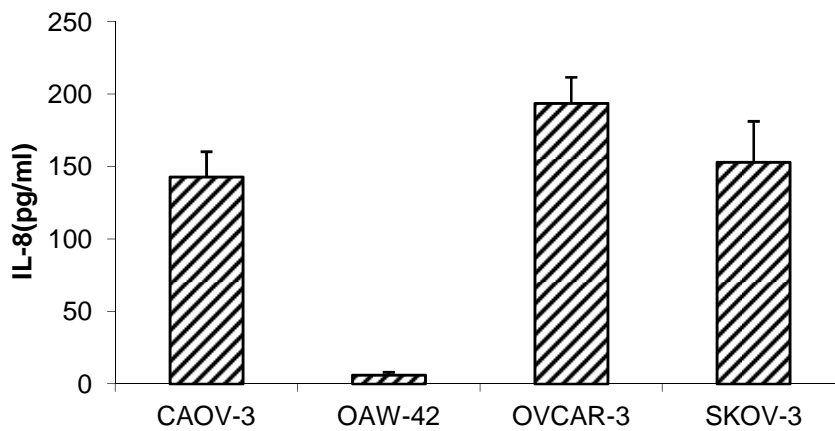


Abbildung 3) Basisexpression von IL-8 in Ovariakarzinomzelllinien (ELISA), gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

Die Nachweisgrenze für IL-8 betrug 20 pg/ml, sodass bei der Zelllinie OAW-42 kein IL-8 nachgewiesen werden konnte. Der stärkste Nachweis von IL-8 fand sich bei OVCAR-3.

3.1.3 Basisexpression von IL-6

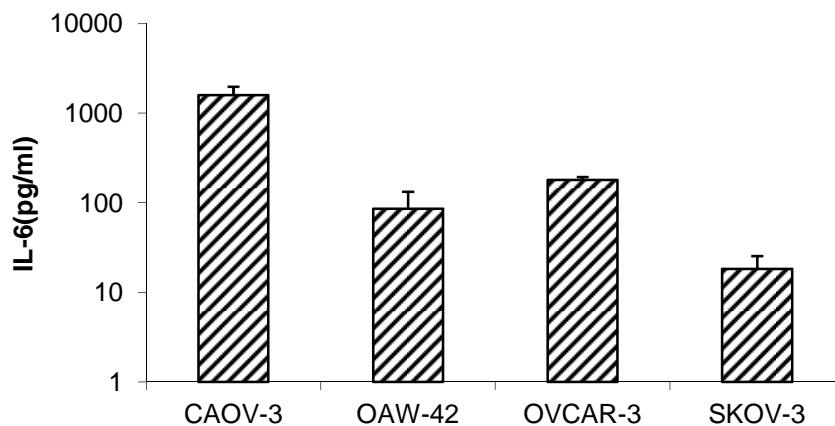


Abbildung 4) Basisexpression von IL-6 in Ovariakarzinomzelllinien (ELISA), gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

Die Nachweisgrenze für IL-6 betrug 20 pg/ml. Demnach konnte in der Zelllinie SKOV-3 keine IL-6-Expression beobachtet werden. Bei der Zelllinie CAOV-3 hingegen, waren sehr hohe

Konzentrationen von IL-6 nachweisbar, sodass eine logarithmische Darstellung gewählt wurde.

3.1.4 Basisexpressionen von IL-10 und TNF-alpha

Unter der Berücksichtigung der Nachweisgrenze von 20 pg/ml war IL-10 in den getesteten Ovarialkarzinomzelllinien nur bei OVCAR-3 knapp nachweisbar.

Bei einer Nachweisgrenze von 20 pg/ml war in keiner der untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien TNF-alpha nachweisbar.

3.1.5 Zusammenfassung der Basisexpressionen der untersuchten Zytokine in den Ovarialkarzinomzelllinien

Einen Überblick über die Basisexpressionen gibt folgende Tabelle:

	CAOV-3	OAW-42	OVCAR-3	SKOV-3
VEGF	(+)	+	+	+
IL-8	+	-	+	+
IL-6	++	+	+	-
IL-10	-	-	(+)	-
TNF-alpha	-	-	-	-

++ *stark exprimiert*, + *exprimiert*, (+) *nachweisbar*, - *nicht nachweisbar*

Tabelle 4) Zusammenfassung der Basisexpressionen der Zytokine in den Ovarialkarzinomzelllinien, gemessen mit ELISA-Technik in drei unabhängigen Experimenten

Bereits die Bestimmung der Basisexpressionen zeigt, dass das Expressionsmuster der verschiedenen Zytokine in den unterschiedlichen Zelllinien sehr heterogen ist. Einzig VEGF wird, obgleich in unterschiedlicher Stärke von allen vier Zelllinien gebildet. Hingegen konnten IL-10 und TNF-alpha überhaupt nicht nachgewiesen werden. Bei der Bildung von IL-6 zeigten die vier Zelllinien eine erhebliche Varianz. So wurde von CAOV-3 sehr viel, von SKOV-3

hingegen kein IL-6 gebildet.

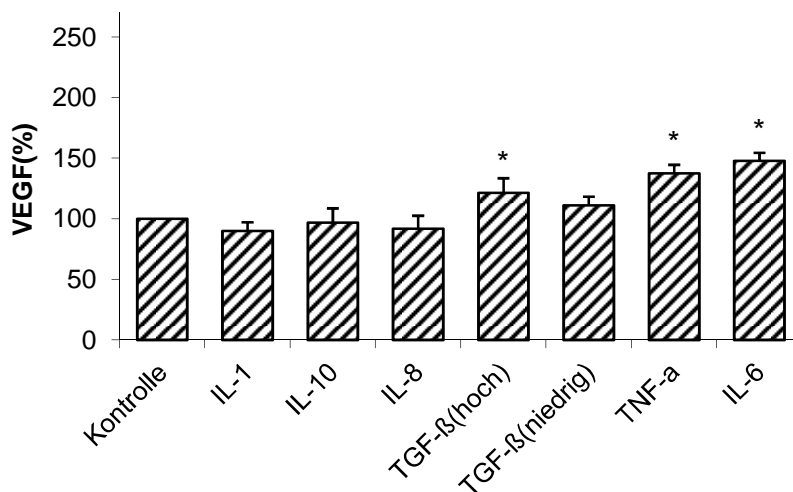
Alle Basisexpressionen wurden in drei unabhängigen Versuchen mit Doppelansätzen bestimmt.

Die Umrechnung der Konzentrationen auf die Zellzahl zeigte keine Veränderung der Ergebnisse.

3.2 Wie wirken die Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TGF- β und TNF- α auf die VEGF-Konzentration in den Ovarialkarzinomzelllinien?

Um zu überprüfen, ob und wie stark die in der Überschrift genannten Zytokine die Expression von VEGF in den untersuchten Zelllinien verändern, wurden nach 72 stündiger Inkubation unter Zytokinzugabe, die Überstände mittels ELISA auf VEGF untersucht und die Ergebnisse mit der Basisexpression verglichen.

3.2.1 TGF- β , TNF- α und IL-6 erhöhen VEGF bei CAOV-3

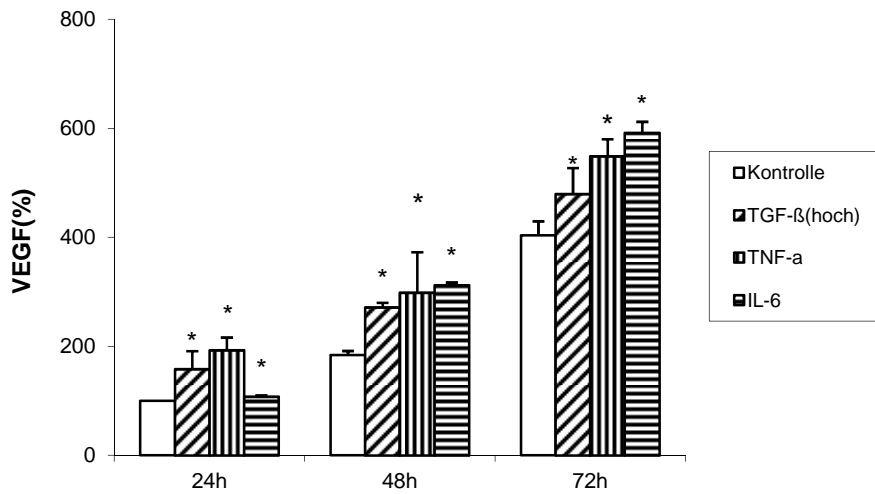


* p-Werte: TGF- β (hoch) vs. Kontrolle = 0,0174
TNF- α vs. Kontrolle = 4,35E-05
IL-6 vs. Kontrolle = 8,003E-05

Abb. 5) Einfluss der Zytokine auf die VEGF-Konzentration bei CAOV-3 nach 72h, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

Unter den untersuchten Zytokinen erhöhen TGF- β (hohe Konzentration), TNF- α und IL-6 die VEGF-Konzentration bei CAOV-3 Zelllinien nach 72h signifikant. Von diesen wurde eine

Zeitreihe über 24, 48 und 72h bestimmt.



p-Werte: 24h : TGF-β (hoch) vs. Kontrolle (24h) = 0,0083
 TNF-α vs. Kontrolle (24h) = 0,0002
 IL-6 vs. Kontrolle (24h) = 0,0019
 48h : TGF-β (hoch) vs. Kontrolle (48h) = 1,9E-05
 TNF-α vs. Kontrolle (48h) = 0,011
 IL-6 vs. Kontrolle (48h) = 3,72E-07
 72h : TGF-β (hoch) vs. Kontrolle (72h) = 0,0174
 TNF-α vs. Kontrolle (72h) = 4,35E-05
 IL-6 vs. Kontrolle (72h) = 8,003E-05

Abb. 6) Einfluss der Zytokine auf die VEGF-Konzentration bei CAOV-3 -Zeitreihe, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

Die Erhöhung der VEGF-Konzentration unter Einfluss der ausgewählten Zytokine zeigte sich hierbei zeitabhängig. (Ausnahme: TNF-α, 48h-Wert)

3.2.2 Keines der Zytokine erhöht VEGF bei OAW-42

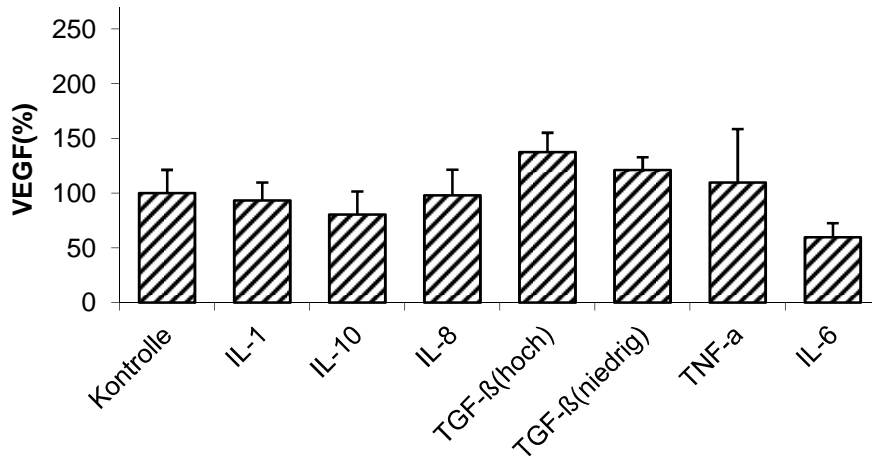
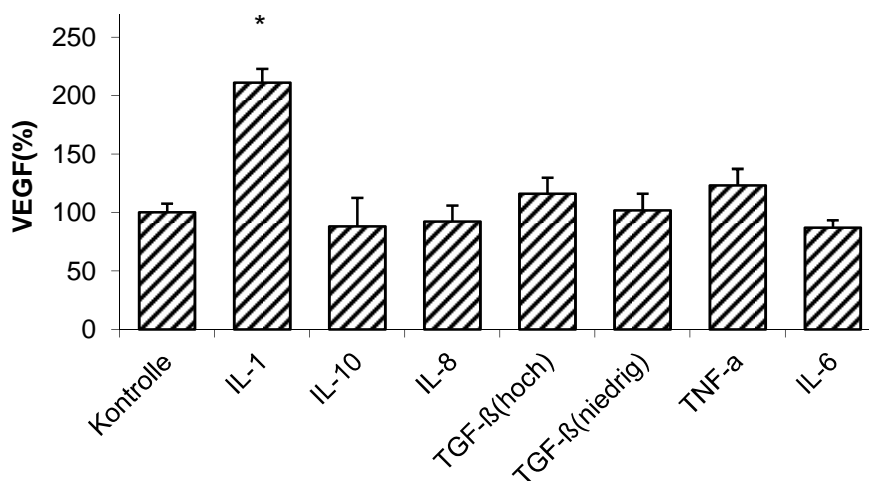


Abb. 7) Einfluss der Zytokine auf die VEGF-Konzentration bei OAW-42 nach 72h, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen

Bei der Zelllinie OAW 42 konnte 72 h nach Zugabe der untersuchten Zytokine keine signifikante Änderung der VEGF-Konzentration gemessen werden.

3.2.3 IL-1β erhöht VEGF bei OVCAR-3 um das Doppelte

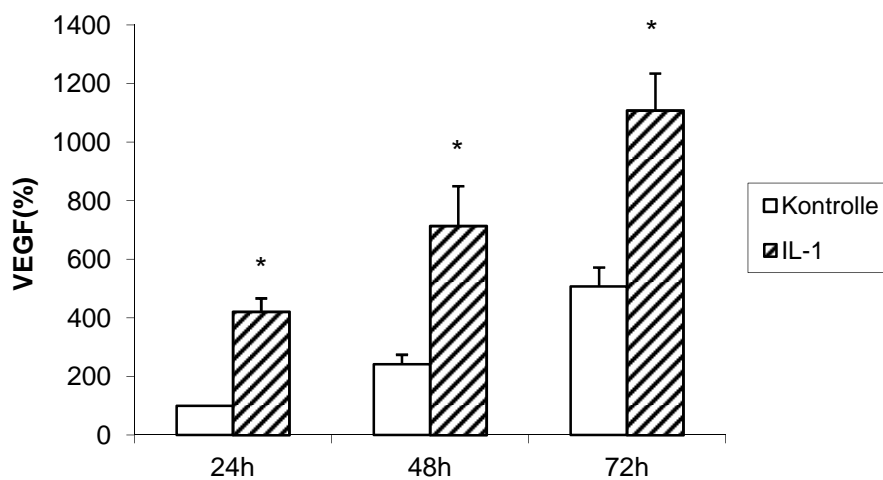


* p-Wert: IL-1β vs. Kontrolle = 4,7E-05

Abb. 8) Einfluss der Zytokine auf die VEGF-Konzentration bei CAOV-3 nach 72h, gemessen mit dem

ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

Unter den untersuchten Zytokinen erhöht nur IL-1 β die Konzentration des VEGF bei OVCAR-3 um das Doppelte und wurde als Zeitreihe untersucht.



* p-Werte: 24h : IL-1 β vs. Kontrolle (24h) = 1,2E-0,5

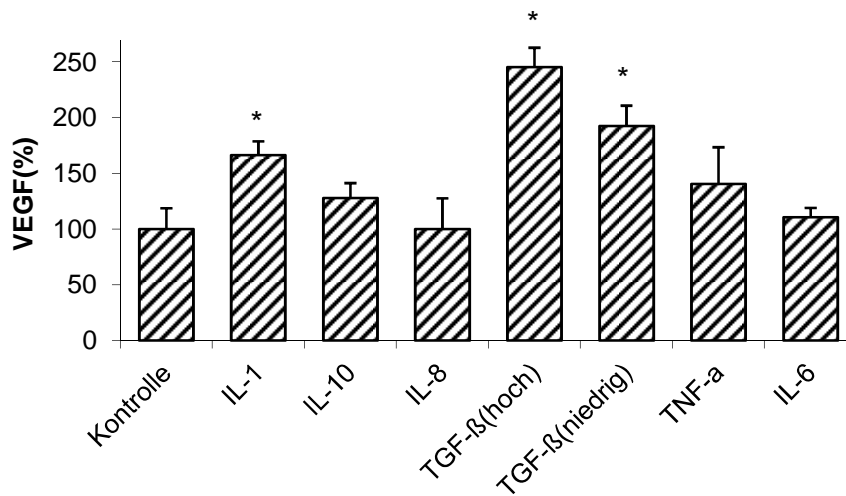
48h : IL-1 β vs. Kontrolle (48h) = 0,00028

72h : IL-1 β vs. Kontrolle (72h) = 4,7E-05

Abb. 9) Einfluss der Zytokine auf die VEGF-Konzentration bei OVCAR- -Zeitreihe, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

Auch in der Zeitreihe konnte bei OVCAR-3 eine Zeitabhängigkeit für die durch IL-1 β erhöhte VEGF-Bildung nachgewiesen werden.

3.2.4 TGF- β und IL-1 β erhöhen VEGF bei SKOV-3



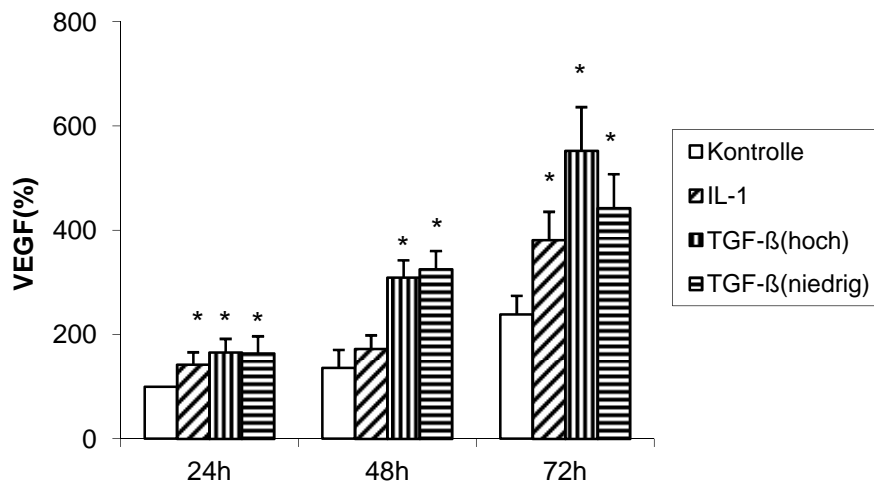
* p-Werte: 72h : TGF- β (hoch) vs. Kontrolle = 1E-04

TGF- β (niedrig) vs. Kontrolle = 0,0015

IL-1 β vs. Kontrolle = 0,0003

Abb. 10) Einfluss der Zytokine auf die VEGF-Konzentration bei SKOV-3 nach 72h, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

Bei SKOV-3 konnten von allen untersuchten Zytokinen nach 72h IL-1 β und TGF- β (in beiden Konzentrationen) die Konzentration von VEGF signifikant erhöhen. Es folgt die Untersuchung der genannten Zytokine in der Zeitreihe.



* p-Werte: 24h : TGF-β (hoch) vs. Kontrolle (24h) = 0,0017
 TGF-β (niedrig) vs. Kontrolle (24h) = 0,0051
 IL-1β vs. Kontrolle (24h) = 0,0073
 48h : TGF-β (hoch) vs. Kontrolle (48h) = 4,6E-07
 TGF-β (niedrig) vs. Kontrolle (48h) = 1,4E-05
 IL-1β vs. Kontrolle (48h) = 0,07
 72h : TGF-β (hoch) vs. Kontrolle (72h) = 1E-04
 TGF-β (niedrig) vs. Kontrolle (72h) = 0,0015
 IL-1β vs. Kontrolle (72h) = 0,0003

Abb. 11) Einfluss der Zytokine auf die VEGF-Konzentration bei SKOV-3 -Zeitreihe, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

Auch in der Zeitreihe konnten die Zytokine IL-1β und TGF-β (in beiden Konzentrationen) die Konzentration von VEGF zeitabhängig erhöhen. (Ausnahme: IL-1β, 48h-Wert)

3.2.5 Zusammenfassung der Wirkung der Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TGF- β und TNF- α
auf die VEGF-Konzentration in den Ovarialkarzinomzelllinien

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Wirkung der o.g. Zytokine auf die Konzentration des VEGF:

	CAOV-3	OAW-42	OVCAR-3	SKOV-3
IL-1β	=	=	++	+
IL-10	=	=	=	=
IL-8	=	=	=	=
IL-6	+	=	=	=
TGF-β	+	=	=	+
TNF-α	+	=	=	=

++ *erhöht VEGF stark*, + *erhöht VEGF*, = *keine Wirkung auf VEGF*

Tab. 5) Zusammenfassung Wirkung der untersuchten Zytokine auf die Konzentration des VEGF, gemessen mit dem ELISA

Anhand dieser Versuchsreihe wird erkennbar, dass die verschiedenen Zytokine auf die VEGF-Bildung in den vier Zelllinien keineswegs einheitlich wirken. Allerdings wurde durchgängig eine konstante oder aber erhöhte VEGF-Konzentration gemessen. Keines der Zytokine senkte VEGF. Traten Erhöhungen der VEGF-Konzentration auf, so waren diese auch zeitabhängig. Die ausgeprägteste Wirkung zeigte sich bei OVCAR-3 unter dem Einfluss von IL-1 beta.

Alle Versuche zur Wirkung der o.g. Zytokine auf die VEGF-Konzentration wurden in drei unabhängigen Versuchen mit Doppeltansätzen bestimmt.

3.3 Wie wirkt VEGF auf die Konzentration der Zytokine IL-8 und IL-6 bei den Ovarialkarzinomzelllinien?

Zur Kontrolle, ob hingegen VEGF selbst, die von den Zelllinien exprimierten Zytokine in Ihrer Konzentration verändert, wurde diese Versuchsreihe durchgeführt. Nach 24, 48 und 72 stündiger Inkubation mit VEGF wurden mittels ELISA die Konzentrationen von IL-8 und IL-6 bestimmt und mit der Basisexpression verglichen.

3.3.1 VEGF verändert die Konzentration von IL-8 bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht

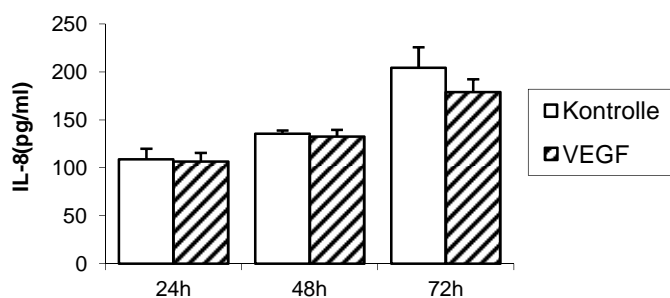


Abb. 12a) Einfluss des VEGF auf IL-8-Konzentration bei CAOV-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

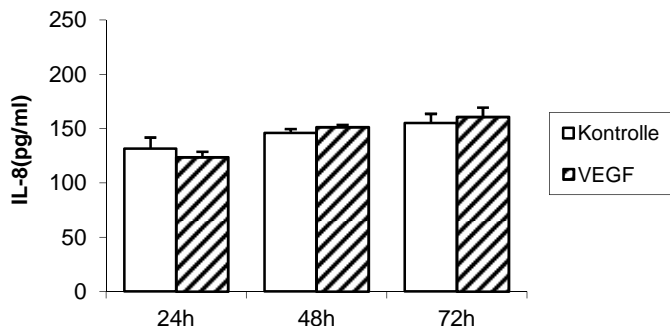


Abb. 12b) Einfluss des VEGF auf IL-8-Konzentration bei OVCAR-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

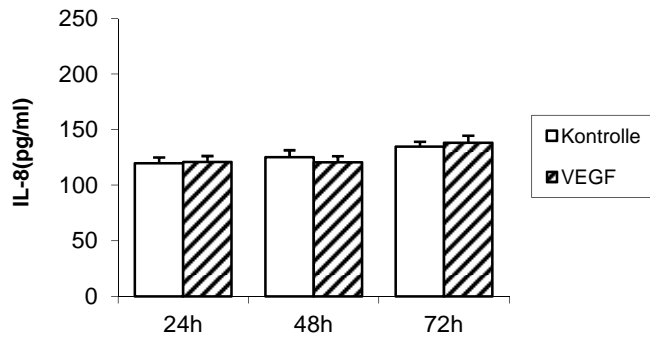
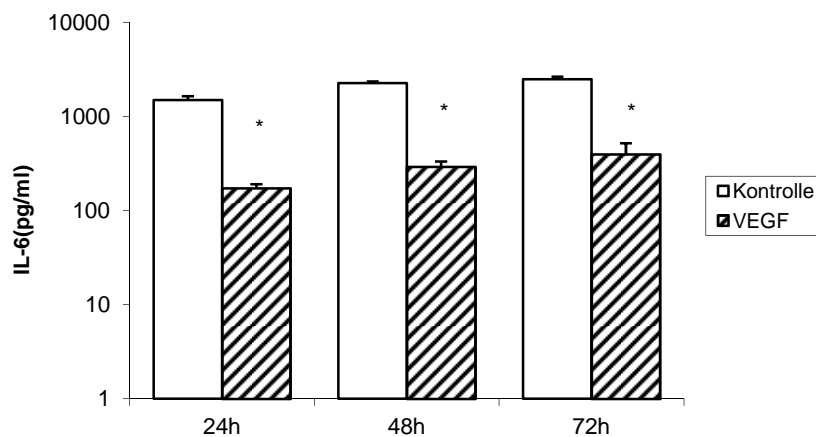


Abb. 12c) Einfluss des VEGF auf IL-8-Konzentration bei SKOV-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

Bei keiner der untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien konnte VEGF einen Einfluss auf die Konzentration von IL-8 nehmen.

3.3.2 VEGF senkt die Konzentration von IL-6 bei CAOV-3 und OAW-42

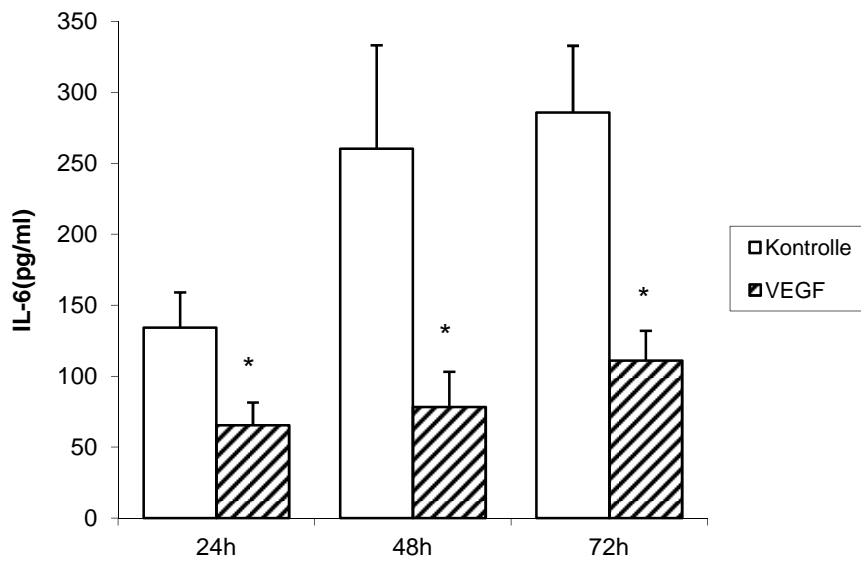


* p-Werte: 24h : VEGF vs. Kontrolle (24h) = 1,44E-09

48h : VEGF vs. Kontrolle (48h) = 6,16E-13

72h : VEGF vs. Kontrolle (72h) = 2,93E-10

Abb. 13a) Einfluss des VEGF auf IL-6-Konzentration bei CAOV-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen



* p-Werte: 24h : VEGF vs. Kontrolle (24h) = 1,44E-09

48h : VEGF vs. Kontrolle (48h) = 6,16E-13

72h : VEGF vs. Kontrolle (72h) = 2,93E-10

Abb. 13b) Einfluss des VEGF auf IL-6-Konzentration bei OAW-42, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

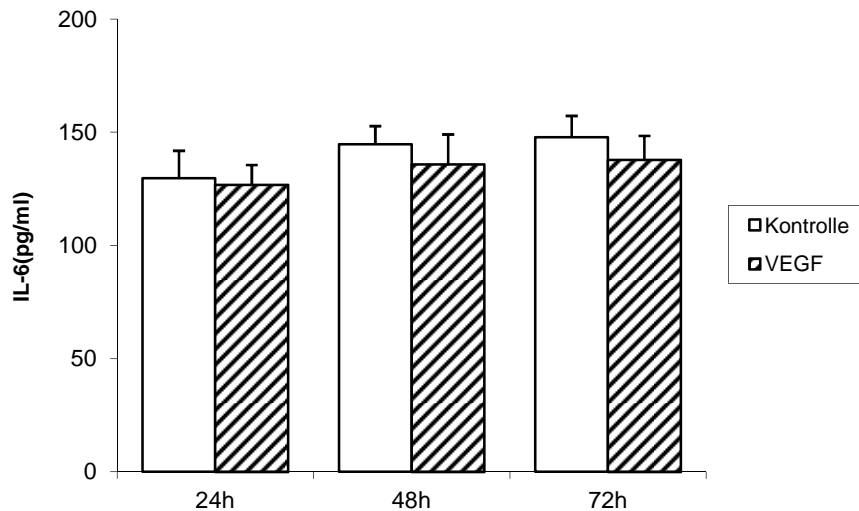


Abb. 13c) Einfluss des VEGF auf IL-6-Konzentration bei OVCAR-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

Bei den Zelllinien CAOV-3 und OAW-42 senkt VEGF die Konzentration von IL-6 signifikant. Bei CAOV-3 wird IL-6 so stark gesenkt, dass eine logarithmische Darstellung gewählt wurde. Bei OVCAR-3 konnte kein signifikanter Einfluss beobachtet werden.

3.3.3 Zusammenfassung Wirkung von VEGF auf die Zytokine IL-8 und IL-6 bei den Ovarialkarzinomzelllinien

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Wirkung des VEGF auf die o.g. Zytokine:

	CAOV-3	OAW-42	OVCAR-3	SKOV-3
IL-8	=		=	=
IL-6	--	-	=	

-- wird durch VEGF stark erniedrigt, - wird durch VEGF erniedrigt, = keine Veränderung durch VEGF

Tab. 6) Zusammenfassung Wirkung des VEGF auf die Konzentration der untersuchten Zytokine, gemessen mit dem ELISA

In dieser Versuchsreihe wird deutlich, dass VEGF nur bei CAOV-3 und OAW-42 die IL-6 Expression negativ beeinflusst. Bei CAOV-3 senkt es die IL-6-Bildung sogar in hohem Maße.

Alle Versuche zur Wirkung des VEGF auf die Konzentration der o.g. Zytokine wurden in drei unabhängigen Versuchen mit Doppeltansätzen bestimmt.

3.4 Wie wirkt VEGF auf Proliferations-, Invasions- und Migrationsverhalten bei den Ovarialkarzinomzelllinien?

3.4.1 VEGF, IL-8 und IL-6 verändern das Proliferationsverhalten bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht

Um feststellen zu können inwiefern die Zytokine VEGF, IL-8 und IL-6 das Proliferationsverhalten der Zelllinien verändern, wurde nach 72 stündiger Inkubation unter Zytokinzugabe ein Proliferationsassay durchgeführt.

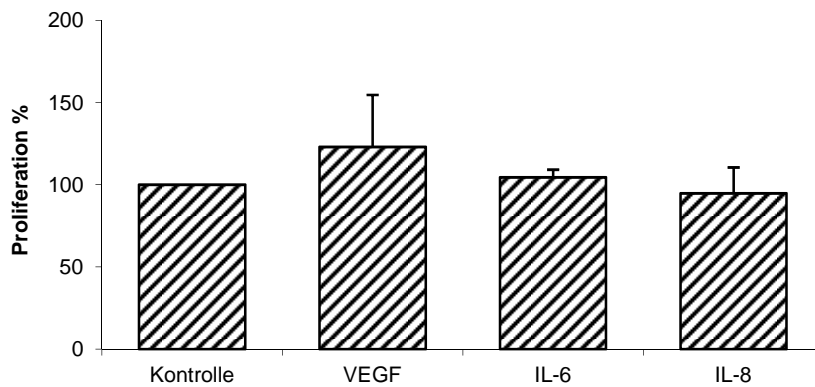


Abb. 14a) Einfluss von VEGF, IL-8 und IL-6 auf das Proliferationsverhalten bei CAOV-3, gemessen mit dem Proliferationsassay, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen

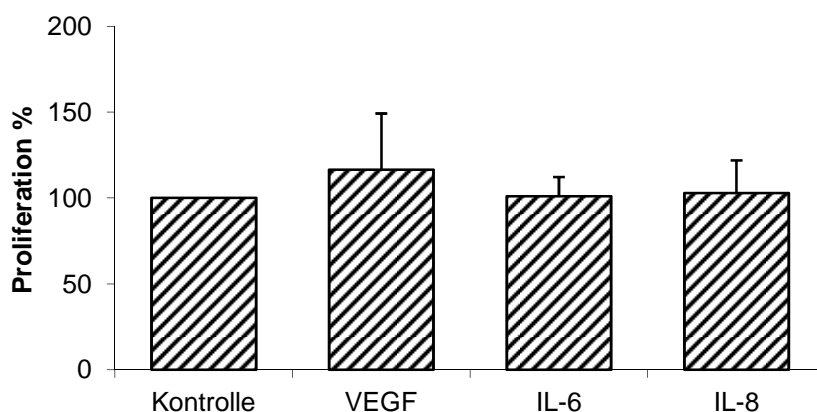


Abb. 14b) Einfluss von VEGF, IL-8 und IL-6 auf das Proliferationsverhalten bei OVCAR-3, gemessen mit dem Proliferationsassay, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen

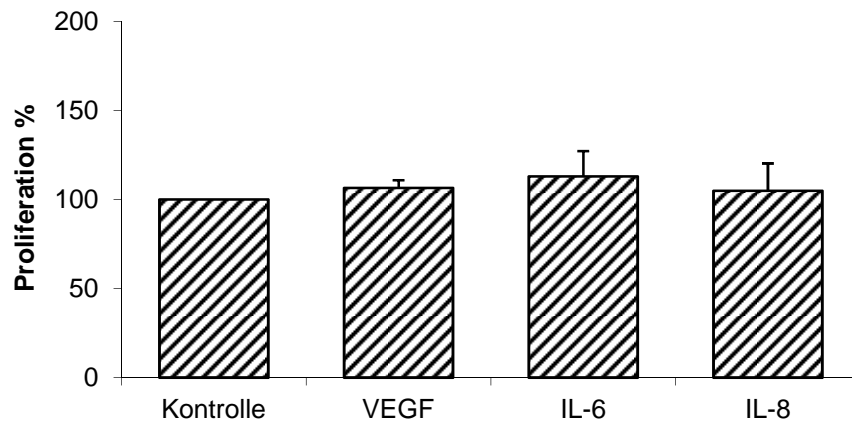


Abb. 14c) Einfluss von VEGF, IL-8 und IL-6 auf das Proliferationsverhalten bei SKOV-3, gemessen mit dem Proliferationsassay, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen

In keiner der untersuchten Zelllinien konnte eines der Zytokine VEGF, IL-8 oder IL-6 eine Veränderung des Proliferationsverhaltens bewirken.

Die Versuche zur Wirkung der Zytokine auf das Proliferationsverhalten wurden in zwei unabhängigen Versuchen mit Vierfachansätzen bestimmt.

3.4.2 VEGF verändert das Invasionsverhalten bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht

Ein Modell zur Untersuchung der Änderung der Invasivität stellt diese Versuchsanordnung dar. Nach 72 stündiger Inkubation der Zelllinien mit VEGF bzw. Medium als Kontrolle, wurde in einem Invasionsassay die Invasionsfraktion der Tumorzellen durch eine Membran bestimmt und miteinander ins Verhältnis gesetzt.

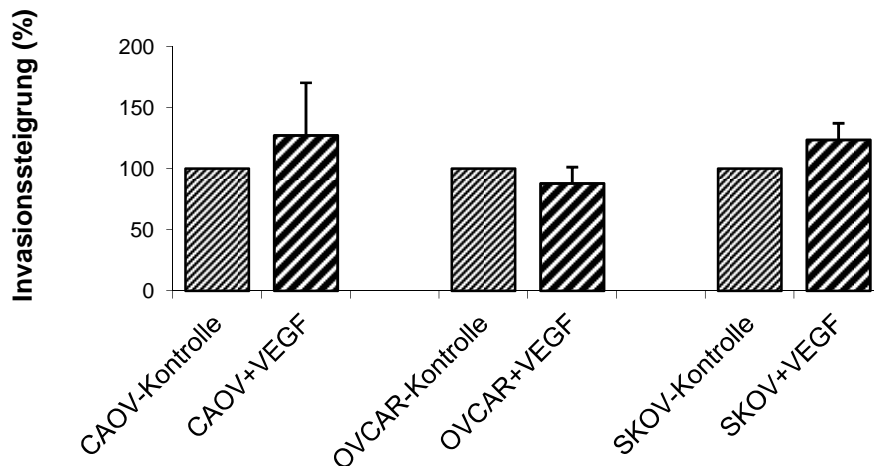


Abb. 15) Einfluss von VEGF auf das Invasionsverhalten bei CAOV-3, OVCAR-3 und SKOV-3, gemessen mit dem Invasionsassay, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen

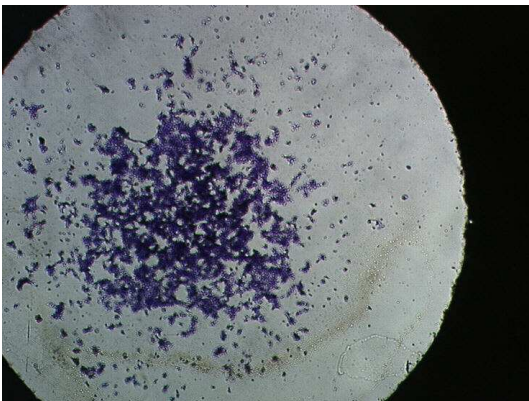
Bei keiner der genannten Zelllinien kam es unter Einfluss von VEGF zu einer signifikanten Änderung des Invasionsverhaltens.

Die Versuche zur Wirkung des VEGF auf das Invasionsverhalten wurden in zwei unabhängigen Versuchen mit Dreifachansätzen bestimmt.

3.4.3 VEGF verändert das Migrationsverhalten bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens unter VEGF-Einfluss wurde ein Migrationsassay durchgeführt. Hierzu wurde eine definierte Anzahl von Tumorzellen auf eine umschriebene Fläche eines Objektträgers gegeben. Hinzugefügt wurde die VEGF-Lösung bzw. Medium als Kontrolle. Nach sieben-tägiger Inkubation wurden die Zellen angefärbt und mittels PC die Migrationsgrenzen gemessen.

a) CAOVI plus Medium



b) CAOVI plus VEGF

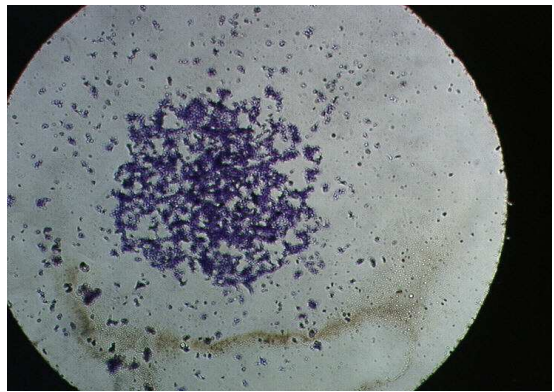
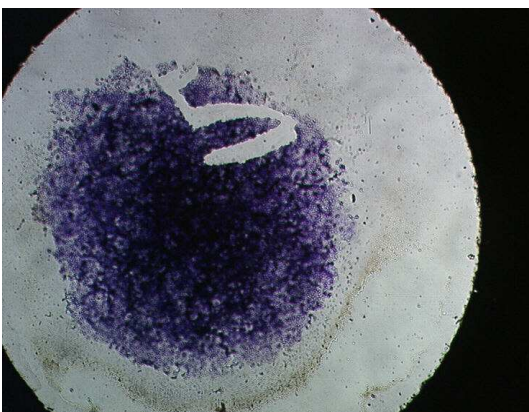


Abb. 16 a und b) Migrationsverhalten ohne Zugabe von VEGF (a) und nach Zugabe von VEGF (b) bei CAOVI-3, gemessen mit dem Migrationsassay, gezeigt sind Fotos der Objektträger bei Versuchsende

c) OVCAR plus Medium



d) OVCAR plus VEGF

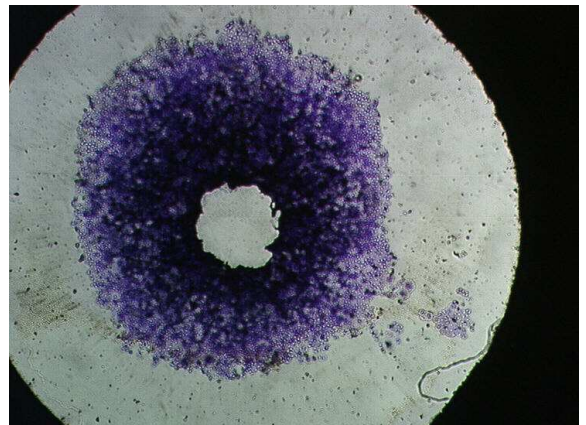


Abb. 16 c und d) Migrationsverhalten ohne Zugabe von VEGF (c) und nach Zugabe von VEGF (d) bei OVCAR-3, gemessen mit dem Migrationsassay, gezeigt sind Fotos der Objektträger bei Versuchsende

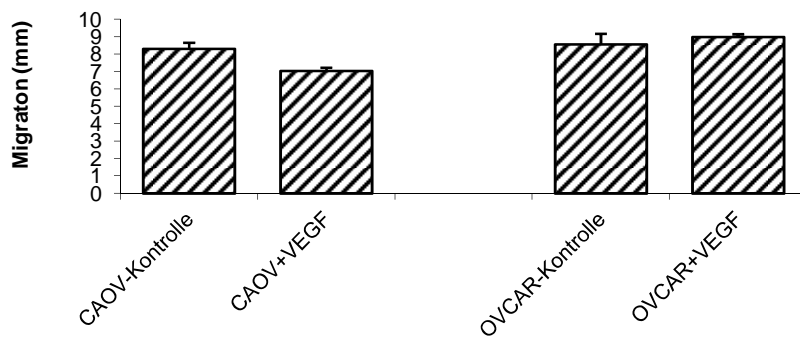


Abb.16 e) Diagramm Einfluss des VEGF auf das Migrationsverhalten bei CAOV-3 und OVCAR-3, gemessen mit dem Migrationsassay, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen

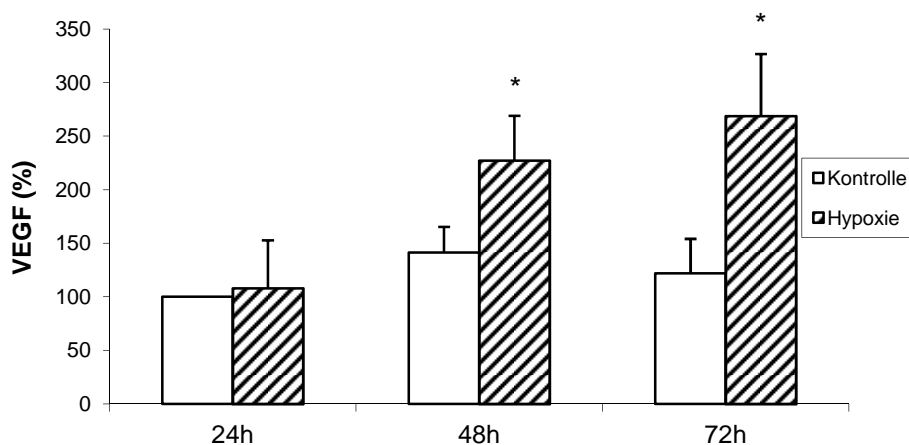
Bei den untersuchten Zelllinien CAOV-3 und OVCAR-3 führte die Stimulation mit VEGF zu keiner Änderung des Migrationsverhaltens.

Die Versuche zur Wirkung des VEGF auf das Migrationsverhalten wurden in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

3.5 Wie wirkt Hypoxie auf die Konzentration der Zytokine VEGF, IL-8 und IL-6 bei den Ovarialkarzinomzelllinien?

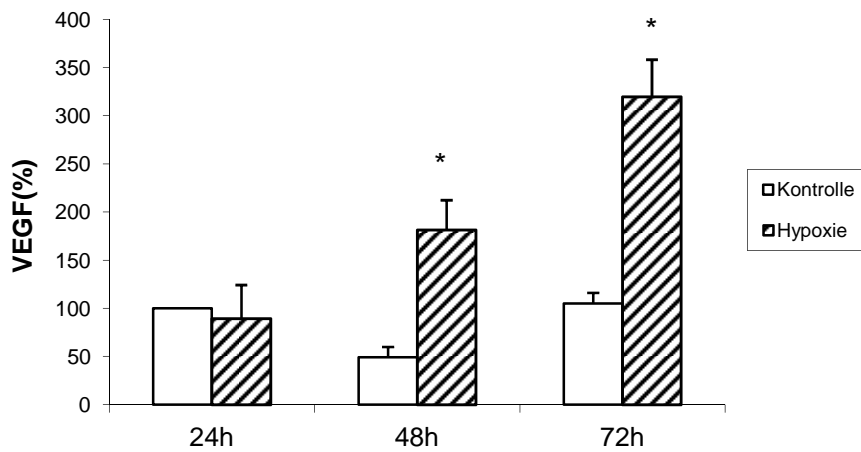
In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung von Hypoxie auf die Expression von VEGF, IL-6 und IL-8 überprüft. Hierzu wurden die Zelllinien in einer Kulturkammer für Anaerobier, die mit einem 97%igen Stickstoffgas gefüllt wurde, für 24, 48 und 72h inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen in den Überständen wurden darauf mittels ELISA bestimmt.

3.5.1 Hypoxie erhöht die Konzentration von VEGF bei den Ovarialkarzinomzelllinien



* p-Werte: 48h : VEGF vs. Kontrolle (48h) = 0,0087
72h : VEGF vs. Kontrolle (72h) = 0,0011

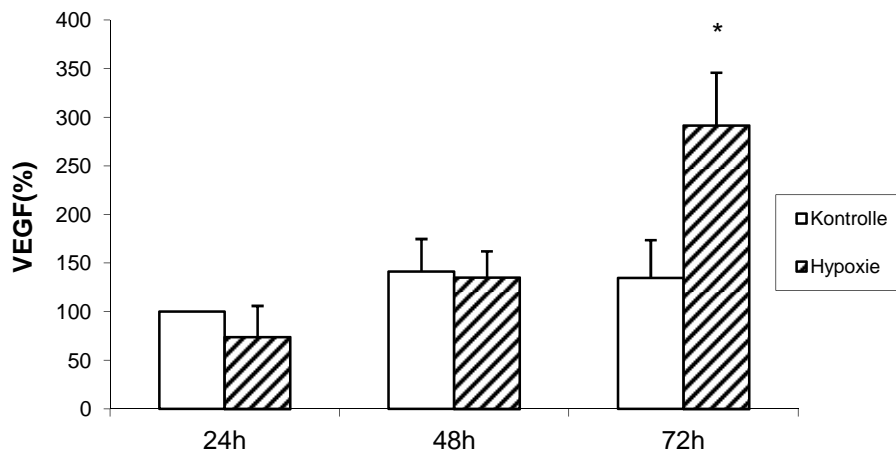
Abb. 17 a) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von VEGF bei CAOV-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen



* p-Werte: 48h : VEGF vs. Kontrolle (48h) = 6,7E-05

72h : VEGF vs. Kontrolle (72h) = 5E-05

Abb. 17b) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von VEGF bei OAW-42, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen



* p-Werte: 72h : VEGF vs. Kontrolle (72h) = 0,0033

Abb. 17c) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von VEGF bei OVCAR-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

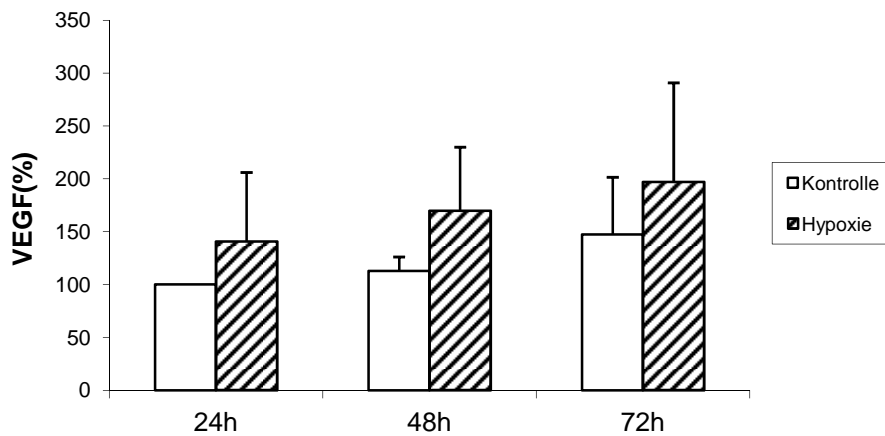


Abb. 17d) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von VEGF bei SKOV-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

Bei allen untersuchten Zelllinien wurde die Konzentration von VEGF unter Hypoxie signifikant erhöht. (Ausnahme SKOV-3, keine Signifikanz) Interessanterweise ist die Erhöhung erst nach 48 und 72 stündiger, jedoch noch nicht nach 24 stündiger Inkubation signifikant.

3.5.2 Hypoxie verändert die Konzentration von IL-8 bei den Ovarialkarzinomzelllinien nicht

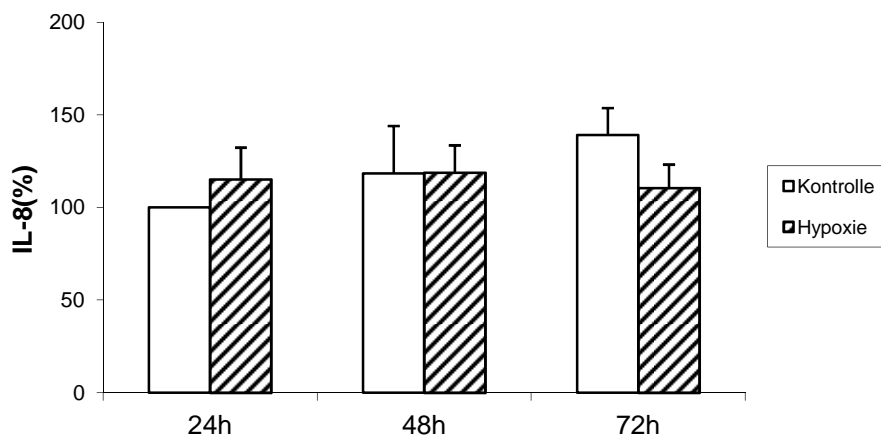


Abb. 18 a) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von IL-8 bei CAOV-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

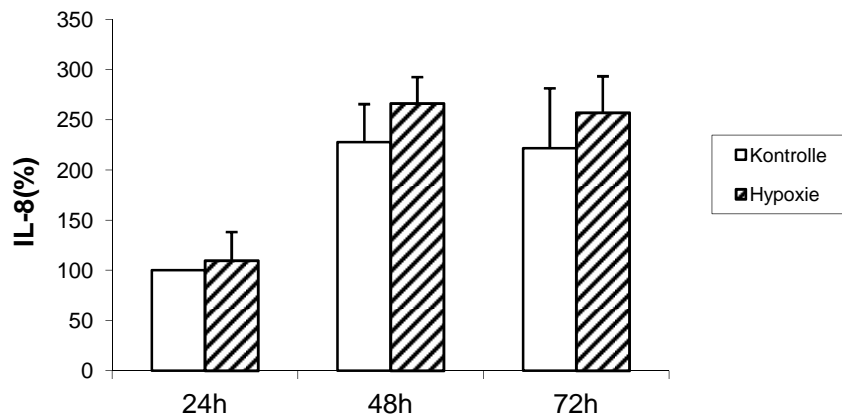


Abb. 18 b) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von IL-8 bei OVCAR-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

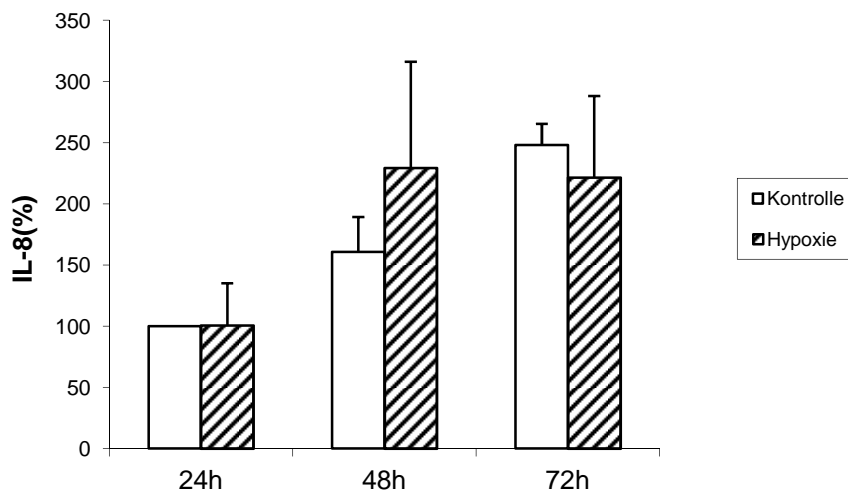
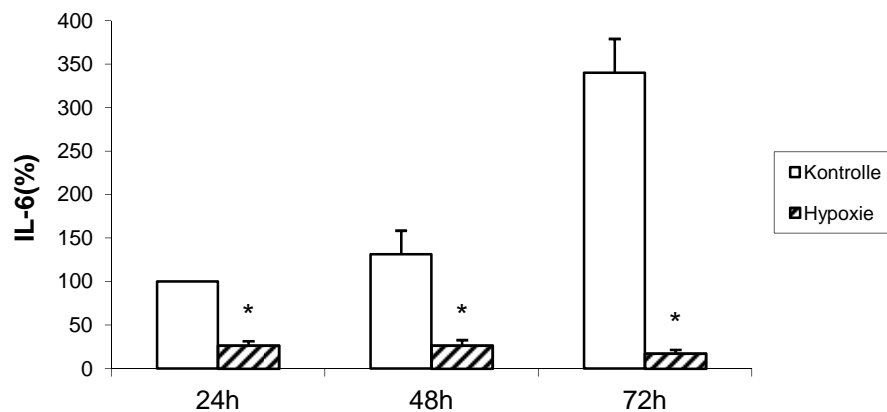


Abb. 18 c) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von IL-8 bei SKOV-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

Bei keiner der untersuchten Zelllinien kam es unter Hypoxie zu einer signifikanten Änderung der IL-8-Konzentration.

3.5.3 Hypoxie senkt die Konzentration von IL-6 bei CAO-3



* p-Werte: 24h : IL-6 vs. Kontrolle (24h) = 6,7E-05

48h : IL-6 vs. Kontrolle (48h) = 6,7E-05

72h : IL-6 vs. Kontrolle (72h) = 5E-05

Abb.19 a) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von IL-6 bei CAO-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, Prüfung der Signifikanz mit Student's t-Test, ab einem p-Wert < 0,05 wurde Signifikanz angenommen

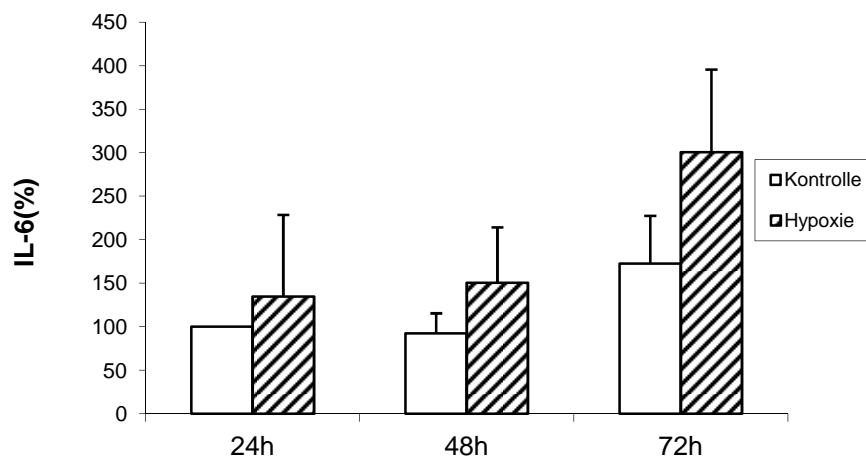


Abb. 19 b) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von IL-6 bei OAW-42, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

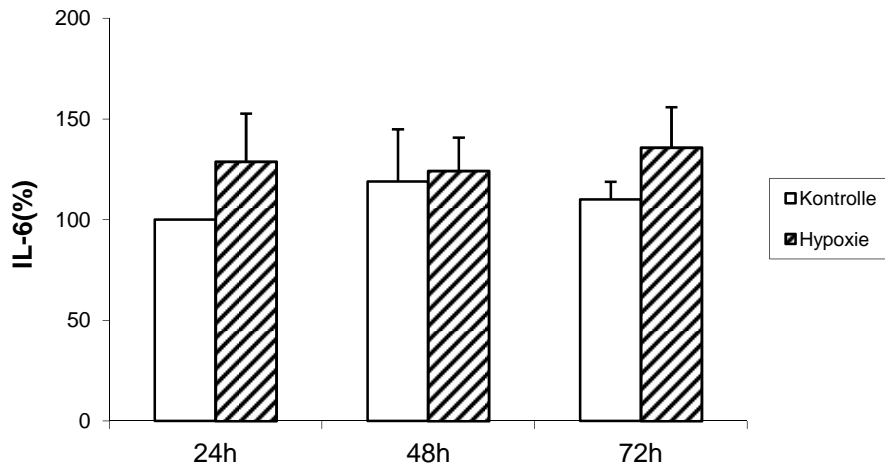


Abb.19 c) Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von IL-6 bei OVCAR-3, gemessen mit dem ELISA, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen

Unter Hypoxie wird die Konzentration von IL-6 bei CAOV-3 hochsignifikant gesenkt. Der Einfluss von VEGF senkte ebenfalls IL-6 in CAOV-3 Zelllinien. Durch Hypoxie wurde VEGF erhöht, sodass der Effekt von Hypoxie auf die IL-6-Bildung VEGF-gesteuert sein könnte.

Bei OAW-42 lässt sich ein solcher Rückkopplungseffekt nicht ausmachen, Hypoxie senkt IL-6 hier nicht, obwohl bei dieser Zelllinie unter VEGF die IL-6-Konzentration erniedrigt wird.

Bei OVCAR-3 Zelllinien war nach Hypoxie keine Veränderung der IL-6-Expression zu erkennen.

3.5.4 Zusammenfassung Wirkung von Hypoxie auf die Konzentration der Zytokine VEGF, IL-8 und IL-6 bei den Ovarialkarzinomzelllinien

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Wirkung von Hypoxie auf die Konzentration der o.g. Zytokine bei Ovarialkarzinomzelllinien:

		CAOV-3	OAW-42	OVCAR-3	SKOV-3
VEGF	24h	=	=	=	=
	48h	+	++	=	(+)
	72h	+	++	+	(+)
IL-8	24h	=		=	=
	48h	=		=	=
	72h	=		=	=
IL-6	24h	--	=	=	
	48h	--	=	=	
	72h	--	=	=	

Wird durch Hypoxie: ++ stark erhöht, + erhöht, (+) geringfügig erhöht, = nicht verändert, - erniedrigt, -- stark erniedrigt

Tab. 7) Zusammenfassung Einfluss von Hypoxie auf die Konzentration von VEGF, IL-8 und IL-6 bei Ovarialkarzinomzelllinien, gemessen mit dem ELISA

Erwartungsgemäß kommt es unter dem Einfluss von Hypoxie, als starkem Angiogenese-Stimulus, zu einer Erhöhung der VEGF-Konzentration. Allerdings zeigt sich dieser Effekt erst nach 48 stündiger Inkubationszeit.

Die Bildung von IL-8 zeigte in diesem Versuch keinerlei Änderungen nach Hypoxie.

In der Zelllinie CAOV-3 kam es nach Hypoxieeinfluss zu einer deutlichen Abnahme der IL-6-Konzentration. In den übrigen Zelllinien konnte kein Unterschied des IL-6 nach Hypoxie gemessen werden.

Die Versuchsreihe zur Wirkung von Hypoxie auf die Konzentration der Zytokine VEGF, IL-8 und IL-6 wurde in drei unabhängigen Versuchen mit Doppelansätzen bestimmt.

3.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammengefasst konnten folgende Ergebnisse in dieser Arbeit gezeigt werden:

- 1.) Bereits die Basisexpressionen von VEGF, IL-8, IL-6, IL-10 und TNF-alpha ist in den unterschiedlichen Zelllinien sehr heterogen. VEGF wird in unterschiedlicher Stärke von allen vier Zelllinien gebildet. IL-10 und TNF-alpha konnten hingegen überhaupt nicht nachgewiesen werden.
- 2.) Einige Zytokine können die VEGF-Konzentration in Ovarialzelllinien erhöhen. Keines der Zytokine senkte VEGF. Bei CAO-3 Zelllinien wurde durch TGF- β , TNF- α und IL-6 die VEGF-Konzentration signifikant erhöht. Bei der Zelllinie OAW 42 änderte sich die VEGF-Konzentration nach keinem der untersuchten Zytokine. Bei OVCAR-3 erhöhte die Zugabe von IL-1 β die Konzentration des VEGF um das Doppelte. Bei SKOV-3 konnte durch IL-1 β und TGF- β die Konzentration von VEGF signifikant erhöhen.
- 3.) Bei keiner der untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien konnte VEGF einen Einfluss auf die Konzentration von IL-8 nehmen. Bei den Zelllinien CAO-3 und OAW-42 senkte VEGF die Konzentration von IL-6 signifikant.
- 4.) In den untersuchten Zelllinien konnte keines der Zytokine VEGF, IL-8 oder IL-6 eine Veränderung des Proliferationsverhaltens bewirken. Unter Einfluss von VEGF kam es zu keiner signifikanten Änderung des Invasionsverhaltens oder Änderung des Migrationsverhaltens.
- 5.) Unter dem Einfluss von Hypoxie kam es in den untersuchten Zelllinien zu einer Erhöhung der VEGF-Konzentration. Die Bildung von IL-8 und IL-6 zeigte hierunter keinerlei Änderungen. Lediglich bei der Zelllinie CAO-3 kam es nach Hypoxieeinfluss zu einer deutlichen Abnahme der IL-6-Konzentration.

4 Diskussion

Die Bildung neuer Blutgefäße ist für das Wachstum maligner Tumoren von essentieller Bedeutung. Unter den angiogenetischen Faktoren nimmt das VEGF eine zentrale Rolle ein und wirkt außerdem stark erhöhend auf die Gefäßpermeabilität.^{22, 27, 28, 39} Das Ovarialkarzinom imponiert zumeist als hypervaskularisierter Tumor, der häufig große Mengen Aszites bilden kann.^{91, 92} Es kann angenommen werden, dass hierbei dem VEGF eine bedeutende Rolle zukommt. Zum besseren Verständnis der regulativen Vorgänge der Angiogenese im Ovarialkarzinom dienen die Untersuchungen dieser Arbeit.

4.1 Expression der proangiogenetischen Zytokine VEGF, IL-8, IL-6, TNF- α und dem immuninhibitorischen IL-10 in Ovarialkarzinomzelllinien

In der Literatur wird beschrieben, dass VEGF von Ovarialkarzinomzellen in der Zellkultur überexprimiert wird.^{33, 95, 96, 99, 102} Ebenso werden erhöhte VEGF-Plasmaspiegel bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nachgewiesen.¹⁰³ Vergleichbar hierzu konnte in der vorliegenden Arbeit VEGF in den untersuchten Zelllinien CAOV-3, OAW-42, OVCAR-3 und SKOV-3, wenn auch in sehr unterschiedlicher Intensität gemessen werden.

VEGF und IL-8 als ebenfalls angiogenetisch wirksames Zytokin, konnten von Kassim et al. bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom nachgewiesen werden und korrelierten hier mit hohem Tumorstadium und schlechter Prognose.¹⁰⁴ Auch bei Untersuchungen von Radke et al. konnten sowohl in Plasma als auch im Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom erhöhte IL-8-Werte gemessen werden. In derselben Arbeit waren ebenfalls IL-6, IL-10 und TNF- α in Plasma und Aszites signifikant erhöht nachweisbar.¹⁰⁵

Eine weitere Untersuchung stammt von Toutirais et al., diese konnte in vitro erhöhte Spiegel von IL-8 und IL-6 in Ovarialkarzinomzelllinien nachweisen. Immuninhibitorisches IL-10 konnte hier nicht gefunden werden und das proinflammatorische Zytokin TNF- α wurde nur wenig produziert.¹⁰⁶ In der Arbeit von Kutteh et al. waren im Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen IL-6 und TNF- α erhöht nachweisbar.¹⁰⁷

Die Ergebnisse aus der Literatur decken sich überwiegend mit denen aus unserer Arbeit. In den von uns untersuchten Zelllinien ließ sich IL-8 mit Ausnahme von OAW-42 nachweisen. IL-6 war in unseren Untersuchungen ebenfalls in den Zelllinien vorhanden, wobei CAOV-3 sehr hohe

Werte aufwies, während es bei SKOV-3 unterhalb der Nachweisgrenze lag.

IL-10 war in unserer Arbeit nur für OVCAR-3 knapp nachweisbar, was den Ergebnissen von Radke et al widerspricht, sich jedoch mit denen von Toutirais et al. deckt.

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α war in unserer Arbeit entgegen den Ergebnissen von Kutteh et al. und Radke et al. in keiner der Zelllinien nachweisbar. Allerdings konnten es auch Toutirais et al. in ihren Untersuchungen nur in geringem Maße nachweisen.

Bereits bei der Betrachtung der Basisexpressionen der Zytokine im Vergleich mit der Literatur fällt die Heterogenität der Zytokinexpression auf. Während VEGF, IL-8 und auch IL-6 regelmäßig nachweisbar waren, schwanken die Ergebnisse für IL-10 und TNF- α .

4.2 Der Einfluss der Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TGF- β und TNF- α auf die VEGF-Expression in den Ovarialkarzinomzelllinien

Für einige Zytokine ist bekannt, dass sie in der Lage sind VEGF zu erhöhen. Hierzu zählen u. a. TNF- α , IL-1 β , IL-6 und TGF- β . Ferner gilt IL-8 ebenfalls als proangiogenetischer Faktor.^{12-15, 58} Als potentieller VEGF- Inhibitor wurde das IL-10 beschrieben.¹⁰⁸ Keine dieser Daten beruht allerdings auf Interaktionsstudien an Ovarialkarzinomen, sodass in dieser Arbeit untersucht wurde, inwiefern die o. g. Zytokine die Expression von VEGF im Ovarialkarzinom am Zellkulturmodell verändern. In den Ergebnissen zeigt sich erneut die Heterogenität der verschiedenen Zelllinien. Von den potentiellen VEGF- Stimulatoren konnte IL-1 β in zwei von vier Zelllinien (OVCAR und SKOV) VEGF erhöhen. IL-6 und TNF- α hingegen konnten nur bei CAOV-3 eine Wirkung zeigen. TGF- β konnte bei CAOV-3 und SKOV-3 eine VEGF- Erhöhung bewirken. Das potentiell VEGF inhibierende IL-10 zeigte bei keiner Zelllinie einen Einfluss auf die VEGF- Expression. Mit den Daten aus der Literatur sind diese Ergebnisse allerdings nur sehr eingeschränkt vergleichbar, da wie oben erwähnt, keine der Zytokinwirkung auf VEGF im Ovarialkarzinom erhoben wurde.

Allerdings legen unsere Ergebnisse nahe, dass eine generalisierte Aussage für die Wirkung der einzelnen Zytokine auf die Expression von VEGF nicht möglich ist, da die Beeinflussbarkeit der VEGF-Expression durch diese Zytokine unter den verschiedenen Zelllinien stark differiert. Es lässt sich jedoch feststellen, dass verschiedene Entzündungsmediatoren mit VEGF interagieren, während das entzündungshemmende IL-10 keine Wirkung zeigt. Dies führt zu der Annahme, dass die Angiogenese im Ovarialkarzinom durch inflammatorische Botenstoffe aus dem Stroma

angeregt werden kann und dann ihrerseits das Tumorwachstum begünstigt.

4.3 Der Einfluss von VEGF auf die Expression der Zytokine IL-8 und IL-6 in den Ovarialkarzinomzelllinien

Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien exprimierten neben VEGF auch überwiegend IL-8 und IL-6. In der Literatur finden sich Hinweise, dass VEGF in der Lage ist, die Expression dieser beiden Zytokine zu verändern. In einer Arbeit von Dankbar, Padro, Leo et al. wird eine Erhöhung der IL-6-Sekretion in Stroma- und Endothelzellen durch rekombinantes VEGF bei Patienten mit Multiplen Myelom beschrieben.¹⁰⁹ In einer weiteren Arbeit von Yoo, Bae, Ryoo et al. findet sich ein erhöhender Effekt von VEGF auf die IL-6-Konzentration in Monozyten.¹¹⁰ Die Untersuchungen von Lee TH, Avraham H, Lee SH et al. postulieren eine IL-8 Erhöhung durch VEGF in Endothelzellen (human brain microvascular endothelial cells).¹¹¹ In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen bei Ovarialkarzinomzelllinien kein Effekt von VEGF auf die IL-8 Bildung nachgewiesen. Bezüglich des IL-6 fand sich in unseren Ergebnissen nicht nur kein erhöhender Einfluss des VEGF, sondern in zwei Zelllinien konnte VEGF die IL-6-Konzentration senken. Bei CAO-V-3 war diese IL-6-Erniedrigung sogar stark ausgeprägt. Die Abweichungen zu den Ergebnissen der Literaturrecherche lassen sich in erster Linie durch die unterschiedlichen Zellarten erklären. Offensichtlich finden sich in den Ovarialkarzinomzellen andere Regulationsmechanismen als in den beschriebenen Blut- und Endothelzellen.

Ogleich VEGF und IL-8 angiogenetisch wirken, beeinflussen sie in unseren Ergebnissen ihre Expression in den Ovarialzellen nicht gegenseitig. Die IL-6-Senkung in CAO-V-3 durch VEGF könnte im Sinne einer negativen Rückkopplung vorkommen, da IL-6 in unseren Untersuchungen bei CAO-V-3 in der Lage war, VEGF zu erhöhen. Insbesondere legt diese Vermutung auch der Effekt der Hypoxie auf IL-6 nahe (siehe unten).

In den Ergebnissen aus der Literatur wurde die Wirkung von VEGF auf die IL-6-Bildung in Stromazellen und Monozyten im Sinne eines parakrinen Wirkmechanismus beschrieben. Eine solche Wirkung des VEGF auf das den Tumor umgebende Stroma mit Leukozyten und Blutgefäßen kann anhand der durchgeführten Zellkulturversuche nicht nachgewiesen werden. Inwiefern hier Regulationen zwischen VEGF und Zytokinen aus der Tumorumgebung vorliegen bliebe in weiterführenden Versuchen zu klären.

4.4 Der Einfluss von VEGF auf das Proliferations-, Invasions- und Migrationsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinien

Daß VEGF nicht ausschließlich auf Endothelzellen Einfluss nehmen kann, zeigt beispielsweise eine Arbeit von Price, Miralem, Jiang et al., in welcher ein Invasivität steigernder Effekt bei Mammakarzinomzellen *in vitro* gefunden wurde.⁹ Bereits 1995 konnten Liu, Earl, Baban et al. den VEGF-Rezeptor KDR in Melanomzelllinien nachweisen. Diese reagierten auf exogenes VEGF mit einer Proliferationssteigerung.¹¹² Auch für IL-6 wird von Ara T, Song L, Shimada H et al. eine Proliferationssteigerung bei Neuroblastomzelllinien beschrieben.¹¹³ Für IL-8 wurden ebenfalls Wirkungen auf Tumorzellen nachgewiesen. Die Arbeit von Xu L. und Fidler I.J. zeigte eine Proliferationssteigerung nach rekombinatem IL-8 in Hey-A8-Ovarialkarzinomzelllinien.¹¹⁴

In unseren Untersuchungen konnte nach VEGF-, IL-6- und IL-8-Zugabe keine Änderung des Proliferationsverhaltens festgestellt werden. Die Unterschiede zu den Ergebnissen der Literatur könnten in den unterschiedlichen Zellarten begründet liegen. Entgegen der Arbeit von Xu und Fidler an Hey-A8-Zellen hatte IL-8 keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zelllinien CAOv-3, OVCAR-3 und SKOV-3. Dies legt die Vermutung nahe, dass es hier unterschiedliche Ovarialkarzinomtypen mit entsprechend unterschiedlichem Rezeptorbesatz gibt.

Anders als in der o.g. Arbeit von Price, Miralem, Jiang et al. an Mammakarzinomzellen war in unseren Untersuchungen die Zugabe von VEGF nicht in der Lage die Invasivität der Ovarialkarzinomzellen *in vitro* zu erhöhen. Auch hier scheint es Abweichungen zwischen verschiedenen Tumorzelltypen zu geben, die keine allgemeingültige Aussage zulassen.

Die Tatsache, dass erhöhte VEGF- und IL-8-Spiegel mit einer schlechteren Prognose und hohem Tumorstadium beim Ovarialkarzinom einhergehen,¹⁰⁴ scheint also nicht in einer Wirkung auf das Verhalten der Tumorzellen begründet. Vielmehr wäre dieses durch die VEGF- und IL-8-vermittelte Neovaskularisation erklärlich.

Ob diese erhobenen *in vitro*- Untersuchungen auch auf die *in vivo*- Verhältnisse übertragen werden können muß offen bleiben, da die Zellkulturversuche keinerlei Wechselwirkungen mit der Tumorumgebung und den Tumorgefäßen abbilden können.

4.5 Der Einfluss der Hypoxie auf die Expression von VEGF, IL-8 und IL-6 in den Ovarialkarzinomzelllinien

Bereits 1992 wurde von Shweiki, Itin, Soffer et al beschrieben, dass VEGF durch Hypoxie

induzierbar ist.⁶⁰ Wahley, Brody, Knapp et al. zeigten 1995 an Kolonkarzinomzellen, daß Hypoxie mit erhöhter VEGF- Expression korreliert.¹¹⁵ Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen insofern mit der Literatur überein. Die untersuchten Zelllinien CAOV-3, OAW-42, OVCA-3 und SKOV-3 bildeten unter Hypoxie verstärkt VEGF. Für SKOV-3 war diese Erhöhung allerdings nicht signifikant. Für die anderen Zelllinien zeigten sich signifikante Erhöhungen nach 48 bzw. 72 Stunden. Es scheint somit auch für Ovarialkarzinomzellen zu gelten, dass unter hypoxischen Bedingungen verstärkt VEGF gebildet wird, um eine Hypervaskularisation zu erzielen, welche wiederum den wachsenden Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Außerdem wird dem Tumor via neugebildeten und hyperpermeablen Gefäßen die Möglichkeit der hämatogenen Metastasierung gegeben. Somit würden ausgedehnte hypoxische Areale mit einer gesteigerten VEGF –Bildung und damit mit progressiverem Tumorwachstum und einer erhöhten Metastasierungsrate korrelieren.

Auch für IL-6 wurde bereits 1995 von Yan, Tritto, Pinsky et al. eine Induzierbarkeit durch Hypoxie in Endothelzellen und in glatten Muskelzellen beschrieben.¹¹⁶ In der vorliegenden Arbeit konnte in keiner der untersuchten Zelllinien eine IL-6-Erhöhung unter Hypoxie beobachtet werden. In den CAOV-3-Zellen führte die Hypoxie sogar zu einer starken IL-6-Reduktion. Interessanterweise war bei dieser Zelllinie auch unter Einfluss von VEGF eine starke IL-6-Repression zu beobachten. Möglicherweise ist die IL-6-Reduktion unter Hypoxie ebenfalls VEGF vermittelt, welches wiederum durch Hypoxie erhöht wird. Warum diese Beobachtungen nur bei CAOV-3 zu finden sind, müsste durch weiterführende Untersuchungen dieser Zelllinie geklärt werden.

Als proangiogenetischer Faktor wird auch für IL-8 eine Induzierbarkeit durch Hypoxie in verschiedenen Zelltypen beschrieben. Hierunter findet sich auch eine Arbeit von Xu, Xie, Mukaida et al., welche diesen Effekt bei Ovarialkarzinomen beschreibt. Hierbei wurden die Zelllinien SKOV-3 und Hey-A8 verwendet.¹¹⁷

In den von uns untersuchten Zellen konnte Hypoxie zu keiner Erhöhung der IL-8-Konzentration führen. Eine IL-8-Erhöhung unter hypoxischen Bedingungen wäre zumindest insofern erklärlich, als dass es ebenso wie VEGF proangiogenetisch wirkt und damit auch unter Hypoxie ein synergistisches Verhalten zu erwarten wäre. Dass in unserer Arbeit IL-8 nicht wie VEGF nach Hypoxie signifikant erhöht messbar war, könnte darauf hindeuten, dass es im Ovarialkarzinom bezüglich der Angiogenese möglicherweise eine nachgeordnete Rolle spielt.

4.6 Zukunftsaussichten: Hemmung der Angiogenese durch VEGF-Inhibition

Wie in der Einleitung beschrieben, benötigen maligne Tumoren für Wachstum und Metastasierung die Bildung neuer Blutgefäße. Unter dem Aspekt, dass physiologische Angiogenese beim Erwachsenen bis auf wenige Ausnahmen (Reproduktionszyklus der Frau, Wundheilung) nicht vorkommt, stellt die Hemmung der Angiogenese einen innovativen Ansatz in der Tumorthherapie dar. Die Endothelzellen in Tumorgefäßen bilden das Ziel der antiangiogenetischen Therapie. Das Tumorwachstum soll über mangelnde Gefäßneubildung und resultierender Minderversorgung gehemmt werden. Wegen seiner besonderen Rolle als Hauptregulator der Angiogenese wurden verschiedene VEGF-Antagonisten entwickelt und in Phase I-III-Studien als Monotherapie und als Kombinationstherapie mit verschiedenen Chemotherapeutika getestet.

Im Maus-Modell mit subkutan implantierten humanen Tumorzelllinien konnte durch die Applikation von Anti-VEGF-Antikörpern (rhuMab VEGF) eine 70-95%ige Wachstumshemmung sowie eine geringere Blutgefäßdichte der Tumoren erreicht werden. In-vitro-Experimente konnten keine Wirksamkeit der Antikörper auf das Wachstum von Tumorzellen aufzeigen.¹¹⁸ Im Lebermetastasenmodell der Kolonkarzinomlinie HM-7 zeigte sich bei den Mäusen, welche mit anti-VEGF-Antikörpern behandelt wurden, eine Reduktion von Grösse und Anzahl der Lebermetastasen.¹¹⁹

Eine Substanz zu der inzwischen Phase III-Studien laufen ist Aflibercept (Sanofi-Aventis und Regeneron Pharmaceuticals) , auch genannt VEGF-Trap. Dieses Molekül stellt einen löslichen Rezeptor dar, der aus VEGF-Rezeptor 1 und VEGF-Rezeptor-2-Anteilen besteht und spezifisch VEGF bindet und damit inhibiert.¹²⁰

Der monoklonale anti-VEGF Antikörper Bevacizumab(Avastin®; Genentech) und die VEGF-Rezeptor Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) Pazopanib (Votrient, GlaxoSmithKline), Sorafenib (Nexavar®, Bayer/ Onyx) und Sunitinib (Sutent®, Pfizer) wurden für den klinischen Gebrauch zugelassen.

Der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®; Genentech) wurde nach den klinischen Studien für die Kombinationsbehandlung mit Chemotherapeutika für die Therapie von kolorektalen Karzinomen, nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und metastasierten Mammakarzinomen zugelassen.¹²¹⁻¹²³

VEGF-Rezeptor-Antagonisten wie SU 11248 (Sunitinib, Pfizer), Bay 43-9006 (Sorafenib, Bayer), Pazopanib (GlaxoSmithKline), PTK 787 (Novartis)/ ZK 222584 (Schering), SU 5416

(Sugen) und SU 6668 (Sugen) inhibieren in präklinischen in-vivo-Modellen und Phase I- Studien Tumorwachstum und erhöhen die Überlebenszeit.¹²⁴⁻⁻¹²⁹ Die klinischen Studien ergaben Responderaten von sporadischem Ansprechen bis hin zu 50 %, bei relativ gemäßigten Nebenwirkungen.^{126, 130-136}

Der TKI Sorafenib wurde für die Monotherapie bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen und Hepatozellulären Karzinomen zugelassen.^{137, 138} Sunitinib, ebenfalls ein TKI, wird auch klinisch für die Therapie des Nierenzellkarzinoms verwendet.¹³⁹

Zur Anwendung von Angiogenese-Inhibitoren beim Ovarialkarzinom gibt es ebenfalls mehrere aktuelle Studien. Beispielsweise wurde Bevacizumab als Monotherapie in Phase II-Studien untersucht. Es wurden Ansprechraten von 8-21% beschrieben.^{140, 141} Ebenfalls mit Bevacizumab erfolgten Phase-II- Studien in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel. Hierin konnte die Sicherheit der Kombinationstherapie gezeigt werden.^{142, 143} Eine Phase-III-Studie zur second line-Therapie mit Carboplatin/ Paclitaxel mit und ohne Bevacizumab ist aktuell in Arbeit (GOG-213). Zwei weitere Phase-III Studien- GOG-0218 und ICON7- untersuchen die first-line-Therapie mit Platin/Taxan-Standardchemotherapie mit und ohne Bevacizumab. Die ersten Ergebnisse wurden 2010 im Rahmen von Kongressen (GOG-0218 beim ASCO in Chicago und ICON7 beim ESMO in Mailand) präsentiert. Beide Studien kommen zu dem Ergebnis, daß die Zugabe von Bevacizumab das progressionsfreie Überleben um etwa 1,5-3 Monate erhöht. Die endgültigen Ergebnisse werden 2012 erwartet.

Das unterschiedliche Ansprechen der verschiedenen Tumorspezies auf Mono- bzw. Kombinationstherapie mit Angiogenesehemmern legt nahe, dass die Tumorangiogenese ein komplexerer Vorgang ist, als nach den präklinischen Ergebnissen angenommen wurde und welche weitere Untersuchungen notwendig macht. Es ist anzunehmen, dass hierbei weitere Faktoren eine Rolle spielen und die VEGF- vermittelte Angiogenese beeinflussen. Hierbei muss insbesondere auch auf inflammatorische Einflüsse aus der Tumorumgebung Augenmerk gelegt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die Wechselwirkungen von inflammatorischen Mediatoren und VEGF nicht einmal bei den beobachteten Ovarialkarzinomzelllinien homogen sind.

5 Zusammenfassung

Viele Tumoren sind durch das Vorhandensein einer entzündlichen Umgebung mit Leukozyten, Lymphozyten oder tumor-assoziierte Makrophagen gekennzeichnet. Dieses entzündliche Milieu schafft durch die Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Proteasen und angiogenetischen Faktoren eine das Tumorstadium begünstigende Umgebung. Die beteiligten Faktoren, u.a. VEGF, können jedoch auch von den Tumorzellen selbst z.B. unter dem Einfluss von Hypoxie gebildet werden.

Ziel dieser Arbeit war es die Interaktion zwischen VEGF und Entzündungsmediatoren beim Ovarialkarzinom mittels Zellkulturversuchen an den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3, OAW-42 und CAOV-3 genauer zu beleuchten, da es sich beim Ovarialkarzinom meist um hypervaskularisierte Tumoren handelt, welche in fortgeschrittenen Stadien häufig große Mengen Aszites bilden. Es wurde angenommen, dass dem VEGF als Faktor mit hoher angiogenetischer Potenz und Gefäßpermeabilität erhöhender Wirkung, hinsichtlich Wachstum und v. a. der Entstehung des malignen Aszites beim Ovarialkarzinom, eine besondere Rolle zukommt.

Die ELISA-Untersuchungen konnten ein heterogenes Expressionsmuster für VEGF, IL-8, IL-6, IL-10 und TNF-alpha in den unterschiedlichen Zelllinien zeigen. Während VEGF von allen Zelllinien gebildet wurde, konnten IL-10 und TNF-alpha überhaupt nicht nachgewiesen werden.

Die Zugabe von IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TGF- β und TNF- α wirkte sich in den einzelnen Zelllinien unterschiedlich auf die VEGF-Konzentration aus. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass proinflammatorische Mediatoren eine Erhöhung des VEGF bewirkten, während das entzündungshemmende IL-10 keine Wirkung zeigte. Dies führt zu der Annahme, dass die Angiogenese im Ovarialkarzinom durch inflammatorische Botenstoffe aus dem Stroma angeregt werden kann.

Hinsichtlich des Proliferationsverhaltens ließ sich in keiner der untersuchten Zelllinien eine Veränderung unter dem Einfluss von VEGF, IL-8 oder IL-6 feststellen. Auch die Invasivität oder das Migrationsverhalten konnte durch VEGF nicht beeinflusst werden. Die Tatsache, dass erhöhte VEGF- und IL-8-Spiegel mit einer schlechteren Prognose und hohem Tumorstadium beim Ovarialkarzinom einhergehen, scheint also nicht primär in einer Wirkung auf das Verhalten der Tumorzellen begründet. Vielmehr wäre dieses durch die VEGF- und IL-8-vermittelte Neovaskularisation erklärlich.

Unter dem Einfluss von Hypoxie kam es zu einer Erhöhung der VEGF-Konzentration, während

für IL-8 keine signifikanten Änderungen festgestellt wurden. Für IL-6 konnte bei CAO-V-3 nach Hypoxie sogar eine deutliche Abnahme der Konzentration verzeichnet werden.

Es scheint somit auch für Ovarialkarzinomzellen zu gelten, dass unter hypoxischen Bedingungen verstärkt VEGF gebildet wird, um eine Hypervaskularisation zu erzielen und Tumorwachstum und Metastasierung zu begünstigen.

Unter dem Aspekt, dass physiologische Angiogenese beim Erwachsenen nur selten vorkommt und ein maligner Tumor für sein Wachstum die Bildung neuer Blutgefäße benötigt, stellt die Hemmung der Angiogenese einen innovativen Ansatz in der Tumorthherapie dar. Ein unterschiedlich gutes Ansprechen verschiedener Tumorspezies auf Mono- bzw. Kombinationstherapie mit VEGF- Inhibitoren legt nahe, dass die Tumorangiogenese ein sehr komplexer Vorgang ist, welcher weitere Untersuchungen notwendig macht. Hierbei sollte auch auf inflammatorische Einflüsse aus der Tumorumgebung Augenmerk gelegt werden.

6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. S. Hauptmann danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die wissenschaftliche Leitung während der Phase der Versuche für diese Arbeit.

Für die Möglichkeit, diese Dissertationsarbeit am Institut für Pathologie der Charité Berlin durchführen zu dürfen, danke ich Herrn Prof. Dr. med. M. Dietel.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tumor-Stroma Interaktion, insbesondere Frau Ines Koch, Medizinisch Technische Assistentin, danke ich für die Unterstützung bei den Versuchen zu der vorliegenden Dissertation.

Herrn Dr. med. S. Berger danke ich für die Initiierung der Thematik, sowie für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die Betreuung bei den Versuchen zu dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. C. Denkert, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit fertigzustellen und der mir beim Verfassen der Dissertation immer eine konstruktive Hilfe war.

Außerdem danke ich herzlich meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben und sich immer wieder liebevoll um meine Tochter kümmern.

7 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Anja Bremert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des VEGF im Ovarialkarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9 Literaturverzeichnis

1. Parkin,D. & Pisani,P. *Infection and Human Cancer*(Cold Spring Harbour Laboratory Press,1999).
2. Negus,R.P., Stamp,G.W., Hadley,J., & Balkwill,F.R. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am. J. Pathol.* **150**, 1723-1734 (1997).
3. Mantovani,A., Bottazzi,B., Colotta,F., Sozzani,S., & Ruco,L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* **13**, 265-270 (1992).
4. Mantovani,A., Bussolino,F., & Dejana,E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* **6**, 2591-2599 (1992).
5. Burke,F., Relf,M., Negus,R., & Balkwill,F. A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine* **8**, 578-585 (1996).
6. Tricot,G.J. New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* **76 Suppl 1**, 334-336 (2002).
7. El-Omar,E.M. *et al.* Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* **404**, 398-402 (2000).
8. Haghnegahdar,H. *et al.* The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 53-62 (2000).
9. Price,D.J., Miralem,T., Jiang,S., Steinberg,R., & Avraham,H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* **12**, 129-135 (2001).
10. Opdenakker,G. & Van,D.J. Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. *Immunol. Today* **13**, 463-464 (1992).
11. O'Byrne,K.J., Dalglish,A.G., Browning,M.J., Steward,W.P., & Harris,A.L. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur. J. Cancer* **36**, 151-169 (2000).
12. Ryuto,M. *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J. Biol. Chem.* **271**, 28220-28228 (1996).
13. Li,J. *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 308-312 (1995).
14. Cohen,T., Nahari,D., Cerem,L.W., Neufeld,G., & Levi,B.Z. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 736-741 (1996).

15. Koch,A.E. *et al.* Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**, 1798-1801 (1992).
16. Sporn,M.B., Roberts,A.B., Wakefield,L.M., & de,C.B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* **105**, 1039-1045 (1987).
17. Plate,K.H., Breier,G., Weich,H.A., & Risau,W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359**, 845-848 (1992).
18. Dvorak,H.F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 233-235 (1995).
19. Risau,W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674 (1997).
20. Folkman,J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 4-6 (1990).
21. Folkman,J. & Hanahan,D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp.* **22**, 339-347 (1991).
22. Senger,D.R. *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-985 (1983).
23. Keck,P.J. *et al.* Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312 (1989).
24. Folkman,J. & Shing,Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934 (1992).
25. Hanahan,D. & Folkman,J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364 (1996).
26. Klagsbrun,M. & D'Amore,P.A. Regulators of angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol* **53**, 217-239 (1991).
27. Ferrara,N., Houck,K., Jakeman,L., & Leung,D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* **13**, 18-32 (1992).
28. Neufeld,G., Tessler,S., Gitay-Goren,H., Cohen,T., & Levi,B.Z. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog. Growth Factor Res.* **5**, 89-97 (1994).
29. Ferrara,N. & Henzel,W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 851-858 (1989).
30. Praloran,V., Mirshahi,S., Favard,C., Moukadiri,H., & Plouet,J. [Mitogenic activity of vasculotropin for peripheral human lymphocytes]. *C. R. Acad. Sci. III* **313**, 21-26 (1991).

31. Guerrin,M. *et al.* Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J. Cell Physiol* **164**, 385-394 (1995).
32. Sondell,M., Lundborg,G., & Kanje,M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* **19**, 5731-5740 (1999).
33. Boocock,C.A. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 506-516 (1995).
34. Carmeliet,P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439 (1996).
35. Ferrara,N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442 (1996).
36. Fong,G.H., Rossant,J., Gertsenstein,M., & Breitman,M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70 (1995).
37. Shalaby,F. *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66 (1995).
38. Alon,T. *et al.* Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.* **1**, 1024-1028 (1995).
39. Connolly,D.T. *et al.* Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 20017-20024 (1989).
40. Bertolini,F., Shaked,Y., Mancuso,P., & Kerbel,R.S. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 835-845 (2006).
41. Lyden,D. *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* **7**, 1194-1201 (2001).
42. Horowitz,J.R. *et al.* Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 2793-2800 (1997).
43. Gabrilovich,D.I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1096-1103 (1996).
44. Brown,L.F. *et al.* Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum. Pathol.* **26**, 86-91 (1995).

45. Brown,L.F. *et al.* Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* **53**, 4727-4735 (1993).
46. Brown,L.F. *et al.* Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis, and erythema multiforme. *J. Invest Dermatol.* **104**, 744-749 (1995).
47. Olson,T.A., Mohanraj,D., Carson,L.F., & Ramakrishnan,S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res.* **54**, 276-280 (1994).
48. Toi,M., Hoshina,S., Takayanagi,T., & Tominaga,T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* **85**, 1045-1049 (1994).
49. Maeda,K. *et al.* Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* **77**, 858-863 (1996).
50. Vincenti,V., Cassano,C., Rocchi,M., & Persico,G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* **93**, 1493-1495 (1996).
51. Houck,K.A. *et al.* The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1806-1814 (1991).
52. Tischer,E. *et al.* Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 1198-1206 (1989).
53. Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.J., Goeddel,D.V., & Ferrara,N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309 (1989).
54. Poltorak,Z. *et al.* VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **272**, 7151-7158 (1997).
55. Park,J.E., Keller,G.A., & Ferrara,N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1317-1326 (1993).
56. Deroanne,C.F., Hajitou,A., Calberg-Bacq,C.M., Nusgens,B.V., & Lapierre,C.M. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* **57**, 5590-5597 (1997).
57. Finkenzeller,G., Sparacio,A., Technau,A., Marme,D., & Siemeister,G. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* **15**, 669-676 (1997).

58. Pertovaara,L. *et al.* Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 6271-6274 (1994).
59. Frank,S. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* **270**, 12607-12613 (1995).
60. Shweiki,D., Itin,A., Soffer,D., & Keshet,E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845 (1992).
61. Minchenko,A., Bauer,T., Salceda,S., & Caro,J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* **71**, 374-379 (1994).
62. Brogi,E., Wu,T., Namiki,A., & Isner,J.M. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* **90**, 649-652 (1994).
63. Enholm,B. *et al.* Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* **14**, 2475-2483 (1997).
64. Dibbens,J.A. *et al.* Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Mol. Biol. Cell* **10**, 907-919 (1999).
65. Tischer,E. *et al.* The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* **266**, 11947-11954 (1991).
66. Houck,K.A., Leung,D.W., Rowland,A.M., Winer,J., & Ferrara,N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **267**, 26031-26037 (1992).
67. Persico,M.G., Vincenti,V., & DiPalma,T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237**, 31-40 (1999).
68. Joukov,V. *et al.* Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J. Cell Physiol* **173**, 211-215 (1997).
69. Yamada,Y., Nezu,J., Shimane,M., & Hirata,Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* **42**, 483-488 (1997).
70. Lyttle,D.J., Fraser,K.M., Fleming,S.B., Mercer,A.A., & Robinson,A.J. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.* **68**, 84-92 (1994).
71. Hauser,S. & Weich,H.A. A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta.

Growth Factors **9**, 259-268 (1993).

72. Park,J.E., Chen,H.H., Winer,J., Houck,K.A., & Ferrara,N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* **269**, 25646-25654 (1994).
73. Olofsson,B. *et al.* Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 11709-11714 (1998).
74. Makinen,T. *et al.* Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 21217-21222 (1999).
75. Joukov,V. *et al.* A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 290-298 (1996).
76. Achen,M.G. *et al.* Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 548-553 (1998).
77. Kukk,E. *et al.* VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* **122**, 3829-3837 (1996).
78. Farnebo,F., Piehl,F., & Lagercrantz,J. Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 891-894 (1999).
79. Ogawa,S. *et al.* A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 31273-31282 (1998).
80. Shibuya,M. *et al.* Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* **5**, 519-524 (1990).
81. Terman,B.I. *et al.* Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **6**, 1677-1683 (1991).
82. Pajusola,K. *et al.* FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res.* **52**, 5738-5743 (1992).
83. de,V.C. *et al.* The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989-991 (1992).
84. Waltenberger,J., Claesson-Welsh,L., Siegbahn,A., Shibuya,M., & Heldin,C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 26988-26995 (1994).

85. Quinn,T.P., Peters,K.G., de,V.C., Ferrara,N., & Williams,L.T. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 7533-7537 (1993).
86. Finnerty,H. *et al.* Molecular cloning of murine FLT and FLT4. *Oncogene* **8**, 2293-2298 (1993).
87. Kaipainen,A. *et al.* Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 3566-3570 (1995).
88. Soker,S., Takashima,S., Miao,H.Q., Neufeld,G., & Klagsbrun,M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**, 735-745 (1998).
89. Gitay-Goren,H., Soker,S., Vlodavsky,I., & Neufeld,G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J. Biol. Chem.* **267**, 6093-6098 (1992).
90. Di Saia,P.J. & Creasman,W.T. Epithelial ovarian cancer in *Clinical Gynecologic* (Mosby- Year Book, Inc., St. Louis, 1993).
91. Hollingsworth,H.C., Kohn,E.C., Steinberg,S.M., Rothenberg,M.L., & Merino,M.J. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am. J. Pathol.* **147**, 33-41 (1995).
92. Perez,R.P., Godwin,A.K., Hamilton,T.C., & Ozols,R.F. Ovarian cancer biology. *Semin. Oncol.* **18**, 186-204 (1991).
93. Luo,J.C., Yamaguchi,S., Shinkai,A., Shitara,K., & Shibuya,M. Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. *Cancer Res.* **58**, 2652-2660 (1998).
94. Boocock,C.A. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 506-516 (1995).
95. Yeo,K.T. *et al.* Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions. *Cancer Res.* **53**, 2912-2918 (1993).
96. Abu-Jawdeh,G.M. *et al.* Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab Invest* **74**, 1105-1115 (1996).
97. Hazelton,D., Nicosia,R.F., & Nicosia,S.V. Vascular endothelial growth factor levels in ovarian cyst fluid correlate with malignancy. *Clin. Cancer Res.* **5**, 823-829 (1999).
98. Kamat,B.R., Brown,L.F., Manseau,E.J., Senger,D.R., & Dvorak,H.F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am. J. Pathol.* **146**, 157-165 (1995).

99. Paley,P.J. *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* **80**, 98-106 (1997).
100. Mesiano,S., Ferrara,N., & Jaffe,R.B. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am. J. Pathol.* **153**, 1249-1256 (1998).
101. Siddiqui,G.K. *et al.* Immunohistochemical expression of VEGF predicts response to platinum based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Angiogenesis.*(2011).
102. Sonoda,T., Kobayashi,H., Kaku,T., Hirakawa,T., & Nakano,H. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett.* **196**, 229-237 (2003).
103. Santin,A.D. *et al.* Secretion of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **20**, 177-181 (1999).
104. Kassim,S.K. *et al.* Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin. Biochem.* **37**, 363-369 (2004).
105. Radke,J. *et al.* -Cytokine level in malignant ascites and peripheral blood of patients with advanced ovarian carcinoma-. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **56**, 83-87 (1996).
106. Toutirais,O. *et al.* Constitutive expression of TGF-beta1, interleukin-6 and interleukin-8 by tumor cells as a major component of immune escape in human ovarian carcinoma. *Eur. Cytokine Netw.* **14**, 246-255 (2003).
107. Kutteh,W.H. & Kutteh,C.C. Quantitation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 in the effusions of ovarian epithelial neoplasms. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**, 1864-1869 (1992).
108. Matsumoto,K., Ohi,H., & Kanmatsuse,K. Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron* **77**, 212-218 (1997).
109. Dankbar,B. *et al.* Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* **95**, 2630-2636 (2000).
110. Yoo,S.A. *et al.* Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) hexapeptide inhibits collagen-induced arthritis and VEGF-stimulated productions of TNF-alpha and IL-6 by human monocytes. *J. Immunol.* **174**, 5846-5855 (2005).
111. Lee,T.H., Avraham,H., Lee,S.H., & Avraham,S. Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via up-regulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 10445-10451 (2002).

112. Liu,B. *et al.* Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 721-727 (1995).
113. Ara,T. *et al.* Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **69**, 329-337 (2009).
114. Xu,L. & Fidler,I.J. Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer. *Oncol. Res.* **12**, 97-106 (2000).
115. Waleh,N.S. *et al.* Mapping of the vascular endothelial growth factor-producing hypoxic cells in multicellular tumor spheroids using a hypoxia-specific marker. *Cancer Res.* **55**, 6222-6226 (1995).
116. Yan,S.F. *et al.* Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J. Biol. Chem.* **270**, 11463-11471 (1995).
117. Xu,L., Xie,K., Mukaida,N., Matsushima,K., & Fidler,I.J. Hypoxia-induced elevation in interleukin-8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* **59**, 5822-5829 (1999).
118. Kim,K.J. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841-844 (1993).
119. Warren,R.S., Yuan,H., Matli,M.R., Gillett,N.A., & Ferrara,N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J. Clin. Invest* **95**, 1789-1797 (1995).
120. Holash,J. *et al.* VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 11393-11398 (2002).
121. Hurwitz,H. *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2335-2342 (2004).
122. Miller,K. *et al.* Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2666-2676 (2007).
123. Sandler,A. *et al.* Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2542-2550 (2006).
124. Drevs,J. *et al.* Effects of PTK787/ZK 222584, a specific inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, on primary tumor, metastasis, vessel density, and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer Res.* **60**, 4819-4824 (2000).
125. Fong,T.A. *et al.* SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* **59**, 99-106 (1999).
126. Stopeck,A. *et al.* Results of a Phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2798-

- 2805 (2002).
127. Drevs,J. *et al.* The VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, ZD6474, inhibits angiogenesis and affects microvascular architecture within an orthotopically implanted renal cell carcinoma. *Angiogenesis*. **7**, 347-354 (2004).
 128. Patyna,S. *et al.* SU14813: a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1774-1782 (2006).
 129. Sonpavde,G. & Hutson,T.E. Pazopanib: a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Curr. Oncol. Rep.* **9**, 115-119 (2007).
 130. Mross,K. *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of PTK/ZK, a multiple VEGF receptor inhibitor, in patients with liver metastases from solid tumours. *Eur. J. Cancer* **41**, 1291-1299 (2005).
 131. Lara,P.N., Jr. *et al.* SU5416 plus interferon alpha in advanced renal cell carcinoma: a phase II California Cancer Consortium Study with biological and imaging correlates of angiogenesis inhibition. *Clin. Cancer Res.* **9**, 4772-4781 (2003).
 132. Hoekman,K. SU6668, a multitargeted angiogenesis inhibitor. *Cancer J.* **7 Suppl 3**, S134-S138 (2001).
 133. Sessa,C. *et al.* Phase I clinical and pharmacological evaluation of the multi-tyrosine kinase inhibitor SU006668 by chronic oral dosing. *Eur. J. Cancer* **42**, 171-178 (2006).
 134. Ng,R. & Chen,E.X. Sorafenib (BAY 43-9006): review of clinical development. *Curr. Clin. Pharmacol.* **1**, 223-228 (2006).
 135. Britten,C.D. *et al.* A phase I and pharmacokinetic study of sunitinib administered daily for 2 weeks, followed by a 1-week off period. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 515-524 (2008).
 136. Kao,J. *et al.* Phase 1 study of concurrent sunitinib and image-guided radiotherapy followed by maintenance sunitinib for patients with oligometastases: acute toxicity and preliminary response. *Cancer* **115**, 3571-3580 (2009).
 137. Escudier,B. *et al.* Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **356**, 125-134 (2007).
 138. Llovet,J.M. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 378-390 (2008).
 139. Motzer,R.J. *et al.* Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **356**, 115-124 (2007).
 140. Burger,R.A., Sill,M.W., Monk,B.J., Greer,B.E., & Sorosky,J.I. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5165-5171 (2007).
 141. Cannistra,S.A. *et al.* Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-

resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5180-5186 (2007).

142. Micha, J.P. *et al.* A phase II study of outpatient first-line paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab for advanced-stage epithelial ovarian, peritoneal, and fallopian tube cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **17**, 771-776 (2007).
143. Penson, R.T. *et al.* Phase II study of carboplatin, paclitaxel, and bevacizumab with maintenance bevacizumab as first-line chemotherapy for advanced mullerian tumors. *J. Clin. Oncol.* **28**, 154-159 (2010).