

In vitro- Untersuchungen zur Regulation des Wachstums und der Invasivität des Ovarialkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung der Rolle von humanem Choriongonadotropin (hCG) und Prostaglandinen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktor der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus- Liebig- Universität Gießen

vorgelegt von Nicole Patricia Kiesenbauer

aus Rothenburg ob der Tauber

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Leiter: Prof. Dr. W. Künzel  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. M. Zygmunt

Gutachter: Prof. Dr. A. Meinhardt

Tag der Disputation: 4. November 2002

# INHALTSVERZEICHNIS

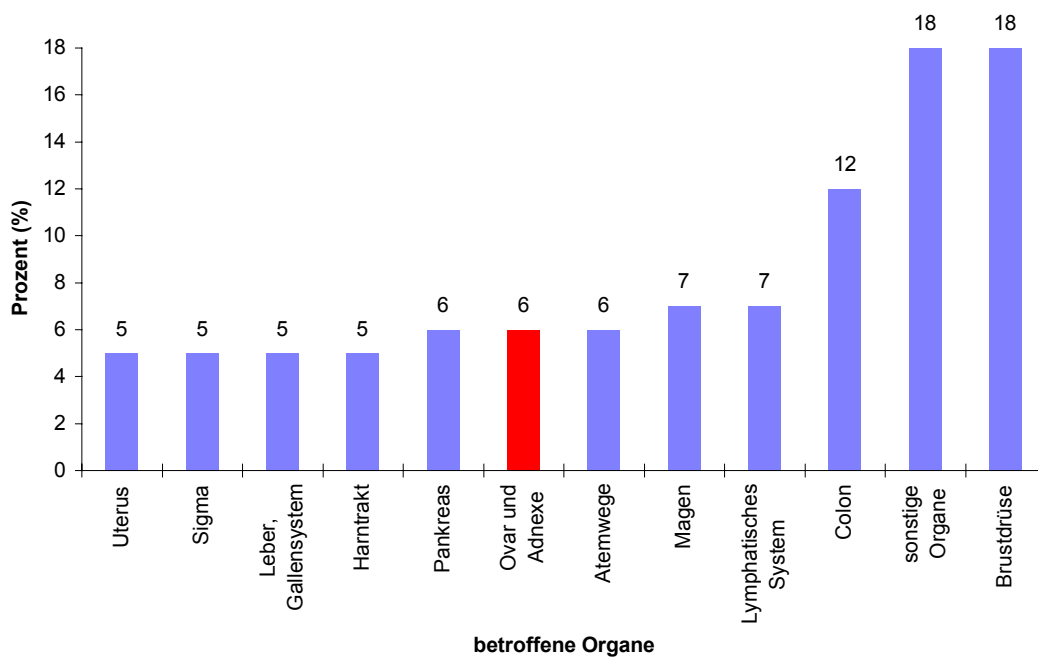
<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b> .....	<b>5</b>
1.1	<u>Das Ovarialkarzinom</u> .....	5
1.1.1	<u>Pathogenese des Ovarialkarzinoms</u> .....	5
1.1.2	<u>Klinik der Ovarialkarzinome</u> .....	6
1.1.3	<u>Therapie der Ovarialkarzinome</u> .....	7
1.2	<u>Regulation des Tumorwachstums und der Metastasenbildung</u> .....	7
1.2.1	<u>Komponenten der metastatischen Kaskade</u> .....	7
1.2.2	<u>Matrixmetalloproteinasen (MMP)</u> .....	10
1.2.3	<u>Adhäsionsmoleküle (Integrine)</u> .....	11
1.2.4	<u>humanes Choriongonadotropin (hCG)</u> .....	12
1.2.5	<u>Prostaglandine</u> .....	15
<b>2</b>	<b><u>FRAGESTELLUNG</u></b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b> .....	<b>20</b>
3.1	<u>Untersuchungsmaterial</u> .....	20
3.1.1	<u>Zelllinien und -kultur</u> .....	20
3.1.2	<u>Geräte</u> .....	22
3.1.3	<u>Chemikalien, Substrate</u> .....	23
3.2	<u>Untersuchungsmethoden</u> .....	24
3.2.1	<u>hCG/LH-Rezeptornachweis</u> .....	24
3.2.2	<u>Proliferationsassay</u> .....	27
3.2.3	<u>Migrationsassay</u> .....	28
3.2.4	<u>Invasionsassay</u> .....	30
3.2.5	<u>Enzym- Immuno- Assays zur Messung der MMP</u> .....	32
3.2.6	<u>Durchflusszytometrische Messung der Integrinexpression</u> .....	37
3.2.7	<u>Statistische Auswertung</u> .....	39
<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b>40</b>
4.1	<u>hCG/LH-Rezeptornachweis</u> .....	40
4.2	<u>Regulation der Proliferation des Ovarialkarzinoms <i>in vitro</i></u> .....	41
4.2.1	<u>Einfluss von hCG auf die Proliferation</u> .....	41

4.2.2	<u>Einfluss von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub> auf die Proliferation</u>	41
4.2.3	<u>Einfluss der Signalübertragungsmoleküle auf die Proliferation</u>	42
4.3	<u>Regulation der Migration und Invasion des Ovarialkarzinoms <i>in vitro</i></u>	43
4.3.1	<u>Einfluss von hCG auf die Migration</u>	43
4.3.2	<u>Einfluss von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub> auf die Migration</u>	45
4.3.3	<u>Einfluss der Signalübertragungsmoleküle auf die Migration</u>	46
4.3.4	<u>Einfluss der Testsubstanzen auf die Invasion der EFO 27 Zellen <i>in vitro</i></u>	50
4.4	<u>Regulation der Expression von Matrixmetalloproteinasen und Integrinen</u> <u>des Ovarialkarzinoms <i>in vitro</i></u>	50
4.4.1	<u>Einfluss der Testsubstanzen auf die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen</u> <u>(MMP)</u>	50
4.4.2	<u>Einfluss von PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2alpha</sub>, db cAMP und Forskolin auf die Expression der</u> <u>Adhäsionsmoleküle</u>	50
4.5	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse</u>	54
<b>5</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>56</b>
5.1	<u>Die Beteiligung von hCG und Prostaglandinen an der Wachstumsregulation des</u> <u>Ovarialkarzinoms</u>	57
5.2	<u>Signalübertragung</u>	62
5.3	<u>Ausblick und Konsequenzen für das Verständnis von Entstehung und Ausbreitung der</u> <u>Ovarialkarzinome</u>	68
<b>6</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>90</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Ovarialkarzinom

In der Reihe der Malignome nimmt das Ovarialkarzinom eine wichtige Stellung ein. Es ist die zweithäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen im gynäkologischen Bereich, obwohl es in der Häufigkeit hinter Endometrium-, bzw. Zervixkarzinom steht (Abb. 1).



*Abbildung 1: Sterblichkeit von Frauen an Krebserkrankungen nach betroffenen Organen in Prozent. Quelle: Statistisches Bundesamt 1995 (adaptiert nach Deutsche Krebshilfe)*

### 1.1.1 Pathogenese des Ovarialkarzinoms

Während die Ätiologie des Ovarialkarzinoms bislang nicht geklärt ist, können eine Anzahl von Risikofaktoren benannt werden. Dazu zählen höheres Lebensalter, Infertilität, Nulliparität, dauerhafte ovulatorische Zyklen und Einnahme von ovulationsauslösenden Medikamenten. Eine genetische Komponente in der Pathogenese der Erkrankung wird diskutiert. Die meisten

Ovarialkarzinome (> 90 %) treten sporadisch auf. Die Schwangerschaft und die Einnahme von Ovulationshemmern wirken hingegen vermutlich protektiv (Kuhn W. und Meier W. 1998).

### **1.1.2 Klinik der Ovarialkarzinome**

In den Frühstadien des Ovarialkarzinoms treten kaum Symptome auf, so dass etwa 70 % der Fälle erst in den fortgeschrittenen Stadien (FIGO III und IV) diagnostiziert werden. Dies hat eine sehr niedrige Fünf-Jahres-Überlebensrate von 20 bis 40 % zur Folge.

Für die Diagnostik des Ovarialkarzinoms sind neben der allgemeinen Anamnese, der gründlichen körperlichen und gynäkologischen Untersuchung, auch Laborparameter, wie z.B. der Tumormarker CA-125 sowie CA-72-4 bzw. CA 19-9 von Bedeutung. Darüber hinaus spielen auch bildgebende Verfahren wie die transvaginale Sonographie eine wichtige Rolle. Für die Prognose der Erkrankung sind die Grösse des postoperativ verbliebenen Tumorrestes, der Lymphknotenstatus, das Lebensalter der Patientin und ihr Allgemeinzustand wichtig (Münstedt K. et al., 1997).

Aufgrund des zunächst symptomarmen Verlaufs ist eine eindeutige Klinik des Ovarialkarzinoms schwer auszumachen. Es handelt sich dabei um Symptome, die erst durch Einwirkung des Tumors auf Nachbarorgane oder Metastasierung hervorgerufen werden, also schon einen organüberschreitenden Prozess voraussetzen (Schmidt-Matthiesen H. und Hepp H. 1998). Dazu gehören Druck- und Völlegefühl, Müdigkeit und Schwäche sowie eine z.T. grosse Zunahme des Leibesumfanges. Letztere steht oft in krassem Gegensatz zum reduzierten Allgemeinzustand der Patientinnen. Begleitend sein können uncharakteristische Schmerzen, Peritonealreize, evtl. Stieldrehungserscheinungen mit den Zeichen des akuten Abdomens. In etwa 25 % sind Blutungsanomalien vorhanden (Stegner H.-E. 1996).

Bei hormonaktiven Tumoren kann es aber auch zu einer unerwarteten Östrogenaktivität in Kindheit und Jugend (Pubertas praecox, juvenile Makromastie) oder im Alter kommen. Darüber hinaus kommen Virilisierungserscheinungen infolge plötzlich einsetzender androgener Effekte vor.

Metastasierungsfolgen sind z.B. Lungen- oder Wirbelsäulenbefall mit den charakteristischen Folgen, aber auch Aszites, welcher im Rahmen einer Peritonealkarzinose zu beobachten ist.

### ***1.1.3 Therapie der Ovarialkarzinome***

Die Behandlung des Ovarialkarzinoms besteht aus zwei Hauptsäulen. Zum einen ist dies die radikale Operation, zum anderen eine aggressive postoperative platin- und paclitaxelhaltige Kombinationschemotherapie.

Das Ziel der Operation besteht in einer möglichst vollständigen Entfernung des Tumorgewebes, um so günstige Bedingungen für eine Polychemotherapie zu schaffen. Die Reduktion der Tumormasse hat somit durchaus wichtigen prognostischen Charakter.

Der Erfolg einer Chemotherapie bei malignen Neoplasien des Ovar hängt im Wesentlichen von Tumorbiologie, d.h. Grading und histologischem Tumortyp, sowie postoperativer Tumorrestgröße ab.

Weitere therapeutische Ansätze finden sich in den Bereichen Hormon-, Gen- und Immuntherapie. Da ca. 70 % der Ovarialkarzinome östrogen- und 50 % gestagenrezeptorpositiv sind, können auch Sexualhormone Einfluss auf die Wachstumsregulation von Ovarialkarzinomen haben (Wimalasena J., et al., 1993). Allerdings liegen die Remissionsraten von Hormontherapeutika bei max. 20 %, so dass sie nur bei mehrfach zytostatisch vorbehandelten Patientinnen als sogenannte Salvage-Therapie zum Einsatz kommen. In rein experimentellem Stadium befindet sich nach wie vor die Gentherapie. Die Immuntherapie scheint als Ergänzung zur konventionellen Chemotherapie geeignet.

## ***1.2 Regulation des Tumorwachstums und der Metastasenbildung***

### ***1.2.1 Komponenten der metastatischen Kaskade***

Bösartige Tumoren, darunter auch Ovarialkarzinome, sind durch ein schnelleres Wachstum, die Fähigkeit zu invasivem, destruierendem und metastasierendem Wachstum und durch einen partiellen oder völligen Verlust der Differenzierung charakterisiert. Dies geschieht durch ein kompliziertes Zusammenspiel von Rezeptor- Tyrosin- Kinasen, welches eine Permeabilitätssteigerung von Blutgefäßen bedingt, das Wachstum und die Invasion von Zellen ermöglicht. Es kommt dabei zu einer veränderten Zusammensetzung von Extrazellulärmatrix (EZM)- Komponenten, Proteasen (Kollagenasen und Plasminogen- Aktivatoren) der Zelle und Expression spezifischer Adhäsionsrezeptoren, die zu einer generellen Desorganisation des

Zytoskeletts führen. Eine disseminierte Metastasierung maligner Tumoren führt häufig zum Tod der erkrankten Patienten.

Für die Bildung von Metastasen ist im einzelnen eine Folge von Schritten, die metastatische Kaskade, erforderlich (Thomas C. 1994):

- a. Ablösen von Zellen des Primärtumors, Durchsetzung des Interstitiums und der Basalmembran;
- b. Bildung von Tumorthromben und Verschleppung mit dem Blut- oder Lymphstrom bzw. der Flüssigkeit seröser Körperhöhlen;
- c. Adhäsion der Tumorzellen an Endothelien der Gefäßwand bzw. an der Serosa;
- d. Infiltration des umgebenden Gewebes;
- e. Zellproliferation, Migration und Anschluss an das örtliche Gefäßsystem.

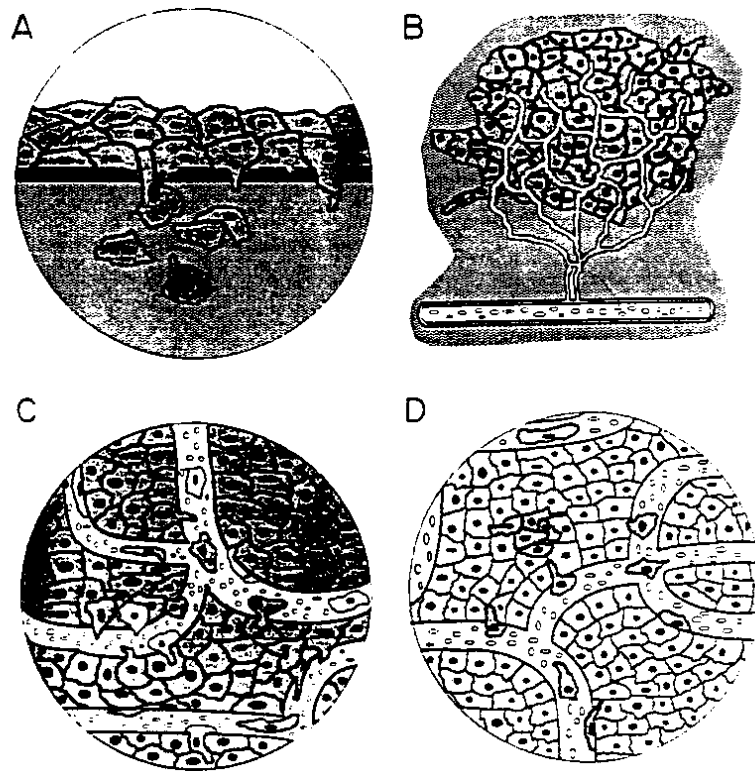
Dabei spielt die EZM eine besondere Rolle. Die EZM bildet sowohl Basalmembranen von 50-100 nm Dicke, als auch interstitielles Stroma, und muss somit von den invadierenden Tumorzellen überwunden werden (Mignatti P. und Rifkin D.B. 1993) (Abb. 2).

Die **EZM** besteht aus mehreren Komponenten:

- a. **Kollagen** (25 % des Gesamtproteins der Zelle, Hauptbestandteil der EZM, besonders Typ IV);
- b. **Laminin** (zweithäufigste Komponente der Basalmembran, vermittelt Zelladhäsion);
- c. **Fibronektin**;
- d. **Entactin und Nidogen, Glycosaminoglycane (GAGs) und Elastische Fasern** (Bryant-Greenwood G.D., 1998, Vogelmann, R. et al., 1999).

Im erwachsenen Organismus bestimmt die EZM Zellarchitektur, Zelladhäsion, Zelldifferenzierung und agiert als makromolekularer Filter. Im Falle von Gewebeumbau und invasiven Prozessen, wie z.B. Entzündung, Wundheilung, Angiogenese und Neoplasie kann sie örtlich begrenzt für Zellen permeabel werden.





**Abbildung 2:** Ablauf der Entstehung maligner Tumore. (A) Invasion: Tumorzellen wachsen in umgebendes Gewebe, (B) Angiogenese: Kapilläre Endothelzellen wachsen in den Tumor, (C) Intravasation: Tumorzellen infiltrieren das Kapillarbett und Immunzellen infiltrieren den Tumor, (D) Extravasation und Metastasierung: Tumorzellen verlassen das Gefäßsystem und siedeln sich in Entfernung als Metastasen ab (Modifiziert nach Mignatti P. und Rifkin D.B., 1993).

Die Interaktion von Zellen mit der EZM läuft sowohl physiologischer-, als auch pathologischerweise in 4 Schritten ab (Allavena P. et al., 1991):

- a. Anheftung;**
- b. Triggerung** (Aktivierung der Oberflächenrezeptoren);
- c. starke Adhäsion** (vermittelt durch aktivierte Integrine);
- d. Migration/ Invasion** (durch lokale promigratorische Faktoren, darunter Zytokine und Chemokine).

Die Modulation des metastatischen Potenzials der Tumorzellen ist auto- und parakrinen Wachstumsfaktoren unterworfen (Teale D.M., et al., 1988).

Zu den wichtigsten Regulatoren gehören u.a.:

- proteolytische Enzyme und die dazugehörigen Inhibitoren, z.B. Metalloproteinasen;
- die EZM und ihre zellulären Rezeptoren (Integrine);
- Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone sowie ihre Rezeptoren (Allavena P., et al., 1991), darunter Prostaglandine, aber auch humanes Choriongonadotropin (hCG) (Allavena P., et al., 1991).

### **1.2.2 Matrixmetalloproteinasen (MMP)**

Matrixmetalloproteinasen (MMP) gehören zu der Familie der Endopeptidasen, die einen Zusammenbruch der EZM und evtl. auch Gewebsschädigungen herbeiführen können. Ihre Aktivität wird durch spezifische Inhibitoren, TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), sehr rigide reguliert. Das hier untersuchte TIMP-1 inaktiviert alle MMP und hat einen Plasmanormwert von 140 ng/ml. Bei einigen Erkrankungen, wie z.B. Arthritis oder Neoplasien gerät das empfindliche Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP aus dem Lot (Mackay A.R., et al., 1992, Hanemaaijer R., et al., 1993).

Die Transskription der MMP kann durch eine Reihe von Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, Onkogen-Produkte, Interleukine) induziert werden. Die meisten der MMP werden erst aufgrund eines Stimulus exprimiert, nur ein kleiner Teil wird ständig produziert (Xia M., et al., 1996, Borden P. und Heller R.A. 1997, Kusano K., et al., 1998). *In vitro* beeinflussen die MMP das Invasionsverhalten unterschiedlicher Zellen (Xia M., et al., 1996). Eine Darstellung, der in der vorgestellten Studie untersuchten MMP, zeigt Tab.1.

	<b>MMP-1</b>	<b>MMP-2</b>	<b>MMP-9</b>
<b>äquivalent zu</b>	Interstitielle Kollagenase	Gelatinase A, Kollagenase IV	Gelatinase B, Kollagenase IV
<b>Substrate</b>		Gelatine, Kollagen IV, V, VII, X, XI, Fibronectin, Elastin, Proteoglykan	Kollagen I, III, IV, V, Gelatine, Proteoglykane, Elastin
<b>Plasmanormwert</b>	nicht nachweisbar	550 ng/ml	nicht nachweisbar
<b>nachgewiesen in</b>		Ovarialkarzinom, weitere benigne und maligne Zellen	Ovarialkarzinom, u.a. Trophoblast- und Tumorzellen,
<b>Sezernierung und Aktivierung</b>	<i>in vivo</i> durch Plasmin und Stromelysin aktiviert	Prekursor, <i>in vivo</i> aktiviert	Prekursor, <i>in vivo</i> aktiviert
<b>Inaktivierung durch</b>	TIMP-1	TIMP-1, TIMP-2	TIMP-1

**Tabelle 1:** MMP, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

### 1.2.3 Adhäsionsmoleküle (Integrine)

Integrine gehören zu den Zelloberflächenmolekülen, welche die Zelladhäsion vermitteln. Damit sind sie von großer Bedeutung für die Verankerung der Zellen, aber auch Migration, Wachstum und Differenzierung. Es gibt zwei wesentliche Formen der Adhäsion: zum einen Zell- Zell-

Kontakte, zum anderen Zell- Extrazellulärmatrix- Verbindungen. Integrine vermitteln in erster Linie letztere, wirken aber darüber hinaus auch bei Zell- Zell- Kontakten mit.

Adhäsionsmoleküle lassen sich aufgrund ihrer Struktur in Immunglobuline, Selektine, Integrine und andere einteilen (Ruoslahti E. 1991).

Zu den Immunglobulinen gehören unter anderem ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül), ICAM-2 und VCAM-1 (Vaskulo-zelluläres Adhäsionsmolekül).

Selektine sind dagegen Kohlenhydrat-bindende Adhäsionsmoleküle, die im Prozess der Immunabwehr zur gesteigerten Adhäsion von Leukozyten am Gefäßendothel des entzündeten Gewebes beitragen.

Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation, Immunfunktionen, Gewebereparaturvorgängen und eben auch der Tumorinvasion. Sie gehören zur Familie der Membranglykoproteine und bestehen aus zwei Untereinheiten, alpha und beta. Sie besitzen eine Anheftungsstelle, die durch beide Untereinheiten gebildet wird, und eine zytoplasmatische Domäne, mit der sie den Kontakt zum Zytoskelett herstellen.

Bisher sind 16 alpha- und 8 beta-Untereinheiten bekannt, welche durch verschiedene Kombinationsmöglichkeiten mindestens 22 Integrine bilden (Vogelmann R., et al., 1999).

Neben den oben angesprochenen MMP und den Integrinen haben auch Hormone, wie humanes Choriongonadotropin (hCG) und Chemokine, wie Prostaglandine, einen grossen Anteil an der Regulation des Wachstumsverhaltens von Zellen, benigner wie maligner.

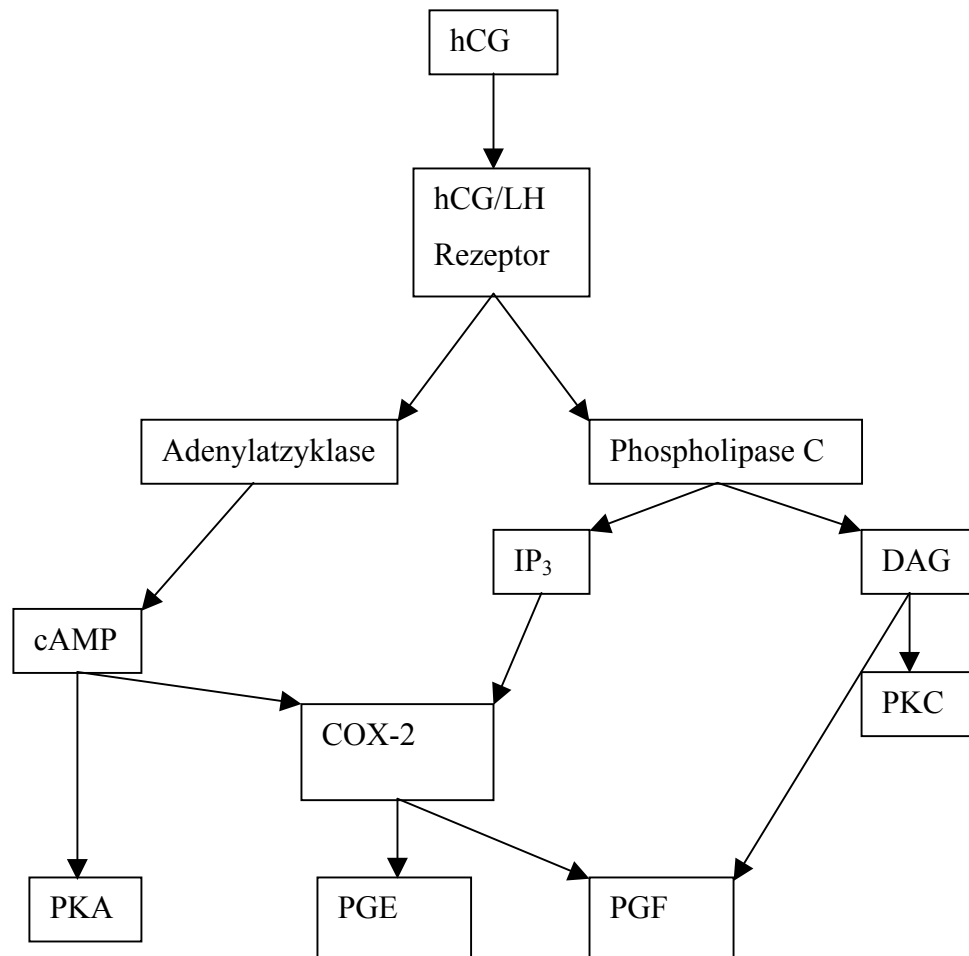
#### ***1.2.4 humanes Choriongonadotropin (hCG)***

hCG ist ein Glykoproteinormon mit einem Molekulargewicht von 39 kD und ebenso wie das luteinisierendes Hormon (LH) bestehend aus zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , wobei die  $\alpha$ -Untereinheit beider Hormone identisch ist. Die  $\beta$ -Untereinheit, welche die biologische Funktion determiniert, stimmt von hCG und LH zu 81 % überein. Daher ist hCG auch in der Lage, an den LH-Rezeptor zu binden und ihn zu aktivieren.

hCG wird vorwiegend im Synzyotrophoblast aber auch durch verschiedene genitale und nicht-genitale Tumore, wie z.B. Chorionkarzinom, Nierentumore, Prostata- und auch Ovarialkarzinom produziert (Monteiro J.C., et al., 1983). Inaktiviert wird das hCG im Serum und in der Niere und anschließend über Urin und Leber ausgeschieden.

Seine biologische Wirkung besteht aus der Stimulation des Corpus luteum und der Steroidhormonproduktion so lange, bis dies von der Plazenta übernommen wird. Es fördert darüber hinaus die Motilität der Trophoblastzellen während der Implantation (Zygmunt M., et al., 1998). Ferner hat es Einfluss auf die Bildung biologisch aktiver Peptide durch das Ovar, welche in der Reproduktionsphysiologie eine Rolle spielen. Darüber hinaus werden ihm zunehmend auch immunmodulierende (Wass M., et al., 1977, Harris S.J., et al., 1984, Reinisch N., et al., 1994) und wachstumsfaktor-ähnliche Eigenschaften zugewiesen (Kido A., et al., 1996).

Der hCG/LH-Rezeptor findet sich extragonadal vor allem im Uterus und auf Nabelschnurgewebe, außerdem in der Tube, der Plazenta, im Amnion und im Chorion, aber auch in der Prostata, dem ZNS und der Nebenniere (Licht P. und Wildt L., 1998). Eine Ausschaltung des hCG/LH-Rezeptors in embryonalen Stammzellen resultiert in der Infertilität beider Geschlechter (Lei Z.M., et al., 2000). Die Interaktion zwischen hCG und dem hCG-Rezeptor (Abb. 3) führt über G- Proteinkopplung zur Aktivierung der Phospholipase C und somit durch Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) auf Kalzium- Kalmodulin und Diacylglycerol (DG) auf die Proteinkinase C (PKC) (Greenwood J.A., et al., 1998). Zum anderen wird die Adenylatzyklase mit nachfolgendem Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und der Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Dufau M.L., 1998). Eine Untersuchung der Signalübertragungskette kann mit Hilfe von Aktivatoren beider Kinasen, cAMP-Analoga für die Proteinkinase A und Phorbolster im Fall der Proteinkinase C, oder kompetitiven Inhibitoren geschehen.



**Abbildung 3:** Zelluläre Antwort auf die Stimulation des hCG/LH-Rezeptors: Nach Stimulation des hCG/LH-Rezeptors folgt eine parallele Aktivierung der Adenylatzyklase und der Phospholipase C. Letztere aktiviert Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG), welches wiederum die Proteinkinase C stimuliert und an der Prostaglandin F-Regulation (PGF) beteiligt ist. Dies geschieht im Zusammenspiel mit der Cyclooxygenase-2 (COX-2), welche einerseits durch IP<sub>3</sub>, andererseits durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), hervorgegangen aus Stimulation der Adenylatzyklase, reguliert wird. Die COX-2 ist wesentlich an der Prostaglandin E (PGE)-Synthese beteiligt, während durch cAMP die Proteinkinase A stimuliert wird. Es wird deutlich, wie viele verschiedene intrazelluläre Signalketten durch den hCG/LH-Rezeptor aktiviert werden können.

### ***1.2.5 Prostaglandine***

Prostaglandine (PG) entstammen dem Arachidonsäurezyklus und gehören somit neben den Leukotrienen und den Thromboxanen zu den Eikosanoiden. Als erstes Produkt des Stoffwechsels der Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase entstehen PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub>, welche zu PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub> weiter umgesetzt werden. Weitere Produkte sind Thromboxan oder Prostazyklin. Die PG werden in praktisch allen Geweben produziert.

Die Metabolisierung der Prostaglandine erfolgt hauptsächlich enzymatisch in der Lunge, bis zu 95 % einer injizierten Dosis bei der ersten Passage. Die erforderlichen Enzyme finden sich außer in der Lunge auch in Niere, Milz, Gastrointestinaltrakt und Plazenta. Die weitere Verstoffwechslung der PG- Abbauprodukte erfolgt vor allem in der Leber.

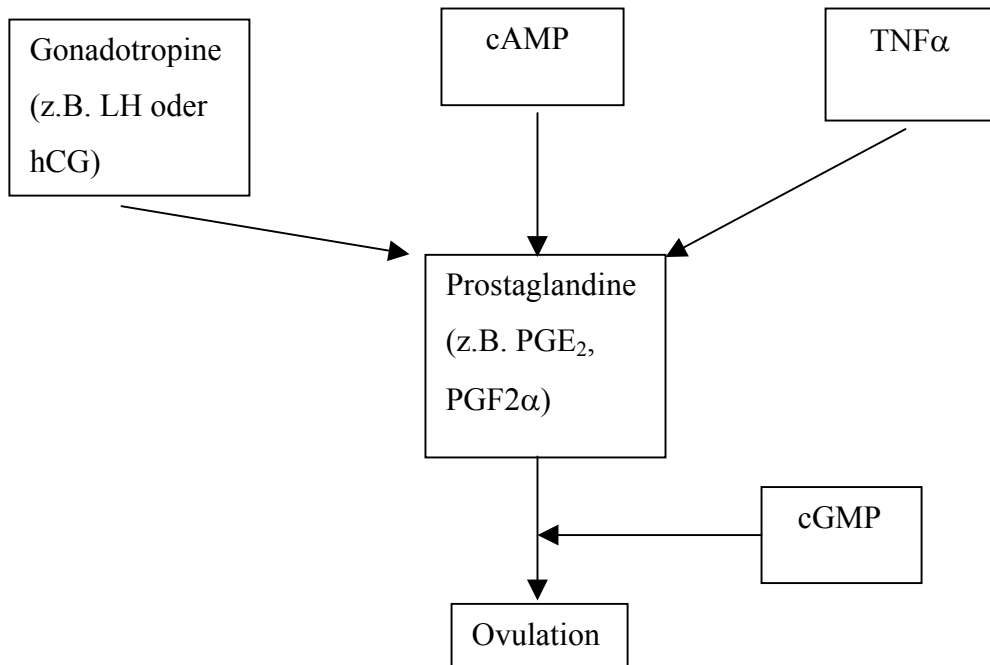
Es wurden folgende PG beschrieben: PGA<sub>1</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>1alpha</sub>, PGF<sub>2alpha</sub>, PGJ<sub>2</sub> und Prostazykline (PGI<sub>2</sub>).

Die Wirkung der Prostaglandine unterscheidet sich nicht sehr von den Effekten der Polypeptidhormone. Sie spielen vor allem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gefäßweite und - permeabilität, der Entstehung von Entzündungsreaktion und Schmerzreiz und bei der Blutstillung (Weiss C.H. und Jelkmann W., 1995).

Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese ist die Cyclooxygenase. Physiologischerweise wird vor allem die Cyclooxygenase-1 (COX-1) produziert; während Entzündungsvorgängen und auch in der Karzinogenese von Kolonmalignomen kommt es jedoch zu einem Anstieg der Expression der COX-2, welche bevorzugter therapeutischer Ansatzpunkt ist (Dimberg J., et al., 1999).

Das Wirkspektrum der Prostaglandine ist vielfältig: Hemmung der Thrombozytenaggregation, Steigerung der Nierendurchblutung, Hemmung der Magensaftfreisetzung und Mitwirkung bei Chemotaxis, Anaphylaxie und Schmerzentstehung. Vom gynäkologischen Standpunkt aus betrachtet, ist vor allem die uteruskontrahierende Wirkung und Beteiligung an der Follikelruptur interessant (Karlson P., et al., 1994, Weiss C., et al., 1995).

Die Regulation der Ovulation unterliegt vielen Einflüssen (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Regulation der Ovulation durch Prostaglandine. Gonadotropine, cAMP, cGMP und TNF $\alpha$  stimulieren die PG-Bildung, welche die Follikelruptur induzieren.

Durch Gabe von Prostaglandinsynthesehemmern in der Zyklusmitte lässt sich die Ovulation verhindern. Prostaglandine sind im Zusammenspiel mit Progesteron am Ablauf des ovariellen Zyklus, an der Follikelruptur, beteiligt (Priddy A.R. und Killick S.R. 1993). PGE<sub>2</sub> ist das wichtigste an der Ovulation beteiligte Prostaglandin (Woods J., et al., 2000, Filion F., et al., 2001).

Diese Vorgänge scheinen durch erhöhte intrazelluläre cAMP- Spiegel vermittelt und vor allem von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  initiiert zu werden (Sugatani J., et al., 1996). Auch die Uteruskontraktionen unter der Geburt werden durch signifikanten Anstieg der Spiegel von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  sowohl im Plasma als auch in der Amnionflüssigkeit ausgelöst. Daher werden Prostaglandine auch zur Geburtseinleitung und zum Abbruch einer Schwangerschaft, auch in Verbindung mit Antigestagenen, eingesetzt.

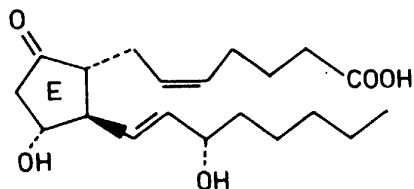


Das Hauptaugenmerk der vorgestellten Untersuchung liegt in der Wirkung von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub>, den meistexprimierten PG des Ovars.

### Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

PGE<sub>2</sub> (Abb. 5) entsteht aus PGH<sub>2</sub>. Wie andere Hormonrezeptoren ist auch der PGE<sub>2</sub>-Rezeptor wandständig und gehört zu der Familie der Rezeptoren, die an G- Proteine koppeln (Yumoto N., et al., 1986) und an verschiedene intrazelluläre Signalübertragungswege gebunden sind (Narumiya S., et al., 1993). Die G<sub>s</sub>- und G<sub>i</sub>- Proteine stimulieren oder inhibieren die Adenylatzyklase.

Man unterscheidet 7 verschiedene PGE<sub>2</sub>- Rezeptortypen (Coleman R.A., et al., 1994, Fedyk E.R., et al., 1996), die sich in 4 Subklassen, EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> und EP<sub>4</sub>, unterteilen lassen. Die EP-Rezeptoren finden sich im gesamten Organismus, wobei EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub> an die Adenylatzyklase gebunden sind (Hebert R.L. 1994, Scutt A., et al., 1995, Choung J., et al., 1998, Crider J.Y., et al., 1998). Die anderen Rezeptoren inhibieren möglicherweise die Adenylatzyklase (G<sub>i</sub>- vermittelt, z.B. EP<sub>3</sub>). Die Rezeptoranzahl erklärt auch die Vielzahl der biologischen Wirkungen, die durch Prostaglandine der E-Reihe ausgelöst werden.



**Abbildung 5:** Biochemische Formel von PGE<sub>2</sub>

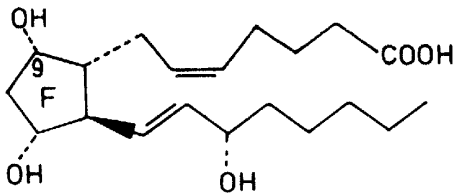
PGE<sub>2</sub> ist vor allem für seine immunsuppressive Wirkung bekannt und findet sich in grossen Mengen in der Nähe von Tumorzellen und deren lokaler Milieus. Als Quelle von PGE<sub>2</sub> werden hauptsächlich Monozyten, auch tumor- infiltrierende, angesehen. Ebenso auch - in Bezug auf maligne Erkrankungen - die peritumorale Mukosa (Milanovich M., et al., 1995).

Die Plasmahalbwertszeit von i.v.-verabreichtem PGE<sub>2</sub> liegt im Bereich von 10 bis 40 Minuten (Bothwell W., et al., 1982, Tuber U., et al., 1993).

### Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)

Gebildet wird PGF<sub>2α</sub> (Abb. 6) wie PGE<sub>2</sub> ebenfalls aus PGH<sub>2</sub>. Da PGF<sub>2α</sub> zu den zyklischen Endoperoxiden gehört, hat es normalerweise entgegengesetzte Effekte zu PGE<sub>2</sub> und wirkt über eine cAMP- unabhängige intrazelluläre Kalzium- Erhöhung (Murdoch W.J., et al., 1993).

Seine Wirkung wird durch einen spezifischen Rezeptor (FP) vermittelt und über spezielle, Pertussistoxin-resistente, G-Proteine weitergeleitet, wobei eventuell die intrazelluläre Kalzium-Erhöhung mittels IP<sub>3</sub> zustande kommt (Davis J.S., et al., 1989, Coleman R.A., et al., 1994, Carrasco M.P., et al., 1997). Der FP- Rezeptor findet sich hauptsächlich im Corpus luteum, wo die luteolytische Wirkung von PGF<sub>2α</sub> vermittelt wird (Coleman R.A., et al., 1994). Bisher gibt es keine Informationen über FP- Rezeptorsubtypen.



**Abbildung 6:** Biochemische Formel von PGF<sub>2α</sub>

Der PGF<sub>2α</sub>-Plasmaspiegel während des menschlichen Reproduktionszyklusses zeigt keine großen Schwankungen, er liegt auf niedrigem Niveau im Mittel zwischen 30 und 70 pg/ml (Kindahl H., et al., 1976). Der Spiegel im Endometrium selbst hingegen schwankt stark zwischen proliferativer und sekretorischer Phase und erreicht sein Maximum in der Mitte der Sekretionsphase bei 2,047 µg/g Frischgewebe (Maathuis J.B. und Kelly R.W., 1978). Bereits etablierte klinische Anwendungsgebiete sind atonische Nachblutungen nach Ausräumung des Uterus oder nach der Geburt und Vorbeugung einer Uterusatonie bei besonderem Risiko, wie z.B. nach Mehrlingsgeburten oder bei Blasenmole.

## 2 FRAGESTELLUNG

Grundlage dieser Arbeit ist die Frage nach dem Einfluss von humanem Choriongonadotropin (hCG) und Prostaglandinen (PG) auf die Wachstumsregulation von Ovarialkarzinomen. Ihre Rolle bei der Entstehung und Metastasierung von Ovarialkarzinomen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es finden sich Hinweise sowohl für wachstumsfördernde, als auch wachstumshemmende Einflüsse. Da beide Substanzen eine breite klinische Anwendung in der Reproduktionsmedizin und Perinatalogie finden, sind diese Einflüsse von grosser Bedeutung.

hCG wird in der Stimulationstherapie bei Infertilität eingesetzt, wobei die ovulationsstimulierende Wirkung des hCG zur Anregung der Follikelreifung, z.B. im Rahmen der *in vitro*-Fertilisation, ausgenutzt wird. Prostaglandine (PG) sind für den Follikelsprung mitverantwortlich und finden aufgrund ihrer Uterus- kontrahierenden Wirkung eine breite Anwendung in der Geburtshilfe.

Zur weiteren Regulation des Tumorwachstums und der Metastasierung gehören verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone.

In der vorgestellten Arbeit sollte der Einfluss von hCG und PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub> auf das Wachstum der Ovarialkarzinomzellen der Linie EFO 27 *in vitro* untersucht werden. Insbesondere sollte die Wirkung von hCG, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub> im Hinblick auf die Proliferation, Migration und Invasion von Ovarialkarzinomzellen beschrieben werden. Ebenso sollten die bekannten Signalübertragungswege von hCG und PG untersucht werden.

Auch der Einfluss von hCG, der oben genannten Prostaglandine, der Signalübertragungsmoleküle cAMP und cGMP und des Adenylatzyklase- Aktivators Forskolin auf die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 sowie der zellulären Adhäsionsmoleküle (CAM) alpha 1, alpha 4, alpha 5, alpha 6 und alpha v sollte untersucht werden.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

##### 3.1.1 Zelllinien und -kultur

a) Für die Versuche wurden folgende verschiedene Zelllinien verwendet (Tab. 2).

Zelllinie	Herkunft	Eigenschaften
EFO 27 (DMSZ, ACC-No 191, Braunschweig, Deutschland)	Humanes, aus einer einzelnen Omentum-Metastase gewonnenes, muzinöses, papilläres Adenokarzinom des Ovars einer 36jährigen Patientin	epithelial, wächst adhärent als Monolayer, Generationszeit 50-80 Stunden, $0,3-0,6 \times 10^5$ Zellen/cm <sup>2</sup> , Zytokeratin (100 %)- und Vimentin (50 %)-positiv und Desmin-, Endothel-, GFAP-, Neurofilament-negativ (Simon W.E., et al., 1983, Kunzmann R., et al., 1987)
EFO 21 (DMSZ, ACC-No 235, Braunschweig, Deutschland)	humane Zystadenokarzinom-zelllinie des Ovars, aus dem Aszites einer 56-jährigen Patientin	epitheloide Zellen, welche als Monolayer wachsen
COLO 704 (DMSZ, ACC-No 198, Braunschweig, Deutschland)	humanes Adenokarzinom des Ovars, aus dem durch eine Kolonmetastase verursachten Aszites einer 46jährigen weißen Patientin	einzeln und in Haufen in Suspension wachsend
Fortsetzung siehe Seite 21		

OVCAR 3 (ATCC, ATCC No HTB-161, Manassas, VA, USA)	humane Zystadenokarzinomzelllinie des Ovars, entnommen einer 60jährigen kaukasischen Patientin	epithelial adhärent wachsend
HT 1080 (DMSZ, ACC-No 315, Braunschweig, Deutschland)	humane Fibrosarkomzelllinie eines 35jährigen kaukasischen Patienten	als Positivkontrolle im Invasionsassay verwendet, wachsen mit $25 \times 10^6$ Zellen/cm <sup>2</sup> als Monolayer adhärent

**Tabelle 2:** Charakteristik der verwendeten Zelllinien

Mehrere Ovarialkarzinomzelllinien wurden in den Vorversuchen verwendet (EFO 21, COLO 704 und OVCAR 3). Die EFO 27- Zelllinie erwies sich aufgrund ihrer Migrations- und Invasionseigenschaften als am besten für die nachfolgenden Experimente geeignet.

Zelllinie	Medium
EFO 27	80 % RPMI 1640, 20 % fetales Kälberserum (FKS) und 2 mM Glutamin
HT 1080	90 % Dulbecco's MEM und 10 % FKS
EFO 21	80 % RPMI 1640, 20 % FKS und 2 mM Glutamin
COLO 704	90 % RPMI 1640 und 10 % FKS
OVCAR 3	80 % RPMI 1640, 20 % FKS und 2 mM Glutamin

**Tabelle 3:** Charakteristik der Wachstumsbedingungen der verwendeten Zelllinien

Die Zellen wuchsen in belüfteten Kulturflaschen (Falcon, Fisher Scientific, #5001, 600 ml/ 150 cm<sup>2</sup>, Nidderau, Deutschland oder Biochrom KG Seromed, #P90151, 690 ml/ 150 cm<sup>2</sup>, Berlin, Deutschland), bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>- Atmosphäre.

Die Generationszeit lag zwischen 2 und 4 Tagen, wonach die Zellen mit Trypsin EDTA 0,5 % geerntet und umgesetzt wurden (Medienzusammensetzung s. Tab. 3). Beim Einkauf waren die Zellen in der 53.- 57. Passage. Nach Kultivierung von mindestens 3 bis 4 Generationen wurden die Zellen für die Versuche eingesetzt (61.- 81. Passage). Langfristig gelagert wurden die Zellen unter Zusatz von DMSO (10 %) in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Für die einzelnen Assays wurden Zellzählungen nach Trypanblaufärbung (1: 10 verdünnt) in einer Neubauer- Zählkammer durchgeführt. Ausgezählt wurden vier Großquadrate, bestehend aus je 16 Kleinquadraten. Der Mittelwert der vier Quadrate wurde gebildet und mit  $2 \times 10^4$  multipliziert. Dies ergab die Zellzahl pro ml.

### **3.1.2 Geräte**

#### a) sterile Werkbank:

GELAIRE Flow Laboratories (Modell Nr. BS 3-4-6, Baujahr 1988, Hersteller: Gruppo Flow s.p.a, Via lambro 23/25, 20090 Opera (MI), Italien).

Es handelt sich um eine Reinraumwerkbank der Klasse 2 mit „laminar flow“-Technik (Lindl T. und Bauer J., 1994; Freshney R.I., 1994).

#### b) Brutschrank:

Heraeus 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland

Die Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter einer 5 %igen  $\text{CO}_2$ -Begasung kultiviert, es bestand die Möglichkeit der Regulation des  $\text{O}_2$ - Gehaltes. Der Brutschrank wurde nicht bewässert, wobei die gegenüber gebräuchlicheren Methoden verringerte Luftfeuchtigkeit keine negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum hatte.

Für bestimmte Verfahren stand ein unbegaster und unbewässerter Brutschrank (BW 50 770353, Memmert, Bad Schwalbach, Deutschland) mit  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  zur Verfügung.

#### c) Zentrifuge: Labofuge GL, Heraeus Sepatech (Heraeus, Hanau, Deutschland)

- d) ELISA-Reader: MR 5000 (Dynatech, Guyanocourt, Frankreich)
- e) Platten-Rüttler: DPC Milenia Micromix 4, ADC (Modell Nr. 602002, Gwynedd, Großbritannien)

### 3.1.3 Chemikalien, Substrate

- a) Zellkulturmedien:
- RPMI 1640 Medium (GIBCO BRL, #31870025, Karlsruhe, Deutschland)
  - Dulbecco's Minimum Essential Medium (SIGMA, #D 6046, Deisenhofen, Deutschland).
- b) fetales Kälberserum (Fetales Bovines Serum, USDA, hitzeinaktiviert, SO 215, Biochrom KG seromed, Berlin, Deutschland)
- c) L-Glutamin 200 mMol (SIGMA, #G 7513, Deisenhofen, Deutschland)
- d) DMSO Cell Culture Freezing Medium (GIBCO BRL, #11101-011, Karlsruhe, Deutschland)
- e) Phosphat Buffered Saline, 7.4 (GIBCO BRL, #10010-015, Karlsruhe, Deutschland).
- f) Trypsin EDTA Solution 0,5 % (GIBCO BRL, #25300062, Karlsruhe, Deutschland)
- g) Testsubstanzen:
- Prostaglandin E<sub>2</sub> (SIGMA, #P 5640, Deisenhofen, Deutschland): Dihydroxy-9-oxoprostano-5,13-dienoic acid
  - Prostaglandin F<sub>2alpha</sub> (Dinoprost) (Minprostin F<sub>2alpha</sub>, Amp., #03026608004, Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland)
  - Prostaglandin F<sub>2alpha</sub> (SIGMA, #P 0424, Deisenhofen, Deutschland): 15-Trihydroxyprosta-5,13-dienoic acid.
  - Choriongonadotropin, human (Predalon 5000 I.E., Amp., Organon GmbH, Oberschleißheim bei München, Deutschland)
  - Choriongonadotropin, human, rekombinant (SIGMA, #C 6322, Deisenhofen, Deutschland)
  - Proteinkinase A Inhibitor (PKAI) (Calbiochem, #116805, Schwalbach, Deutschland): kompetitiver Antagonist der Proteinkinase A

- Proteinkinase C Inhibitor (PKCI) (Calbiochem, #05-23-4904, Schwalbach, Deutschland): Inhibitor der Proteinkinase C
- Forskolin (SIGMA, #F 6886, Deisenhofen, Deutschland): aus *Coleus forskohlii*. cAMP-Agonist (Huang R., et al., 1982).
- N<sup>6</sup>,2'-O-Dibutyryladenosine 3':5'-Cyklisches Monophosphat (Bucladesine, db-cAMP) (SIGMA, #D 0627, Deisenhofen, Deutschland): membrangängiges cAMP-Analogon, aktiviert cAMP-abhängige Proteinkinasen
- Guanosine 2':3'-Cyklisches Monophosphat (cGMP) (SIGMA, #G 8129, Deisenhofen, Deutschland)

## 3.2 *Untersuchungsmethoden*

### 3.2.1 *hCG/LH-Rezeptornachweis*

Für den hCG/LH-Rezeptor-Nachweis wurden die EFO 27 per Zytospin auf Objektträgern fixiert. Vorher wurden sie, konfluent in je 2 x 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen pro Testsubstanz, über Nacht in ihrem unveränderten Zellkulturmedium mit 50 und 50000 mIU/ml hCG sowie als Kontrollgruppe unstimuliert inkubiert.

Am nachfolgenden Tag wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und in einer Konzentration von  $\sim 1 \times 10^7$  Zellen/ml innerhalb von 8 min bei 1300 U/min in der Zytospin (Shandon, Frankfurt, Deutschland) auf mit Eiweißglyzerin beschichtete Objektträger aufgetragen. Die Proben wurden anschließend fixiert (Merckofix, Merck, # 1.03981, Darmstadt, Deutschland) und mit 2- Loch-Filter (Schleicher und Schuell, # 2589, Dassel, Deutschland) getrocknet.

Die Immunzytochemie wurde mittels der Avidin- Biotin- Komplex- (ABC) Methode durchgeführt. Diese zählt zu den indirekten Nachweismethoden, d.h. dass zwei Sekundärantikörper gegen den zu untersuchenden Primärantikörper gerichtet sind, was die Sensitivität des Verfahrens erhöht. Diese Methode beruht auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin, welche über  $10^6$ - fach höher ist als normale Antigen- Antikörper- Verbindungen. Avidin ist ein Protein mit vier Bindungsstellen für das niedermolekulare Vitamin Biotin. Dieses kann seinerseits an grössere Moleküle, wie z.B. Enzyme oder Antikörper, gekoppelt werden. Dabei



wirkt Avidin als Brücke zwischen den peroxidasemarkierten Biotinmolekülen, welche sich mit ihren freien Bindungsstellen an die Avidinmoleküle anlagern; diese doppelseitige Komplexbildung führt zu einer starken Farbintensität in der Auswertung. Das Verfahren läuft in 3 Inkubationsschritten ab:

1. Primärantikörper
2. biotinylierter Sekundärantikörper
3. Avidin- Biotin- Peroxidase- Komplex

Die Zellen auf den Objektträgern wurde zunächst für 5 Minuten in Tris Buffered Saline (TBS)-Puffer gewaschen (Pufferzusammensetzung s. Tab. 4). Danach folgte eine 30- minütige Inkubation in Methanol/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Raumtemperatur. Sie dient der Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität. Es folgten drei Spülungen à 5 Minuten mit TBS- Puffer, anschließend wurden die Objektträger abgetrocknet und in eine feuchte Kammer gelegt.

Als nächster Schritt wurde der Blockpuffer auf die Präparate aufgetragen und nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden mit Hilfe einer Vakuumpumpe die Reste entfernt. Hierdurch wurde die Absorption unspezifisch reagierender Gruppen erreicht.

Über Nacht folgte die Inkubation mit dem in 20 %igem Schweineserum 1: 500 verdünnten Primärantikörper gegen den polyklonalen hCG/LH-Rezeptor (Reshef E., et al., 1990, Toth P., et al., 1994).

In den Kontrollgruppen wurde der Rezeptorantikörper vorab mit Rezeptorpeptiden in Kontakt gebracht, bzw. ungebundene Rezeptorantikörper durch unspezifische IgG ersetzt. Die optimale Verdünnung der Primärantikörper wurde im Rahmen von Vorversuchen ermittelt.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde durch dreimalige Spülung mit TBS- Puffer beendet. Anschließend wurden die Zellen mit einem biotinyliertem Sekundärantikörper (Amersham, Anti- mouse Ig, biotinylierter spezien- spezifischer Antikörper (vom Schaf), USA), Konzentration 1: 200 in 20 %igem Schweineserum, für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Spülen mit TBS- Puffer folgte die Inkubation mit dem Avidin- Biotin- Peroxidase- Komplex (Vector Laboratories, Vectastain Elite Kit, #PK-6100, Burlingame, California, USA) für 30 min.

Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit TBS- Puffer gespült bevor die Entwicklerlösung (Vector Laboratories, Vector Vip Substrate, #SK-4600, oder Vector DAB Substrate Kit, #SK-

4100, Burlingame, California, USA) aufgetragen wurde. Die Inkubationszeit betrug 8 min. Hiernach wurde für 5 min mit Leitungswasser gespült und 30 sek. mit Hämalaun (Vector Laboratories, Vector Hematoxylin, #H-3401, Burlingame, California, USA) gegengefärbt. Zuletzt wurden die Präparate mit Kaiser's Glyzeringelantine (Merck, #640110658, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Um unspezifische Färbungen auszuschließen, beinhaltete jeder immunhistologische Färbegang eine Negativkontrolle. Dazu diente jeweils ein Präparat, auf dem statt des Primärantikörpers der Blockpuffer belassen wurde. Der Rezeptornachweis wurde mit den in Gießen angefertigten Objektträgern von Prof. Dr. C.V. Rao, Laboratory of Molecular and Reproductive Biology and Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Louisville, Kentucky, USA durchgeführt.

Tris Buffered Saline (TBS)- Puffer	pH 7,4, Stammlösung: 56 g Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland), 218,25 g Natriumchlorid z.A. (Merck, Darmstadt, Deutschland) ad 2500 ml Aqua dest., Gebrauchslösung: 1: 10 mit Aqua dest. verdünnen)
Methanol/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % (Merck, # 108597, Darmstadt, Deutschland) in 157 ml Methanol

Blockpuffer	20 %iges Schweineserum (PAA Laboratories GmbH, #B11-130, Linz, Österreich), 0,05 M D-Mannose (Serva, #28460, Heidelberg, Deutschland), 0,025 M D-Biotin (Sigma, #B-4501, Deisenhofen, Deutschland) und 0,025 M Avidin (Sigma, #A-9275, Deisenhofen, Deutschland)
-------------	--

**Tabelle 4:** Spezielle Lösungen für den hCG/LH-Rezeptornachweis

### 3.2.2 Proliferationsassay

Eine Möglichkeit, die Proliferation zu untersuchen, besteht in der Fähigkeit ausschließlich lebender Zellen, Tetrazoliumsalze, wie 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT), Natrium-3'-(1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium)-Bis(4-Methoxy-6-Nitro)-Benzen-sulfonsäurehydrat (XTT) oder eben auch 4-(3-(4-Jodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate (WST-1), so umzusetzen, dass man dies für ein kolorimetrisches nicht-radioaktives Assay nutzen kann.

Tetrazoliumsalze werden von mitochondrialen Enzymen der Atmungskette zu Formazan gespalten. Eine Zunahme der Zellzahl spiegelt sich in einem Aktivitätsanstieg der mitochondrialen Dehydrogenasen wieder, so dass eine Zunahme der Formazan-Färbung proportional der Zunahme der Zellzahl zu sehen ist. Diese durch das Formazan bedingte Färbung kann durch ein Multiwell-Spektrophotometer als Absorption gemessen werden.

#### a) Aufbau

Die Zellen wurden in einer Platte kultiviert, dort mit der Testsubstanz inkubiert und mit dem WST-1-Reagenz versetzt, wonach die Messung im ELISA-reader erfolgen konnte.

#### b) Vorbereitung

Es wurde eine Zellsuspension hergestellt, deren Zellzahl  $5 \times 10^5$ /ml betrug.

### c) **Durchführung**

Zur Durchführung des Versuchs wurden die Zellen in einer 96- Loch- Platte (96- Loch- Mikrotiterplatte, runder Boden, NUNCLON Surface, NUNC, #163320, NUNC A/S, Roskilde, Dänemark) gezüchtet.

Dazu wurde in jedes Loch 100  $\mu$ l der vorbereiteten Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen, Herstellerempfehlung  $0,1- 5 \times 10^4$  Zellen/ml ) gegeben und 10  $\mu$ l der Testsubstanz hinzugefügt.

Es wurden Kontrollwerte erhoben, dadurch, dass sich in mindestens 2 Löchern ausschließlich Zellsuspension ohne Testsubstanz befand und von den eingesetzten Konzentrationen jeweils Doppelansätze durchgeführt wurden. Als Leerwert waren 2 Löcher definiert, die ausschließlich Zellkulturmedium enthielten, um die Eigenfärbung des Mediums als Fehlerquelle auszuschließen.

Nach einer Inkubationszeit von 24- 48 h wurde die Messung durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 10  $\mu$ l WST-1 (Boehringer Mannheim, #1644807, Mannheim, Deutschland) für 30 Minuten bis 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Messung erfolgte alle 30 Minuten bei 420 nm auf einem ELISA- Plattenlesegerät mit einer Referenzwellenlänge von 600 nm.

### d) **Auswertung**

Zur Auswertung wurde der Messzeitpunkt nach 2 Stunden herangezogen, der sich durch maximale WST- Umsetzung im messbaren Bereich auszeichnete.

Die Mehrfachbestimmungen (3fach) wurden gemittelt und mit den Ergebnissen der unstimulierten Zellen verglichen.

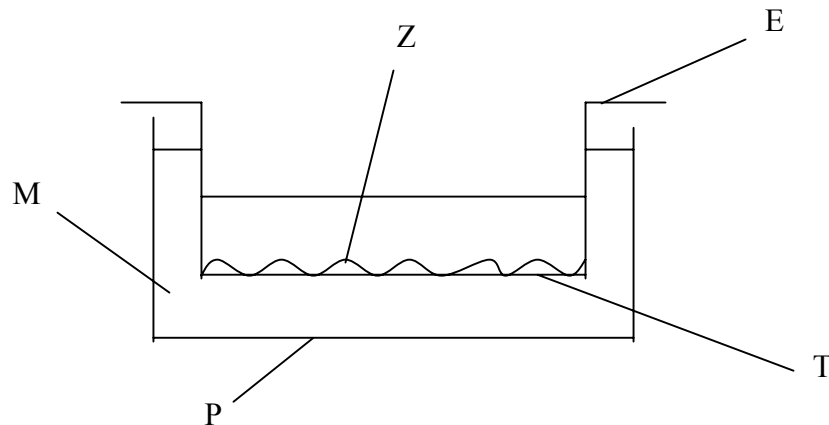
### **3.2.3 Migrationsassay**

Es geht bei diesem Assay darum, die Migration der Zellen zu erfassen.

#### a) **Aufbau**

Die Einsätze (Biocoat Kontroll- Zellkultureinsatz, 24- Loch, Becton Dickinson Labware, #40578, Bedford, MA, USA) sind nicht beschichtet, um auf diese Art und Weise ausschließlich die Migrationsfähigkeit der Zellen von Ober- zu Unterseite zu beurteilen. Sie stellen eine

Modifikation der Boyden- Kammern dar (Abb. 7) und sind mit Transwellfiltern ausgestattet (Durchmesser der Membranöffnungen: 8  $\mu\text{m}$ , Membranfläche: 0,31  $\text{cm}^2$ ).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung eines Assayeinsatzes (modifizierte Boyden-Kammer). P: 24-Loch-Platte. E: Einsatz mit Filter. M: Zellkulturmedium. Z: Zellsuspension im Einsatz. T: Transwellfilter (hier unbeschichtet, im Invasionsassay (s.u.) mit Matrigel beschichtet).

## b) Vorbereitung

Es wurde eine Zellsuspension hergestellt, deren Zellzahl  $5 \times 10^5/\text{ml}$  betrug.

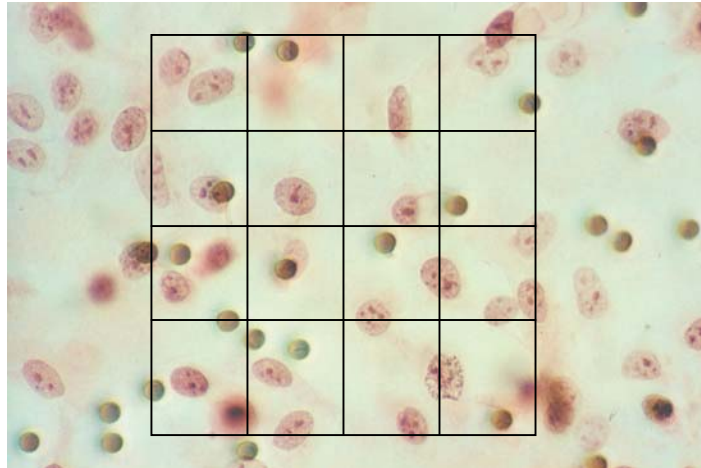
## c) Durchführung

750  $\mu\text{l}$  warmes Medium wurde in die untere Kammer gegeben. Die obere Kammer erhielt 500  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension und zusätzlich 50  $\mu\text{l}$  der Testsubstanz. Die gesamte Platte kam für 72 h in den begasten Brutschrank zur Inkubation (Repeh L.A., et al., 1989).

Um die Ergebnisse auswerten zu können, wurden die Transwellfilter mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Zuerst wurden die Zellen 10 min in eisgekühltem Methanol an den Filtern fixiert, anschließend die oben auf der Membran befindlichen Zellen mit einem Wattetupfer zweifach abgewischt, davon einmal mit PBS. So wird gewährleistet, dass nur die Zellen ausgewertet werden, die durch die Membran gewachsen sind. Im Anschluss an die Fixierung spülten wir die Einsätze mit PBS. Es folgte die Färbung mit Hämatoxylin. Nach einer Spülung wurden die Einsätze mit Eosin gegengefärbt, anschließend zur Fixierung durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt. Abschließend wurden die Einsätze in Xylol gegeben.

Vor dem Eindecken mussten die Transwellfilter von den Einsätzen gelöst werden, was mit einem Skalpell geschah. Zum Eindecken wurde Corbit- Balsam verwendet.

#### d) Auswertung



**Abbildung 8:** Objektträger mit gefärbtem Einsatz, auf dem 8 Sichtfelder bei 400facher Vergrößerung ausgezählt werden, um so den Mittelwert pro Einsatz zu ermitteln.

Die Auszählung erfolgte bei 400 x Vergrößerung, wobei acht Felder ausgezählt wurden (Abb. 8). Daraus wurde der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der fünf Einsätze mit der gleichen Konzentration wurden wiederum gemittelt und dieser Wert in einem Diagramm graphisch dargestellt. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

#### 3.2.4 Invasionsassay

Matrigel stellt eine Rekonstruktion der Basalmembran dar. Diese künstliche Basalmembran wird aus dem Engelbrecht- Holm- Swarm- (EHS) Mäusetumor gewonnen. Die Hauptbestandteile der Membran sind Laminin, Kollagen Typ IV, Entacin und Heparansulfatproteoglykan (HSPG). Darüber hinaus enthält sie TGF- $\beta$ , Fibroblastenwachstumsfaktor, Gewebsplasminogenaktivator (tPA), weitere Wachstumsfaktoren, Matrixmetalloproteinasen (MMP, Kollagenasen) und andere Proteinasen, wie Plasminogen- Aktivatoren (PAs). Matrigel Basalmembranmatrix bietet die Möglichkeit, die Invasion verschiedener Tumorzellen zu untersuchen (Albini A., et al., 1987, Hendrix M.J.C., et al., 1987, Welch D.R., et al., 1989, Jacob K., et al., 1995).

Das Invasionsassay erfolgte analog zum Migrationsassay (s.o.). Die fertig beschichteten Einsätze (Biocoat Matrigel Invasion chamber, 24- Loch, Becton Dickinson Labware, #40480, Bedford,

MA) sind kommerziell erhältlich. Sie verfügen über die gleiche Größe, Membrandicke, Porengröße und -anzahl wie die Kontrolleinsätze. D.h. die Anzahl der Einsätze, Zeitpunkt, Zellsuspension, Testsubstanz, Inkubationsort und Auswertung waren identisch. Die Fibrosarkomzelllinie HT 1080 wurde bei den Invasionsassays als Positivkontrolle mitgeführt. Eine weitere Vorversuchsreihe war notwendig, um die beste Zellkonzentration zu ermitteln und durch Zeitreihen die Inkubationszeiten zu optimieren.

Im Rahmen der Vorbereitung wurden die Einsätze mit 250 µl warmem Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für etwa 1,5-2 h vorinkubiert, um die Extrazellulärmatrix zu rehydrieren. Das zur Vorinkubation verwendete Medium wurde vor dem eigentlichen Versuchsansatz abpipettiert.

Abschließend muss die schlechte Qualität der Matrigel-beschichteten Einsätze erwähnt werden, die uns eine zuverlässige Auswertung dieser Teilergebnisse erschwerte.

### 3.2.5 Enzym-Immuno-Assays zur Messung der MMP

	<b>MMP-1</b>	<b>MMP-2</b>	<b>MMP-9</b>	<b>TIMP-1</b>
<b>Assay</b>	Biotrak human ELISA, Amersham International, #RPN 2610, Little Chalfont, England	Biotrak human ELISA, Amersham International, #RPN 2617, Little Chalfont, England	Biotrak human ELISA, Amersham International, #RPN 2614, Little Chalfont, England	Biotrak human ELISA, Amersham International, #RPN 2612, Little Chalfont, England
<b>Standard- Konzentrationen</b>	100, 50, 25, 12,5, 6,25 ng/ml	24, 12, 6, 3, 1,5 ng/ml	32, 16, 8, 4, 2,1 ng/ml	50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 ng/ml
<b>Sensitivität</b>	1,7 ng/ml	0,37 ng/ml	0,6 ng/ml	1,25 ng/ml
<b>Inkubations- zeiten</b>	Antikörper 2 h, Antiserum 2 h, Peroxidase 1 h, TMB 30 min	Antikörper 2 h, Peroxidase 1 h, TMP 30 min	Antikörper 1 h, Peroxidase 2 h, TMB 20 min	Antikörper 2 h, Peroxidase 2 h, TMB 30 min
<b>Intra- Assay- Variabilität</b>	5,5-7,9 %	5,3-6,3 %	4,92-5,5 %	8,9-11,4 %
<b>Besonderheiten</b>	anti- MMP-1- Antikörper mit weiterem Antikörper konjugiert, zusätzlicher Inkubationsschritt			

**Tabelle 6:** Ablauf und Merkmale der durchgeführten Enzym-Immuno-Assays.



Da sich die hier durchgeführten Assays in Aufbau und Durchführung weitgehend gleichen, wird zunächst der grundsätzliche Versuchsaufbau dargestellt. Unterschiede ergeben sich in einer leicht veränderten Zusammensetzung der verwendeten Puffer und ihrer Anwendung zur Verdünnung der verschiedenen Reagenzien, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll und in leichten Veränderungen des Versuchsaufbaus (Tab. 6).

Für alle oben genannten Enzym- Immuno- Assays wurde das Untersuchungsmaterial folgendermaßen gewonnen: Eine 6- Loch- Platte wurde mit je  $1 \times 10^6$ /ml Zellen in 2 ml serumfreiem Zellkulturmedium für 24 h mit 50  $\mu$ l der Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und bis zur Durchführung der unten beschriebenen Versuche bei  $-20$  °C tiefgefroren.

#### a) **Aufbau**

Die Assays basieren auf einem zweiseitigen ELISA- Sandwich- Format.

Die Standards und Proben werden in 96- Loch- Mikrotiterplatten inkubiert, welche mit anti-MMP, bzw. TIMP- Antikörper beschichtet sind. Dadurch wird sämtliches in der Probe befindliche MMP/ TIMP am Boden der Platte gebunden. Alle anderen Probenbestandteile werden aus der Platte gewaschen.

Die so an der Platte haftenden MMP/ TIMP werden mit Hilfe eines Fab- anti- MMP/ TIMP- Sekundärantikörpers gebunden, welcher mit einer Peroxidase markiert ist. Die Menge dieser in jedem Plattenloch gebundenen Peroxidase wird nach Herauswaschen aller Überstände durch die Zugabe eines TMB- Substrates (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin- Hydrogen- Peroxid in 20 % Dimethylformamid) festgestellt.

Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Säure- Lösung gestoppt und die resultierende Färbung bei 450 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Zur Einordnung der Messwerte dient der Vergleich mit einer Standardkurve.

## b) Vorbereitung

Alle Reagenzien, die bis zum Gebrauch bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden, mussten Raumtemperatur erlangen, wobei die Assay- Puffer (Zusammensetzung s.Tab. 5) über Nacht im Kühlschrank aufgetaut wurden. Assay- Puffer 1 wurde z.B. zur Verdünnung der Peroxidase verwendet, während Assay- Puffer 2 z.B. zur Verdünnung des Standards und des Antiserums gebraucht wurde. Beide Assay- Puffer und der Waschpuffer wurden mit destilliertem Wasser verdünnt. Das TMB- Substrat setzte sich wie oben beschrieben zusammen.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Assay- Puffer 1	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5, 0,9 % NaCl, 0,1 % Rinder- Serum- Albumin, 0,1 % Tween™ 20
Assay- Puffer 2	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5, 0,9 % NaCl, 0,1 % Rinder- Serum- Albumin
Waschpuffer	0,0067 M Phosphat- Puffer, pH 7,5, 0,033 % Tween™ 20

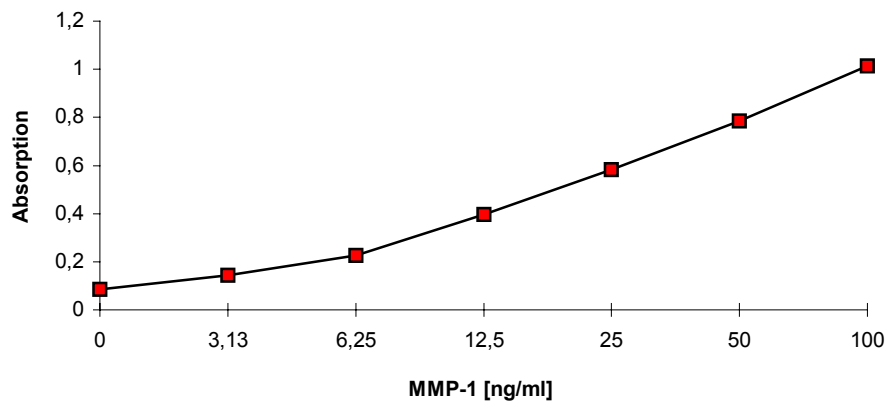
*Table 5: Beispielhafte Zusammensetzung spezieller Puffer für die MMP- Assays.*

## c) Durchführung

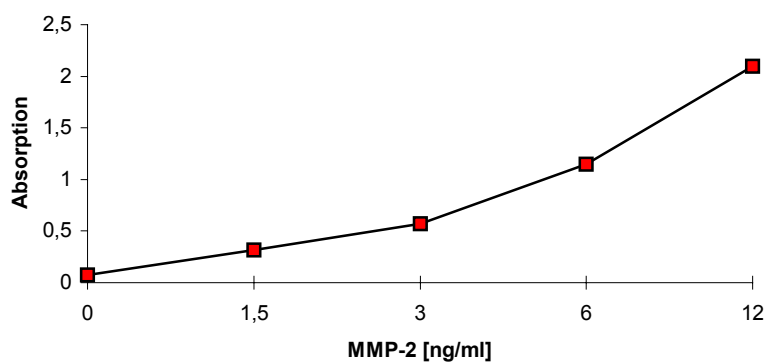
Das Beschicken der Mikrotiterplatte erfolgte zur Doppelbestimmung mit jeweils  $2 \times 100\ \mu\text{l}$  Probe, wobei mit dem Assay- Puffer begonnen wurde, an den sich in aufsteigender Konzentration der Standard anschloss. Die restlichen Löcher konnten mit Probe bestückt werden. In der ersten Inkubationszeit wurde die MMP/ TIMP aus der Probe an den Antikörper der Platte gebunden. Nach gründlichem Waschen der Platte erfolgte die Zugabe des Antiserums. Danach wurde unter gleichen Bedingungen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und die Peroxidase hinzugefügt. Es folgte Waschen, dann das TMB- Substrat. Hier wurde auf dem Platten- Rüttler inkubiert, 1 M Schwefelsäure dazugefügt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

## d) Auswertung

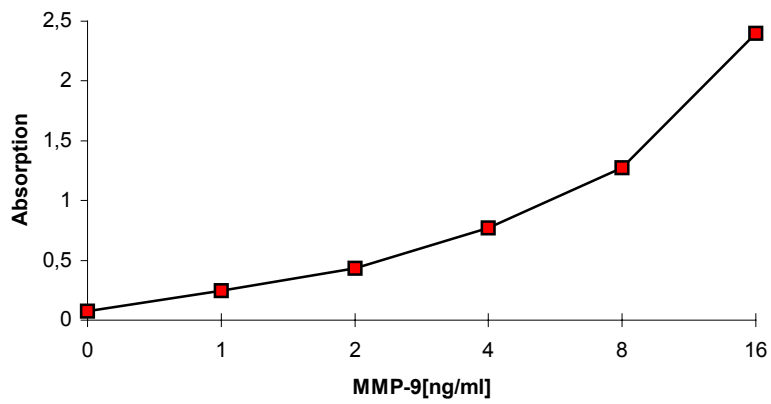
Zur Auswertung wurde aus den Doppelbestimmungen der jeweilige Mittelwert ermittelt. Die Standardkurve entstand durch Auftragung der Konzentration des Standards (x- Achse) gegen die mittlere optische Dichte (y- Achse). So konnten die Probenmesswerte anhand der Absorption einer MMP/ TIMP- Konzentration zugeordnet werden (Abb. 9-12).



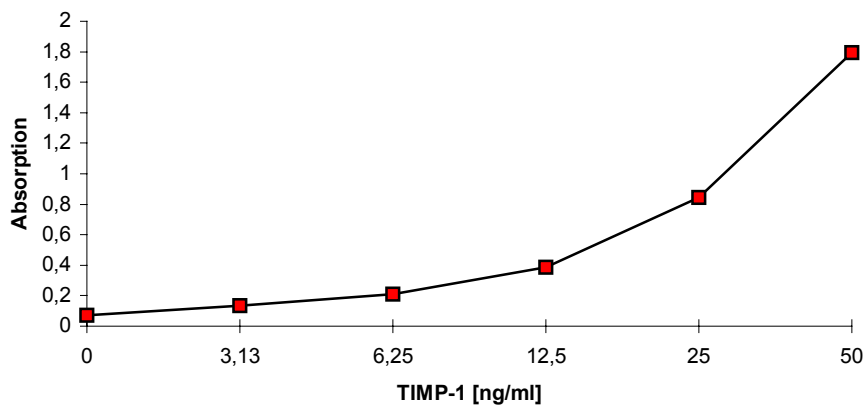
*Abbildung 9: Standardkurve MMP-1, Darstellung der Absorption in Abhängigkeit von der Konzentration*



*Abbildung 10: Standardkurve MMP-2, Darstellung der Absorption in Abhängigkeit von der Konzentration*



*Abbildung 11: Standardkurve MMP-9, Darstellung der Absorption in Abhängigkeit von der Konzentration*



*Abbildung 12: Standardkurve TIMP-1, Darstellung der Absorption in Abhängigkeit von der Konzentration*

### **3.2.6 Durchflusszytometrische Messung der Integrinexpression**

#### **a) Aufbau**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der man Zellen oder Partikel in einem Flüssigkeitsstrom einzeln messen kann, wenn sie einen Messpunkt passieren.

Die Konjugation von fluoreszierenden Farben an polyklonale und monoklonale Antikörper hat es ermöglicht, Dichte und Verteilung von Zelloberflächen- und zytoplasmatischen Determinanten, vor allem Proteinen, zu messen (Ormerod M.G., 1990; Melamed M.R. et al., 1990).

#### **b) Vorbereitungen**

Die Zellen wurden über Nacht mit den Testsubstanzen inkubiert.

Es wurden etwa  $1-2 \times 10^6$  Zellen in serumfreiem Medium in 6- Loch- Platten (Multiwell-Zellkulturplatten, 6- Loch, Falcon, #3046, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) pipettiert und mit 50  $\mu$ l Testsubstanz versetzt. Dabei wurden immer 3 Löcher mit der gleichen Konzentration Testsubstanz angesetzt und die gleiche Anzahl Löcher, bei denen die Zellen unstimuliert blieben. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert und dabei gepoolt, d.h. es wurden die 3 gleichen Löcher zusammengefasst. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (pH 7,4) resuspendiert. Es wurden jeweils 100  $\mu$ l der Zellsuspension in eine spezielle Mikrotiterplatte gebracht (96- Loch- Mikrotiterplatte, runder Boden, Falcon, #3911, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und in dieser zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Die freien Fc- Stücke wurden mit 20  $\mu$ l 1:5 verdünntem Octagam (IgG human, Octapharma, #7708386, Langenfeld, Deutschland) abgefangen. Dies sollte verhindern, dass FITC, welches man bei unkonjugierten Antikörpern hinzufügt, an diesen freien Fc- Fragmenten bindet. Stattdessen sollte es an den unkonjugierten Primärantikörper andocken. Anschließend begann die Inkubation mit den Antikörpern (Tab. 7).

<b>Antikörper</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Nachweis</b>
Anti- CD 45 (monoklonaler Maus anti-human- Antikörper, IgG1, DAKO, #F 0861)	reagiert mit Isoformen des Leukocyte Common Antigen (LCA), FITC-konjugiert	Negativ- Kontrolle
Anti- CD 49a (monoklonaler Maus anti-human-Antikörper, BIOZOL, #MA-49A0)	unkonjugiert	Alpha 1- Integrin
Anti- CD 49d (monoklonaler Maus anti-human-Antikörper, DAKO, #M 0605)	Adhäsion an VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), unkonjugiert	Alpha 4- Integrin
Anti- CD 49e (monoklonaler Maus anti-human-Antikörper, DAKO, #M 0604)	Fibronektin-vermittelte Adhäsion, unkonjugiert	Alpha 5-Integrin
Anti- CD 49f (monoklonaler Maus anti- human- Antikörper, BIOSOURCE, #AHS-4968)	Laminin-vermittelte Adhäsion, FITC- konjugiert	Alpha 6- Integrin
Anti-CD 51 (monoklonaler Maus anti- human- Antikörper, BIOSOURCE, #AHS-5101)	Vitronektin- vermittelte Adhäsion, unkonjugiert	Alpha v- Integrin
FITC oder Flourescein Isothiocyanat (Mausimmunglobulin, F(ab)2, DAKO, #F 0313)		Markierung primär unkonjugierter Antikörper

**Tabelle 7:** Bei der durchflusszytometrischen Messung verwendete Antikörper

Nach der Zugabe von 10 µl Antikörper, wurden die Zellen 30 min bei 4°C inkubiert.

Danach wurden sie 3mal mit PBS gewaschen, anschließend - wenn nötig (Tab. 7) - FITC (1:30 verdünnt mit PBS) als Sekundärantikörper dazugegeben. Es folgte eine 30 minütige Inkubation im Kühlschrank und die Zellen wurden 3mal mit PBS gewaschen. Abschließend wurden sie mit PBS resuspendiert und bis zur Analyse auf Eis gelagert.

### c) **Durchführung**

Ausgeführt wurde die Analyse mit einem fluoreszenzabsorbierenden Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) im Infektionslabor der Medizinischen Klinik (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. W. Seeger) der Universität Gießen, Leiter Prof. Dr. J. Lohmeyer. Durchführung und Auswertung der Analysen durch Frau R. Maus.

Als Negativ- Kontrolle wurde CD 45, ein Leukozytenmarker, gewählt, als Positivkontrolle CD 49f.

### d) **Auswertung**

Die Aufnahme der optischen Daten eines Partikels in der Durchflusszytometrie wird getriggert durch Erreichen einer bestimmten Schwellenfluoreszenz. Diese elektronische Vorselektion (Gating) wird normalerweise dazu genutzt, unspezifisch gefärbte Partikel von der Datenerhebung auszuschließen. In diesem Fall wurde durch Ausschluss der Negativkontrolle ein bestimmter Bereich der gezählten Zellen zur Analyse ausgewählt, in dem sich alle Zellen befanden, deren Fluoreszenz auf den gebundenen Antikörper zurückzuführen war. Der Anteil dieser Zellen wurde in Prozent angegeben und traf eine Aussage darüber, inwieweit das Adhäsionsmolekül auf den Zellen vorhanden war. Anhand dieses Wertes konnten Aussagen über Veränderungen der Oberflächenmoleküle abhängig von der Stimulation getroffen werden. Außerdem wurde die gemessene Fluoreszenz als Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwerts angegeben.

### **3.2.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte in der Abteilung für Medizinische Statistik und Biomathematik des Hochschulrechenzentrum der Justus- Liebig- Universität Giessen (Leiter Prof. Dr. J. Dudeck).

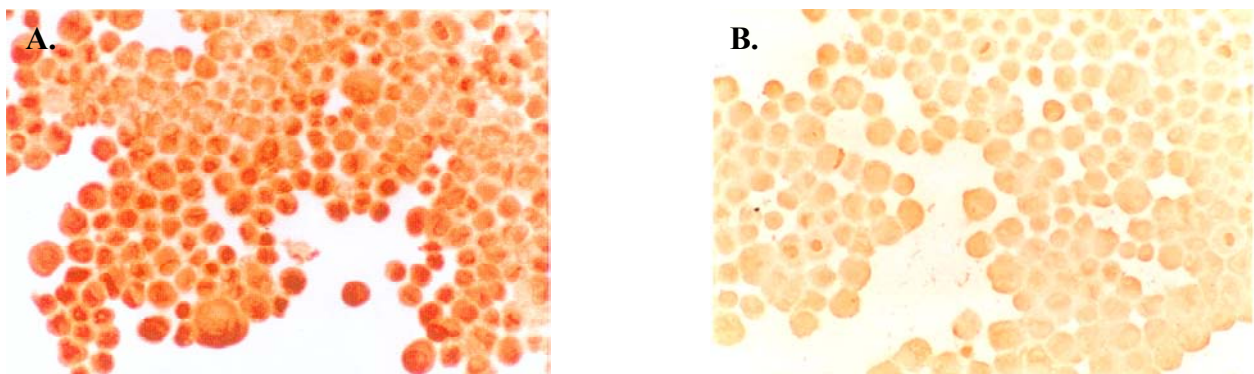
Es wurde eine mehrfache Varianzanalyse (ANOVA) und als post- Test der Dunnett- T- Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei 0,05 (= signifikant), bzw. 0,001 (= hoch signifikant). Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

## 4 ERGEBNISSE

In einer Reihe von Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass sich die EFO 27- Zelllinie aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften am besten für die geplanten *in vitro* Untersuchungen eignete.

### 4.1 hCG/LH-Rezeptornachweis

Auf den unstimulierten EFO 27 Zellen wurde zunächst der hCG-Rezeptor nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zelllinie den hCG/LH-Rezeptor exprimiert. Der Rezeptornachweis wurde auf Protein-, als auch mRNA- Ebene mittels ABC-Immunhistochemiefärbung und rt-PCR erbracht (Abb. 13).



**Abbildung 13:** Nachweis des hCG-Rezeptors auf Ovarialkarzinomzellen. (A) hCG-Rezeptorpositive EFO 27 Zellen (B) EFO 27 Zellen, nativ, als Negativkontrolle.



## **4.2 Regulation der Proliferation des Ovarialkarzinoms *in vitro***

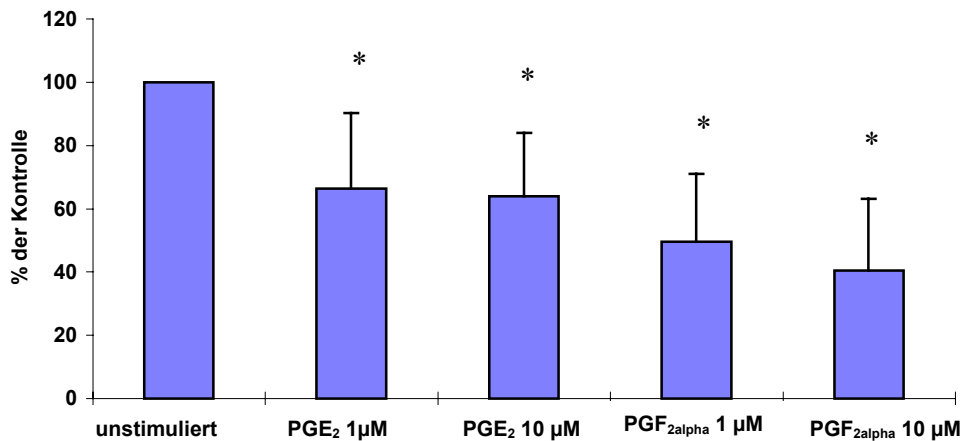
Im zweiten Teil wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf die Proliferation von EFO 27 Zellen *in vitro* untersucht.

### **4.2.1 Einfluss von hCG auf die Proliferation**

Behandlung der Zellen in ansteigenden, physiologischen Konzentrationen von hCG (0-500000 mIU/ml) führte nicht zum signifikanten Anstieg der Proliferation der untersuchten EFO 27 Zellen ( $p > 0,05$ ).

### **4.2.2 Einfluss von $PGE_2$ und $PGF_{2\alpha}$ auf die Proliferation**

Die Inkubation der EFO 27 Zellen sowohl mit  $PGE_2$  als auch  $PGF_{2\alpha}$  führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der Proliferation: unter Einfluss von  $PGE_2$  um 35 % (SD 20 %) der Kontrolle; bei  $PGF_{2\alpha}$  um 61 % (SD 22 %) der Kontrolle. Diese Effekte waren statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) (Abb. 14).

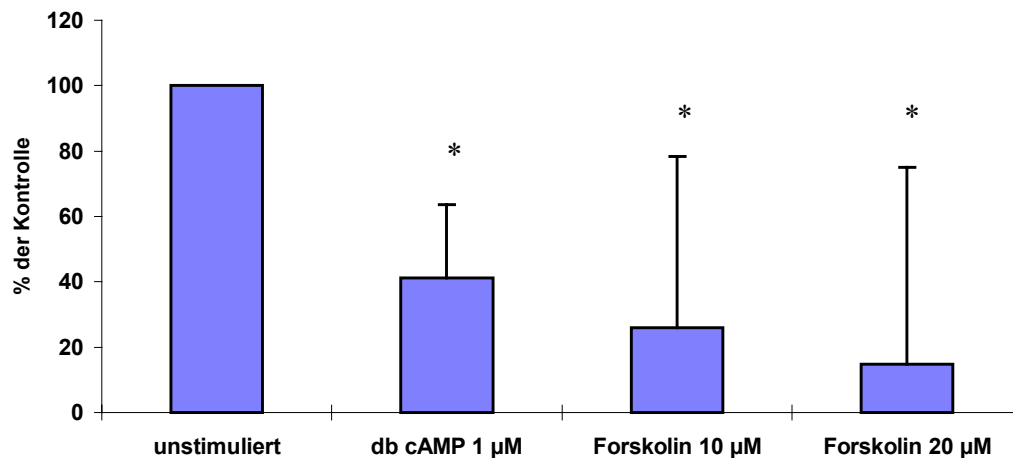


**Abbildung 14:** Wirkung von PGE<sub>2</sub> (0-10 µM) und PGF<sub>2alpha</sub> (0-10 µM) auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzelllinie EFO 27 bei dreimaliger Durchführung des Versuches; Bei PGE<sub>2</sub> Abnahme der Proliferation um 35 % (SD 20 %) der Kontrolle; PGF<sub>2alpha</sub> um 61 % (SD 22 %) der Kontrolle, (\* =  $p < 0,001$ ). Der Ausgangswert der unstimulierten Zellen wurde als 100 % definiert und die Ergebnisse durch Inkubation mit den Testsubstanzen als prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle angegeben.

#### 4.2.3 Einfluss der Signalübertragungsmoleküle auf die Proliferation

In den nachfolgenden Experimenten wurden die als Komponenten der Signaltransduktionskette der Prostaglandine und hCG geltenden dibutryl- cAMP (db cAMP), Forskolin (Aktivator der Adenylatzyklase) und cGMP untersucht.

Die Inkubation mit db cAMP hat einen Rückgang der Proliferation um knapp 59 % (SD 22 %) der Kontrolle zur Folge ( $p < 0,001$ ). Bei Forskolin fand sich eine dosisabhängige Proliferationshemmung von bis zu 85 % (SD 60 %) der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) (Abb. 15). Inkubation der Zellen mit cGMP (0-10 µM) hatte keine Veränderungen der Proliferation der EFO 27 Zellen zur Folge.



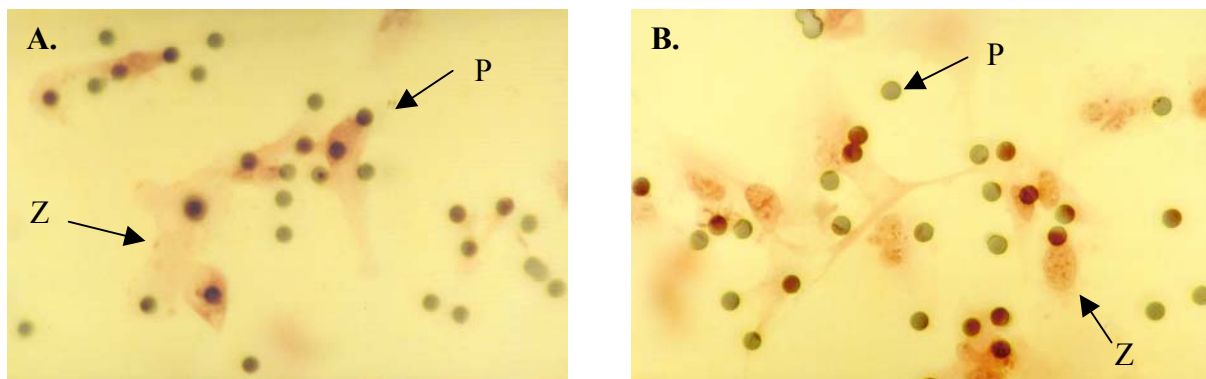
**Abbildung 15:** Wirkung von db cAMP (0-1 µM) und Forskolin (0-20 µM), einem Aktivator der Adenylatzyklase, auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzelllinie EFO 27 bei dreimaliger Durchführung des Versuches; dosisabhängiger Rückgang um 59 % (SD 22 %) bei db cAMP und 85 % (SD 60 %) bei Forskolin, (\* =  $p < 0,001$ ). Der Ausgangswert der unstimulierten Zellen wurde als 100 % definiert und die Ergebnisse durch Inkubation mit den Testsubstanzen als prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle angegeben.

### 4.3 Regulation der Migration und Invasion des Ovarialkarzinoms *in vitro*

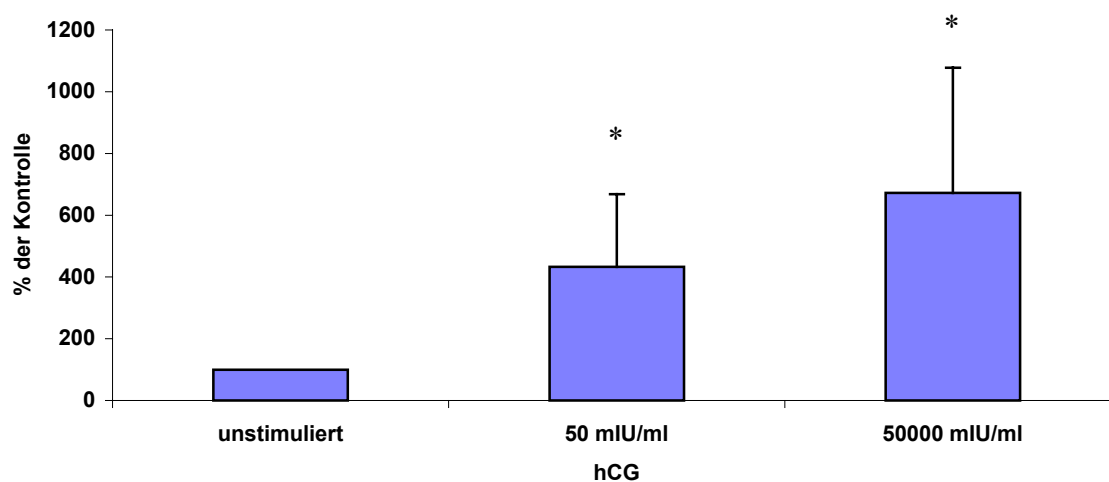
Im nachfolgenden Teil der Arbeit wurde das Verhalten der Ovarialkarzinomzelllinie in Bezug auf Migration und Invasion *in vitro* getestet.

#### 4.3.1 Einfluss von hCG auf die Migration

hCG (0-50000 mIU/ml) induzierte einen dosisabhängigen Anstieg der Zahl der durch die unbeschichteten 8 µm Filter migrierenden EFO 27 Zellen um bis zu 573 % (SD 405 %) der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) (Abb. 16 und 17).



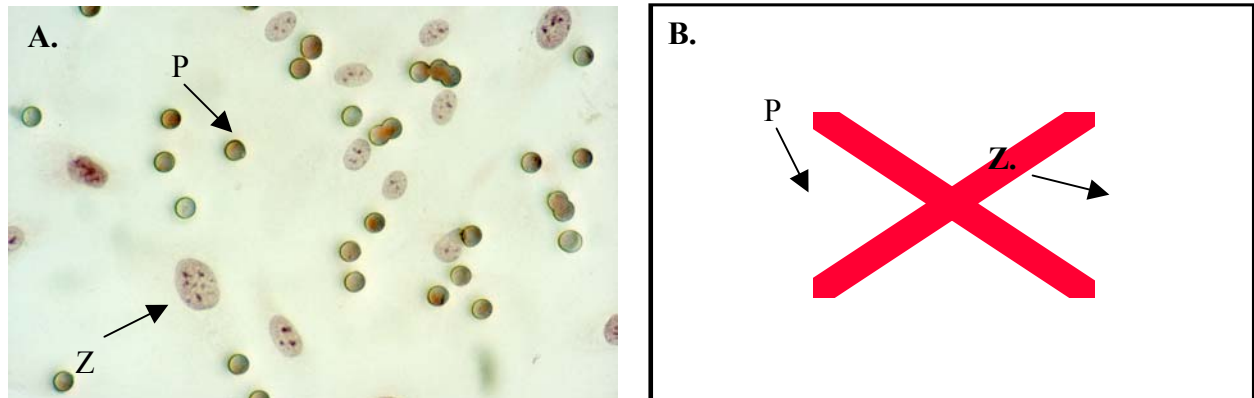
**Abbildung 16:** Repräsentatives Migrationsassay bei Inkubation mit hCG. (A) unstimulierte Zellen, (B) Inkubation mit hCG (50000 mIU/ml). Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Migration (P: Membranporen, Z: migrierte Zellen an der unteren Membranseite).



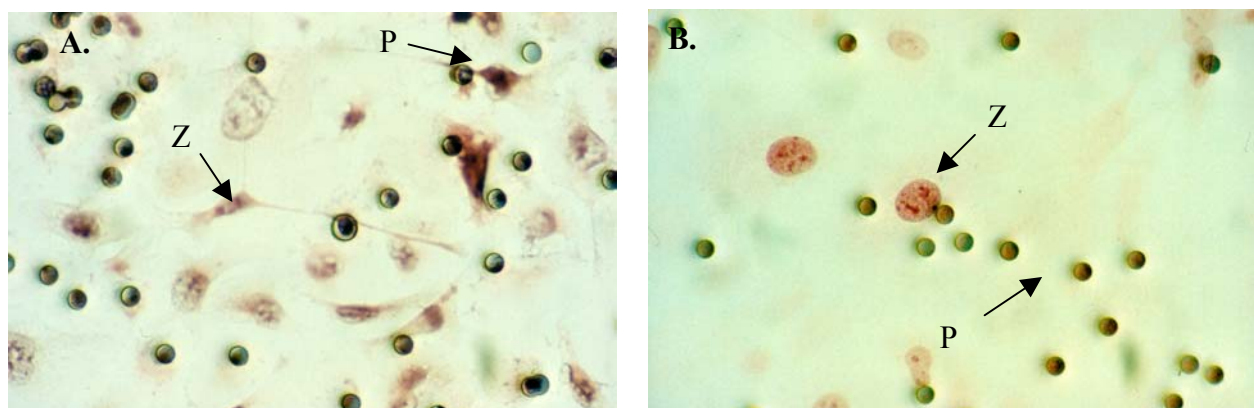
**Abbildung 17:** Wirkung von hCG auf die Migration der Ovarialkarzinomzelllinie EFO 27 bei dreimaliger Durchführung des Versuches; hCG führt zu einer deutlichen Zunahme um 573 % (SD 405 %) der Kontrolle, (\* =  $p < 0,001$ ). Der Ausgangswert der unstimulierten Zellen wurde als 100 % definiert und die Ergebnisse durch Inkubation mit den Testsubstanzen als prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle angegeben.

#### 4.3.2 Einfluss von $PGE_2$ und $PGF_{2\alpha}$ auf die Migration

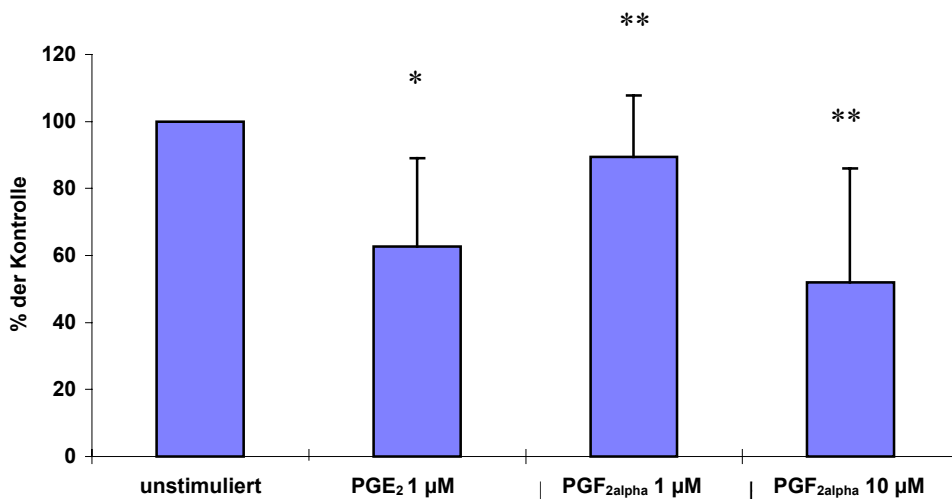
Die Migration nahm bei einer Prostaglandin  $E_2$ - Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  um 37 % (SD 26 %) der Kontrolle ab ( $p < 0,05$ ). Inkubation der Zellen mit  $PGF_{2\alpha}$  ( $0-10 \mu\text{M}$ ) hatte einen dosisabhängigen Abfall der Migration um 48 % (SD 34 %) der Kontrolle zur Folge ( $p < 0,001$ ) (Abb. 18, 19 und 20).



**Abbildung 18:** Repräsentatives Migrationsassay bei Inkubation mit  $PGE_2$ . (A) unstimuliert, (B) Einfluss von  $PGE_2$  ( $1 \mu\text{M}$ ). Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Migration (P: Membranporen, Z: migrierte Zellen an der unteren Membranseite).



**Abbildung 19:** Repräsentatives Migrationsassay bei Inkubation mit  $PGF_{2\alpha}$ . (A) unstimuliert, (B) Einfluss von  $PGF_{2\alpha}$  ( $10 \mu\text{M}$ ). Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Migration (P: Membranporen, Z: migrierte Zellen an der unteren Membranseite).

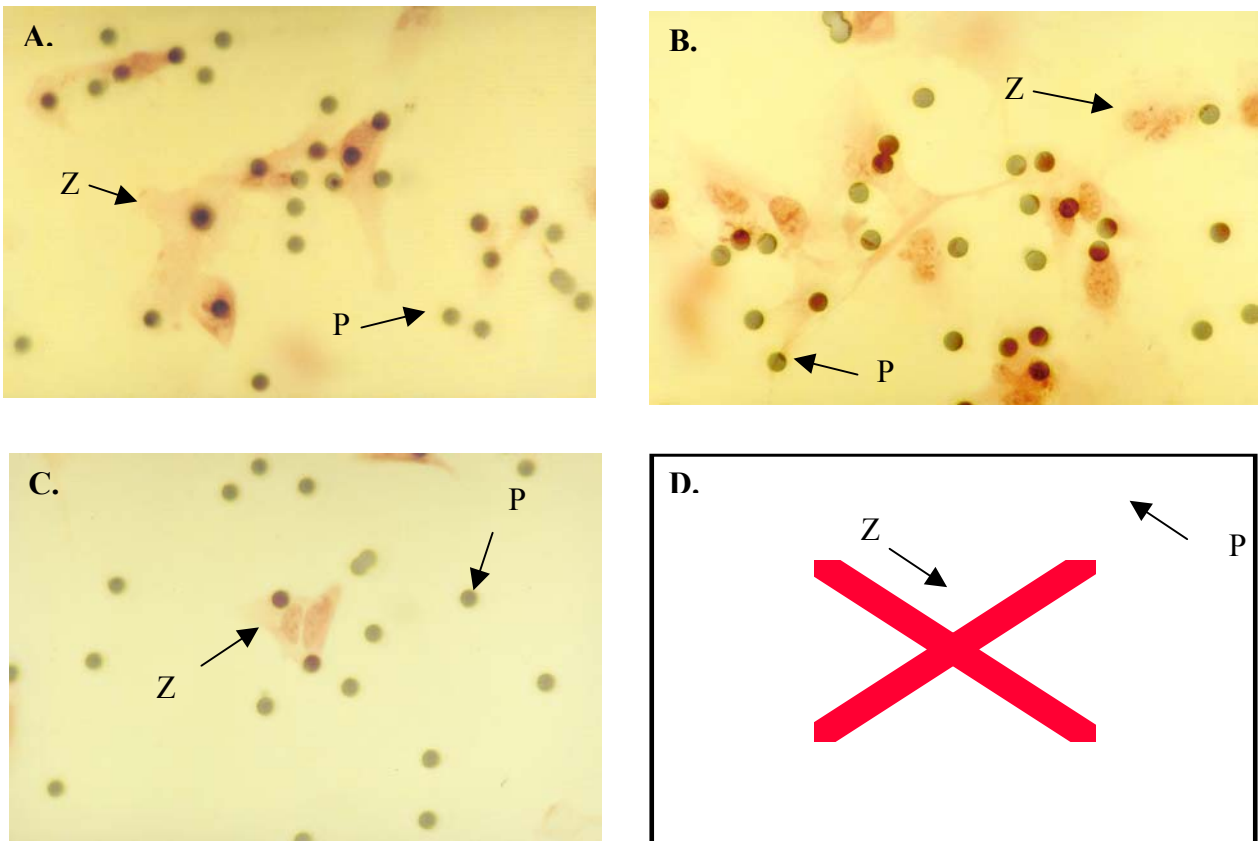


**Abbildung 20:** Wirkung von PGE<sub>2</sub> (0-1 µM) und PGF<sub>2alpha</sub> (0-10 µM) auf die Migration der Ovarialkarzinomzelllinie EFO 27 bei dreimaliger Durchführung des Versuches. Abfall der Migration um 37 % (SD 26 %) der Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Inkubation der Zellen mit PGF<sub>2alpha</sub> (0-10 µM) hatte einen dosisabhängigen Abfall der Migration um 48 % (SD 34%) der Kontrolle zur Folge, (\* =  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ). Der Ausgangswert der unstimulierten Zellen wurde als 100 % definiert und die Ergebnisse durch Inkubation mit den Testsubstanzen als prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle angegeben.

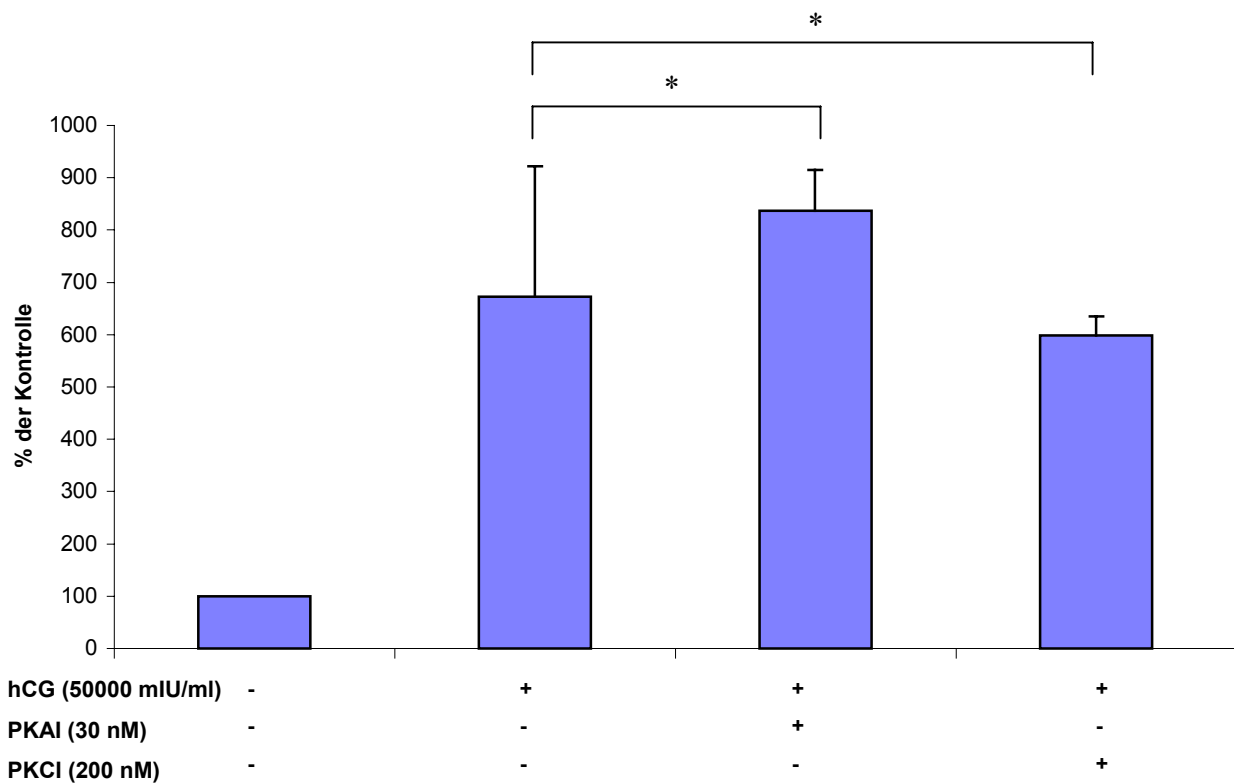
#### 4.3.3 Einfluss der Signalübertragungsmoleküle auf die Migration

Eine gleichzeitige Inkubation der EFO 27 Zellen mit hCG und Proteinkinase A- Inhibitor (PKAI, 30 nM) veränderte die Migration kaum (Zunahme um 24 % (SD 78 %)) im Vergleich mit der durch hCG allein induzierten Zunahme ( $p < 0,001$ ). Dagegen verringerte die Gabe von hCG und Proteinkinase C- Inhibitor (PKCI, 200 nM) die durch hCG- stimulierte Migration partiell um 11 % (SD 36 %) ( $p < 0,001$ ) (Abb. 21 und 22).

Eine Abnahme der Migration war die Folge einer Inkubation der EFO 27 Zellen mit db cAMP (0-10 µM). Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme um 54 % (SD 38 %) der Kontrolle ( $p < 0,001$ ). Die Migration nahm bei Inkubation mit Forskolin (0-20 µM) um etwa 91 % (SD 64 %) der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) ab. cGMP (0-10 µM) veränderte die Migration der EFO 27 Zellen nicht (Abb. 23 und 24).

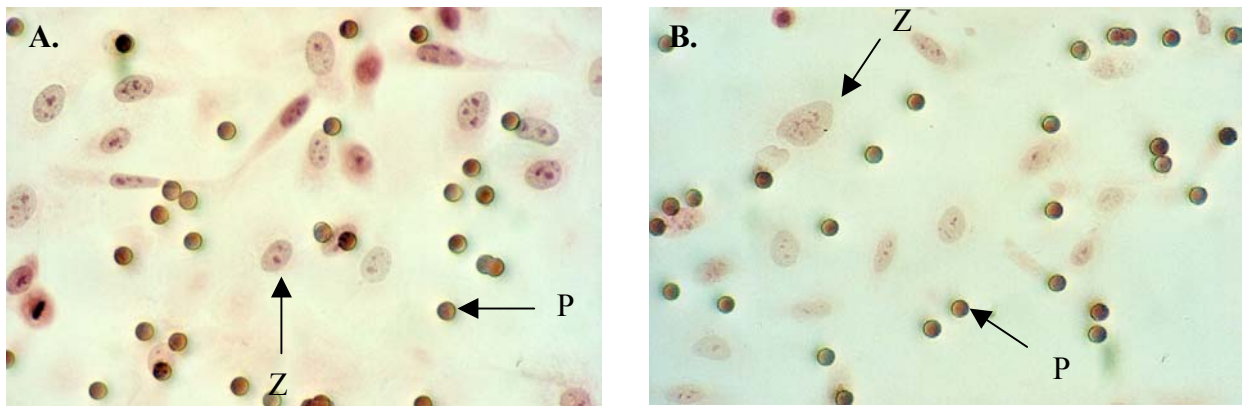


**Abbildung 21:** Repräsentatives Migrationsassay bei Inkubation mit hCG und PKAI, bzw. PKCI. (A) unstimulierte Zellen, (B) Inkubation mit hCG (50000 mIU/ml), (C) Inkubation mit hCG und PKCI (200 nM), (D) Inkubation mit hCG und PKAI (30 nM). Die gleichzeitige Inkubation der EFO 27 Zellen mit hCG und PKCI (Inhibitor der PKC) hemmt die promigratorische Wirkung von hCG teilweise. Die Inkubation mit PKAI steigert die Migration mehr als hCG allein (P: Membranporen, Z: migrierte Zellen an der unteren Membranseite).

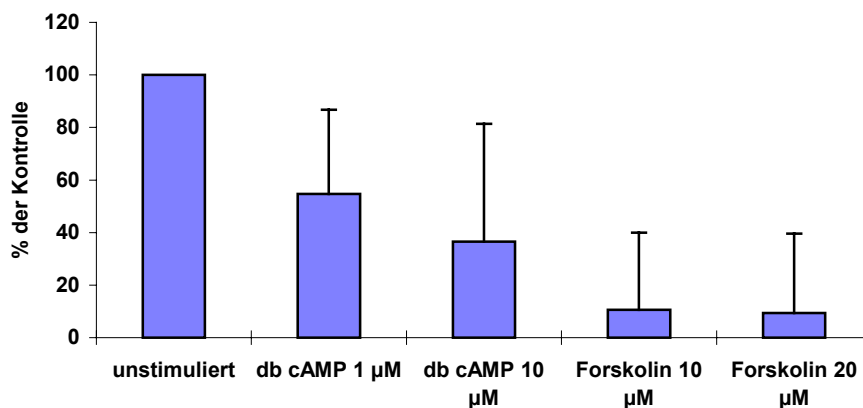


**Abbildung 22:** Wirkung von hCG (50000 mIU/ml), hCG und PKAI (30 nM) und hCG und PKCI (200 nM) auf die Migration der Ovarialkarzinomzelllinie EFO 27 bei dreimaliger Durchführung des Versuches. Deutlich wird die starke Zunahme der Migration um 573 % des Mittelwertes durch Inkubation mit hCG. Diese wird durch Inkubation mit hCG und PKAI noch um 24 % (SD 78 %) verstärkt. Inkubation mit hCG und PKCI reduziert den migrationsfördernden Effekt von hCG allein um 11 % (SD 36 %), (\* =  $p < 0,001$ ). Der Ausgangswert der unstimulierten Zellen wurde als 100 % definiert und die Ergebnisse durch Inkubation mit den Testsubstanzen als prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle angegeben.





**Abbildung 23:** Repräsentatives Migrationsassay bei Inkubation mit db cAMP. (A) unstimuliert, (B) Einfluss von db cAMP (10 µM). Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Migration (P: Membranporen, Z: migrierte Zellen an der unteren Membranseite)



**Abbildung 24:** Wirkung von db cAMP (0-10 µM) und Forskolin (0-20 µM), einem Adenylatzyklase- Aktivator, auf die Migration der Ovarialkarzinomzelllinie EFO 27 bei dreimaliger Durchführung des Versuches. Es zeigt sich eine dosisabhängige Abnahme der Migration nach Inkubation der EFO 27 Zellen mit db cAMP um 54 % (SD 38 %) der Kontrolle. Bei Inkubation mit Forskolin nahm die Migration um 91 % (SD 64 %) der Kontrolle ab, (\* =  $p < 0,001$ ). Der Ausgangswert der unstimulierten Zellen wurde als 100 % definiert und die Ergebnisse durch Inkubation mit den Testsubstanzen als prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle angegeben.

#### ***4.3.4 Einfluss der Testsubstanzen auf die Invasion der EFO 27 Zellen in vitro***

Die Resultate des Invasionsassays, welches mit  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ , db cAMP, Forskolin und cGMP durchgeführt wurde, sind identisch mit den Ergebnissen der Migration. Aufgrund qualitativer Schwankungen und Lieferverzögerungen der kommerziell erhältlichen Matrigel-Einsätze wurde auf eine Fortsetzung und Auswertung dieser Teilversuche verzichtet.

#### ***4.4 Regulation der Expression von Matrixmetalloproteinasen und Integrinen des Ovarialkarzinoms in vitro***

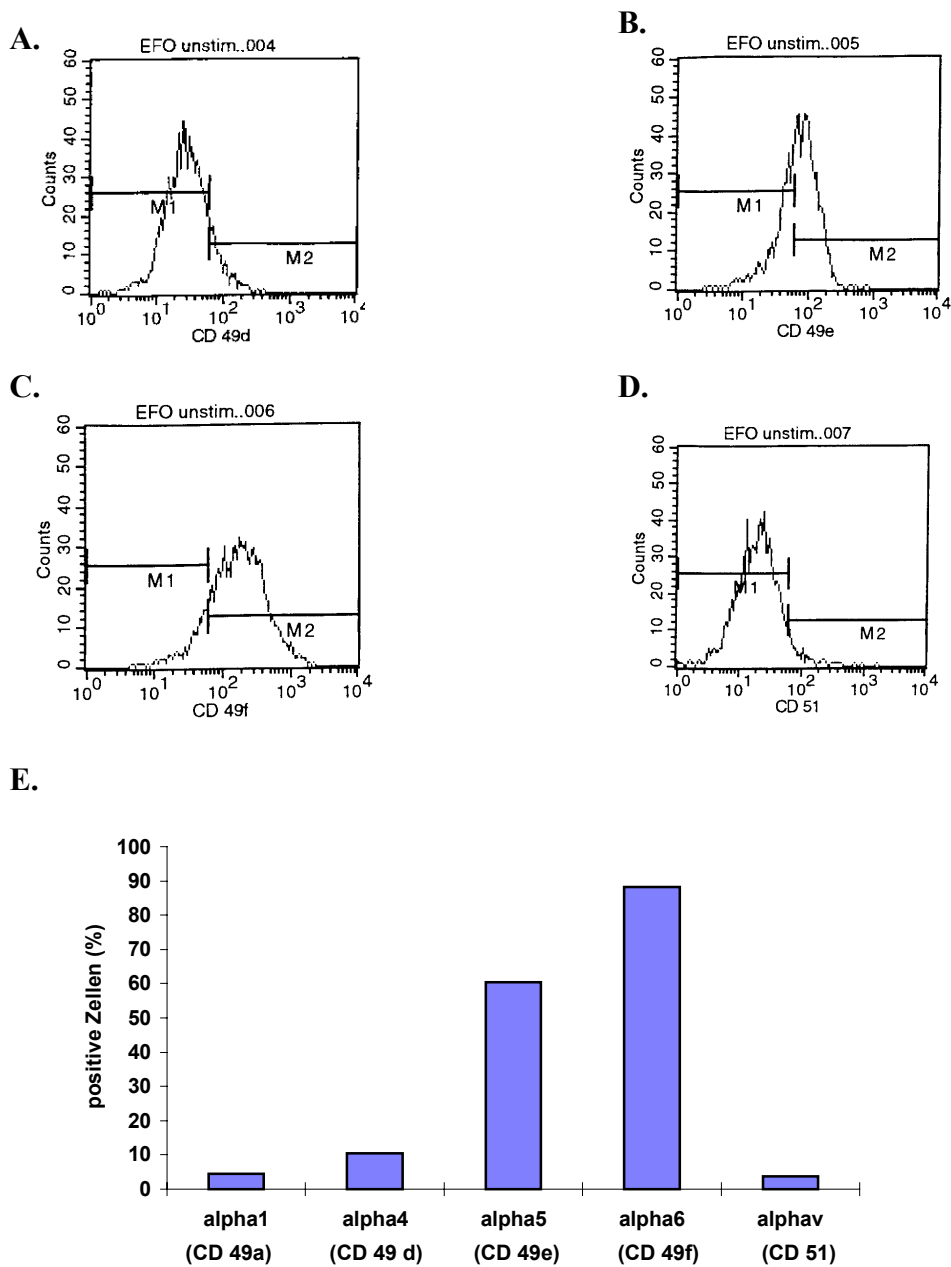
Um die genaueren Mechanismen des expansiven Verhaltens der EFO 27 zu entschlüsseln, wurde im letzten Teil der Arbeit die Sekretion von destruierenden Matrixmetalloproteinasen und die Expression von Integrinen untersucht.

##### ***4.4.1 Einfluss der Testsubstanzen auf die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (MMP)***

Unter Stimulation mit hCG (0-500000 mIU/ml) kam es zu einem Abfall des MMP-9. Der TIMP-1- Gehalt des Zellkulturmediums der unstimulierten Zellen betrug im Mittel 9,3 ng/ml. Inkubation der Zellen mit hCG (0-500000 mIU/ml) hatte keinen Einfluss auf die TIMP-1-Expression. Durch Stimulation der Zellen mit db cAMP (0-10  $\mu$ M) kam es zu einer Steigerung der Expression von TIMP-1 um 29 (+/- 0,03) %. Inkubation mit cGMP (0-10  $\mu$ M) hat eine Steigerung um 40 (+/- 0,74) % zur Folge. Die Expression von MMP-1 und MMP-2 wurde durch die Testsubstanzen nicht signifikant verändert.

##### ***4.4.2 Einfluss von $PGE_2$ , $PGF_{2\alpha}$ , db cAMP und Forskolin auf die Expression der Adhäsionsmoleküle***

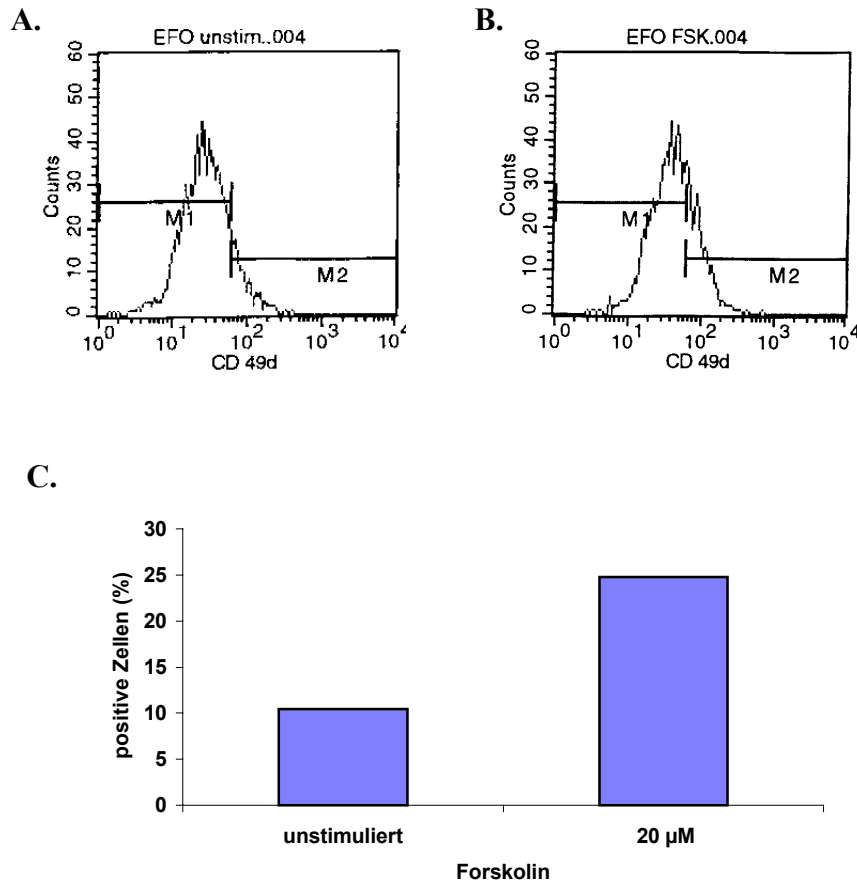
Es wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie das Basis- Integrinexpressionsmuster der EFO 27 Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das alpha 5- und das alpha 6- Integrin von 61 %, bzw. 88 % der Zellen exprimiert werden. 10 % der Zellen waren alpha 4- positiv, wohingegen alpha 1 und alpha v auf 4 % der Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 25 ).



**Abbildung 25:** Integrinexpressionsmuster der unstimulierten EFO 27 Zellen. Darstellung der Resultate der durchflusszytometrischen Messung (A) alpha 4- Integrin (10 % positive Zellen), (B) alpha 5- Integrin (61 % positive Zellen), (C) alpha 6- Integrin (88% positive Zellen), (D) alpha v- Integrin (4 % positive Zellen), (E) prozentuale Darstellung der Integrinverteilung auf der Zelloberfläche. Die Darstellung bezieht sich auf ein repräsentatives Experiment.

### **Einfluss der Testsubstanzen auf die Expression des alpha 4- Integrin (CD 49d)**

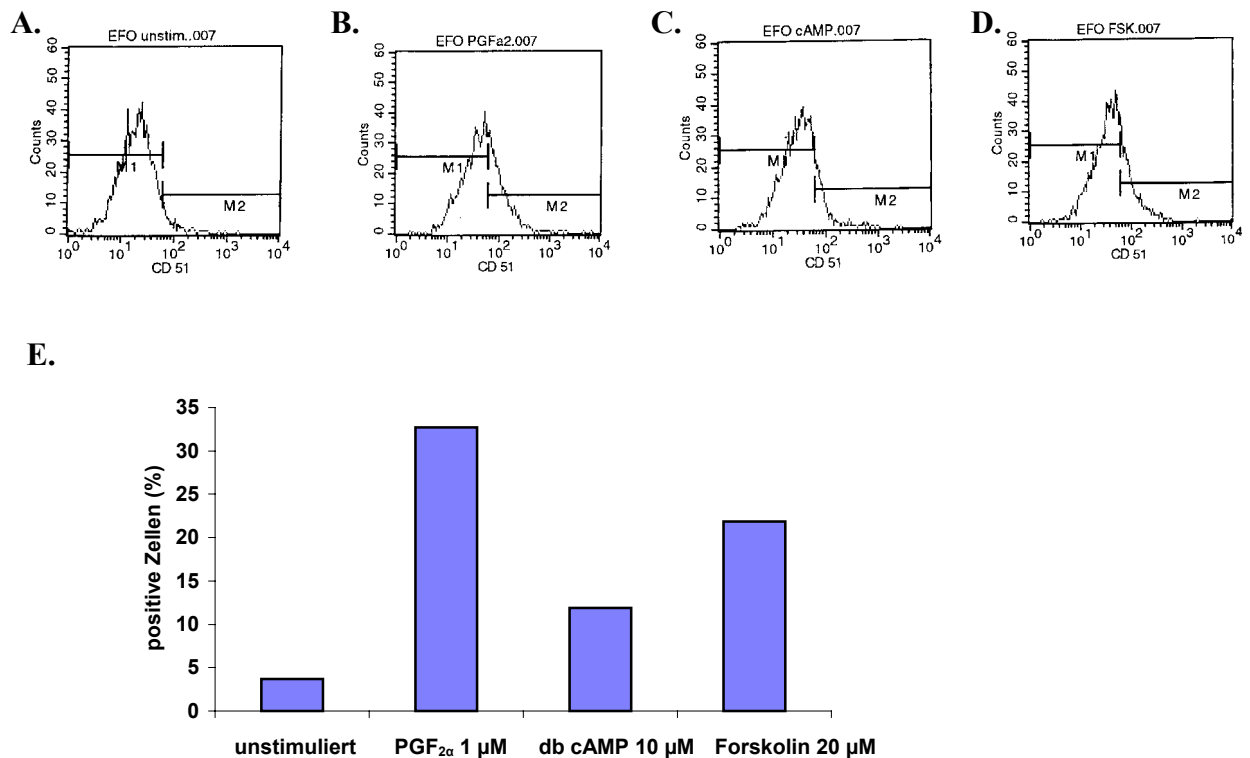
Vorbehandlung der EFO 27 Zellen mit hCG (50000 mIU/ml), PGE<sub>2</sub> (10 µM), PGF<sub>2alpha</sub> (1 µM) und db cAMP (10 µM) hatte keine Veränderung der Expression zur Folge. Unter Einfluss von Forskolin (20 µM) nahm die alpha 4- Expression von 10 auf 25 % positive Zellen zu (Abb. 26 ).



**Abbildung 26:** Veränderung der alpha 4- Integrinexpression durch Inkubation mit Forskolin (20 µM). (A) unstimuliert, (B) Einfluss von Forskolin. Es zeigt sich eine Zunahme der Integrinexpression von 10 auf 25 % der Zellen. (C) Darstellung der Rohwerte ohne prozentuale Umrechnung. Die Darstellung bezieht sich auf ein repräsentatives Experiment.

### **Einfluss der Testsubstanzen auf die Expression von alpha v- Integrin (CD 51)**

Bei Vorbehandlung der Zellen mit hCG und PGE<sub>2</sub> traten keine Veränderungen auf. PGF<sub>2α</sub> (1 μM) führte zu einer Zunahme der alpha v-Integrinexpression von 4 auf 33 %. Inkubation mit db cAMP (10 μM) verstärkte die Expression von 4 auf 12 % der Zellen. Forskolin (20 μM) steigerte das nachweisbare alpha v-Integrin von 4 auf 22 % der Zellen (Abb. 27).



**Abbildung 27:** Einfluss von PGF<sub>2α</sub> (1 μM), db cAMP (10 μM) und Forskolin (20 μM) auf die Expression des alpha v- Integrin. (A) unstimuliert, (B) Unter Stimulation mit PGF<sub>2α</sub>. Anstieg der Expression von 4 auf 33 % der positiven Zellen, (C) Durch Stimulation mit db cAMP Anstieg der Expression von 4 auf 12 % der positiven Zellen, (D) Unter Stimulation mit Forskolin (20 μM) Anstieg der Expression von 4 auf 22 % der positiven Zellen. (E) Darstellung der Rohwerte ohne prozentuale Umrechnung. Die Darstellung bezieht sich auf ein repräsentatives Experiment.

#### 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte nachgewiesen werden, dass die EFO 27 Zellen den hCG/LH-Rezeptor exprimieren. hCG hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Proliferation der EFO 27 Zellen. Beide untersuchten Prostaglandine ( $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) hatten einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum. Gleiches gilt für db cAMP und Forskolin.

Weitere Versuche beschäftigten sich mit dem Einfluss der Testsubstanzen auf die Migration von EFO 27 *in vitro*. Einen migrationsstimulierenden Einfluss hatte die Inkubation mit hCG. Dieser Effekt war dosisabhängig. Eine gleichzeitige Inkubation mit PKA- Inhibitor und hCG veränderte die Migration nicht wesentlich, während die Zugabe von PKC- Inhibitor zu einer partiellen Aufhebung der hCG-Wirkung auf die Migration führte, was auf eine Beteiligung von PKC in der Signaltransduktionskette hindeuten kann. Allerdings ist auch hier die biologische Bedeutung des Ergebnisses aufgrund des geringen Unterschiedes vermutlich irrelevant. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  einen hemmenden Einfluss auf die Migration der EFO 27 Zellen aufweisen. db cAMP und der Adenylatzyklase- Aktivator Forskolin inhibierten die Migration ebenfalls. Kein Einfluss zeigte sich auch bei cGMP.

Die Untersuchungen der Metalloproteinase-Sekretion zeigte, dass die Ovarialkarzinomzelllinie EFO 27 sowohl MMP-9 als auch MMP-2 sezerniert. Die MMP-9- Expression wurde durch hCG gehemmt. TIMP-1- Expression wurde nach Inkubation mit cAMP verstärkt. Die übrigen Testsubstanzen hatten keinen Einfluss auf die MMP und TIMP- Expression. Die Expression von MMP-1 und MMP-2 wurde nicht beeinflusst.

Ovarialkarzinome exprimieren folgende Integrine: alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1, alpha 3 beta 1, alpha 4 beta 1, alpha 5 beta 1, alpha 6 beta 1 und alpha v beta 3. Bei der hier untersuchten Zelllinie fiel auf, dass alpha 6 (88 % positive Zellen) und alpha 5 (61 %) in starkem Maße exprimiert wurde. Alpha 4 (10 %) war mäßiger ausgeprägt. Alpha <sub>1</sub> und alpha v zeigten eine sehr geringe Expression (4 % positive Zellen). Es zeigte sich, dass hCG und die beiden Prostaglandine die Integrinexpression kaum beeinflussten, bis auf eine deutliche Steigerung der alpha v- Expression durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . db cAMP hat eine stimulierende Wirkung auf die Integrine. Forskolin stimuliert die Expression von alpha 4- und alpha v- Integrin.



## 5 DISKUSSION

Die Rolle von humanem Choriongonadotropin (hCG) und Prostaglandinen (PG) bei der Entstehung und Metastasierung von Ovarialkarzinomen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Da beide Substanzen eine breite klinische Anwendung in der Reproduktionsmedizin und Perinatologie finden, sollte in der vorgestellten Studie der Einfluss der o.g. Substanzen auf das Wachstum und die Invasion von Ovarialkarzinomzellen *in vitro* untersucht werden. Es wurden Versuche durchgeführt, die sich mit den Wirkungen von hCG und bestimmter Prostaglandine im Hinblick auf einzelne Eigenschaften wie Proliferation, Migration und Invasion von Ovarialkarzinomzellen beschäftigen.

Bei der Frage nach der Wirkung von hCG und Prostaglandinen (PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub>) auf die Wachstumsregulation und Motilität von Ovarialkarzinomen fällt der Blick zunächst auf physiologische Abläufe im Rahmen der Ovulation. Hier ist ein Zusammenhang im Sinne einer Stimulation von PGE<sub>2</sub> und auch PGF<sub>2alpha</sub> durch hCG schon lange bekannt. Durch präovulatorische Injektion von hCG lässt sich ein signifikanter Anstieg des PGE<sub>2</sub>- Spiegels in der Follikelflüssigkeit auslösen (Munalulu B.M., et al., 1987, Watson E.D. und Sertich P.L., 1991). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine, durch simultane Injektion von hCG und Indomethazin hervorgerufene, Ovulationshemmung durch die Injektion von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub> aufgehoben werden konnte (Kohda H., et al., 1983).

hCG kommt im Bereich der assistierten Reproduktion zur Follikelstimulation und Ovulationsauslösung zum Einsatz, wobei eine Häufung von Ovarialmalignomen bei diesen ungewöhnlich jungen Patientinnen beobachtet wurde (Adewole I.F., et al., 1997). Zu beachten ist dabei, dass häufige Ovulationen einen bedeutenden Risikofaktor zur Entstehung des Ovarialkarzinoms darstellen. Die Frage, inwieweit ovulationsinduzierende Medikamente Ovarialmalignome begünstigen, ist aber immer noch ungeklärt, da die Infertilität allein schon ein grosser Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms darstellt (Bristow R.E. und Karlan, B.Y. 1996, Artini P.G., et al., 1997, Kosec V., et al., 1999).

Im Folgenden werden, vom Einfluss von hCG und den Prostaglandinen ausgehend, verschiedene Aspekte der Wachstumsregulation von Ovarialkarzinomen diskutiert. Insbesondere wird auf die



Rolle der oben genannten Substanzen unter Betrachtung der Signalübertragung auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen und Integrinen eingegangen.

### ***5.1 Die Beteiligung von hCG und Prostaglandinen an der Wachstumsregulation des Ovarialkarzinoms***

#### **a) Die Rolle von hCG bei der Entstehung und Ausbreitung von Ovarialkarzinomen**

Zahlreiche klinische Beobachtungen deuteten auf einen Zusammenhang zwischen medikamentöser Infertilitätstherapie mit exogen zugeführtem hCG und dem Auftreten von Ovarialkarzinomen hin (Nijman H.W., et al., 1992, Adewole I.F., et al., 1997). Dabei war von einer Erhöhung des Risikos an einem Malignom des Ovars zu erkranken um das 2 bis 3fache die Rede (Beltsos A.N. und Odem R.R. 1996). Darüber hinaus konnte in einigen Fällen von Ovarialkarzinomen eine proportional zur Tumorlast ansteigende endogene hCG- Konzentration nachgewiesen werden (Mahlck C.G., et al., 1990). Weitere Studien haben bei Patienten mit aktiven Neoplasien (z.B. Lungen-, Ovarial-, Brust- und Zervixkarzinom) ein Gonadotropinpeptid mit  $\beta$ -hCG- Aktivität nachgewiesen (Kardana A., et al., 1988).

Die Wirkung von exogen zugeführtem hCG auf Tumorzellen *in vitro* wurde bislang als wachstumsfördernd beschrieben (Simon W.E., et al., 1983, Gillott D.J., et al., 1996, Zygmunt M., et al., 1998, Butler S.A., et al., 2000, Matsubara H., et al., 2000). Bezüglich des Ovarialkarzinoms konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation *in vitro* durch hCG (0,1-1  $\mu$ g/ml) um 20 bis 60 % gesteigert werden konnte, gemessen in einem MTT- Assay. Untersucht wurde die Ovarialkarzinomzelllinie OV Ca, welche aus einer mesenterialen Metastase eines primär papillären Adenokarzinoms des Ovars einer 76jährigen Patientin gewonnen wurde. Ziel dieser Studie war, die Effekte von hCG, Estradiol allein und in Kombination mit EGF (epidermalen Wachstumsfaktor) und IGF-1 (Insulin- ähnlichem Wachstumsfaktor 1) auf die Wachstumsregulation von Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen. Durchgeführt wurden dabei Zellzählungen, MTT- Assays, durchflusszytometrische Messungen und Untersuchungen der EGF-, bzw. IGF-Rezeptormodulation durch hCG und Estradiol (Wimalasena J., et al., 1993). Die Frage, inwieweit ovulationsinduzierende Medikamente, wie z.B. hCG, Ovarialmalignome begünstigen, ist aber immer noch ungeklärt (Bristow R.E. und Karlan B.Y. 1996, Artini P.G., et al., 1997, Kosec V., et al., 1999).

Hier wurden mit den Methoden der Immunhistochemie zunächst der hCG/LH-Rezeptor auf der Zelllinie EFO 27 nachgewiesen. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass bis zu 40 % der Ovarialkarzinome hCG/LH-Rezeptor-positiv sind (Kuroda H., et al., 1998). In der Literatur fand sich eine positive Korrelation zwischen der Metastasierungskapazität menschlicher Karzinome und der Expression membranständiger hCG/LH-Rezeptoren (Acevedo H.F. und Hartsock R.J., 1996).

Bei den nachfolgend durchgeführten Versuchen konnte ein deutlicher Anstieg der Migration, aber nicht der Proliferation, nach hCG-Inkubation beobachtet werden.

Ein wichtiger Mechanismus ist die Regulation der Expression von Matrixmetalloproteinasen. Die Metalloproteinasen MMP-1, MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 sind in vielen hochinvasiven Malignomen zu finden und scheinen ein Charakteristikum für Invasivität und Metastasenbildung zu sein (Hayashi H., et al., 1997, Nishikawa A., et al., 2000, Sakata K., et al., 2000). Bei der Betrachtung von Ovarialkarzinomen interessieren vor allem MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 (Moser T.L., et al., 1994, Fishman D.A., et al., 1997, Huang L.W., et al., 2000, Sakata K., et al., 2000). Es wurde nachgewiesen, dass hauptsächlich MMP-2-Gelatinase von vielen Ovarialkarzinomzellen sezerniert wird (Leppert D., et al., 1995, Fishman D.A., et al., 1996, Young T.N., et al., 1996).

Hier inhibierte hCG die Expression von MMP-9, was bereits von anderen Autoren beobachtet wurde (Aston K.E., et al., 1996). Es finden sich auch Quellen, die von einem massiven Anstieg der MMP-9-Expression in Abwesenheit von hCG berichtet (Stamouli A., et al., 1996). Die diffuse Expression von MMP-9 ist vermehrt bei metastasierenden Ovarialkarzinomen (Lymphknotenmetastasen) zu finden (Huang L.W., et al., 2000, Sakata K., et al., 2000). Dies würde im Zusammenhang mit den hier gesehenen Ergebnissen für eine invasionshemmende Wirkung des hCG sprechen. Das korreliert nicht mit den hier vorliegenden Ergebnissen zur Migration.

#### **b) Die Rolle von Prostaglandinen bei der Entstehung und Ausbreitung von Ovarialkarzinomen**

In Tumorzellen wurden hauptsächlich Prostaglandine der E-Reihe, PGF<sub>2α</sub>, Prostazyklin und Thromboxan A<sub>2</sub> nachgewiesen (Karmali R.A., et al., 1984). Einige Autoren stellten sehr früh einen Zusammenhang zwischen erhöhten PGE<sub>2</sub>-Spiegeln im Gewebe und der Malignität von

Tumoren her (Feller N., et al., 1979, Malachi T., et al., 1981). Dabei besteht aber Uneinigkeit über die prognostische Aussagekraft dieser Werte. In manchen Studien konnte keine Korrelation mit Tumorstadien oder Histologie nachgewiesen werden (Malachi T., et al., 1981). Andere Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen den gemessenen Werten und erhöhter Malignität (Feller N., et al., 1979, Carter C.A. et al., 1983). Es gibt deutliche Anzeichen dafür, dass vor allem PGE<sub>2</sub> eine Rolle bei Wachstum und Metastasierung von Tumoren spielt (Tab. 8) (Honn K.V., et al., 1981). Ein wachstumshemmender Einfluss auf Ovarialkarzinome konnte durch PGA<sub>1</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGJ<sub>2</sub> nachgewiesen werden (Fukushima M., et al., 1989, Kato T., et al., 1986, Sasaki H. und Fukushima M., 1994).

<b>Malignom/ Organ</b>	<b>Einfluss des PGE<sub>2</sub></b>
Mammakarzinom (Fulton A.M., et al., 1989), humane Melanomzelllinien (Welch D.R., et al., 1989)	keine
Humane squamöse Tumoren von Kopf und Hals (Lozano Y., et al., 1996)	proliferationsfördernd
Malignes Melanom (Santoro M.G., et al., 1976), Ovarialkarzinom (s.u.) (Kikuchi Y., et al., 1986), B- Zell- Lymphome (Phipps R.P., et al., 1989), Mammakarzinom (Zhang S.-Z. und Fulton A.M., 1991, Planchon P., et al., 1995), Akute lymphoblastische Leukämie (Giordano L., et al., 1997),	zytotoxisch

**Tabelle 8:** Aus der Literatur bekannte Wirkungen von PGE<sub>2</sub> auf die Proliferation von Malignomen verschiedener Organe.

Bei Untersuchungen des Prostaglandinspiegels von Ovarialkarzinomen wurde schon sehr früh entdeckt, dass der PGE<sub>2</sub>- Spiegel in malignem Gewebe erhöht ist: Physiologisch finden sich 119 pg/mg Protein, in Malignomen dagegen 702 pg/mg; und zwar proportional zum Tumorstadium (Heinonen P.K. und Metsa-Ketela T., 1988). Bei Betrachtung der Prostaglandinwirkung auf

Ovarialkarzinomzellen ist die Unterscheidung zwischen endogenem und exogenem PGE<sub>2</sub> wichtig. Die gemessenen erhöhten Konzentrationen, vor allem auch in hochmalignen Tumoren, haben zunächst einen stimulierenden Einfluss von endogenem PGE<sub>2</sub> auf das Karzinom vermuten lassen. Diese Annahme wird in verschiedene Untersuchungen bestätigt (Bennett A., et al., 1977, Fulton A.M., et al., 1984, Lu Z.Y., et al., 1995). Dieser Effekt kam hauptsächlich durch negative Einflüsse auf das Immunsystem zustande (Fulton A.M. und Heppner G.H. 1985, Scioscia K.A., et al., 1997).

Andere Autoren schreiben den Prostaglandinen der A und E- Reihe, so auch endogenem PGE<sub>2</sub>, eine tumorzellhemmende Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu (Santoro M.G., et al., 1976).

Der andere Aspekt ist das Verhalten der Zellen bei Inkubation mit Prostaglandin E<sub>2</sub>, welches exogen zugeführt wurde. Auch dort wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse gefunden. Manche Autoren beschreiben einen stimulierenden, andere wiederum einen inhibierenden Effekt.

Wir beobachteten hingegen *in vitro* eine wachstumshemmende Wirkung von exogen zugeführtem PGE<sub>2</sub> auf die EFO 27 Zellen.

Eine wichtige Rolle des PGE<sub>2</sub>- Rezeptors in punkto Metastasierung wird vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass dieser von Tumorzellen mit hohem Metastasierungspotenzial eine ausgesprochen hohe Affinität besitzt, während nicht- metastasierende Zelllinien Rezeptoren mit niedriger Affinität exprimieren (Fulton A.M., et al., 1989). Es gibt Hinweise darauf, dass PGE<sub>2</sub>- Rezeptoren von Tumorzellen einen modulierenden Einfluss auf Adhäsionsmoleküle und vor allem Laminin haben (Zhang S.-Z. und Fulton A.M., 1991). Die hier untersuchten Integrine (alpha 1, alpha 4, alpha 5, alpha 6 und alpha v) wurden jedoch durch PGE<sub>2</sub> in ihrer Expression nicht beeinflusst. In der vorgestellten Studie wurde die Expression der PGE<sub>2</sub>- Rezeptoren nicht untersucht.

Aus der Literatur lassen sich verschiedene Theorien zum Wirkmechanismen des Prostaglandins unterscheiden, darunter Beeinflussung der körpereigenen Abwehr (Santoro M.G., et al 1977, Kurland J.I., et al., 1978, Kikuchi Y. et al., 1986, Fulton A.M., et al., 1987, Wojtowicz-Praga S., 1997), Beeinflussung der Zellmotilität (Young M.R., et al., 1986) und direkte Zytotoxizität.

PGE<sub>2</sub> ist in der Lage, die MMP- Produktion von Zellen anzuregen. In den vorliegenden Experimenten konnte ein solcher Effekt nicht nachgewiesen werden.

Untersucht wurde auch die Integrinexpression als möglicher Weg für die Vermittlung der wachstumshemmenden Wirkung. Auf Ovarialkarzinomzellen wurde vor allem alpha 1,-2,-3 (Kollagenrezeptor), -5, -6 und manchmal -4 Kette nachgewiesen. Außerdem fand sich das alpha v beta 3- Integrin (Bottini C., et al., 1993).

Die Basis- Integrinexpression der EFO 27- Zelllinie zeigte, dass alpha 5- , bzw. alpha 6- Integrin von 61 %, bzw. 88 % der Zellen exprimiert werden. 10 % der Zellen waren alpha 4- positiv, wohingegen alpha 1 und alpha v nur auf 4 % der Zellen nachgewiesen werden konnte. Keines dieser Integrine wurde durch PGE<sub>2</sub> in seiner Expression beeinflusst.

Eine wichtige grundsätzliche Überlegung bei der Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse ist die Unterscheidung zwischen anti- metastastischen Substanzen und solchen, die zytotoxisch wirken. Die Rolle von PGE<sub>2</sub> wird auch im Zusammenhang mit Apoptose diskutiert. Dabei gibt es durchaus unterschiedliche Einschätzungen. PGE<sub>2</sub> scheint zum einen eine apoptotische Wirkung auf Thymuszellen und Ovarialepithelien auszuüben (Mastino A., et al., 1992, Ackermann R.C. und Murdoch W.J., 1993). Die Apoptose anderer nicht- maligner Zellen, neutrophiler Leukozyten und Magenschleimhautzellen, wird durch das Prostaglandin gehemmt, vermittelt durch den second messenger cAMP (s.u.) (Ottonello L., et al., 1998, Tsutsumi S., et al., 2002). Ebenso durch cAMP vermittelt, diesmal Apoptose- induzierend, wird die Wirkung auf Chondrozyten beschrieben (Miwa M., et al., 2000). Eine ganz andere Beobachtung ist die Hemmung der Apoptose in Kolonkarzinomzellen durch PGE<sub>2</sub> mit nachfolgender Erhöhung des tumorigenen Potenzials dieser Zellen gefunden (Sheng H., et al., 1998). Im Gegensatz dazu wird eine Hemmung der Apoptose sowohl in unveränderten B- Lymphozyten, aber auch in B- Zell- Lymphomen beschrieben (Brown D.M., et al., 1992).

Falls die getesteten Substanzen sich auch negativ auf die Zellproliferation auswirken, könnte man vermuten, dass eine ebenso beobachtete Migrations-, bzw. Invasionshemmung allein durch Verringerung der Zellzahl im Ansatz verursacht sein könnte. Im vorliegenden Fall wird durch PGE<sub>2</sub> sowohl Proliferation als auch Migration deutlich gehemmt.

Offensichtlich ist  $\text{PGE}_2$  an vielfältigen Regelkreisläufen beteiligt. Dazu gehört u.a. der intrazelluläre Transmitter, auch „second messenger“ genannt. Die meisten Untersuchungen auf diesem Gebiet weisen dabei auf die Bedeutung des Adenylatzyklase- System hin (s.u.).

Es wurde angenommen, dass es zwischen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Spiegel und Prognose einer Tumorerkrankung keinen Zusammenhang gibt (van Dam P.A., et al., 1989). In metastasierenden Krebszellen wurden aber erhöhte  $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Spiegel nachgewiesen (Nakazawa I., et al., 1993). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in malignen Zellen die Produktion von Matrixmetalloproteinasen, wie z.B. MMP-2 steigert und somit direkten Einfluss auf Invasivität und Metastasierung hat (Reich R. und Martin G.R. 1996). Über einen Zusammenhang zwischen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und Ovarialkarzinomen finden sich in der Literatur keine Angaben.

Die Ergebnisse aus der hier vorgestellten Studie zeigen zusammenfassend eine Proliferationsabnahme. Es kann allerdings auch sein, dass diese Proliferationshemmung, im Sinne einer Zytotoxizität, für die beobachtete Hemmung der Migration verantwortlich ist.

Der Anstieg der alpha v- Integrin- Expression kann als mögliches Zeichen einer Tumorprogressionshemmung gewertet werden (Abe Y., et al., 1997, Yoshihara T., et al., 1997) .

## **5.2 Signalübertragung**

### **a) Vermittlung der hCG- Wirkung**

Ebenso wie bei  $\text{PGE}_2$ , welches wie oben ausgeführt, eine bedeutende Rolle bei der Ovulation spielt, scheint ein Teil der hCG- Wirkung durch die Adenylatzyklase vermittelt zu werden. Anderen Erkenntnissen zufolge geht man allerdings davon aus, dass die Wirkung von hCG auch über einen PKC- abhängigen Weg vermittelt wird (Combarnous Y., 1993, Dufau M.L., 1998). In der vorgestellten Studie sollten auch Komponenten der intrazellulären Signalkette untersucht werden. Dazu erfolgte eine gleichzeitige Inkubation mit PKAI, bzw. PKCI und hCG, welche eine Einschränkung der Migration durch hCG und PKCI ergab. Dies spricht eher für einen PKC- vermittelten Weg der hCG- Wirkung im Falle der migrationsfördernden Wirkung auf Ovarialkarzinomzellen. Auch Untersuchungen bezüglich Angiogenese und Neovaskularisation, nicht nur von Ovarialmalignomen, weisen einen 3fachen Anstieg der Gefäßneubildung durch hCG nach und verbinden diese Beobachtung mit einem PKC- vermittelten Weg. So zeigte sich

zum Beispiel, dass ein grosser Teil der angiogenen Wirkung auf einer Motilitätssteigerung, und nicht z.B. auf einer Zunahme der Zellzahl zu beruhen scheint (Zygmunt M., et al., 2002, unveröffentlichte Ergebnisse).

Einige Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass hCG die cAMP- Konzentration ansteigen lässt (Kisielewska J., et al., 1996). Andere haben die Ansprechrate der endogenen cAMP- Produktion des Corpus luteum getriggert durch hCG und PGE<sub>2</sub> verglichen und dabei festgestellt, dass beide unter bestimmten Voraussetzungen einen stimulierenden Einfluss haben, welcher aber bei einem physiologischen endogenen hCG- Spiegel wegfällt und nur bei verringerten hCG- Serumspiegeln zu beobachten ist (Hagstrom H.G., et al., 1996). Dies wird von der Beobachtung unterstützt, dass eine Aktivierung der PKC 100fach höhere Liganden- Konzentrationen erfordert als die Aktivierung von Adenylatzyklase und Proteinkinase A (Dufau M.L., 1998). Es scheint also, dass hCG zwar grundsätzlich über einen cAMP- vermittelten Weg seine physiologische Wirkung entfaltet, aber im Falle der Wachstumsregulation von Ovarialkarzinomen überwiegend über einen PKC- vermittelten Weg agiert.

Es muss an dieser Stelle auch der Unterschied zu den Ergebnissen aus dem Bereich der Chorionkarzinome erwähnt werden, wo hCG analog zum second messenger db cAMP eine stimulierende Wirkung auf Migration und Invasion aufwies bei fehlender Beeinflussung der Proliferation (Zygmunt M., et al., 1998).

## **b) Vermittlung der Prostaglandinwirkung**

### **PGE<sub>2</sub>**

Vermittelt wird die Wirkung von PGE<sub>2</sub> in vielen Fällen durch cAMP. Dazu gehören z.B. die Regulierung der Aktivierung inflammatorischer Zytokine (Haynes D.R., et al., 1992), der Aldosteron- Sekretion (Breyer R.M., et al., 1996), von intestinale Transportvorgängen (Breyer R.M., et al., 1996). Bei den Autoren, die eine zytotoxische Wirkung von Prostaglandinen beschreiben, herrscht Uneinigkeit darüber, über welche intrazelluläre Signalkette dies vermittelt wird. Von einigen Autoren wird die Unabhängigkeit vom intrazellulären cAMP- Gehalt dargestellt (Marui N., et al., 1990).

Wichtig in diesem Zusammenhang ist die cAMP- vermittelte wachstumshemmende Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf Mammakarzinome (Planchon P., et al., 1995), sowie die Beeinflussung der Östrogenproduktion durch Mammakarzinome (Brueggemeier R.W., et al., 1999). Außerdem gibt

es Hinweise für eine Beteiligung von PGE<sub>2</sub> via cAMP an Differenzierungsvorgängen der Zellen, wobei die Desensibilisierung gegenüber cAMP möglicherweise eine Rolle bei der Karzinogenese spielt (Yang J.H. 1998).

Die ersten Beobachtungen über einen Zusammenhang zwischen PGE<sub>2</sub> (65,89 pg/mg) und cAMP (0,704 pmol/mg)- Konzentration in malignem Gewebe stammen aus den späten 70er Jahren. Dort wurde bei sehr hohem Niveau der Spiegel in der Tumormasse eine enge Korrelation zwischen beiden Werten in malignen Mammatumoren nachgewiesen. Auch eine Reihe von Genen mit Einfluss auf die Wachstumsregulation von Zellen scheint durch Veränderungen der cAMP-Spiegel moduliert zu werden (Nagpal M.L., et al., 1991, Ilvesmäki V., et al., 1993, McCarthy T.L., et al., 1997).

Im Gegensatz dazu zeigten einige andere Studien einen deutlichen Zusammenhang zwischen PGE<sub>2</sub>- induzierter Stimulation der Adenylatzyklase und nachfolgender Wachstumsinhibition von Karzinomzellen (Phipps R.P., et al., 1989, Planchon P., et al., 1995, Fedyk E.R., et al., 1996). Auch im Ovarialkarzinom soll cAMP eine proliferationshemmende Wirkung entfalten (Wimalasena J., et al., 1992). Es wurde nachgewiesen, dass die cAMP- Spiegel in malignem Gewebe (15,4 pmol/mg Protein) niedriger sind als physiologischerweise (43,4 pmol/mg Protein) (Heinonen P.K. und Metsa-Ketela T., 1988).

Dies wurde auch in den hier vorliegenden Experimenten, wo db cAMP und der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin eingesetzt wurden, bestätigt. db cAMP verminderte hier sowohl Migration als auch die Zellproliferation.

In unseren Experimenten haben wir auch die Effekte des cAMP auf die Expression von MMP und Integrinen *in vitro* untersucht.

Einige hochinvasive Malignome steigern ihre Ausbreitung nicht durch vermehrte Produktion von MMP, sondern durch verminderte Ausbildung von spezifischen Inhibitoren (TIMP) (Jacob K., et al., 1995). So könnten auch die vorliegenden Ergebnisse verstanden werden. Die durch db cAMP induzierte Zunahme der TIMP-1- Sekretion könnte zur Hemmung der MMP zu führen. Eine Induktion der TIMP-1- Expression wurde bereits beschrieben (Ulisse S, et al., 1994, Kraling B.M., et al., 1999). Auch andere Autoren haben eine Down- Regulation von TIMP-1 in malignem Gewebe beobachtet (Sakata K., et al., 2000).



Zusätzlich zu ihrer Wirkung auf die TIMP hat db cAMP auch die Expression einiger untersuchter Integrine beeinflusst. Einige Autoren sprechen davon, dass alpha 5, ein Fibronectinrezeptor, in vielen Tumorzellen vermindert exprimiert wird (Ruoslahti E. 1991). So zeigte sich z.B. eine migrationshemmende Wirkung im Hamsterovar: Bei einer künstlichen Überexpression von alpha 5 beta 1- Integrin, konnte nachgewiesen werden, dass, je mehr Fibronectin sich in der Zellumgebung fand, die Migration der Zellen stark nachließ, sie langsamer wuchsen und unfähig waren, Tumoren auszubilden (Giancotti F.G., et al., 1990), so dass das alpha 5- Integrin über die vermehrte Adhäsion zu einer Umwandlung der Zellen in einen weniger invasiven Phänotyp führt (Seftor R.E.B., et al., 1998). Alpha 5- Integrin soll Adenylatzyklase- vermittelt wirken (Hauzenberger D., et al., 1994). Dies ist bei unseren Versuchen nicht nachvollziehbar gewesen.

Bei *in vitro* Studien mit Matrigel wurde durch Antikörper gegen alpha 6 die Invasivität von Fibrosarkom- (Ramos D.M., et al., 1991), Prostatakarzinom- (Rabinovitz I., et al., 1995) und Pankreaskarzinomzellen (Weinel R.J., et al., 1995) gehemmt. Es fiel auf, dass quantitativ sehr geringe Veränderungen der Expression von alpha 6 beta 4-Integrin Einfluss auf Tumorprogression und Metastasierung haben. Auch bei menschlichen multi- resistenten Ovarialkarzinomen wurde eine vermehrte Expression von  $\alpha 6$  gefunden. Da keine gesteigerte Protease- Produktion nachgewiesen werden konnte, geht man davon aus, dass die Adhäsionsmolekül- Produktion für die gesteigerte Penetration einer Kollagen- Fibroblast- Matrix verantwortlich sein könnte (Sedlak J., et al., 1996). Auch diesbezüglich konnten hier keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Der hier beobachtete Zusammenhang zwischen cAMP, bzw. Forskolin und einer Zunahme der adhäsionsvermittelnden  $\alpha v$ - Expression wurde vorbeschrieben (Kim S., et al., 2000). Dieser kann durchaus eine Abnahme der Migration begründen.

Es wurden bisher verschiedene cAMP- Analoga bezüglich ihrer Wirkung auf Tumore experimentell untersucht. Verhindert wurde der Einsatz von cAMP als Zytostatikum bisher allerdings nicht zuletzt dadurch, dass für eine zytotoxische Wirkung millimolare Konzentrationen im Organismus erforderlich waren, die zu sehr mit unerwünschten Nebenwirkungen behaftet waren. In verschiedenen Studien wurde eine proliferations- aber auch invasionshemmende Wirkung von dibutryl- cAMP auf Tumorzellen beschrieben (Welch D.R., et al., 1989). Dieses

Analogon, db cAMP, wurde in den hier vorliegenden Experimenten verwendet. Die vorliegenden Ergebnisse weisen ebenfalls eine Reduktion des proliferativen und migrativen Potenzials der EFO 27 Zellen aus.

Sowohl cAMP als auch Forskolin (s.u.) werden nicht nur im Zusammenhang mit PGE<sub>2</sub> (s.o.) in Verbindung mit Apoptose gebracht. Untersucht wurde die Apoptose-induzierende Wirkung von cAMP auf humane Kolonkarzinomzellen und Mammakarzinomzellen (Boe R., et al., 1995, Hopfner M., et al., 2001). Auf der anderen Seite sprechen andere Autoren von einer Hemmung der Apoptose (Carlson C.C., et al., 2000).

Eine weitere bei unseren Untersuchungen verwendete Substanz ist Forskolin, ein starker Aktivator der Adenylatzyklase. Forskolin ist ein organisches Molekül aus der Wurzel der indianischen Pflanze *Coleus forskohlii*, welche in der indianischen Heilkunde noch heute als Arznei eingesetzt wird (Berridge M.J. 1985). Bisher stand im Mittelpunkt der Forschung über Zellbewegungen mit Forskolin die Beeinflussung des Verhaltens glatter Muskelzellen der Gefäße. Hierbei wurde von verschiedenen Autoren gezeigt, dass Forskolin auf deren Migration hemmend wirkt (Koyama N., et al., 1992, Horio T., et al., 1995, Kohno M., et al., 1997, Palmer D., et al., 1998). Diese Migrationshemmung wird durch einen PKA-abhängigen Weg vermittelt (Yasunari K., et al., 1997).

Forskolin wirkt invasionshemmend in einem Membran-Invasions-Kultur-System (MICS) bei mehreren Malignomzellen (Welch D.R., et al., 1989). Auch in anderen Studien wurde ihm eine stark proliferationshemmende Wirkung bescheinigt, vor allem in metastasierenden Zelllinien (Ormerod E.J. und Hart I.R. 1989). Andererseits ist Forskolin z.B. an Umbauvorgängen der Zelloberfläche beteiligt, welche in Zusammenhang mit Apoptose stehen (Cohen E., et al., 1999).

*In vitro* zeigte Forskolin bereits einige tumorhemmende Wirkungen, wie z.B. die Akkumulation von platinhaltigen Chemotherapeutika im Ovarialkarzinom (Mann S.C., et al., 1991, Christen R.D., et al., 1993), die Hemmung der Adhäsion von Kolonkarzinomzellen (Daneker G.W., et al., 1996), sowie die Förderung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), welches einen zytotoxischen Einfluss auf Tumorzellen hat (Murata J., et al., 1994). Sowohl eine Proliferations-

als auch eine Migrationshemmung konnten in den hier vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden.

Deutliche Effekte konnten in der vorgelegten Studie in Bezug auf die Expression des alpha v- Integrins beobachtet werden. Die Expression dieses wachstumshemmenden Integrins wurde durch Forskolin, wie auch durch db cAMP, deutlich gesteigert. Ebenfalls vermehrt exprimiert wurde alpha 4 nach Forskolin- Inkubation, wofür sich in der Literatur keine Erklärung findet.

### **PGF<sub>2alpha</sub>**

Es wird angenommen, dass Prostaglandine der E- Reihe den cAMP- Spiegel erhöhen, während Prostaglandine der F-Reihe über cGMP wirken (Carini C., et al., 1981). In der Literatur konnte auch eine Verbindung zwischen dem zytotoxischen Prostaglandin PGF<sub>2alpha</sub> und einem durch sie erhöhten cGMP- Spiegel gezeigt werden (Miwa N., et al., 1988).

Einige Autoren beschreiben einen Zusammenhang zwischen cGMP- Konzentration im Urin und Tumorprogression von Ovarialkarzinomen (Luesley D.M., et al., 1987, Redman C.W., et al., 1990). Bei der Untersuchung der Ovarialkarzinome wurde daher cGMP bisher hauptsächlich als Tumormarker untersucht (Luesley D.M., et al., 1987, Redman C.W., et al., 1990, Turner G.A., et al., 1990). Es wurde z.B. festgestellt, dass der cGMP- Spiegel im Urin von Ovarialkarzinompatientinnen mit abnehmendem Differenzierungsgrad des Tumors ansteigt, wobei andere Autoren zu dem Schluss kamen, dass hier keine Korrelation zwischen cGMP- Spiegel und Prognose besteht (Francavilla A., et al., 1985, Heinonen P.K. und Metsa-Ketela T., 1988).

In der vorliegenden Untersuchung konnte die Wirkung von cGMP auf die Proliferation und Migration der EFO 27 Zellen nicht nachgewiesen werden.

Auffallend war aber die Steigerung der TIMP-1- Expression durch cGMP (10 µM) um 40 %. In der Literatur fanden sich zu dieser Beobachtung keine Angaben. Alle anderen untersuchten Zelleigenschaften blieben hier durch cGMP unbeeinflusst.

### 5.3 *Ausblick und Konsequenzen für das Verständnis von Entstehung und Ausbreitung der Ovarialkarzinome*

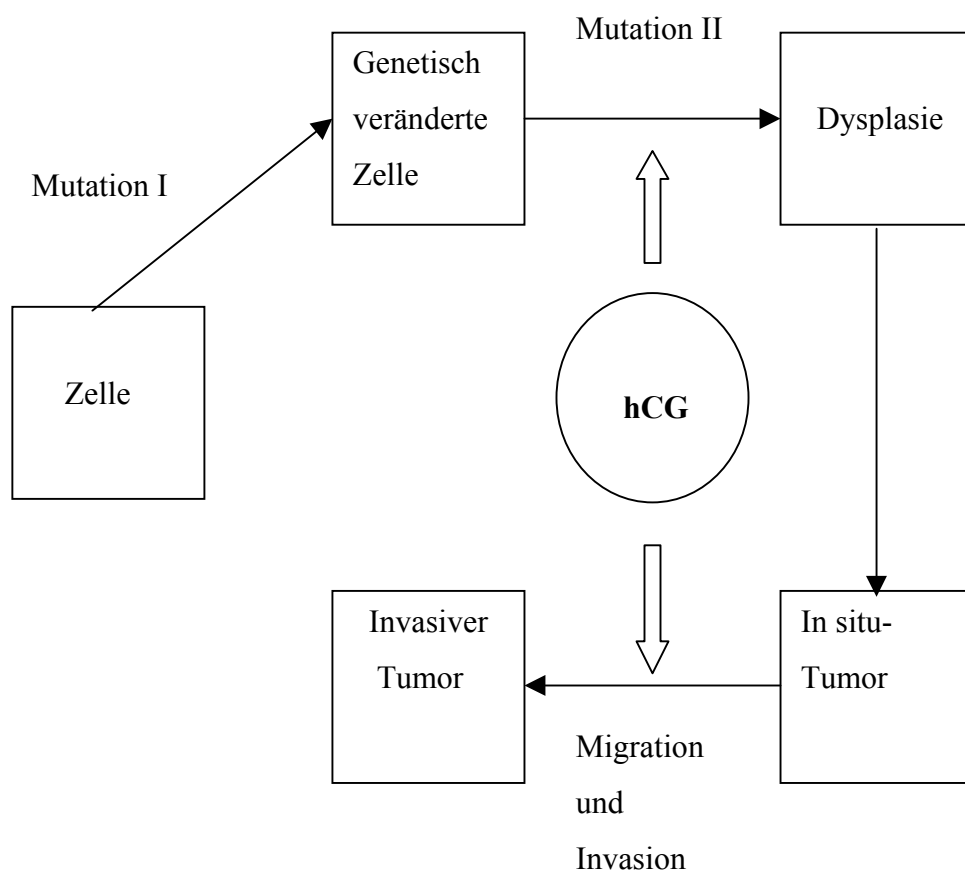
Welche Schlüsse können aus den gewonnenen Ergebnissen bezüglich der Therapie von Ovarialkarzinomzellen gezogen werden?

Zu beachten ist bei allen Überlegungen die Tatsache, dass hier nicht der Einfluss der Testsubstanzen auf die Kanzerogenese betrachtet wurde, sondern die Wirkung von hCG auf bereits invasive Tumoren untersucht wurde. Es ergeben sich daher also möglicherweise zwei klinische Ansatzpunkte, welche es zu unterscheiden gilt. Zum einen ist dies die Beeinflussung der Zelltransformation von einer genetisch veränderten zu einer dysplastischen Zelle, bei der hCG eine Rolle spielen kann (Konishi I, et al., 1999). Der andere Ansatzpunkt ist die hier untersuchte Umwandlung von einem in- situ zu einem invasivem Tumor, welche durch hCG reguliert werden kann (Abb. 28).

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um eventuelle Zusammenhänge, aber auch Unterschiede zwischen exogener Zufuhr von hCG, wie z.B. im Rahmen einer Stimulationstherapie (mögliche kanzerogenetische Wirkung), und den hier auch nachgewiesenen promigratorischen Effekten (Beeinflussung bereits invasiver Zellen), aufzudecken. Hilfreich kann dabei durchaus die Identifizierung der intrazellulären Signalkette sein, da auch sie gewisse therapeutische Ansätze möglich machen kann. Bei Bestätigung der karzinomwachstumsstimulierenden Wirkung *in vivo* könnten eventuell auch Antikörper gegen hCG als therapeutische Option in Betracht gezogen werden. Es konnte gezeigt werden, dass anti-hCG-Antikörper bei humanen Uteruskarzinomen eine zytotoxische Wirkung entfaltet (Kalantarov G. und Acevedo HF, 1998). Auch in Untersuchungen mit nackten Mäusen, welchen Ovarialkarzinome implantiert wurden, konnte das Karzinomwachstum durch anti-hCG-Antikörper gehemmt werden (Zygmunt M., et al., 2002, unveröffentlichte Ergebnisse).

Was die Prostaglandine angeht, erscheint vor allem die Unterscheidung zwischen endogen produziertem, im Malignom vermehrt nachweisbarem, und exogen zugeführtem PGE<sub>2</sub>, welches eine deutlich antiproliferative Wirkung erkennen lässt, wichtig. Der bisherige Einsatz von PGE<sub>2</sub> beschränkt sich auf die Geburtseinleitung und die Vermeidung einer mechanischen, möglicherweise traumatischen, Zervixdilataion. Problematisch bei einer neu zu entwickelnden onkologischen Therapie wäre u.a. die Applikationsform, da PGE<sub>2</sub> bislang lokal appliziert oder i.v. verabreicht wird. Bei Letzterer beträgt die Halbwertszeit (HWZ) lediglich 10-40 Minuten

(Tuber U., et al. 1993), was für die Ansprüche in der Onkologie sicher nicht ausreicht. Kontraindikationen für eine Anwendung sind eine Thyreotoxikose, Asthma und spastische Bronchitis, die Colitis ulcerosa, das Glaukom, eine Epilepsie, Nieren- oder Leberinsuffizienz, Diabetes mellitus und auch kardiovaskuläre Vorerkrankungen, wie Hypertonie und Herzinsuffizienz. Zum Teil sind dies Erkrankungen, die bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom nicht selten sind. Hier besteht durchaus noch Entwicklungsbedarf, um die geeignete Applikation zu finden und Nebenwirkungen zu minimieren.



**Abbildung 28:** Entstehung von Krebs und Krebsmetastasierung und mögliche Angriffspunkte karzinomwachstumstimulierender Substanzen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

**Einleitung:** Das Ovarialkarzinom ist eine der schwerwiegendsten bösartigen Erkrankungen im gynäkologischen Bereich mit einer Fünf- Jahres- Überlebensrate von lediglich 20 bis 40 %. Bei der Suche nach tumorwachstumsregulierenden Einflüssen fiel in der Vergangenheit mehrfach der Zusammenhang zwischen einer Stimulationstherapie im Rahmen einer Infertilitätstherapie mit humanem Choriongonadotropin (hCG) und einer erhöhten Inzidenz von Ovarialmalignomen auf. Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, steigt mit der Anzahl der stattgefundenen Ovulationen, die auch durch Prostaglandine reguliert werden. In der vorgelegten Untersuchung sollte der direkte Einfluss von hCG, sowie PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub> auf die Proliferation und Migration von Ovarialkarzinomzellen untersucht werden. **Material und Methoden:** Der Nachweis der Expression des hCG/LH-Rezeptors wurde durch Immunhistochemie (ABC-Methode) in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO 27 erbracht. Die Proliferation *in vitro* wurde mittels eines kolorimetrischen, nichtradioaktiven WST-1- Assays untersucht. Die Migration wurde mit Hilfe einer unbeschichteten modifizierten Boyden- Kammer beurteilt. Als mögliche Effektoren von Invasivität wurde die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie von Integrinen betrachtet. **Ergebnisse:** Es konnte gezeigt werden, dass die Prostaglandine, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2alpha</sub>, sowie die Aktivatoren der Adenylatzyklase (cAMP und Forskolin) die Proliferation signifikant hemmen. hCG dagegen hat eine stimulierende Wirkung auf die EFO 27 Zellen *in vitro* mit Zunahme der Migration um bis zu 570 % ohne Beeinflussung der Proliferation. Dabei zeigte sich durch gleichzeitige Inkubation mit Proteinkinase-C- Inhibitor (PKCI), dass die positive Wirkung von hCG auf die Migration teilweise reduziert wurde. Ebenfalls hemmend wirkten auf die Migration PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2alpha</sub> und Adenylatzyklase-Aktivatoren. MMP-9- Expression wurde durch hCG gehemmt. cAMP wirkte stimulierend auf TIMP-1- Expression. Die Expression von MMP-1 und MMP-2 wurde nicht verändert. Die Integrinexpression wird durch hCG nicht beeinflusst. Die alpha v- Expression wird durch PGF<sub>2alpha</sub> und cAMP, bzw. Forskolin, welches auch die alpha 4- Expression positiv beeinflusste, massiv gesteigert. **Zusammenfassung:** Migration der EFO 27- Zelllinie wurden durch hCG gesteigert, aber durch zusätzliche Inkubation mit PKCI, bzw. durch die Adenylatzyklaseaktivatoren teilweise reduziert. Unsere Ergebnisse lassen für die hCG- Wirkung

einen PKC- vermittelten Signalübertragungsweg annehmen, während der Einfluss von cAMP auf die Wachstumsregulation von Ovarialkarzinomen PKA- getriggert zu sein scheint.

## ABSTRACT

**Objective:** Ovarian carcinoma is one of the most severe gynecological diseases with a 5- year-survival rate between 20 and 40 %. It was proposed that hCG- treatment for ovulation induction might lead to an increased number of ovarian cancer. Furthermore increased prostaglandin levels of the malignant tissue were reported. Therefore we studied the direct influence of hCG, PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> on proliferation and migration of a human ovarian carcinoma cell line. **Material and Methods:** We used EFO-27 ovarian carcinoma cell line for our experiments. The hCG/LH-receptor expression was examined by immunohistochemistry. A non-radioactive, colorimetric WST-1 Assay was used to study cellular proliferation. Migration of EFO 27 cell was studied using a modified Boyden chamber. Furthermore the expression of matrixmetalloproteinases (MMP) and integrins was quantified by FACS and ELISA. **Results:** Proliferation was significantly decreased by both PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> as well as activators of the adenylatecyclase (db cAMP and forskolin). hCG did not influence proliferation but stimulated migration of EFO 27 cells. Additional incubation of EFO 27 with proteinkinase C-inhibitor (PKCI) partially reduced the promigratory effect of hCG. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> and adenylatecyclase-activators inhibited cellular migration. hCG decreased the expression of MMP-9. cAMP stimulated TIMP-1 expression. Expression of MMP-1 and MMP-2 was not influenced. Furthermore Integrin-expression was not influenced by hCG. Alpha v was stimulated by PGF<sub>2α</sub>, cAMP and forskolin. Alpha 4-expression was also stimulated by forskolin. **Conclusion:** Our data suggest hCG involvement in the regulation of the migration of the ovarian carcinoma cell line EFO 27 *in vitro*. Moreover PKC might be a part of hCG-mediated response.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Abe Y, Tsutsui T, Mu J, Kosugi A, Yagati H, Sobue K, Niwa O, Fujiwara H, Hamaoka T. A defect in cell-to-cell adhesion via integrin-fibronectin interactions in a highly metastatic tumor cell line. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:64-71.

Acevedo HF, Hartsock RJ. Metastatic phenotype correlates with high expression of membrane-associated complete beta-human chorionic gonadotropin *in vivo*. *Cancer*. 1996;78:2388-99.

Ackermann RC, Murdoch WJ. Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins* 1993;45:475-85.

Adewole IF, Babarinsa IA, Thomas JO, Ajayi AB. Ovarian cancer associated with ovulation induction: a case report. *Afr J Med Med Sci*. 1997;26:203-4.

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*. 1987;47:3239-45.

Allavena P, Dejana E, Bussolino F, Vecchi A, Mantovani A. Cytokine regulation of endothelial cells IN Balkwill. *Cytokines- a practical approach*. IRL Press 2. Aufl.:225-45.

Artini PG, Fasciani A, Cela V, Battaglia C, de Micheroux AA, D'Ambrogio G, Genazzani AR. Fertility drugs and ovarian cancer. *Gynecol Endocrinol*. 1997;11:59-68.

Aston KE, Stamouli A, Thomas EJ, Vyas S, Iredale JP, Arthur MJ, Richardson MC. Effect of gonadotrophin on cell and matrix retention and expression of metalloproteinases and their inhibitor on cultured human granulosa cells modelling corpus luteum function. *Mol Hum Reprod*. 1996;2:26-30.

Beltsos AN, Odem RR. Ovulation induction and ovarian malignancy. *Semin Reprod Endocrinol*. 1996;14:367-74.

Bennett A, Charlier EM, McDonald AM, Simpson JS, Stamford IF, Zebro T. Prostaglandins and breast cancer. *Lancet*. 1977;2:624-6.

Berridge MJ. The molecular basis of communication within the cell. *Sci Am*. 1985;253:142-52.

Boe R, Gjertsen BT, Doskeland SO, Vintermyr OK. 8-Chloro-cAMP induces apoptotic cell death in human mammary carcinoma cell (MCF-7) line. *Br J Cancer*. 1995;72:1151-9

Borden P, Heller RA. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1997;7:159-78.

Bothwell W, Verburg M, Wynalda M, Daniels EG, Fitzpatrick FA. A radioimmunoassay for the unstable pulmonary metabolites of prostaglandin E1 and E2: an indirect index of their *in vivo* disposition and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982;220:229-235.

Bottini C, Miotti S, Fiorucci S, Facheris P, Menard S, Colnaghi MI. Polarization of the alpha 6 beta 4 integrin in ovarian carcinomas. *Int J Cancer.* 1993;54:261-7.

Breyer RM, Davis LS, Nian C, Redha R, Stillman B, Jacobson HR, Breyer MD. Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP4 receptor. *Am J Physiol.* 1996;270:485-93.

Bristow RE, Karlan BY. Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. *Fertil Steril.* 1996;66:499-507.

Brown DM, Warner GL, Ales-Martinez JE, Scott DW, Phipps RP. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;63:221-9.

Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML, Joarder FS, Harris RE, Robertson FM. Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett.* 1999;140:27-35.

Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998;19:1-11.

Butler SA, Ikram MS, Mathieu S, Iles RK. The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free beta subunit of human chorionic gonadotrophin is a result of an anti-apoptosis effect and not cell proliferation. *Br J Cancer.* 2000;82:1553-6.

Carini C, Hudspeth BN, Brostoff J. Effect of prostaglandins and cyclic nucleotides on growth and immunoglobulin secretion of two IgE myeloma cell lines. *Br J Cancer.* 1981;43:257-60.

Carlson CC, Chinery R, Burnham LL, Dransfield DT. 8-Cl-adenosine-induced inhibition of colorectal cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Neoplasia* 2000;2:441-8

Carrasco MP, Asboth G, Phaneuf S, Lopez Bernal A. Activation of the prostaglandin FP receptor in human granulosa cells. *J Reprod Fertil.* 1997;111:309-17.

Carter CA, Milholland RJ, Shea W, Ip MM. Effect of the prostaglandin synthetase inhibitor indomethacin on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats fed different levels of fat. *Cancer Res.* 1983;43:3559-62.

Choung J, Taylor L, Thomas K, Zhou X, Kagan H, Yang X, Polgar P. Role of EP2 receptors and cAMP in prostaglandin E<sub>2</sub> regulated expression of type I collagen alpha 1, lysyl oxidase, and cyclooxygenase-1 genes in human embryo lung fibroblasts. *J Cell Biochem.* 1998;71:254-63.

Christen RD, Jekunen AP, Jones JA, Thiebaut F, Shalinsky DR, Howell SB. *In vitro* modulation of cisplatin accumulation in human ovarian carcinoma cells by pharmacologic alteration of microtubules. *J Clin Invest.* 1993;92:431-40.

Cohen E, Ophir I, Shaul YB. Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci* 1999;112:2657-66.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994;46:205-29.

Combarrous Y. Gonadotropins: Structure, synthesis, functions; Reproductions in Mammals and Man Eds. C. Thiebaut, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Ellipses, Paris 1993: 61-450

Crider JY, Griffin BW, Xu SX, Sharif NA. Use of a semi-automated, robotic radioimmunoassay to measure cAMP generated by activation of DP-, EP2-, and IP-prostaglandin receptors in human ocular and other cell types. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998;59:77-82.

Daneker GW, Lund SA, Caughman SW, Staley CA, Wood WC. Anti-metastatic prostacyclins inhibit the adhesion of colon carcinoma to endothelial cells by blocking E-selectin expression. *Clin Exp Metastasis.* 1996;14:230-8.

Davis JS, Alila HW, West LA, Corradino RA, Weakland LL, Hansel W. Second messenger systems and progesterone secretion in the small cells of the bovine corpus luteum: effects of gonadotropins and prostaglandin F2a. *J Steroid Biochem.* 1989;32:643-9.

Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, Soderkvist P. Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. *Gut.* 1999;45:730-2.

Dufau ML. The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:461-96.

Fedyk ER, Ripper JM, Brown DM, Phipps RP. A molecular analysis of PGE receptor (EP) expression on normal and transformed B lymphocytes: coexpression of EP1, EP2, EP3beta and EP4. *Mol Immunol.* 1996;33:33-45.

Feller N, Malachi T, Halbrecht I. Prostaglandin E<sub>2</sub> and cyclic AMP levels in human breast tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1979;93:275-80.

Filion F, Bouchard N, Goff AK, Lussier JG, Sirois J. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation *In Vivo.* *J Biol Chem* 2001;276:34323-30.

Fishman DA, Bafetti LM, Banionis S, Kearns AS, Chilukuri K, Stack MS. Production of extracellular matrix-degrading proteinases by primary cultures of human epithelial ovarian carcinoma cells. *Cancer.* 1997;80:1457-63.

Fishman DA, Bafetti LM, Stack MS. Membrane-type matrix metalloproteinase expression and

- matrix metalloproteinase-2 activation in primary human ovarian epithelial carcinoma cells. *Invasion Metastasis*. 1996;16:150-9.
- Francavilla A, Sabatini R, Ierardi E, Amoruso A, Panella C, Polimeno L, Restaino A, Selvaggi L. Cyclic nucleotides in ascites from ovarian carcinoma. *Horm Metab Res*. 1985;17:617-8.
- Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Wiley-Liss New York. 3. Aufl. 1993.
- Fukushima M, Kato T, Narumiya S, Mizushima Y, Sasaki H, Terashima Y, Nishiyama Y, Santoro MG. Prostaglandin A and J: antitumor and antiviral prostaglandins. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1989;19:415-8.
- Fulton AM. *In vivo* effects of indomethacin on the growth of murine mammary tumors. *Cancer Res*. 1984;44(6):2416-20.
- Fulton AM. Effects of indomethacin on the growth of cultured mammary tumors. *Int J Cancer*. 1984;33:375-9.
- Fulton AM, Heppner GH. Relationships of prostaglandin E and natural killer sensitivity to metastatic potential in murine mammary adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1985;45:4779-84.
- Fulton AM. Interactions of natural effector cells and prostaglandins in the control of metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 1987;78:735-41.
- Fulton AM, Laterra JJ, Hanchin CM. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor heterogeneity and dysfunction in mammary tumor cells. *J Cell Physiol*. 1989;139:93-9.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of chinese hamster ovary cells. *Cell* 1990;60:849-59.
- Gillott DJ, Iles RK, Chard T. The effects of beta-human chorionic gonadotrophin on the *in vitro* growth of bladder cancer cell lines. *Br J Cancer*. 1996;73:323-6.
- Giordano L, Moldwin RL, Downie PA, Goldberg A, Gupta R, Allen R, Aithal NH, Kim DH, Le Moine PJ, Smith SD. Growth inhibition of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cell lines by monocytes: a role for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Leuk Res*. 1997;21:925-32.
- Greenwood JA, Murphy-Ullrich JE. Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility. *Microsc Res Tech*. 1998;43:420-32.
- Hagstrom HG, Hahlin M, Bennegard-Eden B, Bourne T, Hamberger L. Regulation of corpus luteum function in early human pregnancy. *Fertil Steril*. 1996;65:81-6.

Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J*. 1993;296:803-9.

Harris SJ, Anthony FW, Jones DB, Masson GM. Pregnancy-specific-beta 1-glycoprotein: effect on lymphocyte proliferation *in vitro*. *J Reprod Immunol*. 1984;6:267-70.

Hauzenberger D, Klominek J, Sundqvist KG. Functional specialization of fibronectin-binding beta 1-integrins in T lymphocyte migration. *J Immunol*. 1994;153:960-71.

Hayashi H, Shimizu R, Fujii K, Itoh S, Yang D, Onozaki K. Resistance to IL-1 anti-proliferative effect, accompanied by characteristics of advanced melanoma, permits invasion of human melanoma cells *in vitro*, but not metastasis in the nude mouse. *Int J Cancer*. 1997;71:416-21.

Haynes DR, Whitehouse MW, Vernon-Roberts B. The prostaglandin E<sub>1</sub> analogue, misoprostol, regulates inflammatory cytokines and immune functions *in vitro* like the natural prostaglandins E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and E<sub>3</sub>. *Immunology*. 1992;76:251-7.

Hebert RL. Cellular signalling of PGE<sub>2</sub> and its selective receptor analogue sulprostone in rabbit cortical collecting duct. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1994;51:147-55.

Heinonen PK, Metsa-Ketela T. Prostanoids and cyclic nucleotides in malignant and benign ovarian tumors. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. 1988;5:11-5.

Heinonen PK, Metsa-Ketela T. Prostaglandin and thromboxane production in ovarian cancer tissue. *Gynecol Obstet Invest*. 1984;18:225-9.

Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Fidler IJ. A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants. *Cancer Lett*. 1987;38:137-47.

Honn KV, Bockman RS, Marnett LJ. Prostaglandins and cancer: a review of tumor initiation through tumor metastasis. *Prostaglandins*. 1981;21:833-64.

Hopfner M, Maaser K, Barthel B, von Lampe B, Hanski C, Riecken EO, Zeitz M, Scherubl H. Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y<sub>2</sub> receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int J Colorectal Dis* 2001;16:154-66.

Horio T, Kohno M, Kano H, Ikeda M, Yasunari K, Yokokawa K, Minami M, Takeda T. Adrenomedullin as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1995;77:660-4.

Huang LW, Garrett AP, Bell DA, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC. Differential expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and mRNA in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol*. 2000;77:369-76.

Huang RD, Smith MF, Zahler WL. Inhibition of forskolin-activated adenylate cyclase by ethanol and other solvents. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1982;8:385-94.

Ilvesmäki V, Blum WF, Voutilainen R. Insulin-like growth factor-II in human fetal adrenals: regulation by ACTH, protein kinase C and growth factors. *J Endocrin.* 1993;137:533-542.

Jacob K, Bosserhoff AK, Wach F, Knuchel R, Klein EC, Hein R, Buettner R. Characterization of selected strongly and weakly invasive sublines of a primary human melanoma cell line and isolation of subtractive cDNA clones. *Int J Cancer.* 1995;60:668-75.

Kalantarov G, Acevedo HF. Demonstration of dose dependent cytotoxic activity in cancer cells by specific human chorionic gonadotropin monoclonal antibodies. *Cancer* 1998;83:783-7

Kardana A, Taylor ME, Southall PJ, Boxer GM, Rowan AJ, Bagshawe KD. Urinary gonadotrophin peptide-isolation and purification, and its immunohistochemical distribution in normal and neoplastic tissues. *Br J Cancer.* 1988;58:281-6.

Karlson P et al. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* Georg Thieme Verlag Stuttgart 1994. 14. Aufl. S. 456 ff.

Karmali RA, Wustrow T, Thaler HT, Strong EW. Prostaglandins in carcinomas of the head and neck. *Cancer Lett.* 1984;22:333-6.

Kato T, Fukushima M, Kurozumi S, Noyori R. Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J<sub>2</sub> *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 1986;46:3538-42.

Kido A, Mori M, Adachi Y, Yukaya H, Ishida T, Sugimachi K. Immunohistochemical expression of beta-human chorionic gonadotropin in colorectal carcinoma. *Surg Today.* 1996;26:966-70.

Kikuchi Y, Miyauchi M, Oomori K, Kita T, Kizawa I, Kato K. Inhibition of human ovarian cancer cell growth *in vitro* and in nude mice by prostaglandin D<sub>2</sub>. *Cancer Res.* 1986;46:3364-6.

Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin alphavbeta3- mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem.* 2000;275:33920-8.

Kindahl H, Granstrom E, Edqvist LE, Eneroth P. Prostaglandin levels in peripheral plasma during the reproductive cycle. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res.* 1976;2:667-71.

Kisielewska J, Flint AP, Ziecik AJ. Phospholipase C and adenylate cyclase signalling systems in the action of hCG on porcine myometrial smooth muscle cells. *J Endocrinol.* 1996;148:175-80.

Kohda H, Mori T, Nishimura T, Kambegawa A. Co-operation of progesterone and prostaglandins in ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in immature rats primed with pregnant mare serum gonadotrophin. *J Endocrinol* 1983; 96:387-93.

- Kohno M, Yokokawa K, Kano H, Yasunari K, Minami M, Hanehira T, Yoshikawa J. Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertension*. 1997;29:1309-13.
- Konishi I, Kuroda H, Mandai M. Review: gonadotropins and development of ovarian cancer. *Oncology* 1999; 57:45-8.
- Kosec V, Bukovic D, Grubisic G, Fures R. Ovarian cancer and ovulation induction drugs- is there a link? *Coll Antropol*. 1999;23:633-9.
- Koyama N, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S. Regulatory effects of platelet-derived growth factor-AA homodimer on migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1992;267:22806-12.
- Kraling BM, Wiederschain DG, Boehm T, Rehn M, Mulliken JB, Moses MA. The role of matrix metalloproteinase activity in the maturation of human capillary endothelial cells in vitro. *J Cell Sci*. 1999;112:1599-609.
- Kuhn W and Meier W. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge- Maligne Ovarialtumoren. Tumorzentrum München 1998. 5. Aufl.
- Kunzmann R, Holzel F. Karyotype alterations in human ovarian carcinoma cells during long-term cultivation and nude mouse passage. *Cancer Genet Cytogenet*. 1987;28:201-12.
- Kurland JJ, Bockman RS, Broxmeyer HE, Moore MA. Limitation of excessive myelopoiesis by the intrinsic modulation of macrophage-derived prostaglandin E. *Science*. 1978;199:552-5.
- Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Yura Y, Tsuruta Y, Hamid AA, Nanbu K, Matsushita K, Mori T. Human chorionic gonadotropin (hCG) inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells: possible role of up-regulation of insulin-like growth factor-1 by hCG. *Int J Cancer*. 1998;76:571-8.
- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology*. 1998;139:1338-45.
- Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol*. 2001;15:184-200.
- Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration *in vitro*. *J Immunol*. 1995;154:4379-89.
- Licht P, Wildt L. Luteal and extraluteal receptors for hCG and LH. *Zentralbl Gynakol* 1998;120:98-105.
- Lindl, T. Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Spektrum: Akademischer Verlag Heidelberg. 4. Aufl. 2000.

- Lozano Y, Taitz A, Petruzzelli GJ, Djordjevic A, Young MR. Prostaglandin E<sub>2</sub>-protein kinase A signaling and protein phosphatases-1 and -2A regulate human head and neck squamous cell carcinoma motility, adherence, and cytoskeletal organization. *Prostaglandins*. 1996;51:35-48.
- Lu ZY, Bataille R, Poubelle P, Rapp MJ, Harousseau JL, Klein B. An interleukin 1 receptor antagonist blocks the IL-1-induced IL-6 paracrine production through a prostaglandin E<sub>2</sub>-related mechanism in multiple myeloma. *Stem Cells*. 1995;13:28-34.
- Luesley DM, Chan KK, Newton JR, Blackledge GR. Serial urinary cyclic guanosine monophosphate measurements in the assessment of response to treatment in epithelial ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol*. 1987;94:461-6.
- Maathuis JB, Kelly RW. Concentrations of prostaglandins F<sub>2α</sub> and E<sub>2</sub> in the endometrium throughout the human menstrual cycle, after the administration of clomiphene or an oestrogen-progestogen pill and in early pregnancy. *J Endocrinol*. 1978 ;77:361-71.
- Mackay AR, Ballin M, Pelina MD, Farina AR, Nason AM, Hartzler JL, Thorgeirsson UP. Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion Metastasis*. 1992;12:168-84.
- Mahleck CG, Grankvist K, Kjellgren O, Backstrom T. Human chorionic gonadotropin, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1990;36:219-25.
- Malachi T, Chaimoff C, Feller N, Halbrecht I. Prostaglandin E<sub>2</sub> and cyclic AMP in tumor and plasma of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1981;102:71-9.
- Mann SC, Andrews PA, Howell SB. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer*. 1991;48:866-72.
- Marui N, Sakai T, Hosokawa N, Yoshida M, Aoike A, Kawai K, Nishino H, Fukushima M. N-myc suppression and cell cycle arrest at G1 phase by prostaglandins. *FEBS Lett*. 1990;270:15-8.
- Mastino A, Piacentini M, Grelli S, Vavalli C, Autuori F, Tentori L, Oliviero S, Garaci E. Induction of apoptosis in thymocytes by prostaglandin E<sub>2</sub> *in vivo*. *Dev Immunol* 1992;2:263-71.
- Matsubara H, Ikuta K, Ozaki Y, Suzuki Y, Suzuki N, Sato T, Suzumori K. Gonadotropins and cytokines affect luteal function through control of apoptosis in human luteinized granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:1620-6.
- McCarthy TL, Ji C, Shu H, Casinghino S, Crothers K, Rotwein P, Centrella M. 17β-estradiol potently suppresses cAMP-induced insulin-like growth factor-I gene activation in primary rat osteoblast cultures. *J Biol Chem*. 1997;272:18132-9.



- Melamed MR. Flow cytometry detection and evaluation of bladder tumors. *J Occup Med.* 1990;32:829-33.
- Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 1993;73:161-95.
- Milanovich MR, Snyderman CH, Wagner R, Johnson JT. Prognostic significance of prostaglandin E<sub>2</sub> production by mononuclear cells and tumor cells in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope.* 1995;105:61-5.
- Miwa N, Sugino H, Ueno R, Hayaishi O. Prostaglandin induces Ca<sup>2+</sup> influx and cyclic GMP formation in mouse neuroblastoma X rat glioma hybrid NG108-15 cells in culture. *J Neurochem.* 1988;50(5):1418-24.
- Miwa M, Saura R, Hirata S, Hayashi Y, Mizuno K, Itoh H. Induction of prostaglandin E<sub>2</sub> through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2000.
- Monteiro JC, Barker G, Ferguson KM, Wiltshaw E, Neville AM. Ectopic production of human chorionic gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) by ovarian carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1983;19(2):173-8.
- Moser TL, Young TN, Rodriguez GC, Pizzo SV, Bast RC Jr, Stack MS. Secretion of extracellular matrix-degrading proteinases is increased in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer.* 1994;56(4):552-9.
- Munstedt K, Krisch M, Sachsse S, Vahrson H. Serum CA 125 levels and survival in advanced ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 1997;259(3):117-23.
- Munalulu BM, Hillier K, Peddie MJ. Effect of human gonadotrophin and indomethacin on ovulation, steroidogenesis and prostaglandin synthesis in preovulatory follicles of PMSG-primed immature rats. *J Reprod Fertil* 1987;80(1):229-234.
- Murata J, Corradin SB, Janzer RC, Juillerat-Jeanneret L. Tumor cells suppress cytokine-induced nitric-oxide (NO) production in cerebral endothelial cells. *Int J Cancer.* 1994;59(5):699-705.
- Murdoch WJ, Hansen TR, McPherson LA. A review- role of eicosanoids in vertebrate ovulation. *Prostaglandins.* 1993;46(2):85-115.
- Nakazawa I, Iwaizumi M, Ohuchi K. Some features in prostaglandin synthesis of the cancer cells which metastasized into liver from intestinal cancer lesions. *Tohoku J Exp Med.* 1993;170(2):131-3.
- Napgal ML, Wang D, Calkins JH, Chang W, Lin T. Human chorionic gonadotropin up-regulates Insulin like growth factor-1 receptor gene expression of Leydig cells. *Endocrinology* 1991;129:2820-6.

Narumiya S, Hirata N, Namba T, Hayashi Y, Ushikubi F, Sugimoto Y, Negishi M, Ichikawa A. Structure and function of prostanoid receptors. *J Lipid Mediat.* 1993;6(1-3):155-61.

Nijman HW, Burger CW, Baak JP, Schats R, Vermorken JB, Kenemans P. Borderline malignancy of the ovary and controlled hyperstimulation, a report of 2 cases. *Eur J Cancer.* 1992;28(12):1971-3.

Nishikawa A, Iwasaki M, Akutagawa N, Manase K, Yamashita S, Endo T, Kudo R. Expression of various matrix proteases and Ets family transcriptional factors in ovarian cancer cell lines: correlation to invasive potential. *Gynecol Oncol.* 2000;79(2):256-63.

Ormerod EJ, Hart IR. Different growth responses to agents which elevate cAMP in human melanoma cell lines of high and low experimental metastatic capacity. *Clin Exp Metastasis.* 1989;7(1):85-95.

Ormerod MG. *Flow cytometry- a practical approach.* IRL Press Oxford 1990.

Ottonello L, Gonella R, Dapino P, Sacchetti C, Dallegri F. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits apoptosis in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: role of intracellular cyclic AMP levels. *Exp Hematol* 1998;26:895-902.

Palmer D, Tsoi K, Maurice DH. Synergistic inhibition of vascular smooth muscle cell migration by phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 inhibitors. *Circ Res.* 1998;82(8):852-61.

Phipps RP, Lee D, Schad V, Warner GL. E-series prostaglandins are potent growth inhibitors for some B lymphomas. *Eur J Immunol.* 1989;19(6):995-1001.

Planchon P, Veber N, Magnien V, Prevost G, Starzec AB, Israel L. Evidence for separate mechanisms of antiproliferative action of indomethacin and prostaglandin on MCF-7 breast cancer cells. *Life Sci.* 1995;57(12):1233-40.

Planchon P, Veber N, Magnien V, Israel L, Starzec AB. Alteration of prostaglandin E receptors in advanced breast tumour cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;111(2):219-23.

Priddy AR, Killick SR. Eicosanoids and ovulation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1993;49(5):827-31.

Rabinovitz I, Nagle RB, Cress AE. Integrin alpha 6 expression in human prostate carcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype *in vitro* and *in vivo*. *Clin Exp Metastasis.* 1995;13(6):481-91.

Ramos DM, Cheng YF, Kramer RH. Role of laminin-binding integrin in the invasion of basement membrane matrices by fibrosarcoma cells. *Invasion Metastasis.* 1991;11(3):125-38.

Redman CW, Finn C, Ward K, Kelly K, Buxton EJ, Varma R, Shortland-Webb W, Luesley DM. Tumour cell activity markers in epithelial ovarian cancer: are biochemical and cytometric indices complementary? *Br J Cancer*. 1990;61(5):755-8.

Reich R, Martin GR. Identification of arachidonic acid pathways required for the invasive and metastatic activity of malignant tumor cells. *Prostaglandins*. 1996;51(1):1-17.

Reinisch N, Sitte BA, Kahler CM, Wiedermann CJ. Human chorionic gonadotrophin: a chemoattractant for human blood monocytes, neutrophils and lymphocytes. *J Endocrinol*. 1994;142(1):167-70.

Repesh LA. A new *in vitro* assay for quantitating tumor cell invasion. *Invasion Metastasis*. 1989;9(3):192-208.

Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70(2):421-30.

Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest*. 1991;87(1):1-5.

Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol*. 2000;17(4):673-81.

Santoro MG, Philpott GW, Jaffe BM. Dose dependent inhibition of B-16 melanoma growth *in vivo* by a synthetic analogue of PGE<sub>2</sub>. *Prostaglandins*. 1977;14(4):645-51.

Santoro MG, Philpott GW, Jaffe BM. Inhibition of tumour growth *in vivo* and *in vitro* by prostaglandin E. *Nature*. 1976;263(5580):777-9.

Sasaki H, Fukushima M. Prostaglandins in the treatment of cancer. *Anticancer Drugs*. 1994;5(2):131-8.

Weiss CH und Jelkmann W. Funktionen des Blutes IN Schmidt RF und Thews W. *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag Berlin 1995. 26. Aufl. 424 f.

Schmidt-Matthiesen H, Hepp H. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Schattauer Verlag Stuttgart 1998. 9.Aufl. S. 380 ff.

Scioscia KA, Snyderman CH, Rueger R, Reddy J, D'Amico F, Comsa S, Collins B. Role of arachidonic acid metabolites in tumor growth inhibition by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Otolaryngol*. 1997;18(1):1-8.

Scutt A, Zeschnigk M, Bertram P. PGE<sub>2</sub> induces the transition from non-adherent to adherent bone marrow mesenchymal precursor cells via a cAMP/EP<sub>2</sub>-mediated mechanism. *Prostaglandins*. 1995;49(6):383-95.

Sedlak J, Sedlakova O, Hlavcak P, Hunakova L, Bizik J, Grofova M, Chorvath B. Cell surface

phenotype and increased penetration of human multidrug-resistant ovarian carcinoma cells into *in vitro* collagen-fibroblasts matrix. *Neoplasma*. 1996;43(6):389-95.

Seftor RE, Seftor EA, Sheng S, Pemberton PA, Sager R, Hendrix MJ. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res*. 1998;58(24):5681-5.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E<sub>2</sub> in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-6.

Simon WE, Albrecht M, Hansel M, Dietel M, Holzel F. Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones. *J Natl Cancer Inst*. 1983;70(5):839-45.

Stamouli A, O'Sullivan MJ, Frankel S, Thomas EJ, Richardson MC. Suppression of matrix metalloproteinase production by hCG in cultures of human luteinized granulosa cells as a model for gonadotrophin-induced luteal rescue. *J Reprod Fertil*. 1996;107:235-9.

Stegner HE. *Gynäkologie und Genurtshilfe*. Enke-Verlag Stuttgart, 6. Aufl. 1996.

Sugatani J, Masu Y, Nishizawa M, Sakamoto K, Houtani T, Sugimoto T, Ito S. Hormonal regulation of prostaglandin F<sub>2α</sub> receptor gene expression in mouse ovary. *Am J Physiol*. 1996;271(4):686-93.

Teale DM, Khidair IA, Potter CW, Rees RC. Modulation of type IV collagenase and plasminogen activator in a hamster fibrosarcoma by basement membrane components and lung fibroblasts. *Br J Cancer*. 1988;57(5):475-80.

Thomas C et al. *Allgemeine Pathologie*. Schattauer Verlag Stuttgart 1994. S. 167 f.

Toth P, Li X, Rao CV, Lincoln SR, Sanfilippo JS, Spinnato JA 2nd, Yussman MA. Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(1):307-15.

Tsutsumi S, Haruna R, Tomisato W, Takano T, Hoshino T, Tsuchiya T, Mizushima T. Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 2002;47:84-9

Tuber U, Brudny-Kloppel M, Jakobs U, Madetzki C, Mahler M. Pharmacokinetics of nocloprost in human volunteers and its relation to dose. *Eur J Clin Pharmacol*. 1993;44(5):497-500.

Turner GA, Gregg S, Guthrie D, Benedetti Panici P, Ellis RD, Scambia G, Mancuso S. Monitoring ovarian cancer using urine cyclic GMP. A two-centre study. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1990;11(6):421-7.

Ulisse S, Farina AR, Piersanti D, Tiberio A, Cappabianca L, D'Orazi G, Jannini EA, Malykh O, Stetler-Stevenson WG, D'Armiento M, et al. Follicle-stimulating hormone increases the expression of tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 and induces AP-1 site binding complex(es) in prepubertal rat Sertoli cells. *Endocrinology* 1994;135:2479-87.

van Dam PA, Vergote IB, Laekeman GM, Keersmaeckers GH, Uyttenbroeck FL, Herman AG. Prognostic value of prostaglandin F<sub>2α</sub> concentrations in breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 1989;42(10):1046-8.

Vogelmann R, Kreuser ED, Adler G, Lutz MP. Integrin alpha 6 beta 1 role in metastatic behavior of human pancreatic carcinoma cells. *Int J Cancer.* 1999;80(5):791-5.

Wass M, Rawlins GA, Pentycross CR, Bagshawe KD. Response of lymphocytes from cancer patients to human chorionic gonadotrophin. *Lancet.* 1977;1(8004):171-2.

Watson ED, Sertich PL. Concentrations of arachidonate metabolites, steroids and histamine in preovulatory horse follicles after administration of human chorionic gonadotrophin and the effect of intrafollicular injection of indomethacin. *J Endocrinol* 1991;129(1):131-9

Weinel RJ, Rosendahl A, Pinschmidt E, Kisker O, Simon B, Santoso S. The alpha 6-integrin receptor in pancreatic carcinoma. *Gastroenterology.* 1995;108(2):523-32.

Welch DR, Lobl TJ, Seftor EA, Wack PJ, Aeed PA, Yohem KH, Seftor RE, Hendrix MJ. Use of the Membrane Invasion Culture System (MICS) as a screen for anti-invasive agents. *Int J Cancer.* 1989;43(3):449-57.

Wimalasena J, Meehan D, Dostal R, Foster JS, Cameron M, Smith M. Growth factors interact with estradiol and gonadotropins in the regulation of ovarian cancer cell growth and growth factor receptors. *Oncol Res.* 1993;5(8):325-37.

Wimalasena J, Dostal R, Meehan D. Gonadotropins, estradiol, and growth factors regulate epithelial ovarian cancer cell growth. *Gynecol Oncol.* 1992;46(3):345-50.

Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J Immunother.* 1997;20(3):165-77.

Woods J, Rigby S, Brinsko S, Stephens R, Varner D, Blanchard T. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E<sub>2</sub> prior to insemination of mares in the uterine horn or body. *Theriogenology* 2000;53(9):1827-36.

Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM, Goetzl EJ. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immun.* 1996.156:160-7.

- Xia M, Sreedharan SP, Dazin P, Damsky CH, Goetzl EJ. Integrin-dependent role of human T cell matrix metalloproteinase activity in chemotaxis through a model basement membrane. *J Cell Biochem.* 1996;61:452-458.
- Yang JH. Alterations of signal transduction pathways involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced malignant transformation of human cells in culture. *Chemosphere.* 1998;36(14):3015-31.
- Yasunari K, Kohno M, Hasuma T, Horio T, Kano H, Yokokawa K, Minami M, Yoshikawa J. Dopamine as a novel antimigration and antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells through dopamine D1-like receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):3164-73.
- Yoshihara T, Hibi S, Tsunamoto K, Todo S, Imashuku S. Increased levels of alpha V-associated integrins in association with growth inhibition of cultured tumor cells by bromodeoxyuridine. *Anticancer Res* 1997;17:833-8.
- Young MR, Newby M. Enhancement of Lewis lung carcinoma cell migration by prostaglandin E<sub>2</sub> produced by macrophages. *Cancer Res.* 1986;46(1):160-4.
- Young TN, Rodriguez GC, Rinehart AR, Bast RC Jr, Pizzo SV, Stack MS. Characterization of gelatinases linked to extracellular matrix invasion in ovarian adenocarcinoma: purification of matrix metalloproteinase 2. *Gynecol Oncol.* 1996;62(1):89-99.
- Yumoto N, Hatanaka M, Watanabe Y, Hayaishi O. Involvement of GTP-regulatory protein in brain prostaglandin E<sub>2</sub> receptor and separation of the two components. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;135(1):282-9.
- Zhang SZ, Fulton AM. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor modulation affects tumor cell adhesion to laminin. *J Cell Physiol.* 1991;149(2):208-13.
- Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P, Lang U. Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG *in vitro*. *Placenta.* 1998;19(8):587-93.

## 8 ABKÜRZUNGEN

cAMP- zyklisches AMP  
cGMP- zyklisches GMP  
COLO 704- humane Ovarialkarzinomzelllinie  
COX- Cyclooxygenase  
DAG- Diacylglycerol  
db cAMP- dibutryl cAMP  
EZM- Extrazellulärmatrix  
EFO 21- humane Ovarialkarzinomzelllinie  
EFO 27- humane Ovarialkarzinomzelllinie  
hCG- humanes Choriongonadotropin  
IP<sub>3</sub>- Phosphoinositol-3-Phosphat  
JEG 3- Chorionkarzinomzelllinie  
LH- luteinisierendes Hormon  
MMP- Matrixmetalloproteinasen  
MW- Mittelwert  
NSAR- nonsteroidale Antirheumatika  
OVCAR 3- humane Ovarialkarzinomzelllinie  
PA- Plasminogenaktivator  
PAI- Plasminogenaktivator- Inhibitor  
PG- Prostaglandin  
PKA- Proteinkinase A  
PKAI- Proteinkinase A- Inhibitor  
PKC- Proteinkinase C  
PKCI- Proteinkinase C- Inhibitor  
SD- Standardabweichung  
TIMP- tissue inhibitor of metalloproteinase

## 9 LEBENSLAUF

Nicole Patricia Kiesenbauer

Anschrift: Ludwig- Teleky- Str. 10  
59071 Hamm  
Tel: 02381/ 439144  
E-mail: Nicole@Kiesenbauer.de

Geburtsdatum: 03. 07. 1974  
Geburtsort: Rothenburg ob der Tauber

Eltern: Vater: Erich Andreas Kiesenbauer, Generalmajor  
Mutter: Renate Kiesenbauer, geb. Schärffenberg, Hausfrau

Ausbildung: 1980- 1983 Reilschule Aurich  
1983- 1984 Grundschule Swatten Weg, Hamburg- Lurup  
1984- 1985 Goethe - Gymnasium, Hamburg  
1985- 1987 Gymnasium Neunkirchen/ Siegerland  
1987- 1993 Konrad – Adenauer - Gymnasium,  
Meckenheim/ Rheinland  
  
1993 Eintritt in die Bundeswehr als  
Sanitätsoffizier-  
Anwärterin  
  
1994- 2000 Studium der Medizin an der Medizinischen  
Fakultät der Justus- Liebig- Universität,  
Gießen



2000- 2001 Ärztin im Praktikum,  
Bundeswehrkrankenhaus Hamm/ Westfalen

Seit 2001 Assistenzärztin,  
Bundeswehrkrankenhaus Hamm/Westfalen

## 10 DANKSAGUNG

Ich erhielt während meiner wissenschaftlichen Arbeit, die dieser Dissertation zu Grunde liegt, Hilfe und Unterstützung von vielen Seiten, sowohl auf menschlicher als auch fachlicher Ebene. Mein besonderer Dank gilt allerdings den folgenden Personen, da ohne sie diese Arbeit gewiss nicht entstanden wäre.

Herrn PD Dr. M. Zygmunt danke ich für die Vergabe des Themas, die herzliche Aufnahme in sein Team und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, auch während seines Forschungsaufenthaltes in Kanada.

Insbesondere bedanke ich mich bei Frau B. Gill und Frau Dr. med. vet. S. Keller- Schönwetter für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente, aber vor allem auch für ihre unkomplizierte und sympathische Art, mit der sie die Arbeitsatmosphäre in unserem Labor jederzeit angenehm machten.

Vielen Dank auch an Frau Dr. med. J. Wienhard für Unterstützung in vielen Fragen des organisatorischen Ablaufs und allen Aspekten des wissenschaftlichen Arbeitens allgemein und an Frau cand. med. F. Herr, die mir vor allem in der letzten Phase dieser Arbeit vielseitige Unterstützung auf allen Ebenen gewährte.

Frau D. Hahn danke ich für die gründliche und geduldige Einarbeitung in die Methodik und ihre Bereitschaft auch über ihre Tätigkeit in unserem Labor hinaus für alle Fragen zur Verfügung zu stehen.

Bei Herrn Prof. Dr. C.V. Rao und seinem Labor in den USA bedanke ich mich besonders für die Hilfsbereitschaft, mit ihrem Antikörper den hCG-Rezeptor an den EFO 27 Zellen nachzuweisen.

Herrn PD Dr. Braems danke ich für die technische Unterstützung bei vielen methodischen Fragen und seine unentbehrliche Hilfe bei der Auswertung der einzelnen Versuche

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn R. Stahl, Frau D. Ehler und alle MTAs des ehemaligen histologischen Labors und des klinischen Labors der Universitätsfrauenklinik in Gießen für ihre Hilfe, Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. J. Dudeck und Herrn W. Pabst danke ich für viele methodische Anregungen und ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Vielen Dank auch dem Labor von Prof. Dr. W. Seeger und Prof. Dr. J. Lohmeyer, und vor allem Herrn Dr. U. Maus und Frau R. Maus für die Durchführung und die Auswertung der FACS-Analysen.

Meiner Familie danke ich vor allem für Ihren Beistand, die Förderung meiner Motivation und ihre Geduld.

Schließlich möchte ich auch all meinen Freundinnen und Freunden danken, die mich in den vergangenen Jahren fortlaufend, vor allem emotional, unterstützt haben, auch wenn sie in vielen Dingen zurückstehen mussten.