

Frauenklinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar

der Technischen Universität München

Direktorin: Prof. Dr. Marion B. Kiechle

**Untersuchungen zur Rolle der CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 im
humanen Ovarialkarzinom und ihrer Modulation durch das
Cyclooxygenasesystem**

Judith Singer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Holger Bronger

2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 02.06.2020 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.12.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1. DAS HUMANE OVARIALKARZINOM	1
1.1.1. EPIDEMIOLOGIE	1
1.1.2. ÄTIOLOGIE	3
1.1.3. EINTEILUNG DER OVARIALTUMOREN	4
1.1.4. SYMPTOME UND FRÜHERKENNUNG	5
1.1.5. THERAPIE UND PROGNOSE	6
1.1.6. NACHSORGE	6
1.2. CHEMOKINE	7
1.2.1. ALLGEMEINES ZU CHEMOKINEN	7
1.2.2. KLASSIFIKATION DER CHEMOKINE	9
1.2.3. DIE GRUPPE DER CXC- CHEMOKINE	10
1.2.4. CXCR3 UND SEINE LIGANDEN	11
1.2.5. CXCR3-LIGANDEN UND TUMOR-INFILTRIERENDE LYMPHOZYTEN	12
1.2.6. TUMORIMMUNOLOGIE DES OVARIALKARZINOMS	13
1.3. DER EINFLUSS VON PROSTAGLANDINEN UND CYCLOOXYGENASEINHIBITOREN AUF DAS TUMORGESCHEHEN	14
1.4. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. MATERIALIEN	17
2.1.1. ÜBERBLICK	17
2.1.2. ZELLKULTUR	17
2.1.3. STIMULATIONSEXPERIMENTE	18
2.1.4. ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY (ELISA)	18
2.1.5. TRANSIENTE TRANSFEKTIONEN	19
2.2. ZELLINIEN UND IHRE KULTIVIERUNG	19
2.3. METHODEN	20
2.3.1. STIMULATIONSEXPERIMENTE	20
2.3.2. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	21
2.3.3. TRANSIENTE TRANSFEKTIONEN	22
2.3.4. STATISTISCHE METHODEN	23
3. ERGEBNISSE	25
3.1. DER EFFEKT INFLAMMATORISCHER ZYTOKINE AUF DIE SEKRETION DER CXCR3-LIGANDEN AUS HUMANEN OVARIALKARZINOMZELLEN	25
3.2. BETEILIGUNG INTRAZELLULÄRER SIGNALWEGE AN DER ZYTOKIN-INDUZIERTEN CXCR3-LIGANDENFREISETZUNG	30
3.2.1. DER NF- κ B- SIGNALWEG IN OVARIALKARZINOMZELLEN	30
3.2.2. DER JAK/STAT SIGNALWEG	38
3.3. DER EFFEKT VON PROSTAGLANDIN E₂ AUF DIE ZYTOKINABHÄNGIGE CHEMOKINSEKRETION	42
3.4. EINFLUSS DES CYCLOOXYGENASE (COX)-SYSTEMS AUF DIE CXCR3-LIGANDENSEKRETION AUS OVARIALKARZINOMZELLEN	45
3.4.1. UNSPEZIFISCHE COX-HEMMUNG: EINFLUSS VON INDOMETACIN	45
3.4.2. UNSPEZIFISCHE COX-HEMMUNG: EINFLUSS VON ACETYLSALICYLSÄURE (ASS)	48
3.4.3. COX-2-SPEZIFISCHE HEMMUNG: EINFLUSS VON CELECOXIB	49
3.5. CELECOXIBEFFEKTE AUF ZELLKERNEBENE	52
4. DISKUSSION	54
4.1. DER SYNERGISTISCHE EFFEKT VON TNF-ALPHA UND IFN-GAMMA	54
4.2. DIE VERBINDUNG DER SIGNALKASKADEN VON IFN-GAMMA UND TNF-ALPHA	55

4.3. DIE WIRKUNG VON PROSTAGLANDIN E₂ AUF DIE FREISETZUNG DER CXCR3-LIGANDEN	58
4.4. INHIBITION DES CYCLOOXYGENASESYSTEMS	60
4.4.1. INDOMETACIN	61
4.4.2. ASS	62
4.4.3. CELECOXIB	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	68
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	69
7. LITERATURVERZEICHNIS	72
DANKSAGUNG	82

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Das humane Ovarialkarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Krebs ist die häufigste Todesursache weltweit. Im Welt-Krebsbericht der WHO (International Agency for Research on Cancer, 2014) wurde die weltweite Zahl der Krebstoten im Jahr 2014 auf rund 8,2 Millionen Fälle geschätzt. Unter den gynäkologischen Tumorerkrankungen stellt das Ovarialkarzinom die tödlichste aller Krebserkrankungen dar und ist nach dem Endometriumkarzinom die zweithäufigste bösartige Erkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane. Es ist eine der häufigsten Krebstodesursachen der Frau in der westlichen Welt (Kandalaf et al., 2011). Nach Schätzungen der WHO erkranken weltweit jährlich circa 200 000 Frauen an einem malignen Ovarialtumor, demnach eine von 68 Frauen im Laufe ihres Lebens (Ferlay J, 2004). Nach dem Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Bronchialkarzinom und Endometriumkarzinom steht das Ovarialkarzinom in Deutschland mittlerweile an der fünften Stelle der Tumorinzidenzen der Frau. Gleiches gilt auch für die Mortalität (nach dem Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Bronchialkarzinom und Pankreaskarzinom; Gesellschaft epidemiologischer Krebsregister in Deutschland, 2008, kurz GEKID). Trotz intensiver Forschungsarbeit in den letzten Jahrzehnten, die auch durchaus zu Verbesserungen in der operativen und systemtherapeutischen Patientenversorgung geführt haben, bleiben die Überlebensraten nach wie vor gering (Rainczuk et al., 2012). Im Jahr 2010 lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei etwa 40% (RKI, Berlin). Das Tumorregister München von 2008 (verfügbar unter www.tumorregister-muenchen.de) gibt eine mittlere tumorbezogene Überlebenszeit von 2,4 Jahren an. Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland lag im Jahr 2010 bei 69 Jahren (RKI, Berlin), wobei familiäre Ovarialkarzinome durchschnittlich zehn Jahre früher auftreten als sporadische.

Betrachtet man die Inzidenz sowie die krebsbezogene Mortalität des Ovarialkarzinoms im internationalen Vergleich, erkennt man große Unterschiede zwischen den einzelnen Kontinenten.

Tabelle 1. Schätzungen der WHO (Globocan Projekt) aus dem Jahr 2002 von Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms im Ländervergleich

Kontinent/ Staat	Inzidenz (absolut)	Inzidenz (ASR*)	Mortalität (absolut)	Mortalität (ASR*)
Welt	204.499	6,6	124.860	4,0
Entwickelte Länder	96.769	10,2	62.248	5,7
Weniger entwickelte Länder	107.541	5,0	62.512	2,9
Ostafrika	4.706	5,8	3.340	4,1
Südafrika	1.003	5,2	612	3,2
Südamerika	12.794	7,7	6.108	3,7
Nordamerika	25.794	10,7	16.005	6,1
Süd-/ Zentralasien	32.559	5,3	22.813	3,8
Australien/Neuseeland	1.553	9,4	957	5,1
Südeuropa	11.649	9,4	6.431	4,5
Zentral-/Osteuropa	23.637	10,2	15.243	6,0
Nordeuropa	10.531	13,3	7.188	7,9
Westeuropa	17.650	11,3	12.162	6,3
USA	22.491	10,6	14.461	6,1
Dänemark	637	14,2	461	9,0
Schweden	873	11,4	645	7,2
Vereinigtes Königreich	6707	13,4	4.590	8,0
Frankreich	4720	9,7	3.377	5,7
Österreich	889	12,9	553	6,5
Deutschland	8572	12,0	5.981	6,6

*ASR: Altersstandardisierte Rate, hier bezogen auf die standardisierte Weltbevölkerung (Weltstandard). Altersstandardisierte Raten versuchen Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Ländern unterschiedlicher Größe und Bevölkerungsdichten zu erreichen und beziehen sich jeweils auf 100.000 Personen.

Tabelle in Anlehnung an die Daten von Ferlay, 2004

Wie sich anhand dieser Statistik erkennen lässt, ergibt sich innerhalb Europas ein deutliches Nord-/Südgefälle mit der höchsten Inzidenz in Skandinavien. Weiter zurückreichenden Zahlen aus dem Jahr 1992 zufolge hat das Ovarialkarzinom in Entwicklungsländern sowie ländlichen Regionen Japans eine Inzidenz von 2-4 auf 100 000 Frauen (Parkin, 1992). Aktuellen Zahlen zufolge (siehe Tabelle 1) ist die Inzidenz und krebsbedingte Mortalität in den entwickelten Ländern doppelt so hoch wie in den weniger entwickelten Ländern. Die Ursachen dafür sind nach wie vor nicht eindeutig geklärt, wobei

sicher nicht zuletzt die höheren Geburtenzahlen pro Frau in den weniger entwickelten Ländern eine Rolle spielen mögen.

1.1.2. Ätiologie

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist bislang weitgehend unbekannt. Wie bei vielen anderen Tumorerkrankungen steigt mit zunehmendem Alter das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Einer epidemiologischen Studie unter Migranten zufolge spielen Umwelteinflüsse bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms eine wichtigere Rolle als genetische Determination (Parkin, 1992). Frauen, die eine Hormonersatztherapie (HRT) in der Postmenopause durchführen, haben ein signifikant höheres Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, als Frauen ohne HRT (RKI, Berlin). Das Risiko sinkt aber nach Absetzen der HRT schnell wieder ab (Morch et al., 2009). Als Risikofaktoren diskutiert werden auch eine erhöhte Anzahl an Ovulationen, wie sie beispielsweise im Rahmen einer frühen Menarche sowie einer späten Menopause oder aber einer Kinderwunschbehandlung vorkommen, sowie das Syndrom der polyzystischen Ovarien; der Zusammenhang ist aber noch nicht eindeutig geklärt (RKI, Berlin). Auch ein Zusammenhang mit Ernährungsgewohnheiten wie der erhöhte Konsum an tierischen Fetten (Cramer et al., 1984) und Adipositas wurde beobachtet. Präventiv wirken orale Kontrazeptiva (Cameron, 2009), Schwangerschaften, Stillen sowie eine Tubenligatur in Kombination mit oder die alleinige Hysterektomie (Daly and Orams, 1998, Rainczuk et al., 2012, Seidman et al., 2002). Nulliparität und Infertilität gelten demnach als Risikofaktoren. Mehr als 90% der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf, 5-10% sind genetisch bedingt, vermutlich jedoch deutlich mehr (Kuschel et al., 2006). Aber auch bei den sporadischen Formen werden Mutationen beobachtet, am häufigsten die des p53-Tumorsuppressorgens in somatischen Zellen (Runnebaum et al., 1998), wobei bislang eine Reihe weiterer inaktivierter Tumorsuppressorgene im Ovarialkarzinom gefunden wurden. In den serösen G3-Ovarialkarzinomen ist die Mutation des p53-Tumorsuppressorgens in bis zu 80% der Fälle nachweisbar (Vang et al., 2009). Bei benignen Ovarialtumoren kommen diese Mutationen jedoch nicht vor, bei serösen Borderlinetumoren und niedriggradigen (G1) invasiven Ovarialkarzinomen nur sehr selten (Singer et al., 2005). Während die p53-Mutation klinisch bzw. therapeutisch bislang von untergeordneter Wichtigkeit ist, liefert sie biologisch betrachtet interessante Hinweise: ungünstige Prognose bei FIGO-I-Tumoren, Resistenz gegenüber platinhaltigen Zytostatika (Wen et al., 1999) sowie frühzeitige Metastasierung (Cho and Shih Ie, 2009). Von großer Wichtigkeit bei den genetisch

bedingten Ovarialkarzinomen sind das familiäre Brust- und Eierstockkrebssyndrom (Nahas, 1997) sowie das Lynch-II-Syndrom (HNPCC) mit Mutationen im MLH1- oder MSH2-Gen, seltener das Li-Fraumeni-Syndrom mit einer Keimbahnmutation im p53-Gen. Beim familiären Brust- und Eierstockkrebssyndrom spielen vor allem Mutationen der Hochrisikogene BRCA1 und BRCA2 eine wichtige Rolle. Frauen mit einer Mutation im BRCA1-Gen haben eine lebenslange Wahrscheinlichkeit von 45-55 Prozent an Eierstockkrebs zu erkranken, bei Mutationen im BRCA2-Gen 15-20 Prozent. Streng genommen gilt dies jedoch nur für Frauen aus Hochrisikofamilien (Meindl, 2013).

1.1.3. Einteilung der Ovarialtumoren

Weitestgehend durchgesetzt hat sich die von der Weltgesundheitsorganisation festgelegte Einteilung der Ovarialtumoren. Die WHO nimmt die Histogenese der Ovarialtumoren als Ausgangspunkt für die Einteilung. Unter den genuinen Tumoren des Ovars unterscheidet man drei große Gruppen: Keimzelltumore, Keimstrang-Stroma-Tumore und epitheliale Tumore, wobei die epithelialen Tumore mit Abstand die größte Gruppe darstellen und wiederum unterteilt werden können in benigne, maligne und Borderline-Tumore. Borderline-Tumore sind durch fehlende Stromainvasion definiert bei gleichzeitigem Vorhandensein von nukleärer Atypie, mitotischer Aktivität und Mehrreihigkeit des Epithels (Borges and Schmalfeldt, 2011). Das Ovarialkarzinom ist der häufigste aller malignen Tumoren des Ovars und entsteht durch maligne Transformation des ovariellen Deckepithels, ein einreihiges flaches bis kuboides Epithel („Keimdrüsenepithel“). Es kann in weitere histologische, therapierelevante Subtypen unterteilt werden: seröse, muzinöse, klarzellige, endometroide, Adeno- sowie undifferenzierte Karzinome des Ovars. Das serös-papilläre Zystadenokarzinom ist die häufigste Form des Ovarialkarzinoms, und wird weiter unterteilt in ein niedrigdifferenziertes (*high-grade*) und ein hochdifferenziertes (*low-grade*) Karzinom.

Eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielen auch die metastatischen Tumoren des Ovars wie beispielsweise der Krukenbergtumor welcher eine häufig beidseitige Ovarialmetastase eines diffusen Magenkarzinoms darstellt.

Für die klinische Einteilung mit Einfluss auf das chirurgische Vorgehen wird die FIGO-Klassifikation verwendet (siehe Tabelle 2 im Anhang). Weiter berücksichtigt bei der Therapieplanung wird das Grading der Tumorzellen, der Histologie kommt jedoch keine weitere Bedeutung zu- mit der Ausnahme, dass beim muzinösen Ovarialkarzinom die Appendix mitentfernt werden muss.

1.1.4. Symptome und Früherkennung

Zum Zeitpunkt der Diagnose haben die meisten Patientinnen ein fortgeschrittenes Tumorstadium im Sinne eines FIGO III oder IV (Menon et al., 2009). Das ist zu großen Teilen dadurch begründet, dass spezifische Symptome für das Ovarialkarzinom weitgehend fehlen (Rainczuk et al., 2012), sowohl im Frühstadium als oft auch in fortgeschrittenen Stadien. Unspezifische Symptome, die von den Patientinnen häufig beschrieben werden, sind eine Bauchumfangszunahme, bedingt durch den Aszites, Völlegefühl, unklare Gewichtsabnahme, neu aufgetretener Meteorismus, Harndrang und Veränderung des Stuhlverhaltens (Bankhead et al., 2005, Burges and Schmalfeldt, 2011). Häufig bemerken die Patientinnen erst dann eine Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes, wenn sich der Tumor auf Grund der intraperitonealen Lage der Ovarien bereits in der gesamten Bauchhöhle ausgebreitet hat und die Mengen an Aszites sowie die Tumormasse selbst Druck auf andere Organe ausüben. Anders als beim Mammakarzinom oder beim Zervixkarzinom (Kobayashi et al., 2012), gibt es derzeit keine Methode, die die Empfehlung für die Durchführung eines generellen Screenings für das Ovarialkarzinom rechtfertigt (Burges and Schmalfeldt, 2011). Weder vernünftige Biomarker zur Früherkennung noch effektive Screeninguntersuchungen sind bislang verfügbar (Rainczuk et al., 2012). Die transvaginale oder transabdominale Ultraschalluntersuchung mit oder ohne Dopplersonographie in der Normalpopulation kann zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms nicht empfohlen werden (Buys et al., 2005, Menon et al., 2009). Der Tumormarker CA 125 ist ein hochmolekulares Glykoprotein, das bei 80% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom erhöht ist (Bast et al., 1998). Allerdings findet sich im Stadium FIGO I lediglich bei der Hälfte aller Patientinnen ein erhöhter Wert (Van Nagell and Pavlik, 2012, Kobayashi et al., 2012). Somit ist die alleinige Bestimmung von CA 125 für die Früherkennung bei asymptomatischen Patientinnen wegen seiner niedrigen Sensitivität ungeeignet (Einhorn et al., 1992). Auch auf Grund seiner niedrigen Spezifität ist CA 125 als Biomarker für die Früherkennung ungeeignet: im Fall eines anderen Malignoms, wie beispielsweise eines Endometrium-, Brust-, Pankreas-, gastrointestinalen oder Lungenkarzinoms, aber auch beim Vorliegen einer gutartigen Erkrankung wie Hepatitis, Pankreatitis, der „pelvic inflammatory disease“, Endometriose, aber auch Zuständen wie Schwangerschaft oder Menstruation kann der CA 125 Spiegel erhöht sein (Kobayashi et al., 2012). Für das Monitoring der Tumorpatientinnen ist es allerdings der bislang am

häufigsten genutzte Biomarker: CA 125 korreliert besser mit dem klinischen Verlauf als andere Biomarker (Gadducci et al., 2004).

1.1.5. Therapie und Prognose

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht aus dem radikalen operativen Tumordebulking mittels Längslaparotomie sowie einer anschließenden Chemotherapie, wobei die Prognose maßgeblich vom Erfolg der Operation und somit von der verbleibenden Resttumormasse abhängt (Eisenhauer et al., 2006). Die Tumorresektionsraten sind stadienabhängig, mit zunehmendem FIGO- Stadium sind die Tumorresektionsraten abnehmend. Wichtige weitere Prognosefaktoren sind das FIGO-Stadium, der histologische Subtyp, das Grading sowie das vorhandene Aszitesvolumen. Da der postoperative Tumorrest der stärkste und gleichzeitig durch den Arzt beeinflussbare Prognosefaktor ist, stellt die leitliniengerechte Operation eine Hauptsäule der Therapie beim frühen und fortgeschrittenen Ovarialkarzinom dar. Bei der Operation werden auf jeden Fall entfernt: die Adnexen beidseits, der Uterus, das Omentum majus, verdächtige Areale des Peritoneums, beim muzinösen Subtyp die Appendix sowie – abhängig von Stadium und Befall – die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten. Bei fortgeschrittenen Befunden werden darüber hinaus alle makroskopisch tumorbefallenen Strukturen entfernt, was in vielen Fällen Multiorganeingriffe notwendig macht (Kunz and Makek, 2006). Mit Ausnahme eines ganz frühen Stadiums (IA G1) erfordert das Ovarialkarzinom eine platinbasierte adjuvante (Kombinations-)Chemotherapie, ggf. ergänzt durch den VEGF-Inhibitor Bevacizumab (Burger et al., 2011).

1.1.6. Nachsorge

Trotz einer leitliniengerecht durchgeführten Therapie erleiden ca. 70-80% der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom ein Tumorrezidiv. Ca. 98% der Tumorrezidive können anhand der Nachsorge durch eine ausführliche Anamnese, die körperliche Untersuchung inkl. gynäkologischem Ultraschall sowie die Bestimmung von CA 125 diagnostiziert werden (Fugunt et al., 2008). Allerdings wird nach aktuellen Leitlinien die regelmäßige Bestimmung von CA 125 bei asymptomatischen Patientinnen nach erfolgreicher Primärtherapie nicht empfohlen, da sich in einer prospektiven Studie trotz einer signifikant früheren Detektion des Rezidivs (Rustin et al., 2010, Gadducci et al., 2007) kein Vorteil für das Gesamtüberleben der Patientinnen zeigte. Jedoch wird das krankheits- und therapiefreie Intervall dadurch verkürzt und somit die Lebensqualität erheblich

beeinträchtigt. Gleiches gilt für die apparative Diagnostik: Die symptomfreie Patientin sollte keiner routinemäßigen apparativen Diagnostik unterzogen werden. Nur bei klinischem Verdacht auf ein Rezidiv ist eine weiterführende Bildgebung bzw. apparative Diagnostik empfohlen. Die S3-Leitlinie Ovarialkarzinom der AGO-Organisationskommission (www.ago-online.de) empfiehlt für die Nachsorge der symptomfreien Patientin nach Abschluss der Primärtherapie die sorgfältige Anamnese-Erhebung, die körperliche Untersuchung inklusive gynäkologischer Spiegel- und Tastuntersuchung, die rektale Untersuchung und die Vaginalsonographie zunächst alle drei Monate.

1.2. Chemokine

1.2.1. Allgemeines zu Chemokinen

Chemokine sind Botenstoffe des Immunsystems, die zu den Zytokinen gehören und sind eine Gruppe von Heparin-bindenden Molekülen mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 10 kDa (Mukaida and Baba, 2012). Der Name ist eine Abkürzung für den Begriff „chemotaktisches Zytokin“, der ihrer Funktion Ausdruck gibt: Chemokine induzieren eine zelluläre Chemotaxis, wobei sich die wandernden Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten hin zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration bewegen. Chemokine sind die entscheidenden Regulatoren bei der Wanderungsbewegung von Zellen (Rossi and Zlotnik, 2000), insbesondere jedoch bei der Migrationssteuerung von Leukozyten (Charo and Ransohoff, 2006). Beim Menschen sind etwa 50 verschiedene Chemokine sowie 20 Rezeptoren bekannt (Loetscher et al., 2000). Bei den Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen (Kiefer and Siekmann, 2011). Die Chemokine bestehen jeweils aus 70-130 Aminosäuren. Die Tertiärstruktur enthält bei allen Chemokinen einen Bereich einer dreisträngigen antiparallelen β -Faltblattstruktur (siehe Abbildung 1). Am C-Terminus befindet sich eine α -Helix, der Aminoterminus dagegen ist unspezifisch aber entscheidend für den weiteren Signalweg, da er mit dem jeweiligen Rezeptor interagiert (O'Hayre et al., 2008). Trotz großer struktureller Gemeinsamkeiten und der gemeinsamen Fähigkeit der Chemotaxis kann jedes Chemokin eine für sich spezifische Zellantwort hervorrufen (Kijowski et al., 2001).

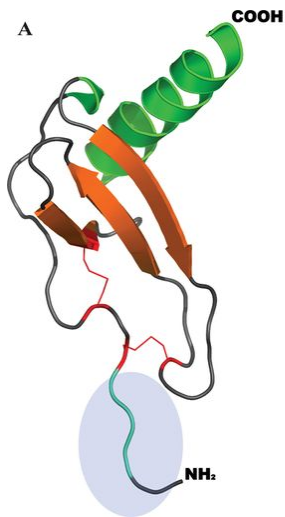


Abb. 1. Struktur des Interleukin-8-Monomers (CXCL8)

Beispielhafte Darstellung eines Chemokins aus der CXC-Gruppe. Der Aminoterminus ist grau hinterlegt. Dieser Teil des Liganden tritt in Interaktion mit dem Rezeptor. Zu sehen ist die für die Chemokine charakteristische dreisträngige β -Faltblatt-Struktur sowie eine α -Helix am C-Terminus des Proteins.

Übernommen von: Chemokines and cancer; migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment (O'Hayre et al., 2008).

Im Zusammenhang der Erforschung der Metastasierung von Tumorzellen gewannen die Chemokine in den letzten Jahren an Bedeutung. Metastasierung ist kein zufälliger Prozess, sondern zeigt vielmehr Vorlieben für bestimmte Gewebe (Muller et al., 2001). So zum Beispiel das Mammakarzinom, das bevorzugt in die regionären Lymphknoten sowie in Leber, Lunge und Knochen metastasiert. Sowohl die spezifischen Chemokinrezeptoren auf den jeweiligen Tumorzellen als auch die Lokalisation der korrespondierenden Liganden können Hinweise für ein Verständnis der Metastasierungswege geben (Muller et al., 2001). Präklinische Daten zeigen, dass einige Chemokine sowie die dazugehörenden Rezeptoren eine Rolle bei der Metastasierung spielen, indem sie die rezeptortragenden Tumorzellen an den Ort der Metastasierung lotsen, an dem die Liganden exprimiert werden (O'Hayre et al., 2008). In verschiedenen Tumorgeweben hat man festgestellt, dass die entarteten Zellen eine Überexpression von Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, verglichen mit ihrem normalen Ursprungsgewebe (Balkwill, 2004, Murakami et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung der Chemokine in Bezug auf das Ovarialkarzinom näher untersucht werden.

1.2.2. Klassifikation der Chemokine

Die Chemokine werden anhand der Anzahl und Anordnung zweier Cysteinreste am Aminoterminus in vier Familien eingeteilt. Wie bereits oben erwähnt, ist der Aminoterminus der Teil des Moleküls, der mit dem jeweiligen Rezeptor interagiert. Aus der Primärstruktur ergeben sich die Gruppen der C, CC, CXC und CX3C Chemokine, wobei X eine beliebige andere Aminosäure darstellt (Baggiolini, 1998, Luster, 1998, Rollins, 1997). Die Cysteinreste am Aminoterminus bilden mit anderen Cysteinen des Moleküls Disulfidbrücken aus. Jedes Chemokin enthält zwei für die Familie der Chemokine charakteristische Disulfidbrücken, abgesehen von den Chemokinen der C-Gruppe, die nur eine C-C-Gruppe aufweisen. Ergänzend werden die Buchstaben ‚R‘ für Rezeptor beziehungsweise ‚L‘ für Ligand angehängt. Der Aufbau der Chemokine ist in Abbildung 2 dargestellt.

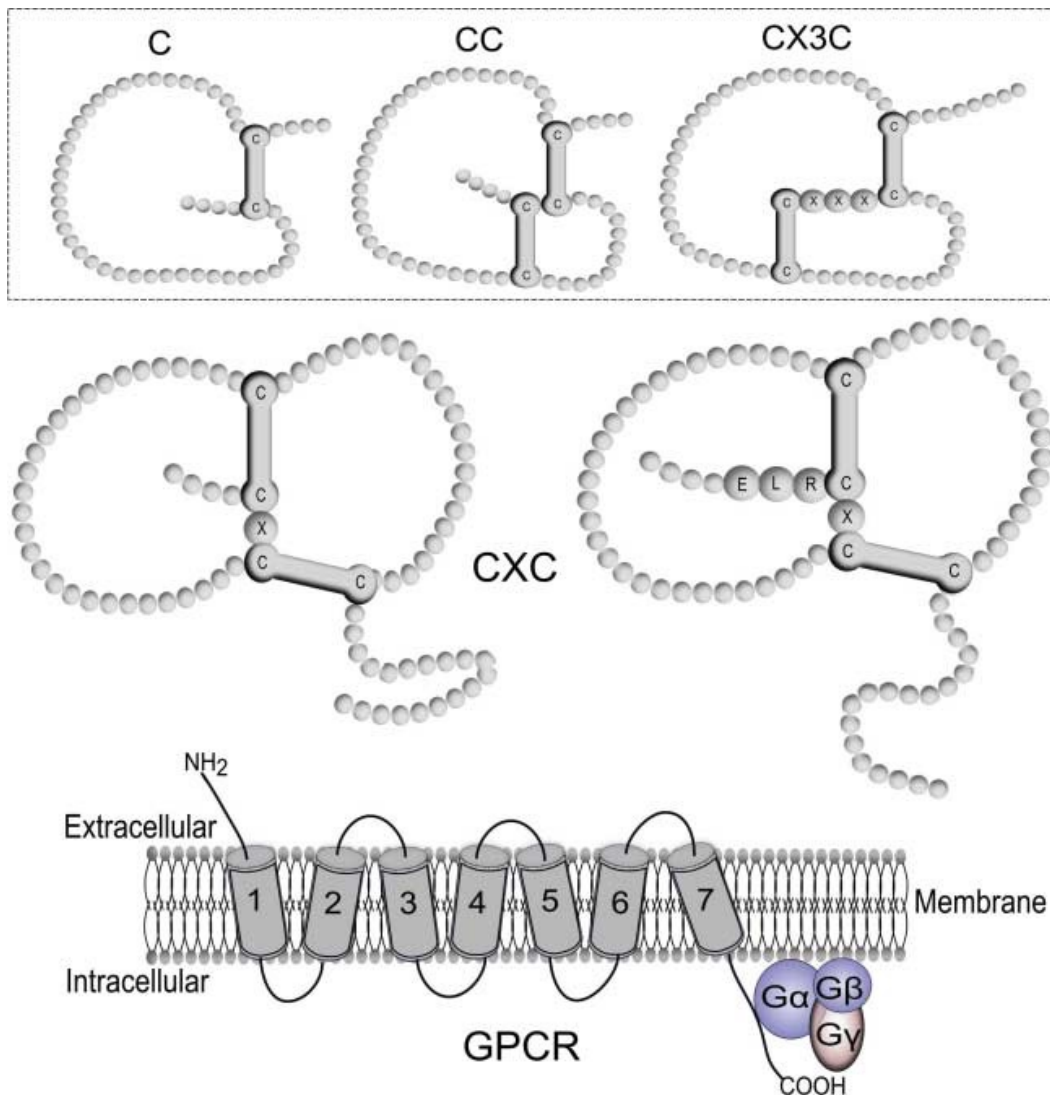


Abb. 2. Chemokine und ihr Rezeptor

Die intramolekularen Disulfidbrücken zwischen Cystein 1 und 3 sowie zwischen Cystein 2 und 4 führen zur typischen dreifachen β -Faltblattstruktur der Chemokine (mit Ausnahme der C-Untergruppe, die nur eine C-C Gruppe hat). In Abhängigkeit des Vorhandenseins des ELR-Motifs, werden die Chemokine weiter unterteilt. Chemokine binden an ihren entsprechenden G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR), der sieben Transmembrandomänen umfasst.

Übernommen aus Rainczuk et al., 2012.

1.2.3. Die Gruppe der CXC- Chemokine

Neben ihrer chemotaktischen Funktion spielen die CXC Chemokine eine duale Rolle bei der Angiogenese und vermitteln je nach Gruppenvertreter sowohl deren Induktion, als auch deren Inhibition. Auf Grund dieser Eigenschaft gewinnen die CXC-Chemokine immer mehr an Bedeutung für das Ovarialkarzinom (Rainczuk et al., 2012), denn das Ovarialkarzinom stellt, wie auch andere Tumoren des weiblichen Genitaltraktes, einen besonders gut kapillarisierten Tumor dar (Abulafia et al., 1999). Ein wachsender Tumor braucht viel

Energie für die zahlreichen Zellteilungen, insbesondere in Form von Glukose. Somit spielt die Angiogenese, also die Bildung neuer Kapillargeflechte aus bereits bestehenden, eine entscheidende Rolle bei Tumorwachstum und -ausbreitung (Kiefer and Siekmann, 2011). Die CXC-Chemokine werden unterteilt in ELR-positive und ELR-negative Chemokine (s. Abbildung 2). Die ELR-Gruppe ist eine kurze Sequenz, bestehend aus drei Aminosäuren, nämlich Glutaminsäure, Leucin und Arginin, die der CXC-Sequenz vorausgehen (Strieter et al., 2004, Baggiolini, 1998). Vereinfacht kann man sagen, dass Chemokine der ELR-negativen Untergruppe angiostatische Wirkung haben, vermittelt über den CXCR3-Rezeptor (Mukaida and Baba, 2012), die Chemokine der ELR-positiven Untergruppe dagegen angiogenetischen Effekte durch den CXCR2-Rezeptor vermitteln (Rainczuk et al., 2012).

1.2.4. CXCR3 und seine Liganden

Der CXCR3-Rezeptor ist einer von 18 verschiedenen Chemokinrezeptoren, die zur Gruppe der 7-Transmembrandomänenrezeptoren und somit zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gezählt werden (Kiefer and Siekmann, 2011). Der CXCR3-Rezeptor wird hauptsächlich auf Zellen des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems wie beispielsweise aktivierten T- und natürlichen Killer (NK)- Zellen sowie dendritischen Zellen exprimiert (Wennerberg et al., 2015, Qin et al., 1998, Dagan-Berger et al., 2006), aber auch auf Fibroblasten, glatten Muskelzellen sowie Epithel- und Endothelzellen (Van Raemdonck et al., 2015). Der CXCR3-Rezeptor kann konstitutiv exprimiert sein, aber auch im Rahmen inflammatorischer Prozesse induziert werden (Dagan-Berger et al., 2006, Kuo et al., 2018). Es werden zwei Splicevarianten des CXCR3-Rezeptors unterschieden, CXCR3A und CXCR3B (Li et al., 2019, Smith et al., 2017), die sich durch 51 (bzw. bei manchen Autoren 52) Aminosäuren am N-Terminus unterscheiden (Kuo et al., 2018, Metzemaekers et al., 2017). Die Liganden beider Splicevarianten sind die ELR-negativen Chemokine CXCL9/MIG (monokine induced by gamma interferon), CXCL10/IP10 (interferon- γ inducible protein of 10kDa) und CXCL11/I-TAC (interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) (Dagan-Berger et al., 2006, Wu et al., 2012, Van Raemdonck et al., 2015, Smith et al., 2017). CXCR3B konnte außerdem als Rezeptor für CXCL4/PF4 (platelet factor 4) identifiziert werden (Lasagni et al., 2003). Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit liegt auf CXCL9 und CXCL10.

Die Splicevarianten des CXCR3 sind an unterschiedliche Signalkaskaden gekoppelt und vermitteln somit, auch in Abhängigkeit vom jeweiligen Liganden, unterschiedliche

Funktionen (Berchiche and Sakmar, 2016). CXCR3A, die häufigste Splicevariante, wird hauptsächlich von Zellen des Immunsystems exprimiert und seine wesentliche Rolle liegt in der Chemotaxis von aktivierten T- und NK-Zellen (Romagnani et al., 2004). Er vermittelt überwiegend proliferative Effekte (Urta et al., 2018). CXCR3B dagegen wird überwiegend von Endothelzellen exprimiert (Lasagni et al., 2003) und vermittelt angiostatische Effekte (Van Raemdonck et al., 2015), überwiegend durch die Förderung von Apoptose (Urta et al., 2018) sowie die Hemmung der Wanderungsbewegung von Zellen.

1.2.5. CXCR3-Liganden und Tumor-infiltrierende Lymphozyten

Die CXCR3-Liganden spielen zum einen über die Rekrutierung der Zellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems eine sehr wichtige Rolle im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen, aber auch im Zusammenhang mit bösartigen Tumorerkrankungen. Deshalb kommt ihnen in den letzten Jahren eine immer wichtigere Bedeutung im Bereich der Tumorummunologie zu.

Eine hohe intratumorale Konzentration an CXCR3-Liganden ist assoziiert mit einer höheren Lymphozyteninfiltration in Tumoren, den sogenannten TILs (Tumor-infiltrierende Lymphozyten). Diese TILs wiederum hemmen das Tumorwachstum, beeinträchtigen die Metastasierung von Tumorzellen und tragen so zu einem verbesserten Überleben bei verschiedenen bösartigen Tumorerkrankungen bei (Zhang et al., 2003, Denkert et al., 2010, Suyama et al., 2005, Kondo et al., 2004). Studien an Patienten mit Nierenzellkarzinom deuten darauf hin, dass die intratumorale Expression von CXCL9 und CXCL10 mit erhöhter Infiltration des Tumors mit CD8⁺-T-Lymphozyten korreliert und damit mit schrumpfender Tumorgröße und niedrigeren Rezidivraten nach Tumoresektion (Kondo et al., 2004). Indem sie zu einer vermehrten Restriktion der MHC-Klasse I Moleküle durch die Tumorzellen führen, erleichtern sie es den Zellen des Immunsystems, den Tumor zu erkennen. Die Fähigkeit von CXCL9 und CXCL10, eine tumorunterdrückende Zellantwort hervorzurufen, wird auch vermittelt durch ihre Rolle als Mediatoren von IL 12, einem potenten immunregulatorischen Zytokin (Whitworth and Alvarez, 2011). Auf der Grundlage dieser Beobachtungen besteht die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten, die daran ansetzen, den T-Zellen das Einwandern in Tumoren zu erleichtern (Abastado, 2012) sowie die Akkumulation von NK Zellen in Tumoren zu steigern (Wendel et al., 2008). Eine Erhöhung der intratumoralen Chemokinkonzentration könnte also durch die erhöhte Infiltration des Tumors mit TILs zu einer verbesserten Überwachung des Tumors durch das Immunsystem führen und somit als

immuntherapeutischer Ansatz oder zumindest als Adjuvans für andere Immuntherapien wie z.B. Immuncheckpoint-Inhibitoren genutzt werden (Kohrt et al., 2012).

1.2.6. Tumorimmunologie des Ovarialkarzinoms

Im gesunden Ovar spielen Chemokine eine wichtige Rolle: die Ovulation führt zu Schäden am Deckepithel und die damit verbundenen Reparaturmechanismen führen zu einer Immunantwort mit Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren (Rainczuk et al., 2012). Das im gesunden Ovar konstitutiv exprimierte CXCL10 steigt somit während der Ovulation weiter an (Rainczuk et al., 2012). Aber auch bei der Bildung und Ausbreitung des Ovarialkarzinoms sind Chemokine von großer Bedeutung, zum einen über die Beeinflussung der Angiogenese und damit verbunden der Verlangsamung des Tumorwachstums (Luster et al., 1995, Rainczuk et al., 2012, Strieter et al., 2004), zum anderen, wie oben bereits ausgeführt, durch die Überwachung des Tumors durch das eigene Immunsystem, den TILs. Die Zahl der TILs steht in engem Zusammenhang mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben sowie dem Gesamtüberleben im Ovarialkarzinom (Zhang et al., 2003, Sato et al., 2005). Anhand dieser Beobachtung verstärkte sich in den letzten Jahren der Eindruck, dass Ovarialkarzinome immunogene Tumore sind. Darüber hinaus ist die Zusammensetzung des Tumormilieus an TILs assoziiert mit dem Ansprechen der Tumoren auf Chemotherapie sowie dem operativen Erfolg in Hinblick auf die maximale Zytoreduktion (Gasparri et al., 2015). Somit hat das Thema Tumorimmunologie beim Ovarialkarzinom wie auch bei vielen anderen Tumoren in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zahlreiche Arbeiten haben einen sogenannten ‚immunoreaktiven‘ Subtyp des serösen Ovarialkarzinoms identifiziert, der mit einer günstigeren Prognose der Erkrankung einhergeht (TCGA, Nature 2015; Tothill et al., 2008). Hinweise auf einen protektiven Effekt von CXCR3-Chemokinen kommen beispielsweise aus einer Arbeit, die bei einer Patientin mit Ovarialkarzinom über Jahre des Krankheitsverlaufs sequentielle aber auch simultane Proben aus verschiedenen Metastasenlokalisationen genommen und untersucht haben: CXCL9 war eines der am stärksten hochregulierten Gene in den Metastasen, die auch nach Jahren noch stabil oder unter Therapie rückläufig waren (Jimenez-Sanchez et al., Cell 2018). Eine immunhistochemische Analyse von 148 Fällen fortgeschrittener, seröser Ovarialkarzinome, hat gezeigt, dass eine hohe Expression der Tumoren von CXCL9 und CXCL10 mit einem näherungsweise verdoppelten Gesamtüberleben assoziiert ist (Bronger et al., 2016). In der gleichen Arbeit korrelierte die Expression der beiden CXCR3 Liganden

signifikant mit der Anzahl der TILs. Es gibt Hinweise darauf, dass die CXC-vermittelte Regulation des Tumormikromilieus im Ovarialkarzinoms maßgeblich von den beiden Chemokinen CXCL9 und 10 abhängt (Qin et al., 1998, Yuan et al., 2001, Furuya et al., 2007, Lasagni et al., 2003). Somit könnten diese beiden Chemokine vielversprechende Angriffspunkte für die Therapie des Ovarialkarzinoms sein.

1.3. Der Einfluss von Prostaglandinen und Cyclooxygenaseinhibitoren auf das Tumorgeschehen

Prostaglandine sind kleine Eicosanoide, die ausgehend von der Arachidonsäure synthetisiert werden. Hierbei stellt die Cyclooxygenase das Enzym dar, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Synthesekette katalysiert. Man unterscheidet zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase, COX-1 und COX-2. Die COX-1 wird konstitutiv in den Zellen der meisten menschlichen Geweben exprimiert, während die COX-2 durch entzündliche Prozesse induziert wird, beispielsweise vermittelt durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Onkogene (DuBois, 2004). Während Acetylsalicylsäure und Indometacin Vertreter der nichtselektiven COX-Inhibitoren sind, stellen Coxibe (z.B. Celecoxib) selektive COX-2-Inhibitoren dar.

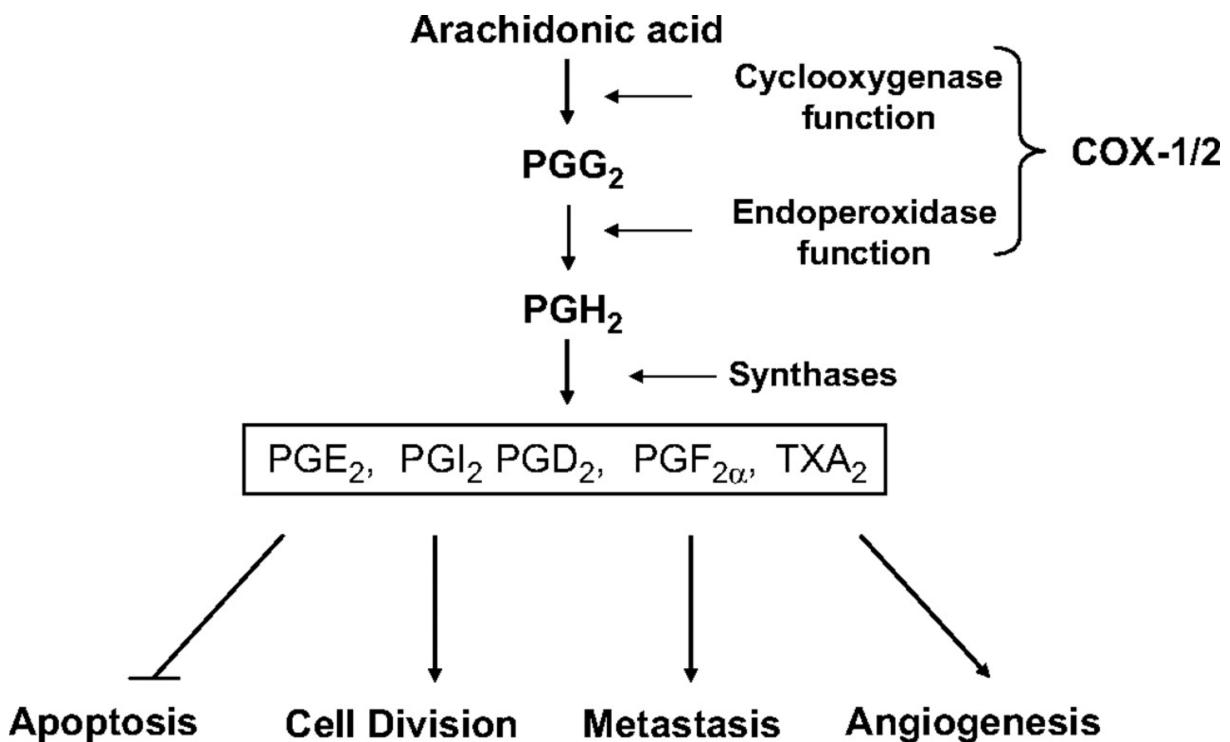


Abb. 3. Das Cyclooxygenase- (COX) System und seine Bedeutung für die Tumorentstehung.

COX-1/2 katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H, welches wiederum durch verschiedene Prostaglandinsynthetasen zu PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α} und TXA₂ umgewandelt wird. Diese Prostaglandine fördern Zellteilung, Metastasierung und Angiogenese. Außerdem hemmen sie die Apoptose, was in Summe zu einem verstärkten Tumorwachstum führt.

Übernommen von: Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Independent Anticarcinogenic Effects of Selektive COX-2 Inhibitors (Grosch et al., 2006).

Es ist mittlerweile mehrfach gezeigt worden, dass die COX-2 Überexpression assoziiert ist mit aggressivem Verhalten sowohl von Mammakarzinomzellen als auch von Zellen anderer bösartiger Tumoren (Fulton et al., 2006). Für das Mammakarzinom konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die selektive Hemmung beider COX-Isoenzyme ebenso wie der Einsatz des nichtselektiven COX-Inhibitors Indometacin das Wachstum und die Metastasierung dieser Tumorentität hemmen kann. Der Einsatz sowohl von selektiven COX-1- als auch von COX-2-Inhibitoren hemmt die Zellreplikation, indem die Anzahl der Zellen, die sich in der G₀/G₁ Phase befinden, signifikant zunimmt und die Zahl der Zellen in der S-Phase deutlich abnimmt (Kundu et al., 2002).

Die immunmodulatorische Komponente der Tumorchemmung durch COX-Inhibitoren konnte beim Mammakarzinom insofern demonstriert werden, als dass der therapeutische Effekt von Indometacin abhängig von NK-Zellen war (Kundu et al., 2005). Für die vorliegende Arbeit war die Frage nach einem Zusammenhang zwischen dem CXCR3-Chemokin- und dem Cyclooxygenasesystem von Interesse. An Mammakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass die IFN- γ -vermittelte Freisetzung von CXCL9 und CXCL10 durch Prostaglandin E₂ deutlich reduziert wird, wohingegen die Hemmung der endogenen Cyclooxygenaseaktivität, etwa durch Indometacin oder Acetylsalicylsäure, in diesen Zellen zu einer erhöhten Produktion der CXCR3-Liganden führt (Bronger et al., 2012). Die Überexpression von Prostaglandinen im Ovarialkarzinom erhöht die Invasivität der Tumorzellen, indem die Expression von Zytokinen und Chemokinen verändert wird (Ness and Modugno, 2006). Wie bereits weiter oben ausgeführt, korreliert die intratumorale Konzentration an CXCR3-Liganden mit der Anzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs). Präklinische Daten zeigen, dass eine Überexpression der beiden COX-Isoenzyme COX-1 und COX-2 mit einer niedrigeren Zahl an TILs und damit einer schlechteren Prognose des Ovarialkarzinoms assoziiert ist (Liu et al., 2009, Denkert et al., 2002). Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde für die vorliegende Arbeit die Hypothese

aufgestellt, dass die Hemmung der COX zu einer erhöhten Infiltration des Tumors mit TILs führt, indem die Expression der CXCR3 Liganden durch die Ovarialkarzinomzellen induziert wird. Das COX-System wäre somit ein möglicher pharmakologischer Angriffspunkt, um die intratumorale Konzentration an CXCR3 Liganden zu erhöhen. In Anbetracht der Tatsache, dass einige COX-Inhibitoren mit genau definiertem pharmakologischem Profil verfügbar sind, wäre es dann eventuell möglich, zukünftigen Immuntherapien des Ovarialkarzinoms COX-Inhibitoren beizufügen.

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Signalkaskaden, die die Freisetzung von CXCR3-Chemokinen aus Ovarialkarzinomzellen vermitteln, besser zu verstehen. Darüber hinaus gilt es, den Einfluss von Cyclooxygenase-Inhibitoren auf die CXCR3-Ligandenexpression in Ovarialkarzinomzellen systematisch zu untersuchen, um die Grundlage für eine therapeutische Nutzbarkeit zu legen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Überblick

Verbrauchsmaterialien und Substanzen:

Pipettenspitzen und EppendorfgeläÙe von der Firma Sarstedt AG&Co (Nürnberg), Falcons und Stabpipetten von der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen).

Alle verwendeten Chemikalien entsprechen p.a. Qualität und wurden, sofern weiter unten nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) oder von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Folgende technische Geräte kamen zum Einsatz:

Sicherheitswerkbank: Hera safe von Heraeus (Hanau)

Inkubator: Hera cell 150i CO2 incubator von Thermo Fisher Scientific™ (Waltham, MA, USA)

Mikroskop: Axiovert 25 von Zeiss (Jena); CK 30 von Olympus Scientific Solutions (Waltham, USA)

Lumat: Lumat 3, LB 9508 von Berthold (Pforzheim)

Zentrifuge für EppendorfgeläÙe: 5424R von Eppendorf (Hamburg)

Zentrifuge für Zellkultur: Rotina 48R von Hettich (Tuttlingen); Labofuge 400R, Function line, Heraeus instruments (Hanau)

Vakuum Konzentrator: Speed Vac SVC 100 von Savant™, Thermo Fisher Scientific™ (Waltham, MA, USA)

Pipetten: Eppendorf (Hamburg), Gilson (Middleton, WI, USA), Thermo labsystems (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA)

2.1.2. Zellkultur

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetales Kälberserum (FCS), Gentamycin, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-PiperazinethansulfonsäÙe (HEPES), Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) stammten von Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA).

Die dem Medium zugesetzten AminosäÙen Asparagin und Arginin wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) erworben.

Die zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen verwendete EthylendiamintetraessigsäÙe (EDTA) stammte von der Firma Biochrom AG (Berlin).

Die Zellkulturflaschen zur Kultivierung der Zellen wurden sowohl von der Firma Sarstedt AG&Co (Nürnbrecht), als auch von Greiner Bio-One bezogen, die für die Stimulationsexperimente benötigten Zellkulturplatten von der Firma Falcon.

Zellkulturmedien:

Hungermedium:	Komplettmedium:
500ml DMEM	Hungermedium + 10% (v/v) FCS
10 mM HEPES (1M)	
550 mM Arginin	Einfriermedium:
272 mM Asparagin	FCS + 5% Dimethylsulfoxid (DMSO)
20 µg/ml Gentamycin	

2.1.3. Stimulationsexperimente

Rekombinantes humanes Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) waren von PeproTech (Hamburg) und wurden in bovinem Serumalbumin (BSA) rekonstituiert, Prostaglandin E₂ (PGE₂), Indometacin und Celecoxib wurde von der Firma Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) geliefert und in DMSO rekonstituiert. JAK-Inhibitor I stammte von Merck (Darmstadt) und die NF- κ B Inhibitoren N-*p*-Tosyl-L-Phenylalaninchloromethyl Keton (TPCK) sowie (E)-3-(4-Methylphenylsulfonyl)-2-Propenenitril (BAY 11-7082) stammten von Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA). Die Inhibitoren wurden ebenfalls in DMSO rekonstituiert.

2.1.4. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Der für die Quantifizierung der beiden Chemokine CXCL9 und CXCL10 durchgeführte ELISA wurde unter Verwendung der beiden DuoSets ELISA Kit DY392 (CXCL9) und DY266 (CXCL10) von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) durchgeführt. Die DuoSets enthalten den Erstantikörper (capture antibody (CA)), Zweitantikörper (detection antibody (DA)), den Standard (rekombinantes Chemokin) sowie das mit der Meerrettich-Peroxidase konjugierte Streptavidin. Das verwendete Bovine Serumalbumin 1470 (BSA) sowie Tween 20 stammten von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), die Substrate der Meerrettich-Peroxidase Reagenz A, bestehend aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) sowie Reagenz B, bestehend aus Tetramethylbenzidin, waren von Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) und wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Nunc™ MicroWell™ 96-Well Platten aus

Polypropylen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) wurden für den ELISA verwendet.

Für die Auswertung der ELISA- Platten stand folgendes Photometer zur Verfügung: SLT Spectra Elisa Reader, Software easy WIN fitting E 5.0 a (SLT, Crailsheim).

Außerdem kamen folgende Lösungen zum Einsatz:

PBS: pH 7,4

137 mM Natriumchlorid (NaCl)

2.7 mM Kaliumchlorid (KCl)

8.1 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)

1.5 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)

Waschpuffer:

0,05 % Tween 20 in PBS; pH 7,4

Trägerlösung zum Lösen von Antikörpern:

1% BSA in PBS; pH 7,4; 0,2 µm steril filtriert

Stopplösung:

1 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

2.1.5. Transiente Transfektionen

Zum Einsatz kamen zwei Reporter-gen-Vektoren, die jeweils für das Enzym Luziferase kodierten. 3κB war ein großzügiges Geschenk von K. Brand (Medizinische Hochschule, Hannover), Renilla-Luciferase-Reporter-gen-Vektor pRL-SV40 stammte von Promega (Madison, WI, USA). Ebenfalls von Promega war das Duale Luciferase Reporter-gen-Assay System, das neben den benötigten Enzymsubstraten den für die Zellyse verwendeten Passive Lysis Buffer (PLB) enthielt. Transfiziert wurde mit Lipofektin, das von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) stammte, die verwendeten Polystyrol-Röhrchen waren von BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA).

2.2. Zelllinien und ihre Kultivierung

Verwendet wurden die humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6, SKOV-3 und OVCAR-3. Die SKOV-3 Zellen sowie die OVCAR-3 Zellen bezogen wir von American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Bei SKOV-3 handelte sich um Tumorzellen, die aus dem Aszites einer 64-jährigen kaukasischen Frau mit Adenokarzinom des Ovars

gewonnen wurden (am ehesten klarzellig), bei OVCAR-3 ebenfalls um Zellen eines Adenokarzinoms, in diesem Fall einer 60-jährigen kaukasischen Frau (am ehesten serös). Die Zelllinie OV-MZ-6 wurde ebenfalls aus dem Aszites einer 70-jährigen nicht vorbehandelten Patientin mit serös-papillärem Zystadenokarzinom des Ovars im Stadium FIGO IV etabliert und uns zu Untersuchungszwecken zur Verfügung gestellt (Mobus et al., 1992). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen der Größe T75 sowie T175; verwendet wurde das Zellkulturmedium DMEM, das im Vergleich zum „Basal Medium Eagle (BME)“ die vierfache Konzentration an Vitaminen und Aminosäuren enthält. Es erfolgte das Wachstum der adhärennten Zellen im Inkubator bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ bis zu einer Konfluenz von 70-80%. Bei allen drei Zelllinien wurde spätestens nach drei Tagen das Kulturmedium durch neues Medium ersetzt, als Hilfestellung diente ein dem Medium zugesetzter pH-Indikator.

Um die Zellen zu passagieren, wurden sie zunächst mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen, und anschließend mit 0,05%igem EDTA/PBS vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Dabei wurde das sogenannte „Shake off“-Verfahren angewandt, das heißt, die Zellen wurden durch sanftes Beklopfen der Zellkulturflasche und mehrfaches Spülen der Flasche mit PBS in Suspension gebracht und anschließend 3 Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in neuem Medium resuspendiert, um anschließend in eine neue Zellkulturflasche überführt zu werden. Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen nach Resuspension einer Lebend-Tot-Färbung mit Trypsinblau unterzogen, um dann unter dem Mikroskop in der Zählkammer ausgezählt und auf 12-Well-Zellkulturplatten in der gewünschten Menge ausgesät zu werden. Wenn die Zellen nicht für Stimulationsexperimente gebraucht wurden, erfolgte die Kryokonservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff in FCS + 5% DMSO bei -196°C.

2.3. Methoden

2.3.1. Stimulationsexperimente

Die auf 12-Well-Platten ausgesäten humanen Ovarialkarzinomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von circa 70% kultiviert, wenn nötig erfolgte dazwischen ein Mediumwechsel. Anschließend wurde das Komplettmedium abgesaugt, die Zellen wurden 2x/Well mit PBS gewaschen um FCS vollständig zu entfernen. Um die Zellen für das nachfolgende Stimulationsexperiment vorzubereiten, wurden sie in Hungermedium überführt und darin für weitere 24h belassen. Das hatte die Intention, die Zellen eine gewisse Zeit von

Wachstumsfaktoren zu entwöhnen, damit sie anschließend für die Stimulationssignale bereit waren. Am Tag der Stimulation wurden die einzelnen Stimulanzen laut Protokoll in Eppendorfgefäßen vorverdünnt, anschließend wurde das Hungermedium von jedem einzelnen Well sorgfältig abgesaugt und die Wells wurden in Triplets stimuliert. Es erfolgte die weitere Inkubation der Zellen bei 37°C für 24h, anschließend konnten die Überstände geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren werden. Dazu wurde 500µl des jeweiligen Überstands abgenommen und in vorher beschriftete Eppendorfgefäße überführt. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

2.3.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Je nach Stimulationsexperiment wurden die Zellüberstände pur auf den ELISA aufgetragen, in 1% BSA/PBS verdünnt oder mittels eines Vakuumkonzentrators einkonzentriert. Am Vortag erfolgte das Coating der 96-Well-Mikrotiter-Platte mit dem Erstantikörper (capture antibody), der 1:180 in PBS verdünnt wurde. Die Platte wurde bei Raumtemperatur (RT) über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Platte mit dem eigens dafür hergestellten Waschpuffer (s.o.) gewaschen, anschließend wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen mit einprozentigem BSA/PBS geblockt, um die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung zu verbessern. Nach 1h Inkubation bei RT konnten nun die Zellüberstände sowie der Standard aufgetragen werden. Für die Herstellung des Standards wurde eine Verdünnungsreihe, bestehend aus 8 Proben mit absteigenden Konzentrationen, angefertigt. Bei CXCL9 reichte die Verdünnungsreihe von 0 bis 4000 pg/ml, bei CXCL10 von 0 bis 2000 pg/ml. Nach einer weiteren Inkubationszeit von zwei Stunden bei RT wurde wieder gewaschen, der Zweitantikörper (*detection antibody*), im Verhältnis 1:180 in BSA/PBS verdünnt aufgetragen und für weitere 2h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde Streptavidin-HRP im Verhältnis 1:200 in 1% BSA/PBS verdünnt aufgetragen und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Streptavidin ist ein von Bakterien des Stammes *Streptomyces avidinii* synthetisiertes Protein, das eine sehr starke Bindungsaffinität zu Biotin aufweist. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten derzeit bekannten nicht-kovalenten Bindungen. Auf Grund der Tatsache, dass der Zweitantikörper an Biotin gekoppelt ist, kann also eine feste Bindung zwischen dem Zweitantikörper und Streptavidin-HRP entstehen. Es erfolgte ein letzter Waschschrift, danach wurden die Substrate A und B im Verhältnis 1:1 gemischt aufgetragen und für weitere 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Durch Umsetzung der Substrate A und B durch die an das Streptavidin gebundene Meerrettich-Peroxidase wurde eine blaue Farbreaktion

sichtbar, die durch die Zugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt wurde. Ein gelber Farbumschlag wurde sichtbar. Anschließend konnten die Proben im ELISA-Photometer gemessen und so die enthaltene Konzentration des jeweiligen Chemokins durch Vergleich mit der Standardkurve quantifiziert werden.

2.3.3. Transiente Transfektionen

Um herauszufinden, warum der COX-2-spezifische Inhibitor Celecoxib in hohen Konzentrationen zu einer Abnahme der Chemokinsekretion führt und nicht wie erwartet zu einer weiteren Zunahme der Sekretion (s.u.), wollten wir die Aktivität des Promotors für NF- κ B näher untersuchen. Dazu führten wir transiente Transfektionen der OV-MZ-6 Zelllinie durch. Zum Einsatz kam ein Reportergen, das für die Firefly-Luziferase kodiert und mit einem Promotor, der 3 Bindungsstellen für NF κ B enthält, verbunden wurde. Damit die fusionierte DNA für Forschungszwecke verwendet werden kann, wurde sie in ein speziell dafür konstruiertes Plasmid eingebaut, das im Folgenden als 3 κ B bezeichnet wird. Firefly-Luziferase wurde ursprünglich aus dem amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (englisch: firefly) gewonnen, wird heute aber überwiegend gentechnisch hergestellt. Der ko-transfizierte Renilla-Luciferase-Reporter-Gen-Vektor pRL-SV40 diente der Normalisierung der Transfektionseffizienz und kodiert für die Renilla-Luziferase. Im Gegensatz zum Promotor des Plasmids 3 κ B benötigt der Renilla-Promotor keinen Transkriptionsfaktor, um seine DNA zu transkribieren und im Folgenden Renilla-Luziferase zu synthetisieren. Wenn Renilla von den Zellen aufgenommen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass 3 κ B ebenfalls aufgenommen wurde. Sowohl die Firefly-Luziferase als auch die Renilla-Luziferase oxidieren das Substrat Luziferin zu Oxyluziferin (Steghens et al., 1998), wobei molekularer Sauerstoff zu Kohlenstoffdioxid umgesetzt wird (Shimomura et al., 1977). Die Reaktion verläuft in mehreren Stufen und wird von einer Lichtemission begleitet. Die Arbeiten von William D. McElroy Ende der 1940er Jahre haben gezeigt, dass für die Reaktion ATP und Magnesiumionen als Kofaktoren benötigt werden. Die Zellen wurden für die Transfektion wie bei den oben beschriebenen Stimulationsexperimenten auf 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 60% kultiviert. Für die Transfektion wurde Lipofektion verwendet, die den Zellen die Aufnahme der Plasmide erleichtern sollte. 3 μ l Lipofektin wurde dazu mit 100 μ l GAM in der Anzahl der zu transfizierenden Wells für 45 Minuten bei RT inkubiert. Parallel wurden ebenfalls in der Anzahl der zu stimulierenden Wells die eingesetzten Plasmide 3 κ B

mit 1 µg pro Well und Renilla-Luciferase-Reportergen-Vektor pRL-SV40 (im Folgenden kurz als „Renilla“ bezeichnet) mit 500 ng pro Well mit weiteren 100 µl GAM bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide in Lipofektin überführt und für weitere 15 Minuten inkubiert. Die zu transfizierenden Wells wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 300 µl/ Well GAM bestückt. Anschließend wurden die Plasmide vorsichtig auf die Zellen gegeben und die Zellkulturplatten für weitere 6h im Inkubator gelagert. Nach dieser Zeit wurde die Transfektion abgebrochen, in dem das Medium abgesaugt wurde und die Zellen mit neuem GAM bestückt wurden. Für weitere 14h wurden die Zellen gehungert und anschließend nach Protokoll für weitere 4h stimuliert. Um den Stimulationsversuch zu beenden, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 120 µl/Well Passive Lysis Buffer (PLB) versehen. Die enthaltenen Proteasen spalten die Zellen auf, um anschließend intrazelluläre Proteine nachweisen zu können. Dazu wurde der im Kit mitgelieferte PLB 1:5 in A. dest. verdünnt. Die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis gelagert, was das Abkratzen der lysierten Zellen vom Boden der Zellkulturplatten erleichterte. Jedes einzelne Well wurde gründlich mit dem Zellschaber abgetragen und die Lysate bei 4°C und 21000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Aus den Überständen konnte dann am Luminometer die Luziferaseaktivität gemessen werden. Dazu wurde ein für die jeweilige Luziferase spezifisches Substrat zugegeben und die Lichtemission als Maß für die Luziferaseaktivität konnte vom Luminometer detektiert werden. Vor der Messung wurde eine Eichkurve angefertigt, um sicherzustellen, dass die Luziferaseaktivität im linearen und nicht im gesättigten Bereich der Enzymaktivität gemessen wird. Da die enzymatisch katalysierte Reaktion der Michaelis-Menten-Kinetik folgt, ist bei Substratüberschuss die Lichtemission proportional der Luziferasemenge in der Probe. Die Aktivität des 3κB Promotors und damit das Ausmaß der Promotoraktivierung durch NF-κB ist proportional zur Enzymaktivität und damit zur gemessenen Lichtemission und konnte mittels des Quotienten aus Firefly-Luziferase und Renilla-Luziferase ausgedrückt werden.

2.3.4. Statistische Methoden

Die Ergebnisse der Experimente sind in relativen Einheiten dargestellt und beziehen sich in der Regel auf IFN-γ in der Konzentration von 10 µM, sofern nicht anders angegeben. Nach der Normierung der Werte wurden aus den Ergebnissen der Zellstimulationsexperimente Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten gebildet ($n \geq 9$) und die Werte als Mittelwerte plus/minus Standardfehler in den Grafiken abgebildet. Die

statistische Analyse hinsichtlich der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests durchgeführt (SPSS Statistics Software, Version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die statistische Signifikanz wurde definiert als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$. Wurden die Signifikanzmarker (*) in den Grafiken über dem jeweiligen Balken angebracht, bezieht sich der p-Wert auf den Vergleich mit der Kontrolle des Versuchs. Wurde die Signifikanz zwischen zwei anderen Werten berechnet, sind diese durch einen Balken miteinander verbunden.

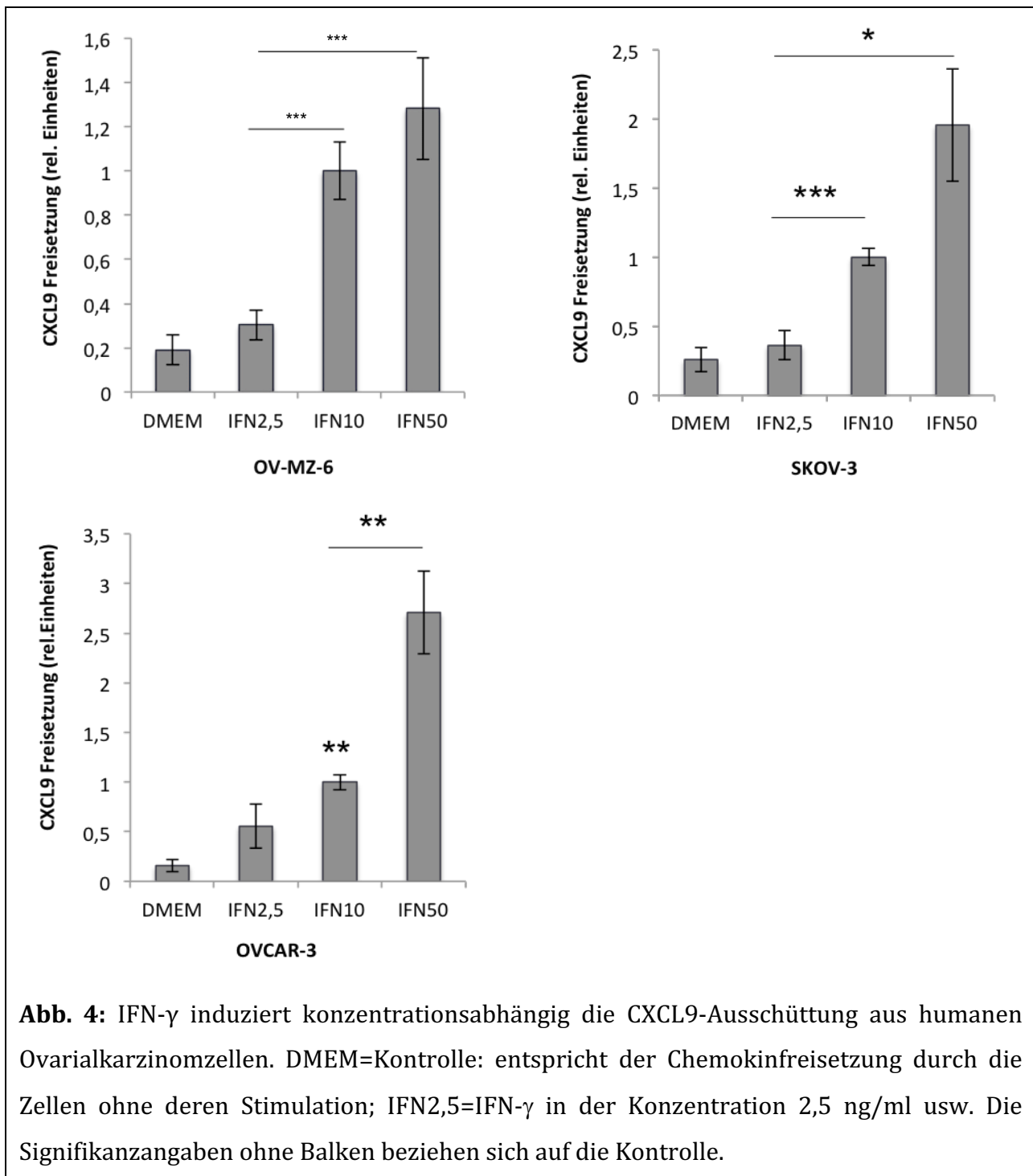
3. Ergebnisse

3.1. Der Effekt inflammatorischer Zytokine auf die Sekretion der CXCR3-Liganden aus humanen Ovarialkarzinomzellen

Immunhistochemische Untersuchungen an Ovarialkarzinomgeweben ergaben, dass die beiden Chemokine CXCL9 und CXCL10 im Ovarialkarzinom überwiegend in den Tumorzellen lokalisiert sind (Bronger et al., 2016). Auf der Basis dieser Beobachtung wurde die Regulation der CXCR3-Liganden in humanen Ovarialkarzinomzelllinien untersucht, um ein geeignetes *in vitro*-Modell zu haben. Verwendet wurden die drei Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 (beide serös) sowie SKOV-3 (klarzellig).

Zunächst wurden die drei Zelllinien im *in-vitro*-Modell jeweils ansteigenden Konzentrationen der beiden inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α ausgesetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen in reinem Medium (DMEM) belassen. Die beiden Zytokine IFN- γ und TNF- α sind reichlich im Mikromilieu von Ovarialkarzinomen vorhanden und bereits als starke Induktoren der CXCR3-Liganden bekannt (Takeyama et al., 1991, Rabinowich et al., 1996).

Die Ergebnisse hinsichtlich der Chemokinsekretion, die durch die inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α hervorgerufen wurde, waren in allen drei Zelllinien ähnlich. Unstimulierte Zellen produzierten keine Chemokine bzw. eine zu vernachlässigende Menge. IFN- γ führte zur Freisetzung von CXCL9 und CXCL10 (Abb. 4 und 5), wobei die Höhe der Chemokinsekretion von der Dosis abhing, in der IFN- γ eingesetzt wurde. TNF- α dagegen induzierte in OV-MZ-6 und SKOV-3 nur die Sekretion von CXCL10 (Abb. 7), nicht jedoch die von CXCL9 (Abb. 6). Wurden beide Zytokine gleichzeitig zur Stimulation der Ovarialkarzinomzellen eingesetzt, zeigte sich ein synergistischer Effekt der beiden Zytokine. Durch den kombinierten Einsatz von IFN- γ und TNF- α konnte im Vergleich zum alleinigen Einsatz von TNF- α in allen drei Zelllinien eine CXCL9-Freisetzung hervorgerufen werden. Und dies in einer um ein Vielfaches höheren Konzentration als durch den alleinigen Einsatz von IFN- γ (OV-MZ-6 ca. 12fach, SKOV-3 ca. 10fach, OVCAR-3 ca. 24fach höher). Ebenfalls synergistisch stimuliert wurde durch den kombinierten Einsatz beider Zytokine im Vergleich zum alleinigen Einsatz von IFN- γ oder TNF- α die Freisetzung von CXCL10. Auch hier stieg die Freisetzung des CXCR3-Liganden um ein Vielfaches (OV-MZ-6 ca. 100fach, SKOV-3 ca. 4fach, OVCAR-3 ca. 32fach höher) im Vergleich zum alleinigen Einsatz von IFN- γ oder TNF- α an.



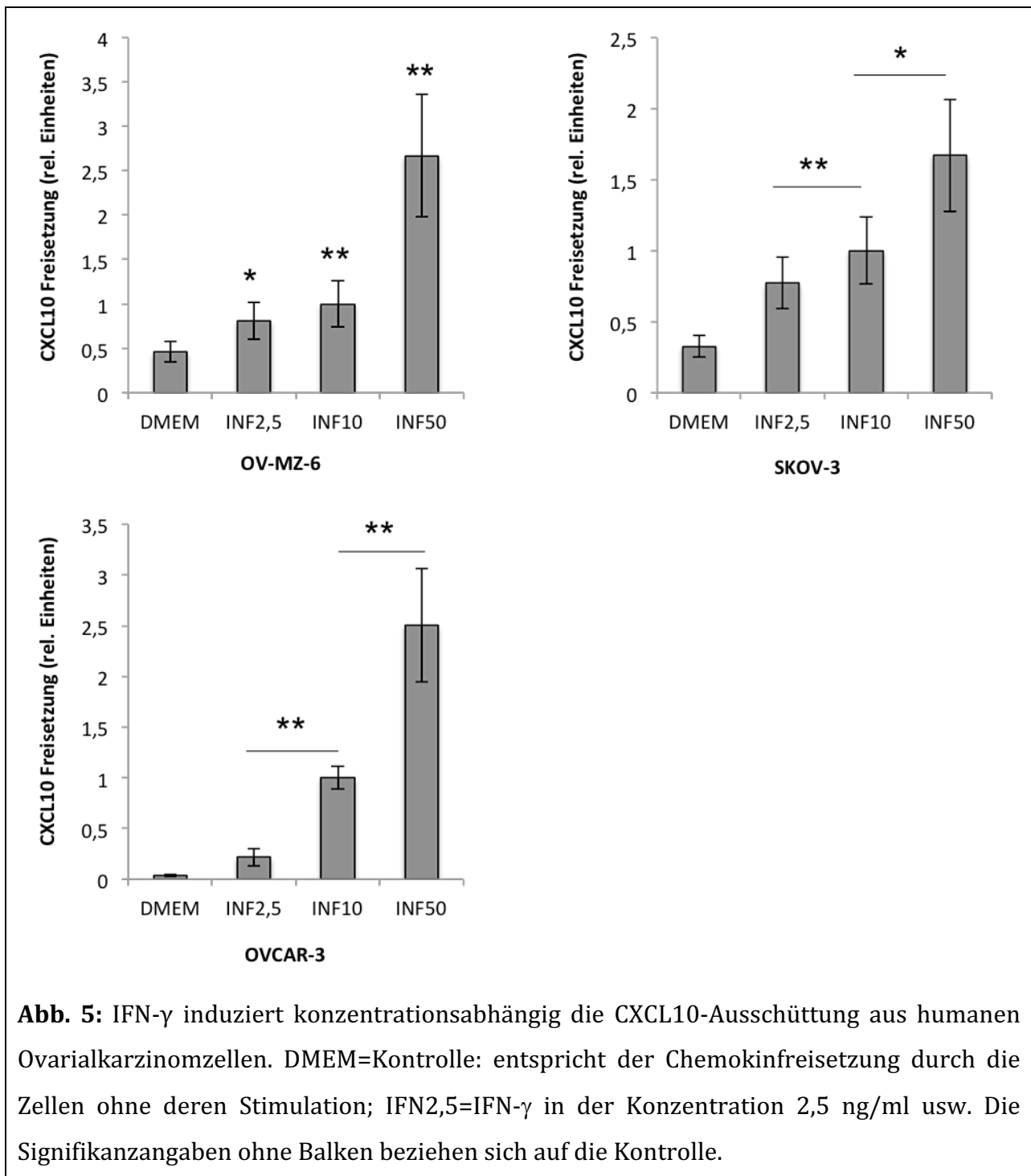


Abb. 5: IFN- γ induziert konzentrationsabhängig die CXCL10-Ausschüttung aus humanen Ovarialkarzinomzellen. DMEM=Kontrolle: entspricht der Chemokinfreisetzung durch die Zellen ohne deren Stimulation; INF2,5=IFN- γ in der Konzentration 2,5 ng/ml usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

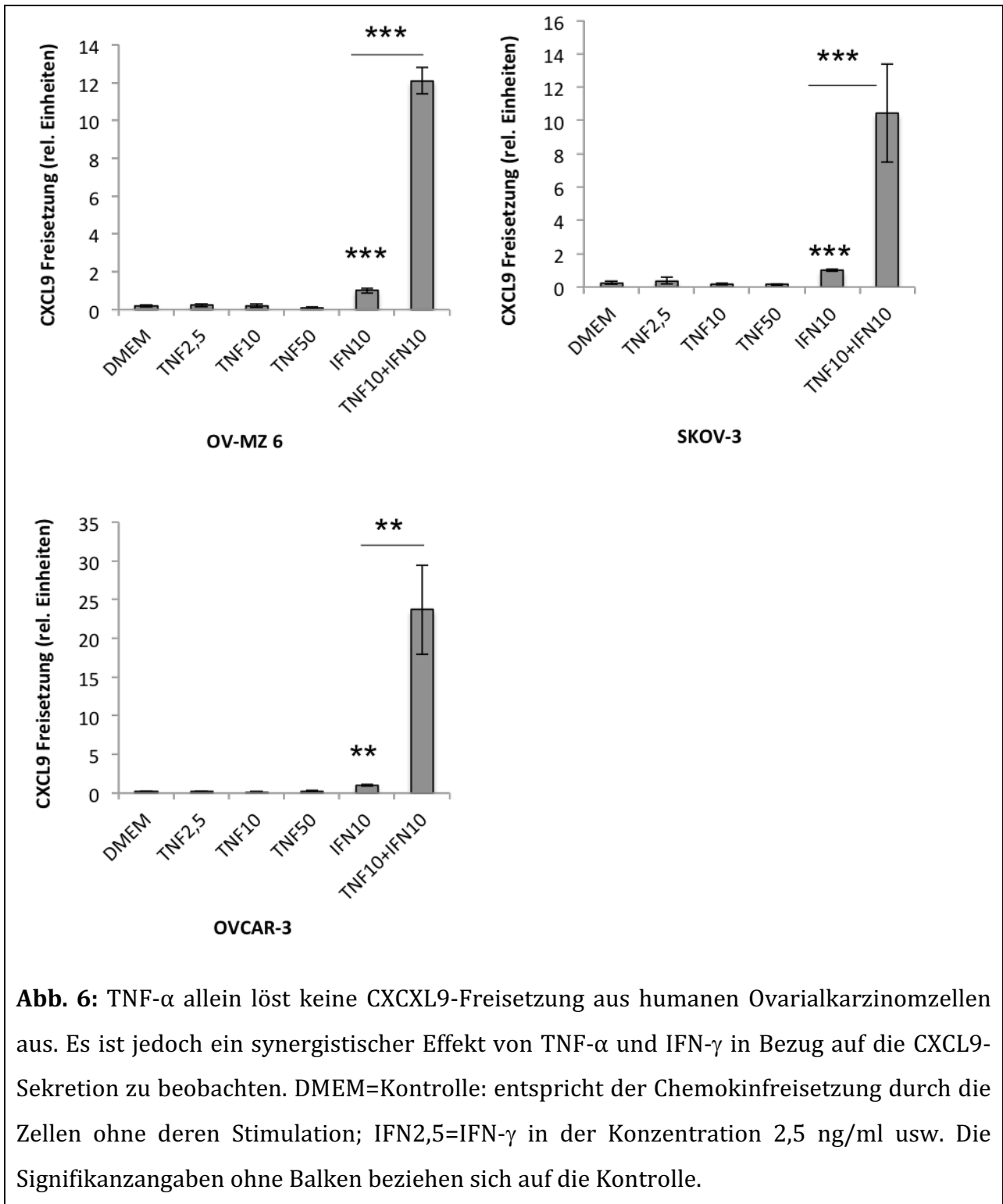


Abb. 6: TNF- α allein löst keine CXCL9-Freisetzung aus humanen Ovarialkarzinomzellen aus. Es ist jedoch ein synergistischer Effekt von TNF- α und IFN- γ in Bezug auf die CXCL9-Sekretion zu beobachten. DMEM=Kontrolle: entspricht der Chemokinfreisetzung durch die Zellen ohne deren Stimulation; IFN2,5=IFN- γ in der Konzentration 2,5 ng/ml usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

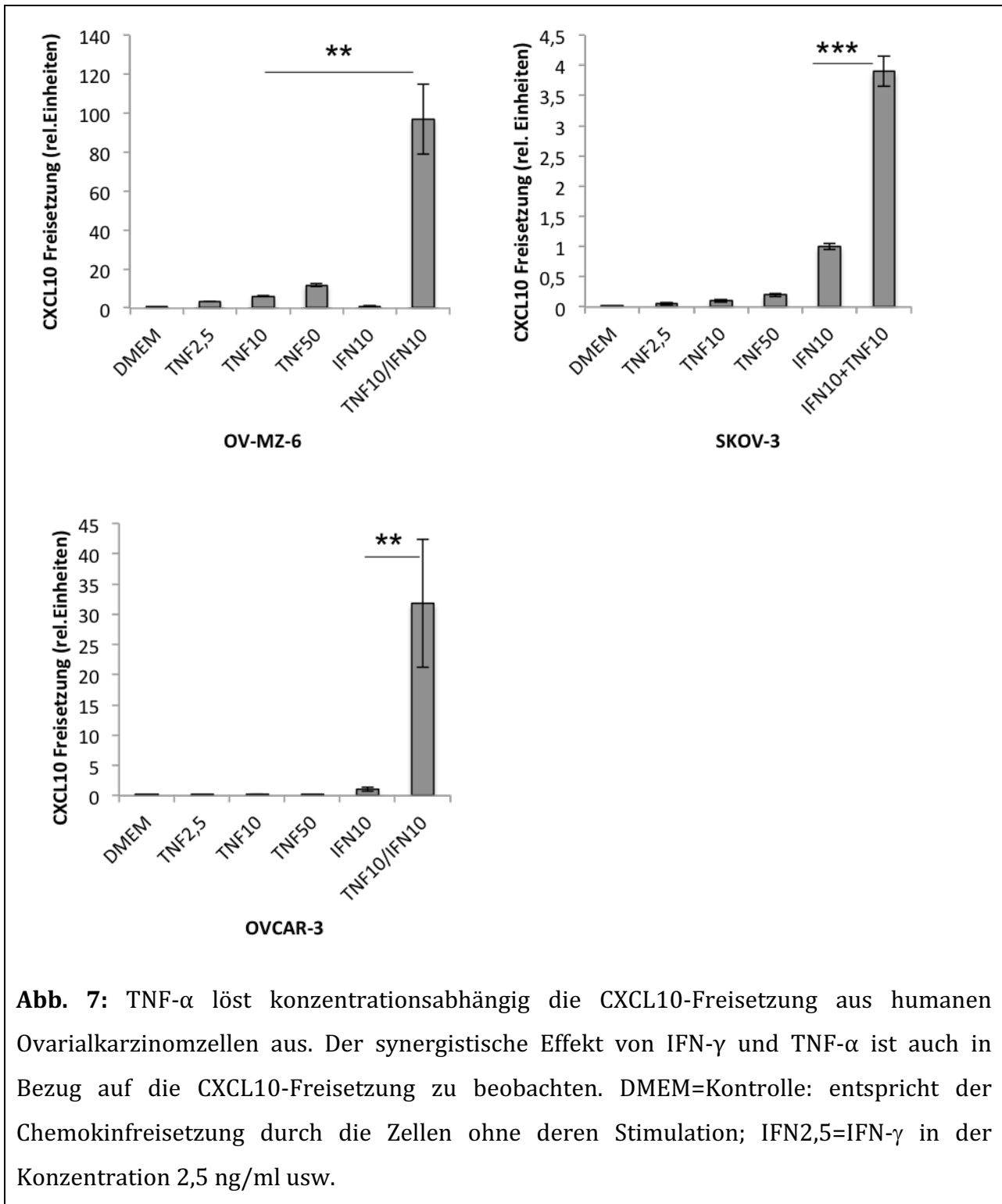


Abb. 7: TNF- α löst konzentrationsabhängig die CXCL10-Freisetzung aus humanen Ovarialkarzinomzellen aus. Der synergistische Effekt von IFN- γ und TNF- α ist auch in Bezug auf die CXCL10-Freisetzung zu beobachten. DMEM=Kontrolle: entspricht der Chemokinfreisetzung durch die Zellen ohne deren Stimulation; IFN2,5=IFN- γ in der Konzentration 2,5 ng/ml usw.

3.2. Beteiligung intrazellulärer Signalwege an der Zytokin-induzierten CXCR3-Ligandenfreisetzung

Wie bereits gezeigt werden konnte, führen sowohl TNF- α als auch IFN- γ zu einer Freisetzung der CXCR3-Liganden aus den verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien. Im nächsten Schritt sollte nun die Frage geklärt werden, über welchen intrazellulären Signalweg die beiden Zytokine ihre Effekte vermitteln. Es wurden sowohl der NF- κ B-, wie auch der JAK/STAT-Signalweg untersucht, deren Beteiligung an INF- γ und TNF- α getriggerten Effekten bereits beschrieben ist (Clarke et al., 2010). Die Zelllinie OVCAR-3 wurde dafür, wie auch für alle weiteren Versuche, nicht mehr verwendet.

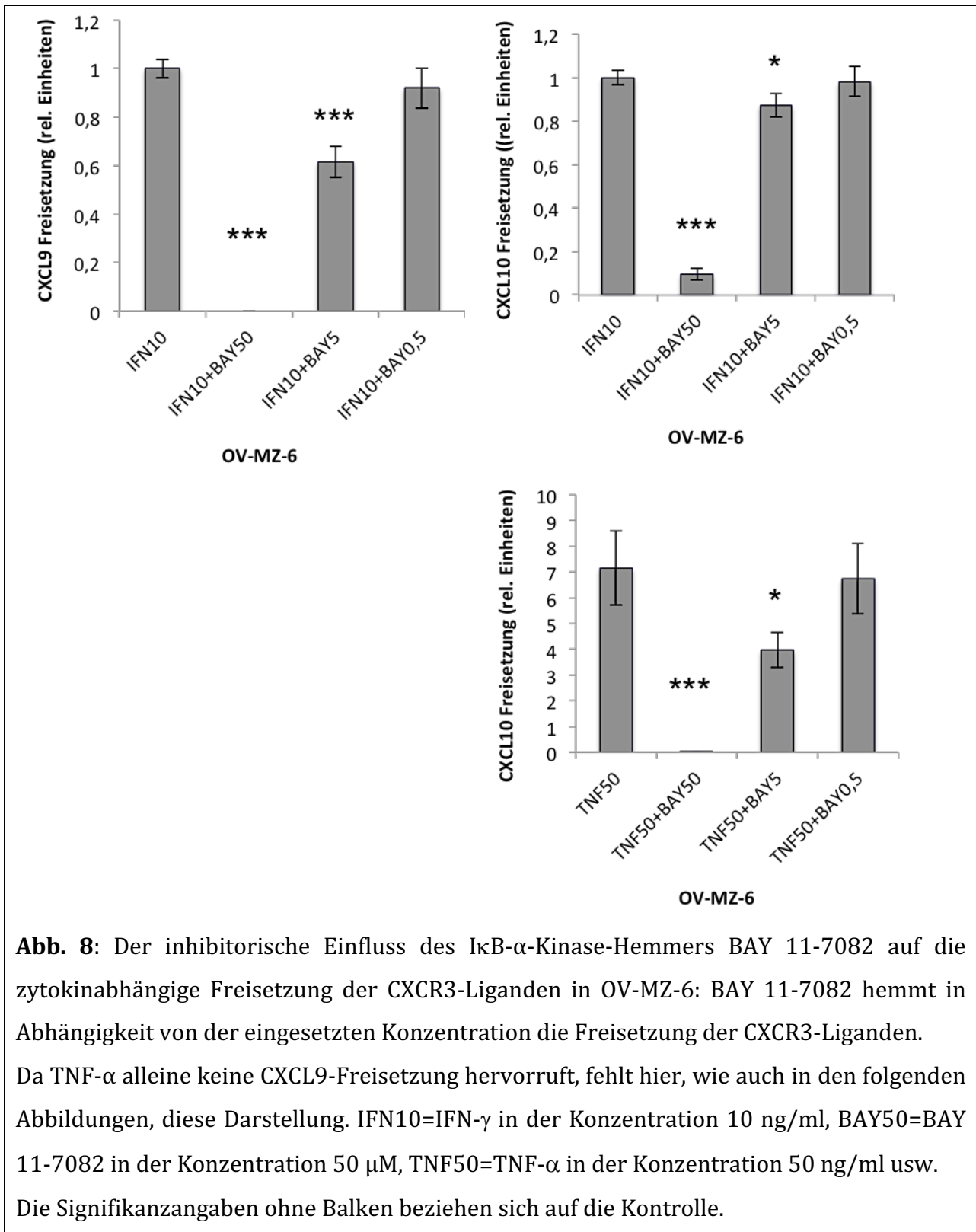
3.2.1. Der NF- κ B- Signalweg in Ovarialkarzinomzellen

3.2.1.1. I κ B- α Kinase-Hemmer BAY 11-7082

Als erstes wurde die Bedeutung des NF- κ B-Signalwegs untersucht, indem der Inhibitor BAY 11-7082 eingesetzt wurde. BAY 11-7082 hemmt die I κ B-Kinase (IKK) β . Dadurch wird die Phosphorylierung von I κ B- α gehemmt und in Folge die Translokation von NF- κ B in den Zellkern verhindert (Irrera et al., 2017). Der Inhibitor wurde dafür jeweils 30 Minuten vor IFN- γ beziehungsweise TNF- α auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle diente die reine Stimulation mit IFN- γ oder TNF- α . Um einerseits eine ausreichende Stimulation der verwendeten Zelllinien durch die inflammatorischen Zytokine zu erzielen und andererseits nicht in den gesättigten Bereich innerhalb der Messung durch das ELISA- Photometers zu gelangen, musste die eingesetzte Konzentration von IFN- γ und TNF- α in diesen wie auch in nachfolgenden Versuchen variiert werden.

Da sich bereits in vorherigen Versuchen gezeigt hatte, dass TNF- α allein keine CXCL9 Sekretion hervorruft, wurde der Effekt von BAY 11-7082 auf die TNF- α -abhängige CXCL9 Sekretion in diesen Versuchen – wie auch in analogen Versuchen – nicht untersucht. Der I κ B- α -Kinase-Hemmer BAY 11-7082 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, letztlich orientiert an der Literatur: 50 μ M, 5 μ M und 0,5 μ M. In den OV-MZ-6 Zellen reichte die Konzentrationen von 50 μ M des I κ B- α -Kinase-Hemmers aus, um die IFN- γ -abhängige, wie auch die TNF- α -abhängige Chemokinsekretion fast vollständig zu unterdrücken (Abb. 8). In der Konzentration von 5 μ M kam es auch zu einer deutlich niedrigeren Chemokinfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle sowohl in Bezug auf TNF- α wie auch auf IFN- γ . Die Konzentration von 0,5 μ M BAY 11-7082 führte ebenfalls bei beiden Zytokinen zu keinem signifikanten Unterschied in der Chemokinfreisetzung im Vergleich

zur Kontrolle. In den SKOV-3-Zellen fiel der Effekt von 50 μM I κ B- α -Kinase-Hemmer BAY 11-7082 nicht ganz so deutlich aus wie in den OVMZ-6-Zellen (Abb.9). Aber auch hier zeigte sich eine deutliche Unterdrückung der Freisetzung beider Chemokine durch 50 μM BAY 11-7082 und das ebenfalls sowohl bei TNF- α als auch bei IFN- γ . Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl die IFN- γ -, wie auch die TNF- α -abhängigen Effekte auf die Chemokinsekretion durch den Inhibitor des NF- κ B-Signalweges inhibitorisch beeinflusst werden können und somit ihre Wirkung, zumindest teilweise, über den NF- κ B-Signalweg entfalten. Außerdem liefern die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die Signalwege von IFN- γ und TNF- α in Ovarialkarzinomzellen über NF- κ B miteinander in Verbindung stehen.



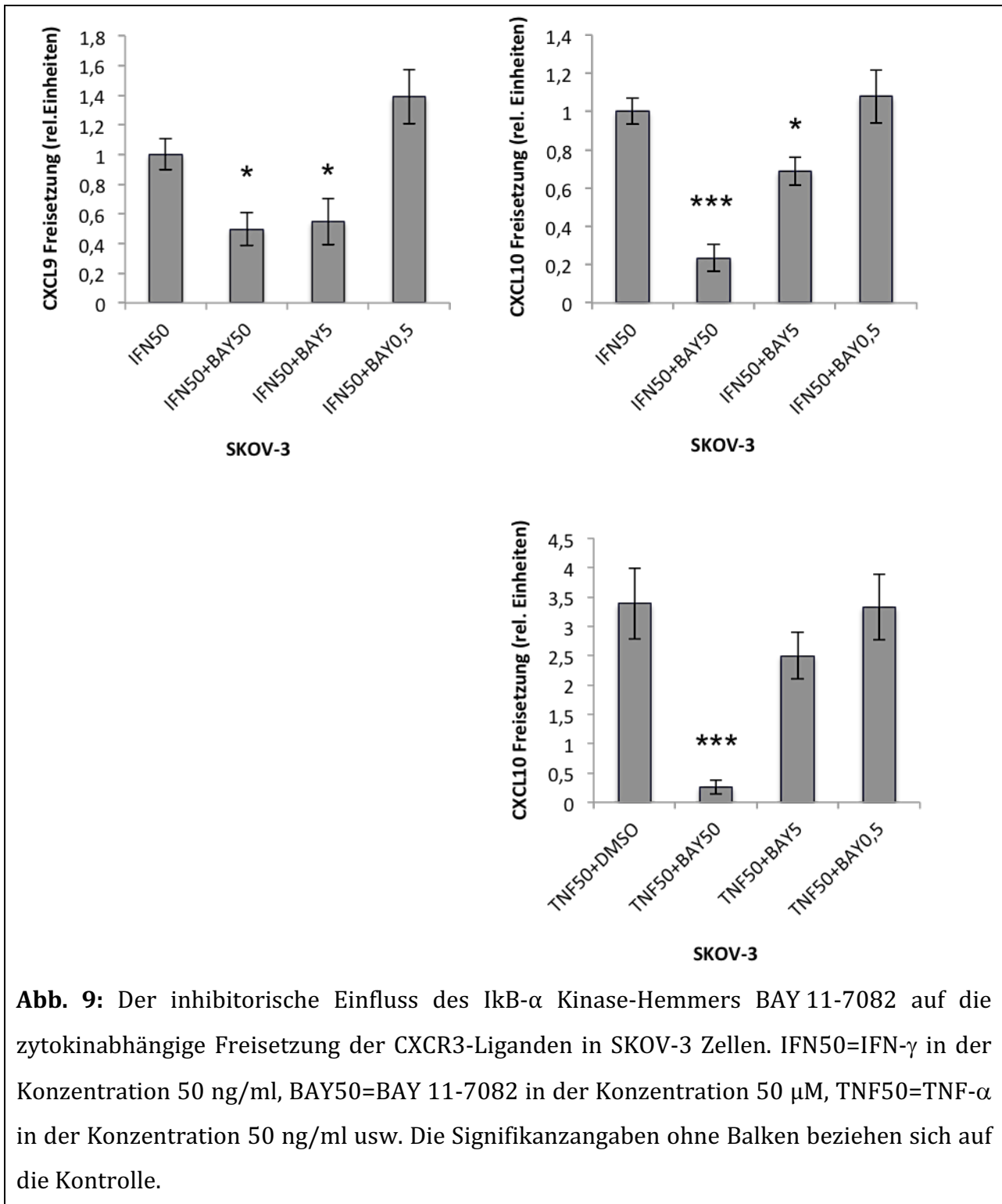


Abb. 9: Der inhibitorische Einfluss des I κ B- α Kinase-Hemmers BAY 11-7082 auf die zytokinabhängige Freisetzung der CXCR3-Liganden in SKOV-3 Zellen. IFN50=IFN- γ in der Konzentration 50 ng/ml, BAY50=BAY 11-7082 in der Konzentration 50 μ M, TNF50=TNF- α in der Konzentration 50 ng/ml usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

3.2.1.2. NF- κ B Inhibitor TPCK

Zur weiteren Validierung der vorangegangenen Ergebnisse wurde der NF- κ B- Inhibitor TPCK eingesetzt. TPCK vermittelt seine inhibitorische Wirkung auf NF- κ B durch das Anfügen von Thiolgruppen an Cysteine zweier Moleküle: an die I κ B Kinase (IKK) β und an p65/relA (Ha et al., 2009).

In den OV-MZ-6-Zellen beeinflusste TPCK sowohl die IFN- γ -abhängige als auch die TNF- α -abhängige Chemokinsekretion. TPCK 50, 25 und 10 μ M hemmten die IFN- γ -abhängige CXCL10 Freisetzung signifikant, die Konzentration von 5 μ M reichte nicht mehr aus, um die IFN- γ abhängige CXCL10 Freisetzung signifikant zu hemmen (Abb. 10). Die TNF- α -abhängige CXCL10-Freisetzung wurde durch die Konzentration von 10 μ M nicht mehr signifikant gehemmt, sondern nur in der höheren Konzentration von 25 und 50 μ M (Abb.11). Auch der synergistische Effekt von IFN- γ und TNF- α konnte durch den Einsatz von TPCK gehemmt werden, sodass es durch den Einsatz von TPCK in der Konzentration von 50 und 25 μ M zu einer signifikanten Erniedrigung der CXCL10-Ausschüttung in Verbindung mit dem kombinierten Einsatz beider Zytokine kam (Abb.11). Für CXCL9 ergaben sich analoge Ergebnisse. Um die CXCL9 Freisetzung in den OV-MZ-6 Zellen zu hemmen, war sogar eine etwas niedrigere Konzentration von TPCK notwendig. Schon durch den Einsatz von TPCK in der Konzentration von 5 μ M konnte die IFN- γ -abhängige CXCL9 Ausschüttung signifikant gehemmt werden (Abb. 10). In den SKOV-3-Zellen beeinflusste TPCK die IFN- γ -vermittelte CXCL9 Ausschüttung nicht signifikant (Abb. 12). TPCK hemmte jedoch ebenso wie in den OV-MZ-6 Zellen sowohl die IFN- γ - wie auch die TNF- α -vermittelte CXCL10 Sekretion. Die niedrigste eingesetzte Konzentration von 5 μ M reichte aus, um eine signifikante Hemmung sowohl der IFN- γ -abhängigen als auch der TNF- α -abhängigen CXCL10-Freisetzung in SKOV-3-Zellen hervorzurufen. Auch die Ergebnisse für den TPCK-Inhibitor lieferten somit Hinweise darauf, dass die Signalwege beider Zytokine miteinander über NF- κ B in Verbindung stehen. Wie bereits bekannt ist, vermittelt TNF- α sein Signal über den NF- κ B Signalweg, IFN- γ hingegen sein Signal über den JAK/STAT Weg. Außerdem war in beiden Versuchsreihen zu sehen, dass in den Zellen, wenn man sie mit einem Inhibitor für NF- κ B behandelte, nicht nur die TNF- α -abhängige, sondern auch die IFN- γ -abhängige Chemokinsekretion gehemmt wurde. Die NF- κ B-Aktivierung scheint also auch ein Downstreameffekt von IFN- γ zu sein.

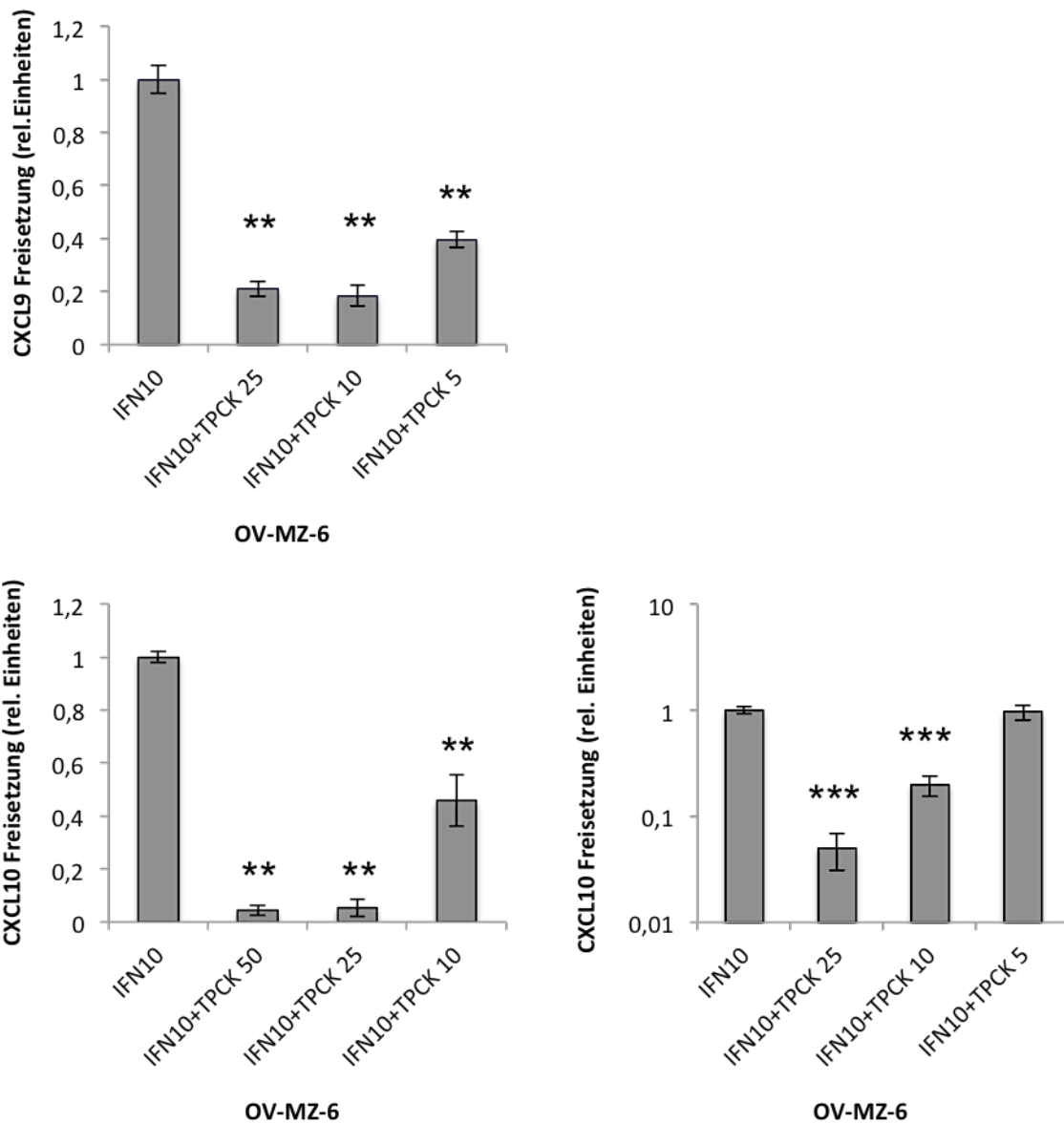


Abb. 10: Der Effekt des NF- κ B-Inhibitors TPCK auf die IFN- γ abhängige CXCR3-Liganden Freisetzung in OV-MZ-6. TPCK hemmt konzentrationsabhängig die IFN- γ abhängige CXCR3-Liganden-Sekretion. IFN10=IFN- γ in der Konzentration 10 ng/ml, TPCK25=TPCK in der Konzentration 25 μ M usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

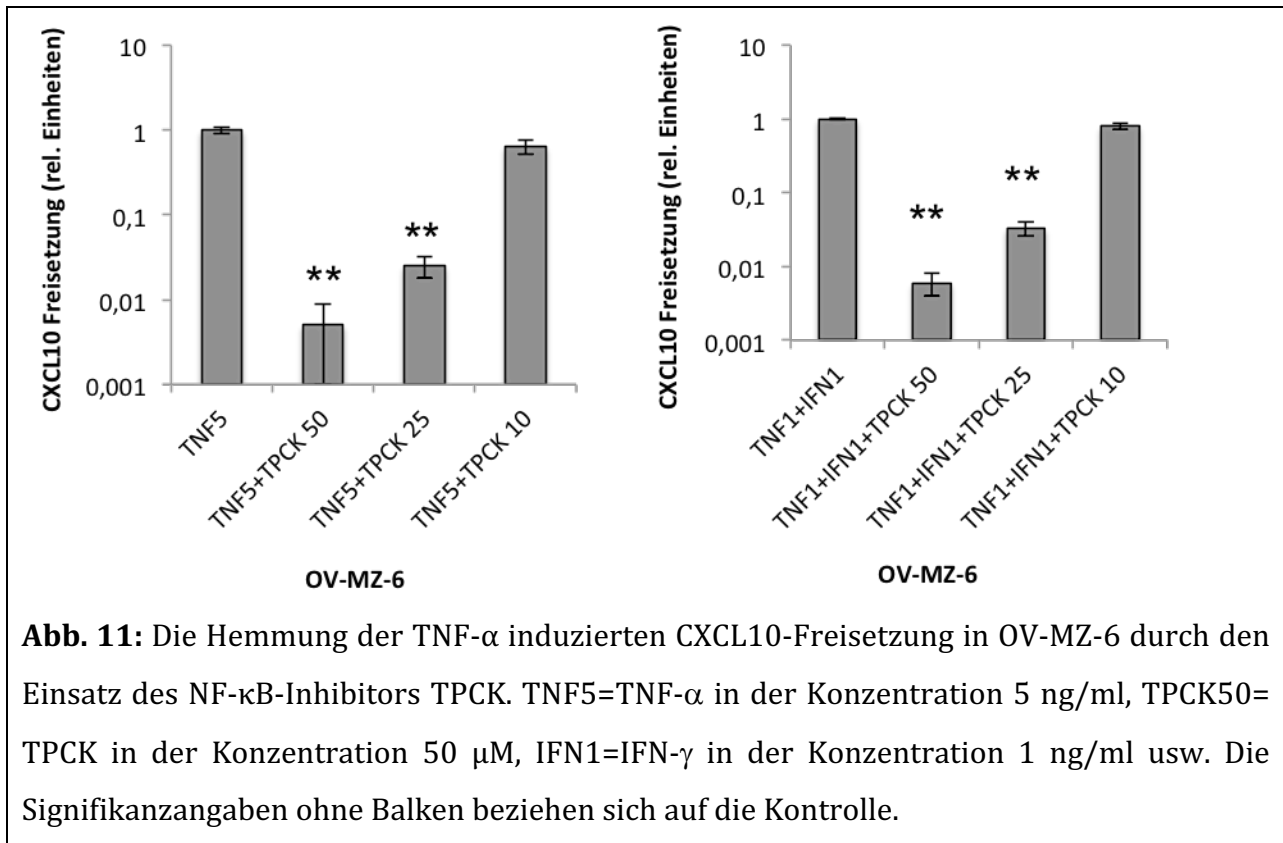
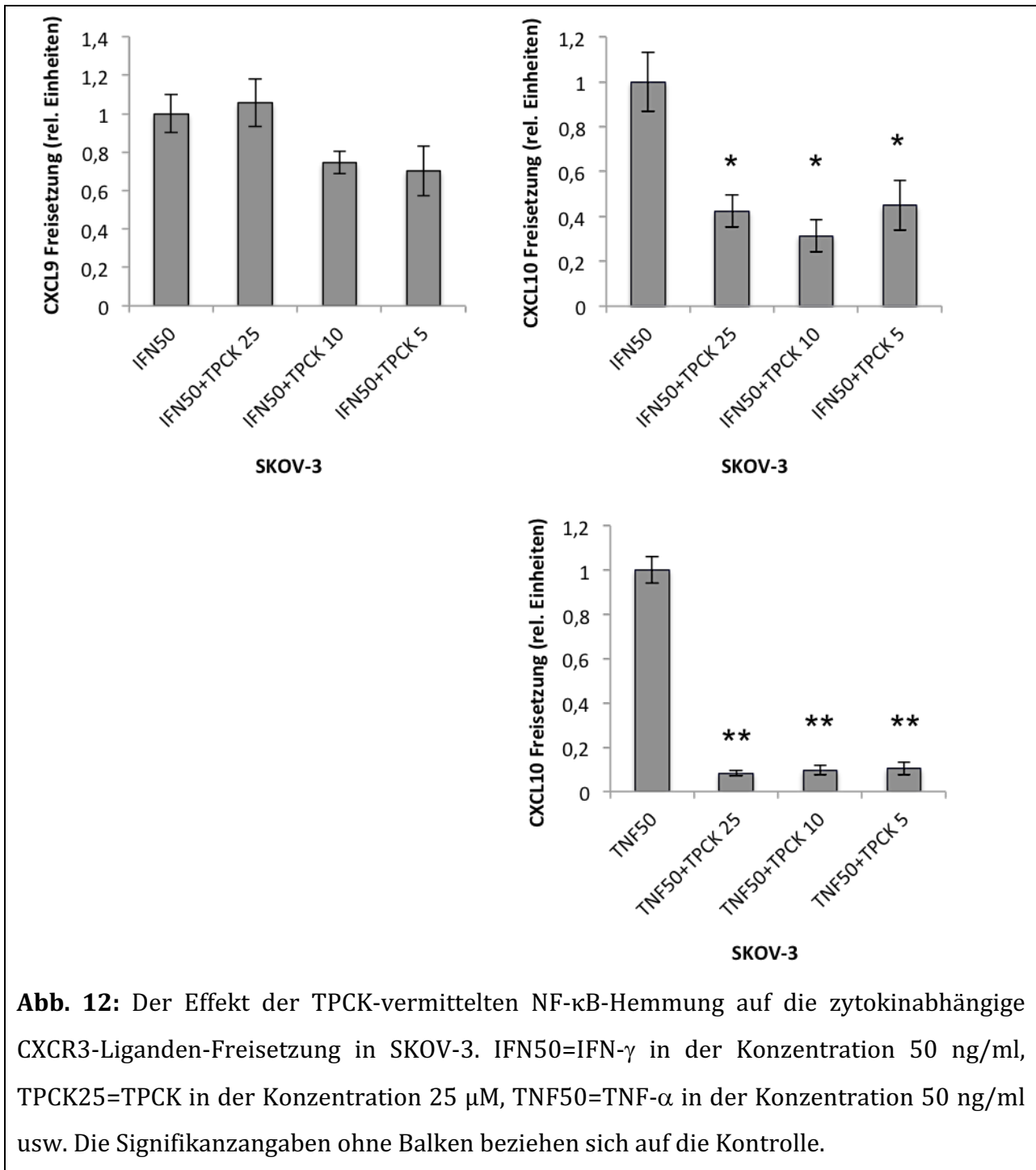


Abb. 11: Die Hemmung der TNF- α induzierten CXCL10-Freisetzung in OV-MZ-6 durch den Einsatz des NF- κ B-Inhibitors TPCK. TNF5=TNF- α in der Konzentration 5 ng/ml, TPCK50=TPCK in der Konzentration 50 μ M, IFN1=IFN- γ in der Konzentration 1 ng/ml usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.



3.2.2. Der JAK/STAT Signalweg

Um die Bedeutung des JAK/STAT-Signalwegs für die IFN- γ - und TNF- α -induzierte Chemokinfreisetzung zu bestimmen, wurden die Zellen mit den entsprechenden inflammatorischen Chemokinen und verschiedenen Konzentrationen des JAK-Inhibitors I stimuliert. Hierdurch konnte für beide Zytokine eine solche Beteiligung von JAK/STAT nachgewiesen werden. Um die IFN- γ -abhängige CXCL9-Ausschüttung in OV-MZ-6-Zellen zu hemmen, war dabei eine deutlich niedrigere Konzentration des JAK-Inhibitors notwendig, als um die synergistisch durch IFN- γ und TNF- α hervorgerufene CXCL9-Ausschüttung zu hemmen. Für CXCL10 ergaben sich analoge Ergebnisse. Sowohl die durch den alleinigen Einsatz von IFN- γ als auch die durch den kombinierten Einsatz beider Zytokine hervorgerufene CXCL10-Ausschüttung konnte durch den JAK- Inhibitor gehemmt werden, wobei die eingesetzte Konzentration eine Rolle spielte. Auch der durch den alleinigen Einsatz von TNF- α hervorgerufene Effekt auf die CXCL10- Ausschüttung konnte durch den Einsatz des Inhibitors signifikant gehemmt werden.

In den SKOV-3-Zellen ergaben sich analoge Ergebnisse zu den in den OV-MZ-6-Zellen beobachteten Ergebnissen (Abb. 15). Allerdings mit dem Unterschied, dass der Effekt des JAK-Inhibitors auf die TNF- α -abhängige CXCL10 Ausschüttung in SKOV-3 Zellen nicht untersucht wurde und die Versuche für die IFN- γ -abhängige CXCL10-Freisetzung keine signifikanten Ergebnisse lieferten, wenn auch ein deutlicher inhibitorischer Effekt durch den JAK-Inhibitor zu beobachten war. Die IFN- γ -abhängige CXCL9-Ausschüttung konnte durch den JAK-Inhibitor in den SKOV-3-Zellen signifikant gehemmt werden. Auch der synergistische Effekt der beiden Zytokine sowohl auf die CXCL9- wie auch auf die CXCL10-Ausschüttung wurde analog zu den OV-MZ-6 durch den JAK-Inhibitor signifikant gehemmt. Die Versuche mit dem JAK-Inhibitor konnten somit analog zu den Versuchen mit den NF- κ B-Inhibitoren zeigen, dass in Ovarialkarzinomzellen sowohl IFN- γ als auch TNF- α den JAK/STAT-Signalweg nutzen, um ihre Wirkung zu entfalten.

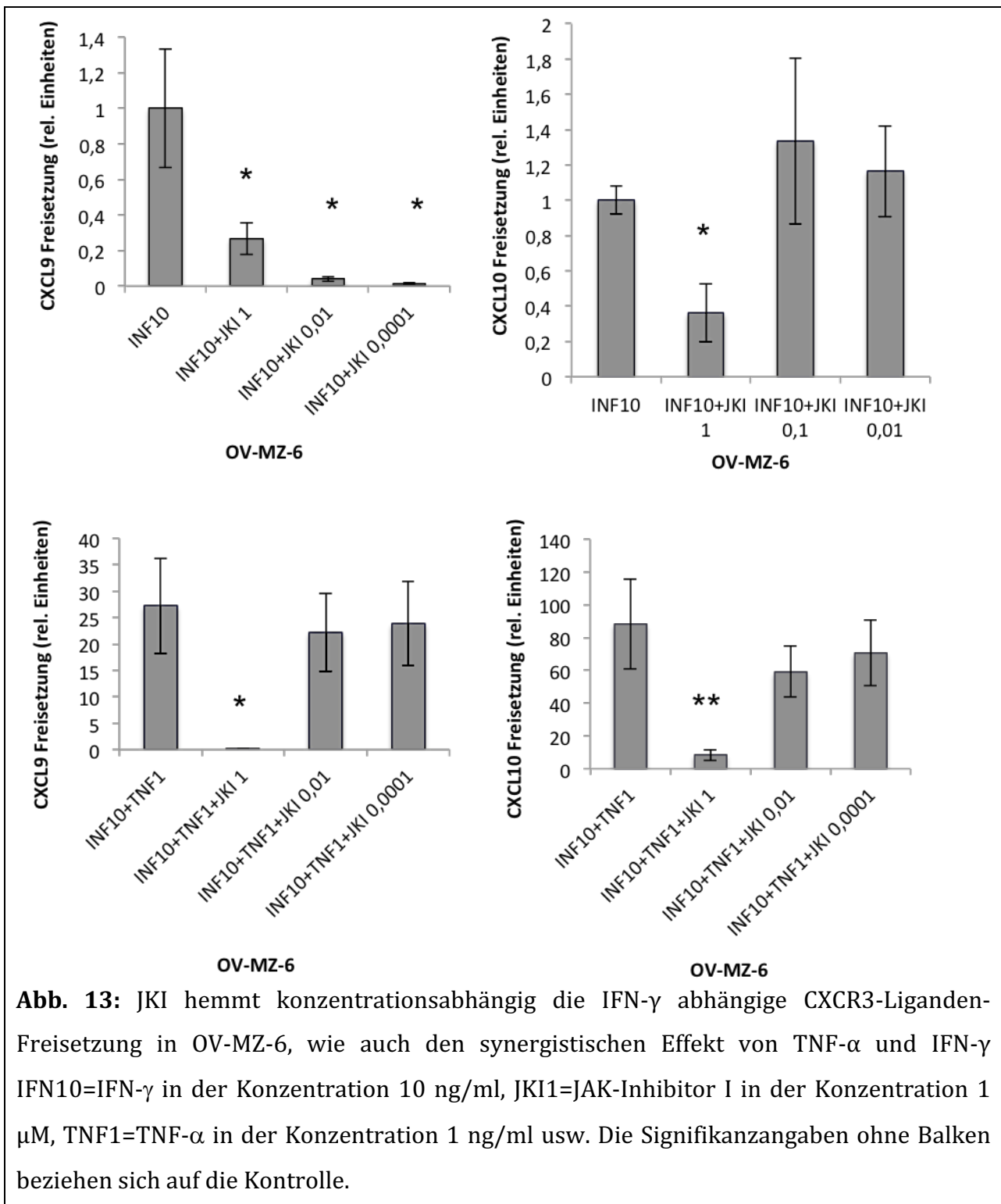
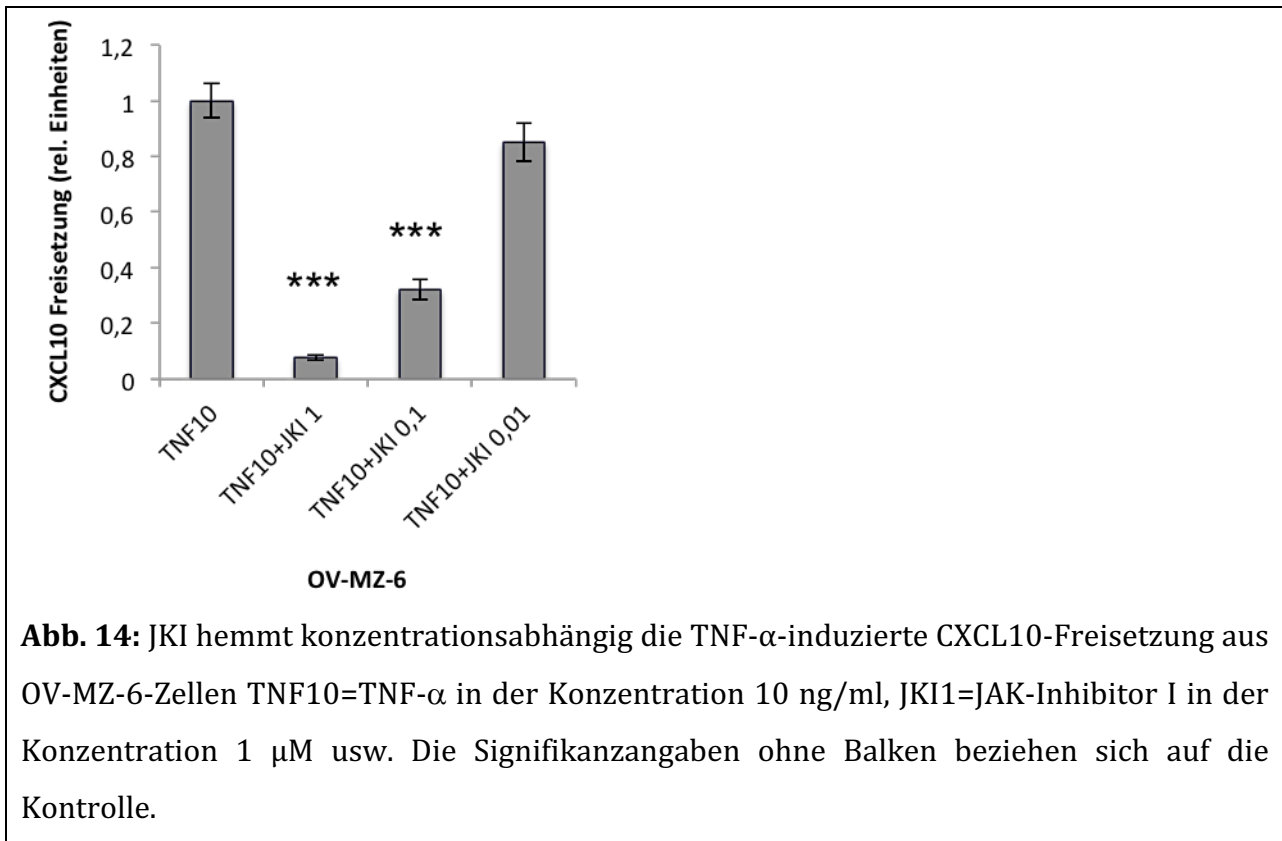


Abb. 13: JKI hemmt konzentrationsabhängig die IFN- γ abhängige CXCR3-Liganden-Freisetzung in OV-MZ-6, wie auch den synergistischen Effekt von TNF- α und IFN- γ . INF10=IFN- γ in der Konzentration 10 ng/ml, JKI1=JAK-Inhibitor I in der Konzentration 1 μ M, TNF1=TNF- α in der Konzentration 1 ng/ml usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.



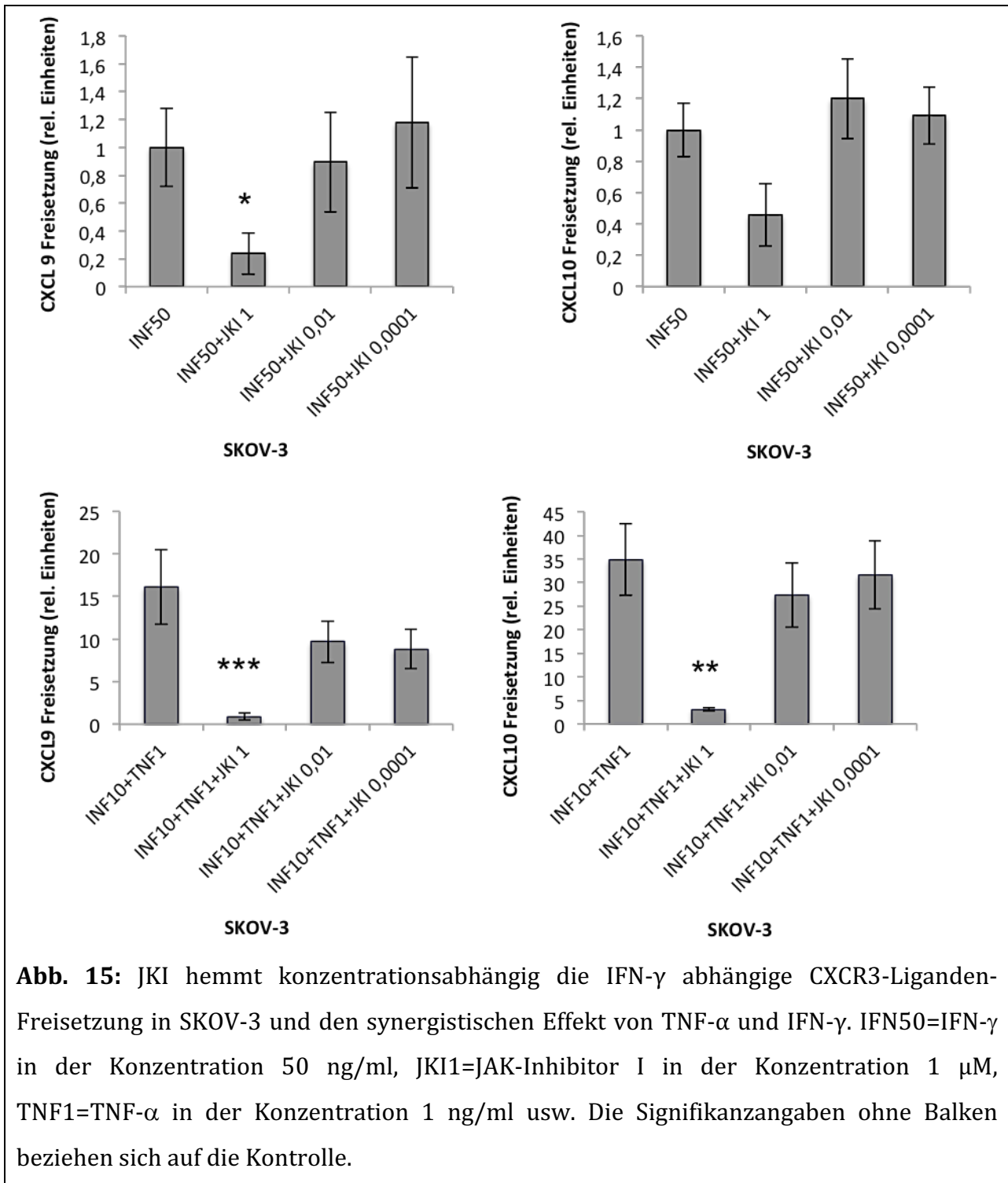


Abb. 15: JKI hemmt konzentrationsabhängig die IFN- γ abhängige CXCR3-Liganden-Freisetzung in SKOV-3 und den synergistischen Effekt von TNF- α und IFN- γ . INF50=IFN- γ in der Konzentration 50 ng/ml, JKI1=JAK-Inhibitor I in der Konzentration 1 μ M, TNF1=TNF- α in der Konzentration 1 ng/ml usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

3.3. Der Effekt von Prostaglandin E₂ auf die zytokinabhängige Chemokinsekretion

In weiteren Versuchen sollten nun Einflussmechanismen auf die zytokinabhängige Chemokinsekretion untersucht werden, die möglicherweise therapeutisch nutzbar gemacht werden können. Die bisherigen Versuche hatten gezeigt, dass die Chemokinsekretion durch TNF- α und IFN- γ stimuliert werden kann, die beiden Zytokine ihr Signal sowohl über NF- κ B wie auch JAK/STAT entfalten und die Signalwege beider Zytokine über NF- κ B und JAK/STAT in Verbindung zu stehen scheinen. Da, wie bereits ausgeführt wurde, die beiden Chemokine CXCL9 und CXCL10 einen tumorunterdrückenden Effekt in soliden Tumoren haben und dementsprechend auch im serösen Ovarialkarzinom unabhängige prognostische Marker eines verbesserten Überlebens darstellen (Bronger et al., 2016), schien es sinnvoll, weitere Mechanismen der Chemokinsekretion durch Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen, eventuell auch mit der Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussbarkeit.

Ergebnisse präklinischer Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Überexpression des Cyclooxygenasesystems im Ovarialkarzinom mit einer verminderten Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten korreliert und mit einer schlechteren Prognose des Ovarialkarzinoms assoziiert ist (Liu et al., 2009, Denkert et al., 2002). An Brustkrebszellen konnte bereits ein negativer Effekt von Prostaglandin E₂, dem Hauptmetaboliten des Cyclooxygenasesystems (Dannenbergh and Subbaramaiah, 2003), auf die Sekretion der CXCR3-Liganden gezeigt werden (Bronger et al., 2012). Somit war zu fragen, welchen Einfluss Prostaglandin E₂ auf die Bildung der CXCR3-Liganden im Ovarialkarzinom hat.

Obwohl OV-MZ-6- und SKOV-3-Zellen sowohl COX-1 als auch COX-2 exprimieren (Bronger et al., 2016) und somit eine endogene PGE₂-Produktion haben, kam es durch den exogenen Einsatz von PGE₂ generell zu einer weiteren Suppression der Chemokinfreisetzung: PGE₂ 30 μ M führte ungefähr zu einer Halbierung der IFN- γ -abhängigen CXCL9- und CXCL10-Freisetzung in beiden Zelllinien.

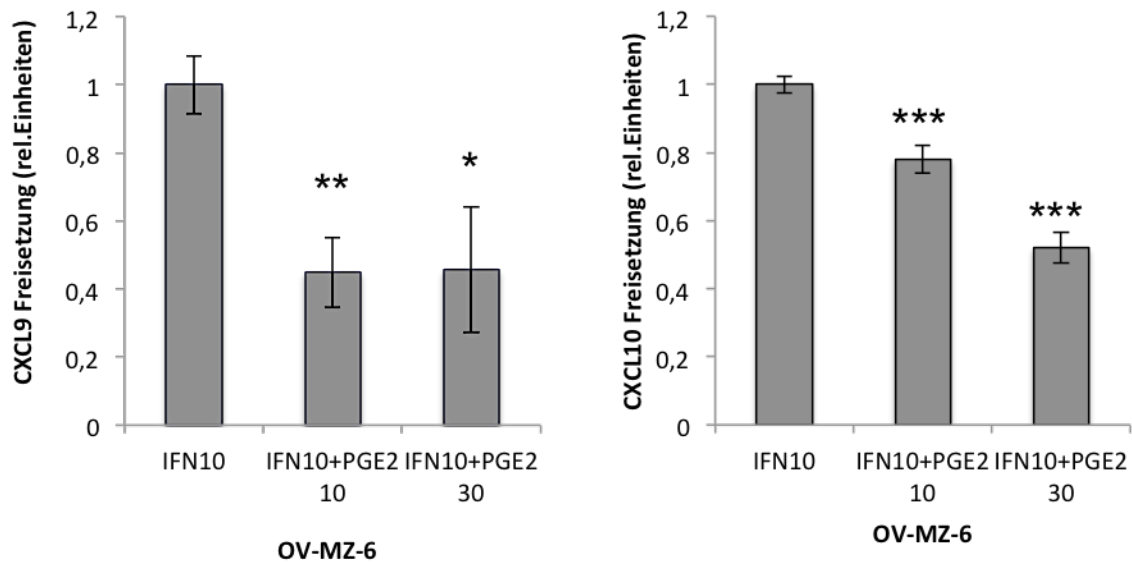


Abb. 16: PGE₂ hemmt die IFN- γ -induzierte CXCL9- und CXCL10-Freisetzung aus OV-MZ-6-Zellen. IFN10=IFN- γ in der Konzentration 10 ng/ml, PGE2 10=Prostaglandin E₂ in der Konzentration 10 μ M usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

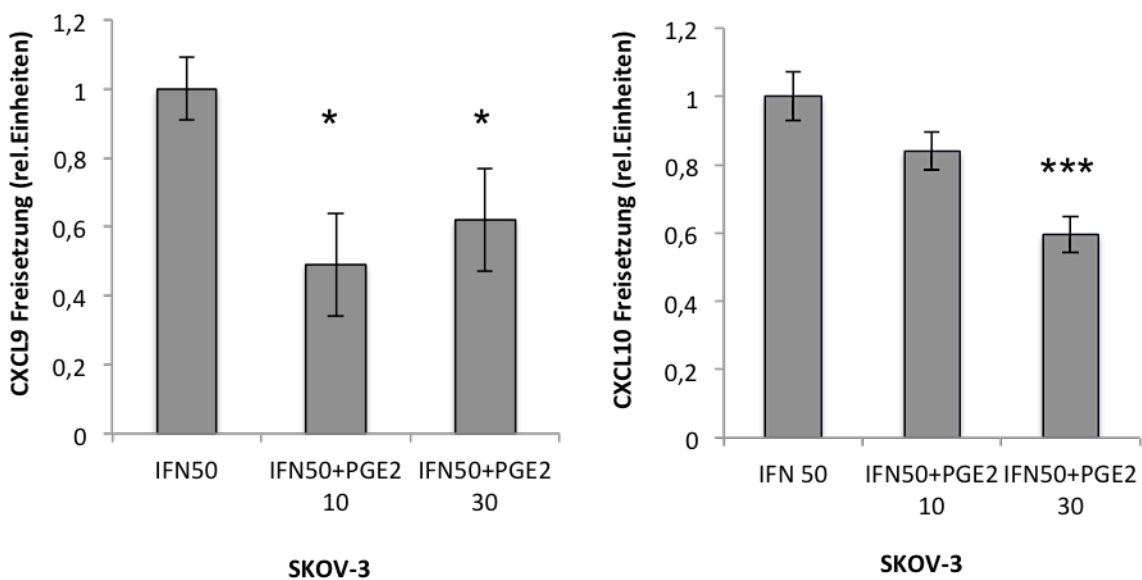
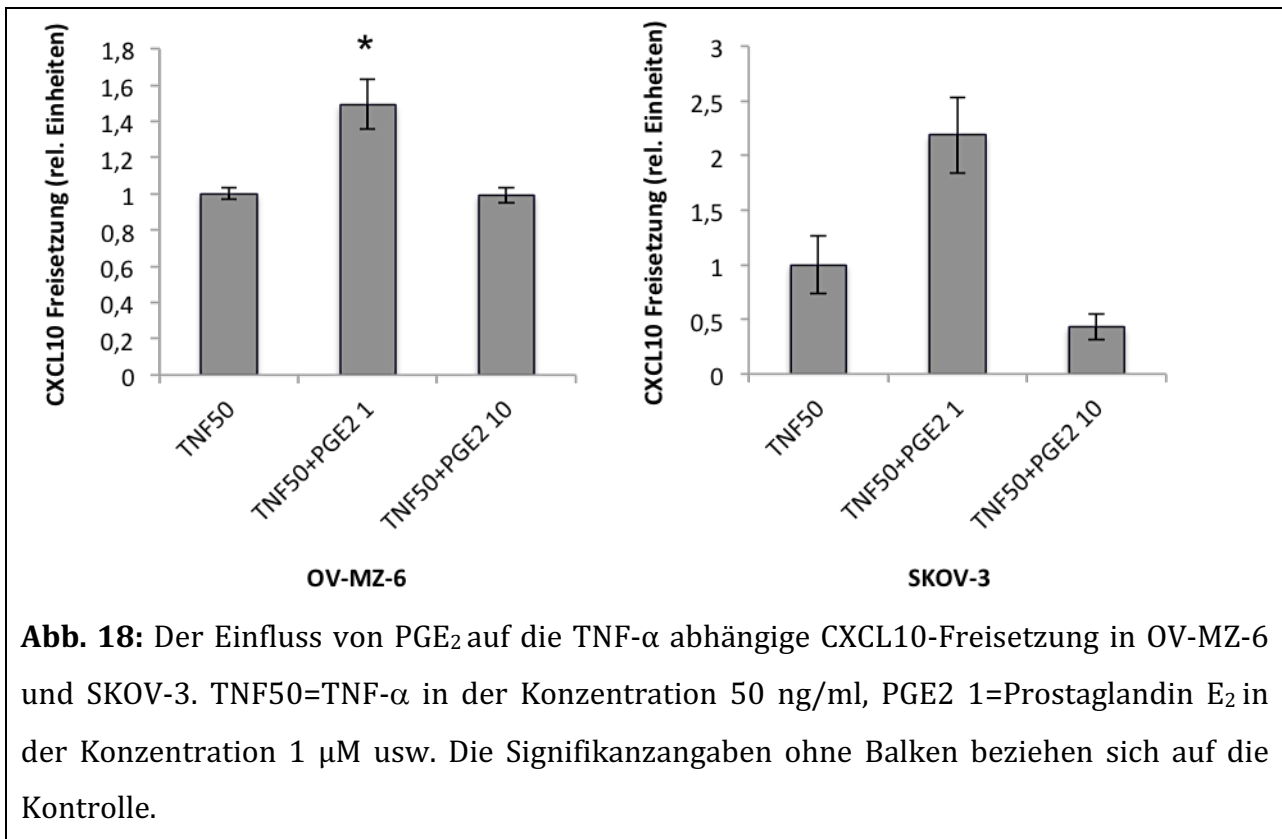


Abb. 17: PGE₂ hemmt die IFN- γ -induzierte CXCL9- und CXCL10-Freisetzung aus SKOV-3-Zellen. IFN50=IFN- γ in der Konzentration 50 ng/ml, PGE2 10=Prostaglandin E₂ in der Konzentration 10 μ M usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde getestet, wie sich PGE₂ auf die TNF- α -vermittelte CXCL10-Sekretion auswirkt. Es kam in beiden Zelllinien bei der 1 μ molaren Prostaglandinkonzentration zu einer Erhöhung der TNF- α -abhängigen Chemokinsekretion (in den SKOV-3-Zellen allerdings mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \geq 0,088$ und somit nicht innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus). Bei der 10 μ molaren PGE₂-Konzentration zeigte sich in beiden Zelllinien jedoch kein signifikanter Unterschied zum alleinigen Einsatz von TNF- α (Abb. 18).



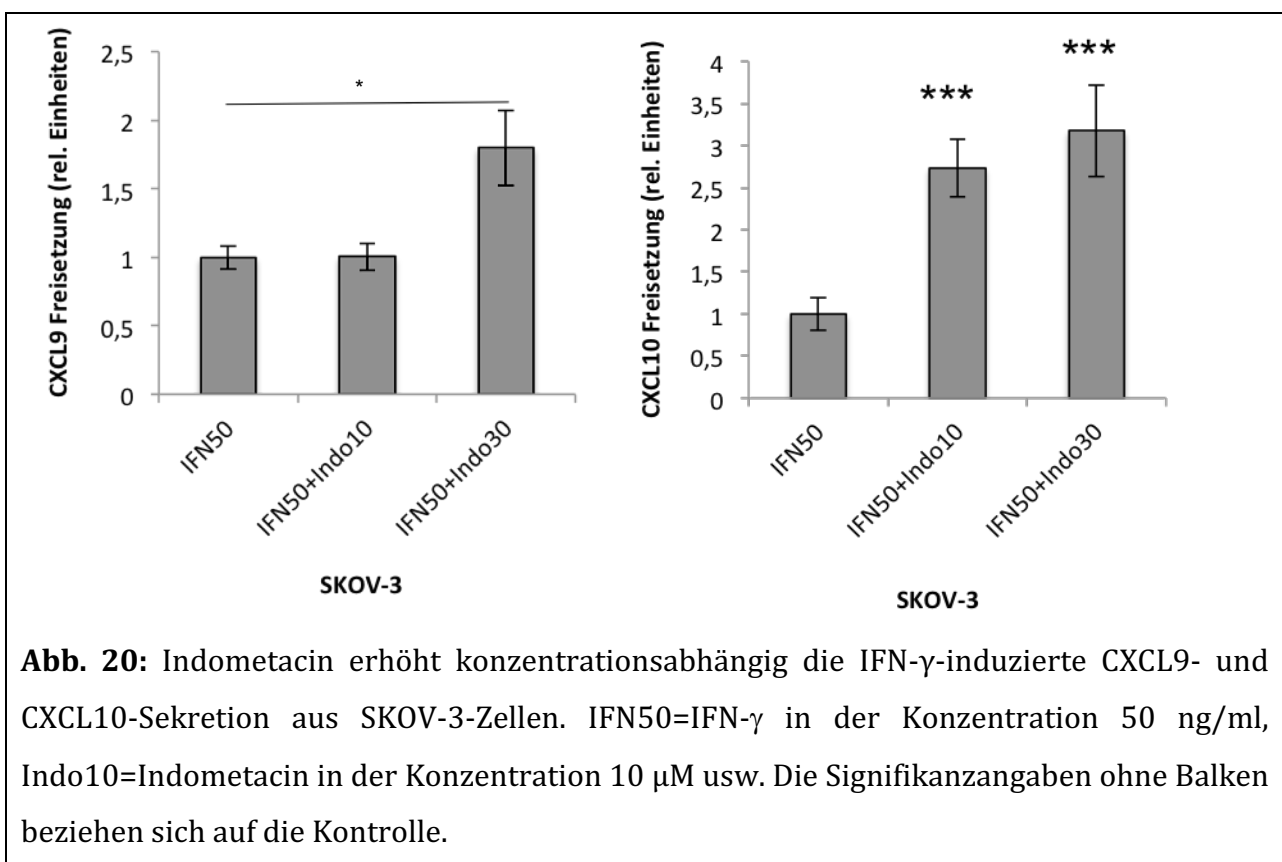
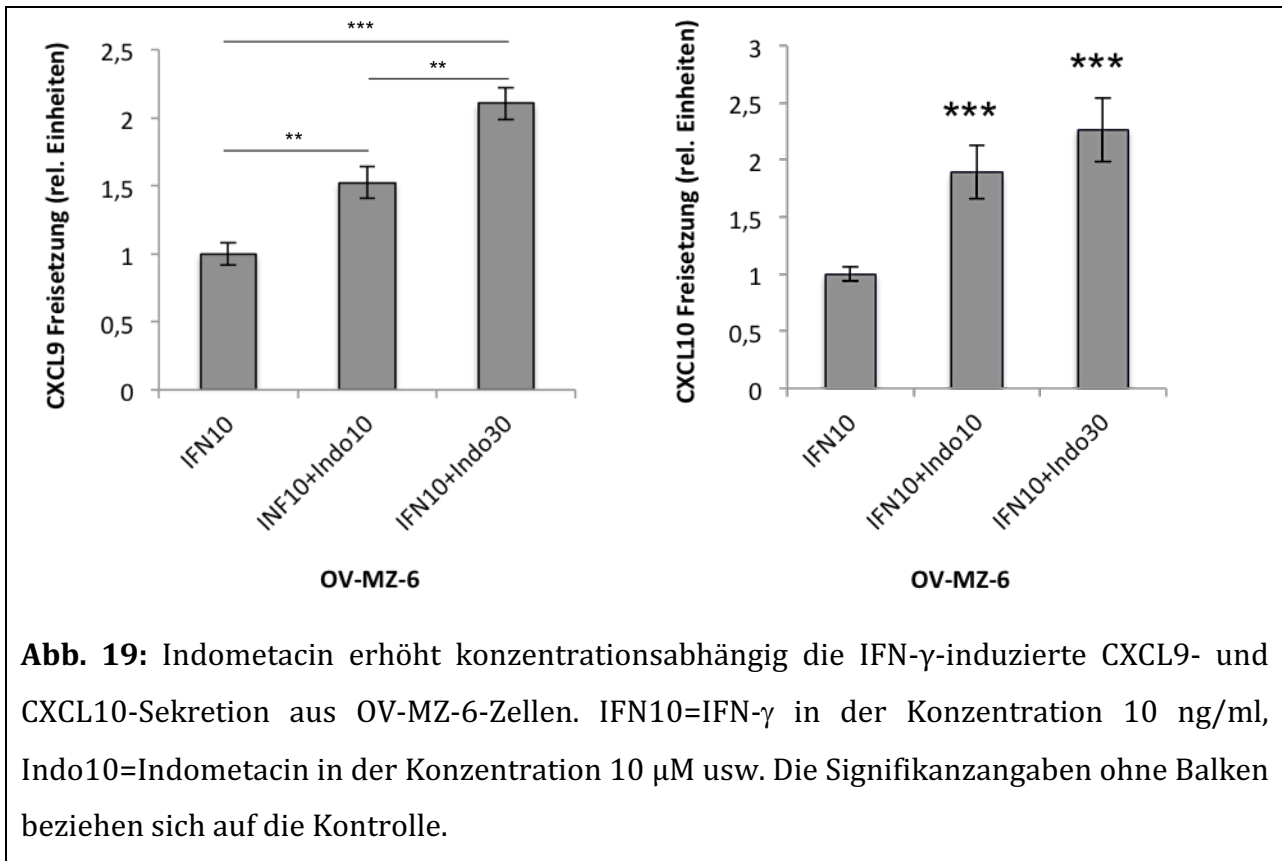
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PGE₂ in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration einen hemmenden Einfluss auf die IFN- γ -abhängige Sekretion der beiden CXCR3-Liganden hat. Somit war in einem weiteren Schritt die Frage von Interesse, ob sich nun umgekehrt durch den Einsatz von COX-Inhibitoren die Sekretion der beiden CXCR3-Liganden verbessern ließe, und ob ein potentieller pharmakologischer Ansatzpunkt besteht, die Immunintervention beim Ovarialkarzinom verbessern zu können.

3.4. Einfluss des Cyclooxygenase (COX)-Systems auf die CXCR3-Ligandensekretion aus Ovarialkarzinomzellen

3.4.1. Unspezifische COX-Hemmung: Einfluss von Indometacin

Um die Frage zu klären, ob eine Inhibition der Cyclooxygenase-Enzyme zu einer Verbesserung der CXCR3-Chemokinausschüttung führt, wurde Indometacin als unspezifischer COX-Inhibitor ausgewählt, der auch in Mammakarzinomzelllinien bereits gute Effekte gezeigt hatte (Bronger et al., 2012). In den OV-MZ-6 Zellen kam es zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ -abhängigen CXCL9- und CXCL10-Ausschüttung durch Indometacin (Abb. 19): Indometacin 30 μ M führte zu einer Verdoppelung der IFN- γ -abhängigen CXCR3-Liganden-Freisetzung. Dabei war in Bezug auf die IFN- γ -abhängige CXCL9-Freisetzung ein signifikanter Unterschied zwischen der 10 μ molaren und der 30 μ molaren Konzentration zu beobachten, da es durch die 30 μ molare Konzentration zu einer stärkeren Erhöhung der IFN- γ -abhängigen CXCL9-Freisetzung kam. In Bezug auf die IFN- γ -abhängige CXCL10-Freisetzung war kein Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Konzentrationen zu beobachten. Jedoch kam es jeweils durch beide Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ -abhängigen CXCL10-Ausschüttung. Auch in den SKOV-3 kam es nahezu zu einer Verdoppelung der IFN- γ -abhängigen CXCL-9-Freisetzung durch Indometacin 30 μ M, die IFN- γ -abhängige CXCL-10-Freisetzung aus SKOV-3 wurde sogar verdreifacht. Die TNF- α -abhängige CXCL10-Freisetzung aus SKOV-3 wurde durch Indometacin 30 μ M nahezu verdreifacht, in den OV-MZ-6 konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht beobachtet werden.

Die Versuche konnten somit zeigen, dass es durch Indometacin zu einer Zunahme überwiegend der IFN- γ -vermittelten, teilweise aber auch der TNF- α -vermittelten Chemokinfreisetzung kommt.



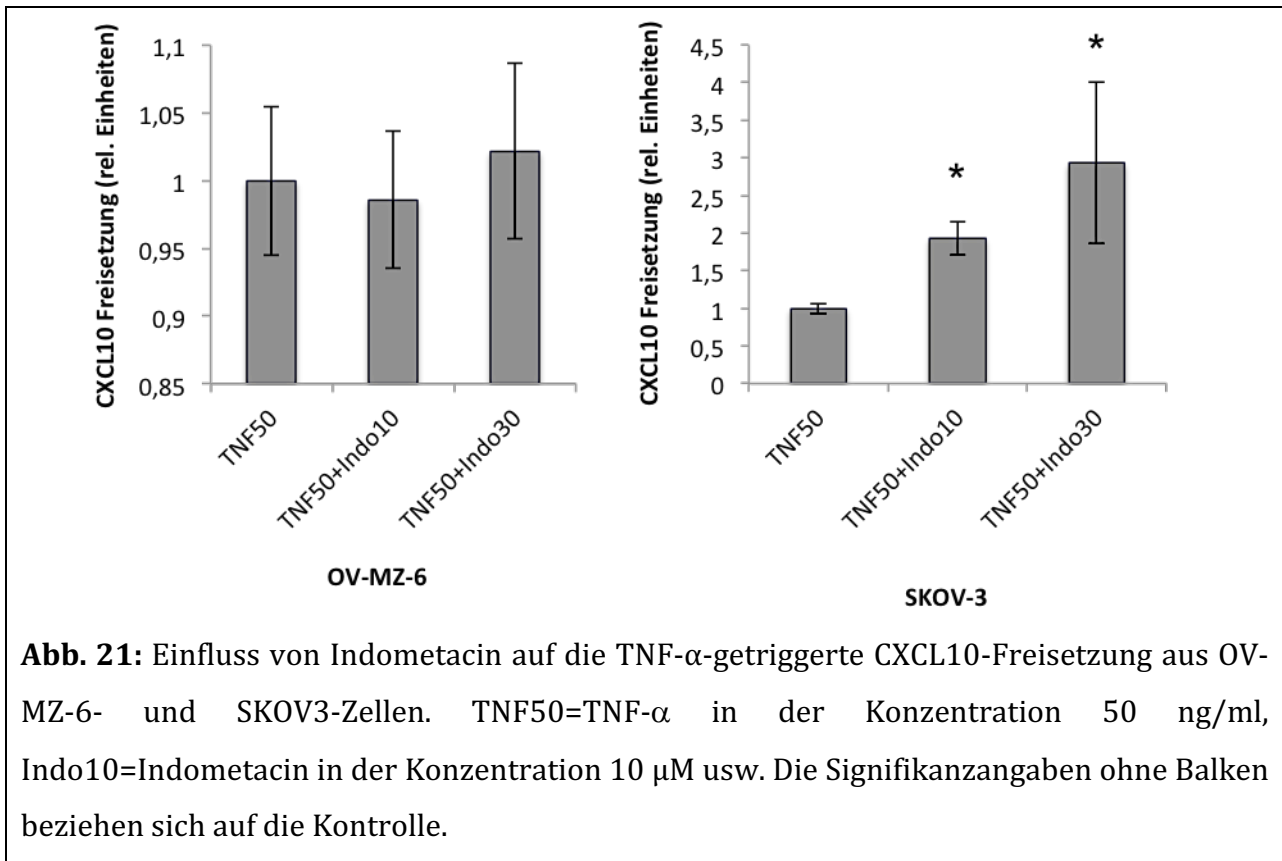


Abb. 21: Einfluss von Indometacin auf die TNF- α -getriggerte CXCL10-Freisetzung aus OV-MZ-6- und SKOV3-Zellen. TNF50=TNF- α in der Konzentration 50 ng/ml, Indo10=Indometacin in der Konzentration 10 μ M usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

3.4.2. Unspezifische COX-Hemmung: Einfluss von Acetylsalicylsäure (ASS)

Als nächstes wurde der Einfluss von Acetylsalicylsäure (ASS) als ein weiterer unspezifischer Inhibitor der Cyclooxygenase auf Ovarialkarzinomzellen untersucht. In den OV-MZ-6-Zellen kam es durch ASS zu einem Anstieg der IFN- γ -abhängigen CXCL10-Freisetzung, der jedoch statistisch nicht signifikant war (Abb. 22). In den SKOV-3-Zellen kam es hingegen zu einer signifikanten Abnahme der IFN- γ -abhängigen CXCL10-Freisetzung durch ASS in der höheren der beiden eingesetzten Konzentrationen von 30 μ M (Abb. 22). Somit konnte durch die unspezifische Hemmung der Cyclooxygenase durch ASS im Gegensatz zu Indometacin kein positiver Effekt auf die zytokinabhängige Chemokinsekretion in Ovarialkarzinomzellen beobachtet werden.

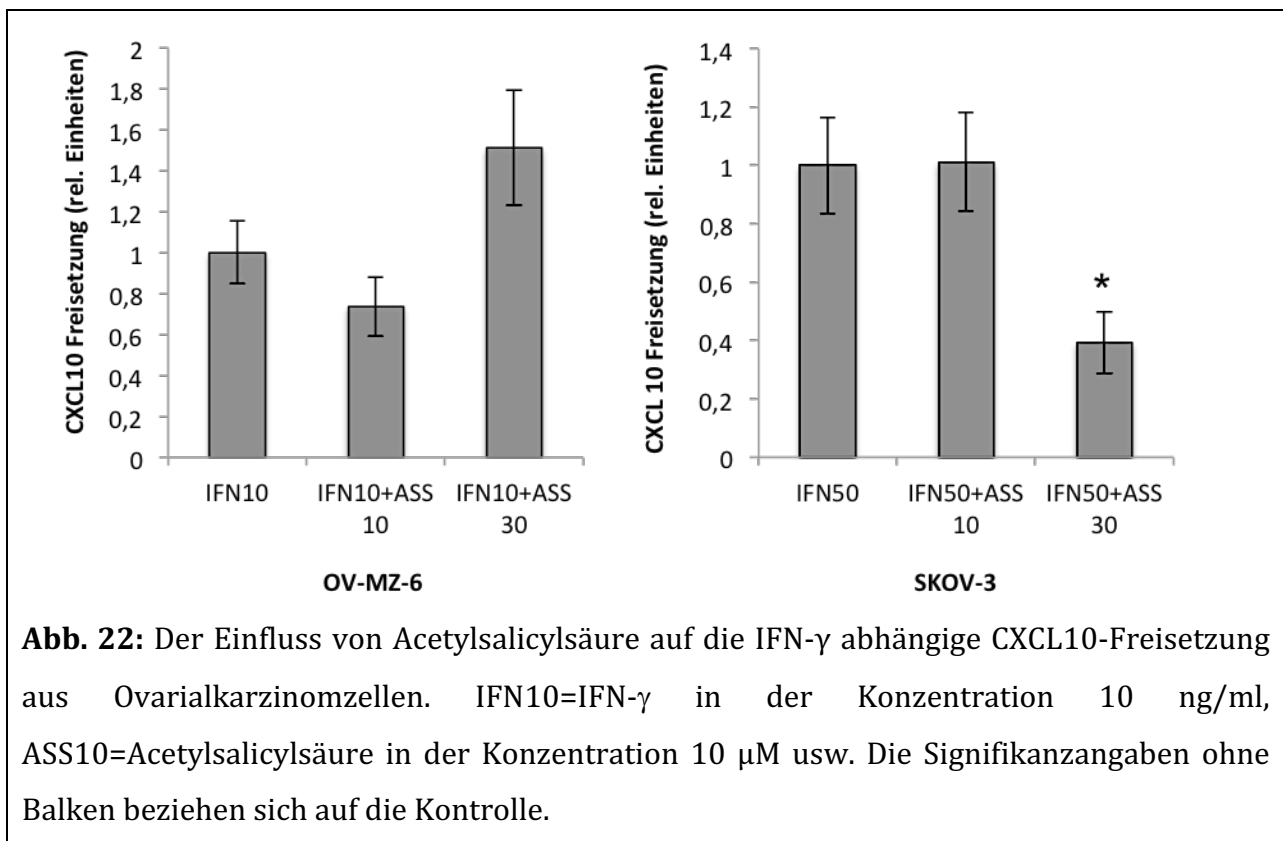
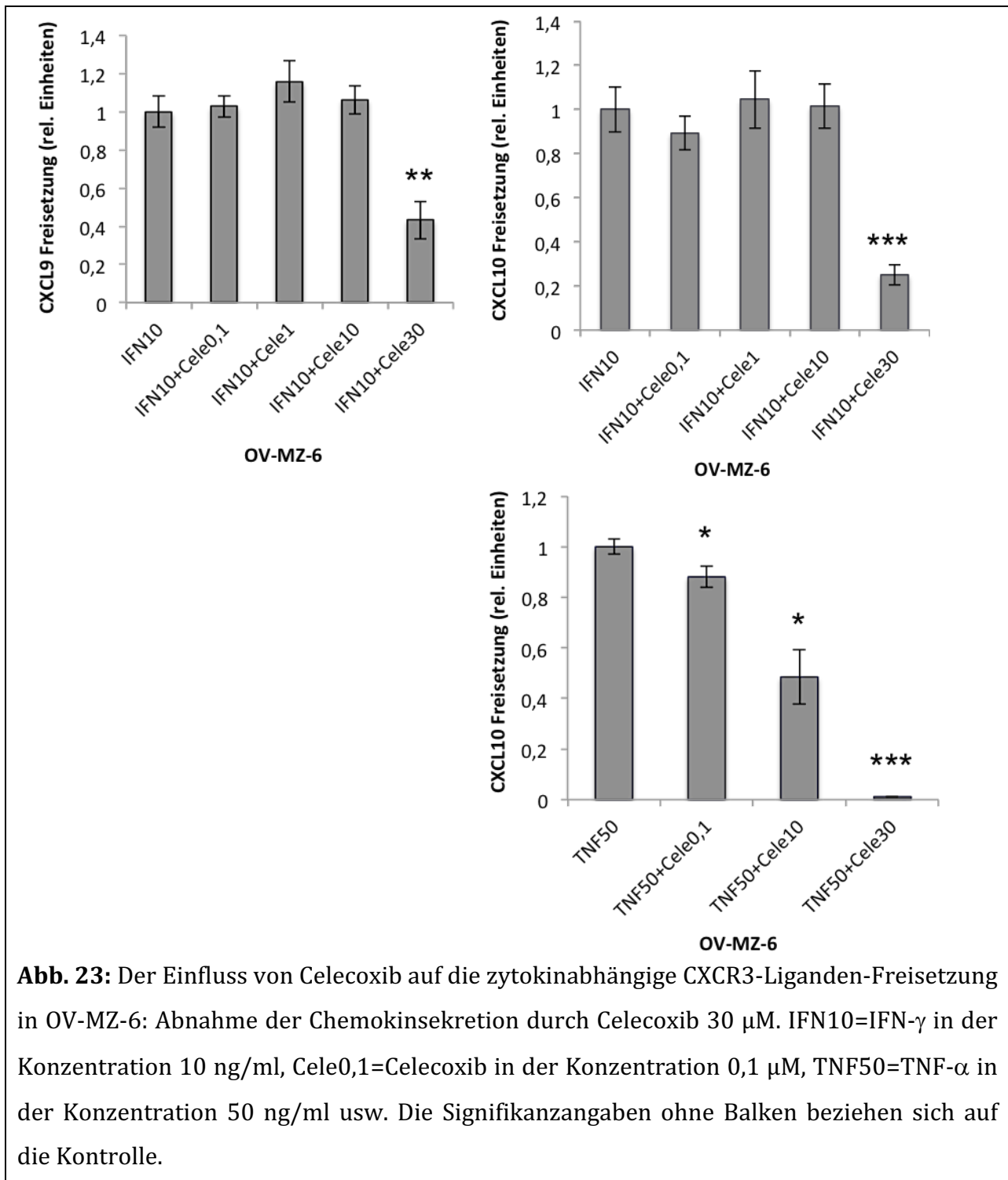
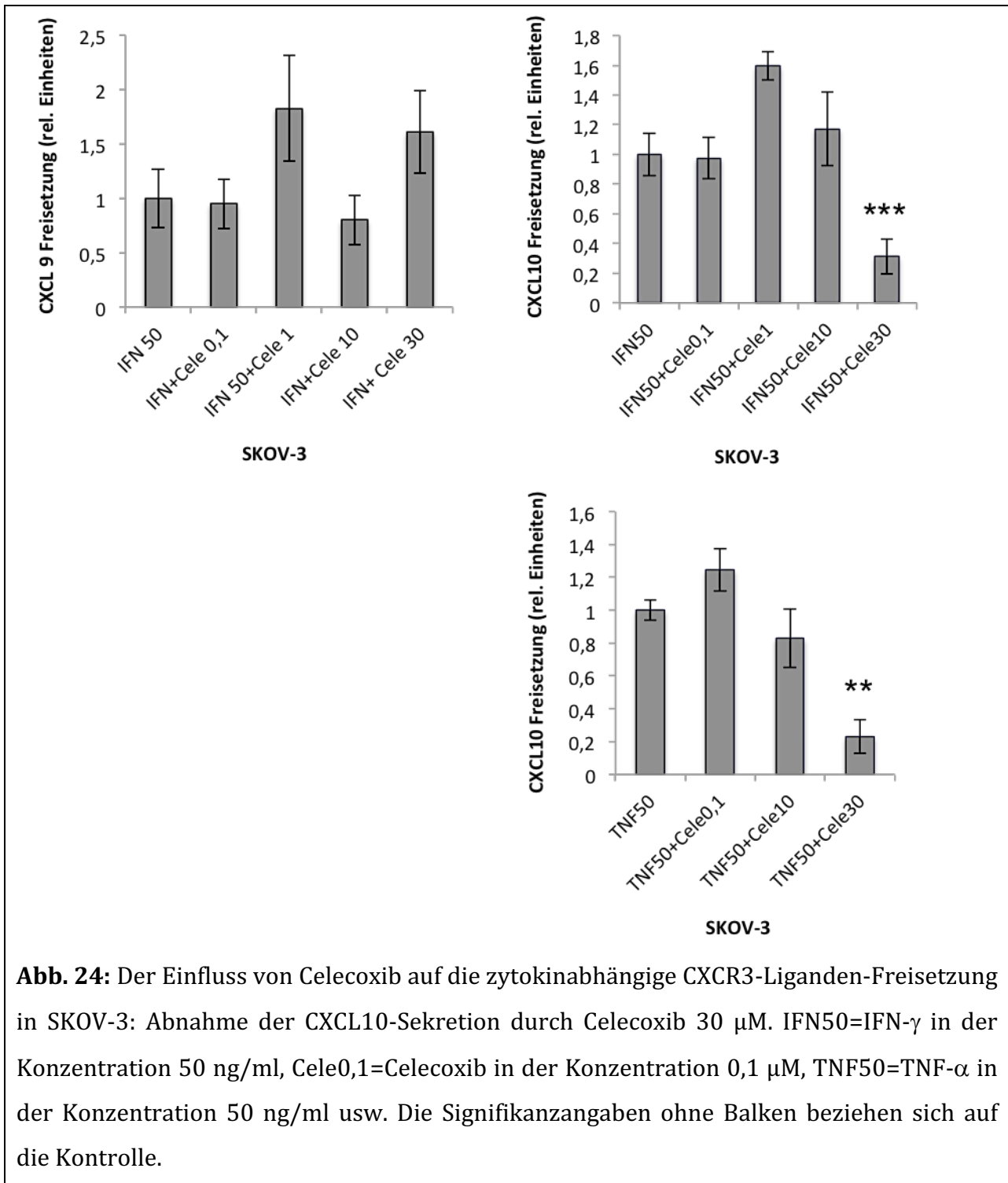


Abb. 22: Der Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die IFN- γ abhängige CXCL10-Freisetzung aus Ovarialkarzinomzellen. IFN10=IFN- γ in der Konzentration 10 ng/ml, ASS10=Acetylsalicylsäure in der Konzentration 10 μ M usw. Die Signifikanzangaben ohne Balken beziehen sich auf die Kontrolle.

3.4.3. COX-2-spezifische Hemmung: Einfluss von Celecoxib

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Effekt des COX-2-spezifischen Inhibitors Celecoxib auf die zytokinabhängige Chemokinfreisetzung in Ovarialkarzinomzellen untersucht. Celecoxib ist der einzige Cyclooxygenaseinhibitor, der bislang therapeutisch in humanen Ovarialkarzinomen im Rahmen einer prospektiven Untersuchung eingesetzt wurde (Reyners et al., 2012). Anders als durch Indometacin kam es sowohl in OV-MZ-6 Zellen (Abb. 23) als auch in SKOV-3-Zellen (Abb. 24) durch Celecoxib zu keiner signifikanten Erhöhung der IFN- γ -abhängigen CXCL9- und CXCL10-Freisetzung. Der gleiche Zusammenhang galt auch für TNF- α (Abb. 23 und 24). In den OV-MZ-6 Zellen war sogar eine signifikante Abnahme der TNF- α -abhängigen CXCL10-Freisetzung durch Celecoxib bereits ab einer Konzentration von 0,1 μ M zu beobachten. Ganz deutlich zeigte sich jedoch in beiden Zelllinien der Effekt der Hemmung durch Celecoxib bei einer Konzentration von 30 μ M: in dieser Konzentration kam es in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Abnahme sowohl der IFN- γ - als auch der TNF- α -abhängigen Chemokinsekretion. Die einzige Ausnahme stellte dabei die IFN- γ -abhängige CXCL9-Sekretion in SKOV-3 dar, wo es im gesamten Versuch zu keiner signifikanten Beeinflussung der IFN- γ -abhängigen CXCL9-Freisetzung durch verschiedene Konzentrationen von Celecoxib kam.





3.5. Celecoxibeffekte auf Zellkernebene

Im Folgenden wurde untersucht, wodurch die Hemmung der Chemokinsekretion durch Celecoxib in der Konzentration von 30 μM hervorgerufen werden könnte und ob sie womöglich durch Cyclooxygenase-unabhängige Effekte zustande kommt. Da die Vermutung bestand, dass der Effekt im Zusammenhang mit der NF- κ B-Signalkaskade stehen könnte, wurden Transfektionsversuche durchgeführt, um die NF- κ B-Aktivierung in stimulierten Ovarialkarzinomzellen beobachten zu können. Hierzu wurden als Modell stellvertretend die OV-MZ-6-Zellen benutzt. Die Transfektionsversuche waren so aufgebaut, dass das gemessene Signal am Luminometer direkt proportional mit der NF- κ B-Aktivität in den OV-MZ-6 Zellen war. Um festzustellen, welchen Einfluss die verwendeten Lösungsmittel DMSO (Celecoxib) und BSA (TNF- α) auf die NF- κ B-Aktivität haben, wurden beide als Kontrolle in den Versuch miteinbezogen (Abb. 25).

Die mit TNF- α stimulierten Zellen hatten im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine um das circa 6-fache (DMSO 1 μM) bzw. das circa 8-fache (DMSO 30 μM) erhöhte NF- κ B-Aktivität. Celecoxib hemmte in der Konzentration von 30 μM die NF- κ B-Aktivität um deutlich mehr als die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle (TNF- α 10 ng/ml und DMSO 30 μM). In der Konzentration von 1 μM beeinflusst Celecoxib die NF- κ B-Aktivität jedoch nicht signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass Celecoxib in einer Konzentration von 30 μM das NF- κ B-Signal hemmt und über diesen Mechanismus zu einer Erniedrigung der zytokinabhängigen Chemokinsekretion in OV-MZ-6 Zellen führen könnte. Weiterführende Untersuchungen mit Hilfe von MTT assays haben gezeigt, dass für diese Unterschiede in der NF- κ B-Aktivität keine Veränderungen der Zellviabilität (Anteil der lebenden Zellen innerhalb der Zellpopulation) verantwortlich gemacht werden können (Bronger et al., 2016).

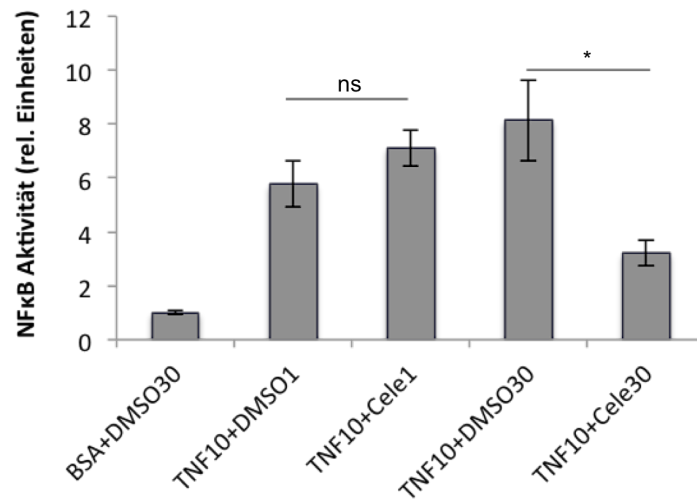
**OV-MZ-6**

Abb. 25: Der Einfluss von Celecoxib auf die NF-κB-Aktivität in OV-MZ-6
BSA+DMSO=Kontrolle: entspricht der NF-κB-Aktivität der Zellen ohne deren Stimulation,
DMSO30=DMSO in der Konzentration 30 μM, TNF10=TNF-α in der Konzentration
10 ng/ml, Cele1=Celecoxib in der Konzentration 1 μM usw.

4. Diskussion

4.1. Der synergistische Effekt von TNF-alpha und IFN-gamma

Der kombinierte Einsatz der beiden proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α führt zu einer um ein Vielfaches höheren Freisetzung der CXCR3-Liganden als der isolierte Einsatz eines jeweiligen Zytokins. Der synergistische Effekt von TNF- α und IFN- γ konnte durch die Versuche an allen drei Ovarialkarzinomzelllinien bestätigt werden. Analoge Ergebnisse lieferten auch die Versuche an den oben bereits erwähnten Brustkrebszellen. Somit stellte sich die Frage, wodurch der beobachtete synergistische Effekt zustande kommt. Bereits 1991 berichtete Fiers, dass die nekrotische Wirkung von TNF- α auf Tumorzellen durch die Anwesenheit von IFN- γ verstärkt werden könne (Fiers, 1991). Die Arbeitsgruppe um Deborah L. Clarke stellte sich ebenfalls die Frage, auf welcher Regulationsebene der Synergismus der beiden Zytokine in Bezug auf die Freisetzung von CXCL10 erklärt werden könne (Clarke et al., 2010). Dafür wurden glatte Muskelzellen untersucht, die aus Geweben der menschlichen Trachea gewonnen wurden. Die Untersuchungen ergaben, dass die Synergie unabhängig von NF- κ B vermittelt wird, sondern durch die Wirkung von CREB-binding-protein (CBP) am CXCL10-Promotor erklärt werden kann. CBP wird ausgehend durch das Signal verschiedener Rezeptoren (siehe Abbildung 4) durch die Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert und bindet in der phosphorylierten Form an cAMP responsive elements (CRE's), die wiederum Transkriptionsfaktoren rekrutieren. Somit führt die Aktivierung von CBP zu einer Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum CXCL10-Promotor und somit zu einer verstärkten Transkription des CXCL10-Genes. In den Untersuchungen von D. Clarke et al. war der Effekt von TNF- α oder IFN- γ in alleiniger Anwendung in Bezug auf die Rekrutierung der Polymerase bedeutend geringer. Auch die Ergebnisse von Jindarat et al. beschreiben den Synergismus von TNF- α und IFN- γ in Bezug auf die Phosphorylierung von CREB (Jindarat et al., 2013). Die Vermutung ist also naheliegend, dass auch in Ovarialkarzinomzellen ein Grund für den synergistischen Effekt von TNF- α und IFN- γ auf Zellkernebene durch den Einfluss von Coaktivatoren von Transkriptionsfaktoren wie CBP zu suchen ist. Der in den Versuchen dieser Arbeit beobachtete Zusammenhang, dass die alleinige Stimulation der Ovarialkarzinomzellen mit TNF- α zu keiner CXCL9-Ausschüttung führt, der synergistische Effekt von TNF- α und IFN- γ in Bezug auf die CXCL9-Ausschüttung aber gegeben ist, stützt diese These. Denn das alleinige Signal von NF- κ B scheint nicht auszureichen, um die Transkription des CXCL9-Genes in Ovarialkarzinomzellen zu

initiieren. Auf Zellkernebene kommt es allerdings zu einer gegenseitigen Verstärkung beziehungsweise Synergie der Signale von NF- κ B und STAT-1, sodass eine um ein Vielfaches höhere CXCL9-Freisetzung, wie sie beispielsweise durch IFN- γ alleine hervorgerufen wird, in Gang gesetzt wird. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Aktivierung von CBP in Bezug auf den Synergismus von TNF- α und IFN- γ nur einer von vielen Mechanismen ist. Die Arbeit von Richard Pine an HepG2 Zellen (ATCC HB 8065) ergab, dass die Promotoren bestimmter Gene separate Bindungsstellen für NF- κ B und STAT-1 haben, die gleichzeitig besetzt werden können (Pine, 1997). Pine konnte zeigen, dass es in Zellen, die mit IFN- γ und TNF- α gleichzeitig stimuliert wurden, zur Transkription des IRF1 Genes gekommen ist. IRF1 entfaltet dann wiederum gemeinsam mit NF- κ B synergistische Wirkung, indem es zur Expression weiterer Gene wie beispielsweise der MHC Klasse I Gene führt. Um zu beweisen, durch welche Mechanismen Synergie zwischen TNF- α und IFN- γ in Ovarialkarzinomzellen verursacht wird, müssten jedoch weitere Untersuchungen angestellt werden.

4.2. Die Verbindung der Signalkaskaden von IFN-gamma und TNF-alpha

Es ist bereits bekannt, dass TNF- α sein Signal über NF- κ B vermittelt. Auch die Arbeit von Deborah L. Clarke an glatten Muskelzellen konnte dies ebenso zeigen wie die Ergebnisse anderer Forschungsarbeiten an unterschiedlichen Zelltypen (To et al., 2013, Bonetti et al., 2000, Bruun et al., 2009). Ebenfalls bekannt ist, dass IFN- γ den JAK/STAT-Signalweg nutzt (Shen et al., 2018, Johnson et al., 2011, Young and Bream, 2007).

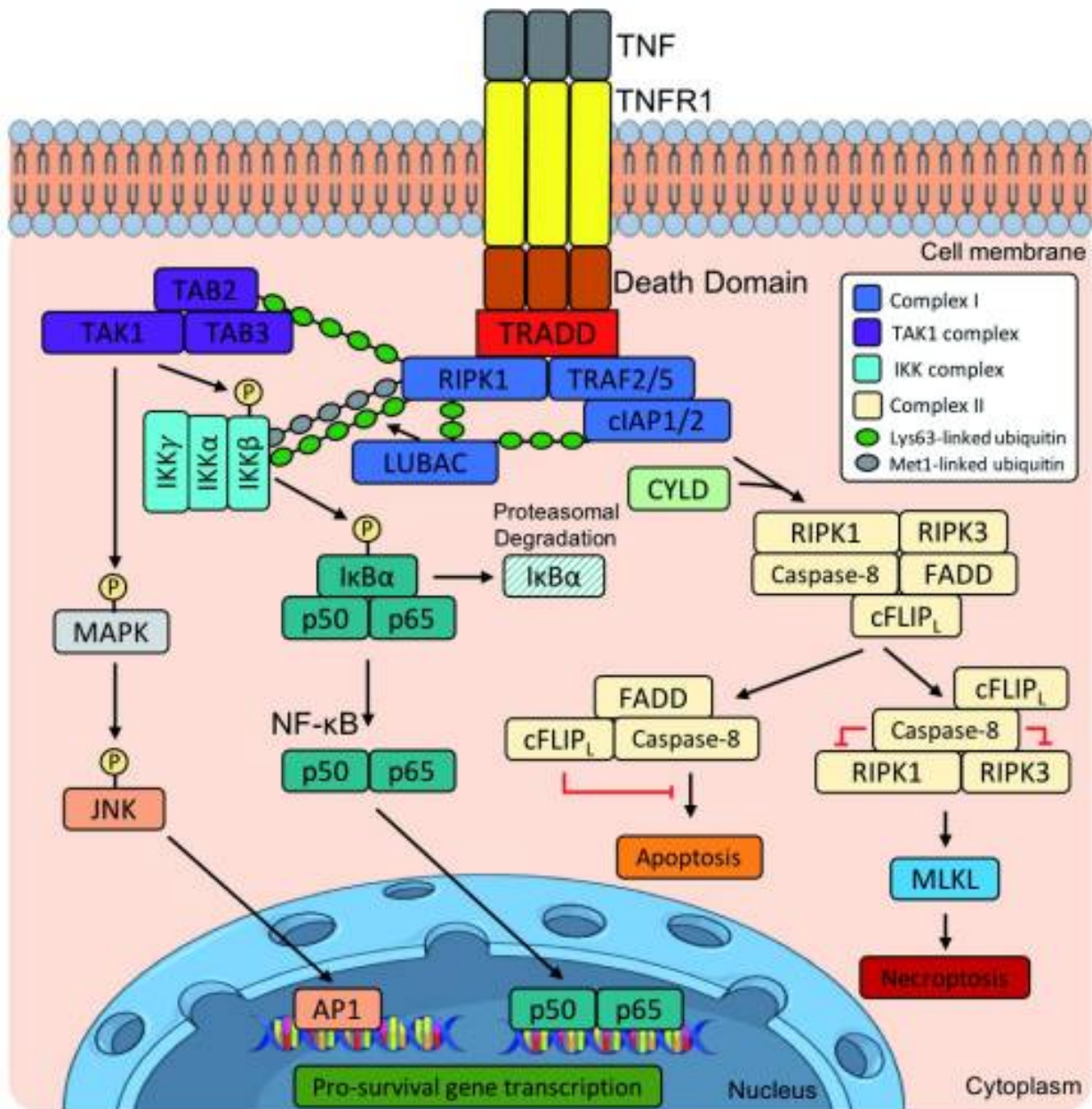


Abb. 26: Auszüge aus der TNF- α -Signalkaskade

Die Bindung von TNF- α an den TNF- α -Rezeptor1 (TNFR1) führt zur Aktivierung des IKK (IkappaB Kinase) Komplexes, was die Phosphorylierung von IκB zur Folge hat. Dadurch kann IκB im Proteasom abgebaut werden, was wiederum zur Folge hat, dass NF-κB freigegeben wird, in den Zellkern wandert und dort die entsprechenden Gene transkribiert werden (Holbrook et al., 2019).

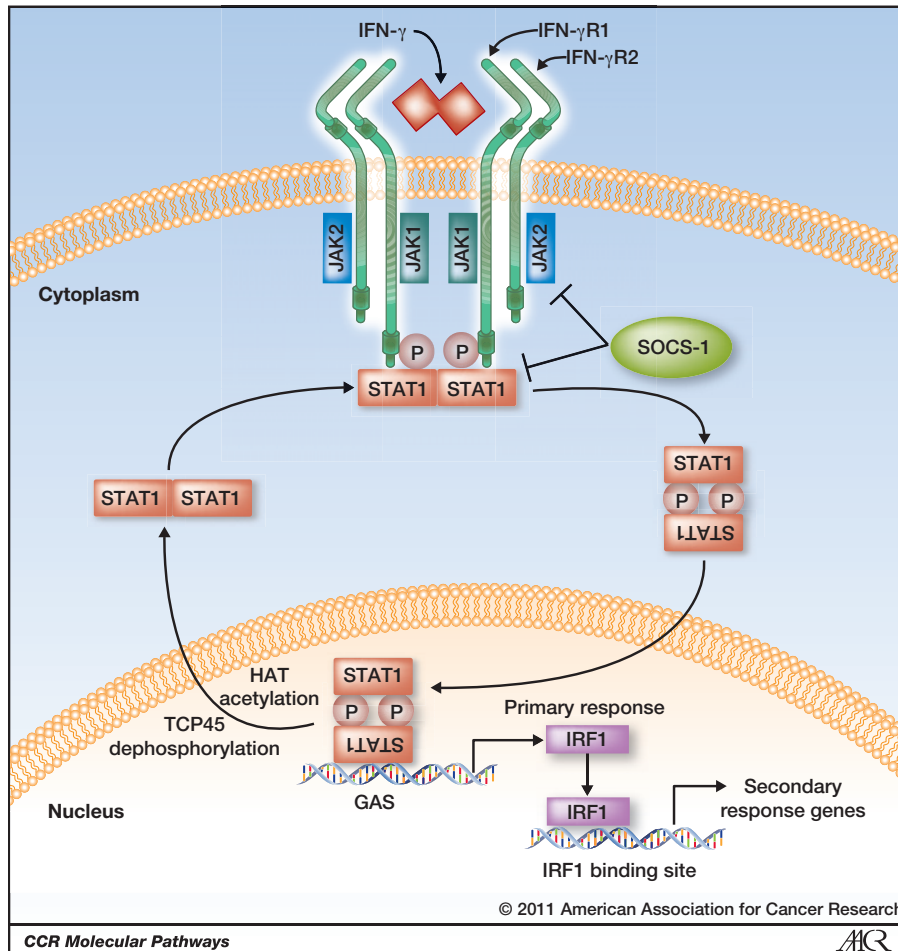


Abb. 27: Die durch IFN- γ vermittelte intrazelluläre Signalkaskade

Durch die Bindung von IFN- γ am Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung des Rezeptors durch JAK-I und JAK-II. Durch die Phosphorylierung entstehen Bindungsstellen für die STAT-Proteine, vorwiegend STAT-1 α (hier nur STAT-1 genannt). Der STAT-1-Homodimer transloziert in den Zellkern, wo er an GAS (gamma activated sequences) von entsprechenden Promotoren bindet und die nachfolgenden Gene transkribiert werden können (Zaidi and Merlino, 2011).

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass in OV-MZ-6 und SKOV-3 Zellen das Signal von TNF- α durch den Einsatz der beiden NF- κ B-Inhibitoren BAY 11-7082 sowie TPCK in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration gehemmt werden kann. Gleichzeitig kann das Signal von IFN- γ durch den JAK-Inhibitor I konzentrationsabhängig gehemmt werden. Das Signal von TNF- α konnte durch den JAK-Inhibitor I ebenfalls gehemmt werden wie auch das Signal von IFN- γ durch die beiden NF- κ B-Inhibitoren. Auch der synergistische Effekt von TNF- α und IFN- γ ließ sich sowohl durch den NF- κ B-Inhibitor TPCK als auch durch den Inhibitor des JAK/STAT-Signalweges JKI I hemmen. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass es in Ovarialkarzinomzellen eine Verbindung der beiden Signalwege geben muss. Es scheint, als könne NF- κ B sein Signal ohne die Anwesenheit von STAT-1 α bzw. einem anderen Bestandteil des JAK/STAT Signalweges nicht entfalten,

ebenso wie STAT-1 α sein Signal ohne die Anwesenheit von NF- κ B nicht zu entfalten scheint. Es darf dabei nicht unerwähnt bleiben, dass die Ergebnisse an allen drei Zelllinien gezeigt haben, dass die isolierte Stimulation mit IFN- γ zu einer Freisetzung sowohl von CXCL9 als auch von CXCL10 führt, ebenso wie die isolierte Stimulation der Zellen mit TNF- α in allen drei Zelllinien zu eine CXCL10-Freisetzung auslöst. Diese Beobachtungen scheinen im ersten Augenblick widersprüchlich zu der These zu sein, dass NF- κ B in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor auf die Anwesenheit von Bestandteilen des JAK/STAT Signalweges angewiesen ist und andersrum.

Ein Erklärungsansatz, um diese Widersprüchlichkeit aufzulösen, könnte in einer transienten Aktivität von NF- κ B bzw. STAT-1 α in Tumorzellen liegen, die erst durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren unterbunden werden kann. Für eine transiente NF- κ B-Aktivität von Zellen gibt es Hinweise in der Literatur (Sakaeda et al., 2006). Die Verbindung zwischen dem NF- κ B- und STAT-1 α -Signal wäre beispielsweise dadurch denkbar, dass das Genprodukt eines durch NF- κ B-regulierten Gens für die Transkription eines durch STAT-1 α -regulierten Gens vonnöten ist oder andersrum. Auch die oben bereits ausgeführten Beobachtungen von Pine liefern Erklärungsansätze in dieser Fragestellung. Das durch TNF- α und IFN- γ vermittelte, durch die Signale von NF- κ B und STAT-1 α synergistisch aktivierte Genprodukt führt gemeinsam mit NF- κ B zur Transkription des Zielgens. Die Beobachtungen von Richard Pine lieferten aber auch Ergebnisse, die widersprüchlich zu der aufgestellten These sind. Der synergistische Effekt von TNF- α und IFN- γ bezog sich in seinen Versuchen auf Gene, die auch durch jedes der beiden Zytokine alleine reguliert werden können.

4.3. Die Wirkung von Prostaglandin E₂ auf die Freisetzung der CXCR3-Liganden

Die Frage des Effekts von PGE₂ auf die zytokinabhängige Freisetzung der CXCR3-Liganden war bereits Gegenstand verschiedener Forschungsarbeiten und anhand unterschiedlicher Zellarten untersucht worden (Bronger et al., 2012, Kanda and Watanabe, 2002, Mathieu et al., 2008, McIlroy et al., 2006). Die Gemeinsamkeit aller Arbeiten besteht in der Beobachtung, die auch an den beiden Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und SKOV-3 gemacht werden konnte: PGE₂ führt zu einer verminderten IFN- γ -abhängigen Freisetzung der beiden CXCR3-Liganden durch Tumorzellen. Somit ist PGE₂ auf Grund der oben bereits beschriebenen Zusammenhänge ein negativer Einflussfaktor auf die IFN- γ abhängige

Freisetzung der CXCR3-Liganden. Für die Beziehung zwischen TNF- α und PGE₂ ergab sich in den vorliegenden Versuchen an Ovarialkarzinomzellen jedoch ein anderer Zusammenhang. In der Konzentration von 1 μ M PGE₂ kam es zu einem Anstieg der Freisetzung von CXCL10 sowohl in OV-MZ-6-Zellen ($p \leq 0,05$), als auch in SKOV-3-Zellen (jedoch $p = 0,088$). In der Konzentration von 10 μ M hatte PGE₂ keinen Einfluss auf die TNF- α -abhängige CXCL10-Freisetzung in beiden Zelllinien. Der Einfluss von PGE₂ auf die TNF- α abhängige CXCL10-Freisetzung wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nur am Rande untersucht, so dass sich an dieser Stelle sicher ein sinnvoller Ansatz für weitere Forschungsarbeit ergibt. Auch der Frage, ob und – wenn ja – in welchem Maße, TNF- α bzw. IFN- γ Einfluss auf die PGE₂-Produktion durch Tumorzellen haben, wurde nicht nachgegangen.

Die krebsfördernden Effekte von PGE₂ sind vielfältig, sodass es nicht unbedeutend zu sein scheint, die Zusammenhänge von Prostaglandinen und CXCR3-Liganden im Ovarialkarzinom besser zu verstehen. Es gibt Hinweise darauf, dass PGE₂ β -Catenin aktiviert (Che et al., 2017, Li et al., 2016). β -Catenin ist ein Protein mit verschiedensten Funktionen, dessen Hauptaufgabe in der Aufrechterhaltung eines physiologischen Zellgleichgewichts liegt. Abnormale Expression von β -Catenin führt zu unterschiedlichen Krankheiten, unter anderem Krebs; in Bezug auf die maligne Transformation gesunder Zellen kommt β -Catenin eine entscheidende Rolle zu (Thakur and Mishra, 2013). Die Rolle von β -Catenin im Zusammenhang mit bösartigen Tumoren des Menschen ist für eine ansehnliche Anzahl von Tumorarten beschrieben (Zhan et al., 2017). Krebsfördernde Wirkung entfaltet β -Catenin beispielsweise über die Regulation der Expression von VEGF, wobei sich ein positiver Einfluss auf die Angiogenese ergibt (Mann et al., 1999). Diese Eigenschaft von β -Catenin deckt sich auch mit der Beobachtung, dass COX-1-Überexpression im Ovarialkarzinom positiv mit Neovaskularisation in Verbindung steht und die selektive Hemmung der COX-1 die Bildung von VEGF negativ beeinflusst; in derselben Studie konnte der positive Einfluss von PGE₂ auf die VEGF-Produktion gezeigt werden (Gupta et al., 2003). Damit im Einklang steht auch die Beobachtung, dass COX-2-Überexpression im Magenkarzinom in Verbindung mit gesteigerter PGE₂-Synthese und Gefäßneubildung steht (Uefuji et al., 2000). Somit steht die Wirkung von PGE₂ bzw. β -Catenin in Bezug auf die Angiogenese von Tumorzellen antagonistisch zur Funktion der beiden angiostatischen CXCR3-Liganden, was wiederum in Einklang steht mit der Beobachtung der inversen Korrelation von PGE₂ und den beiden CXCR3-Liganden in Bezug

auf deren IFN- γ abhängige Freisetzung. In Magenkarzinomzellen konnte sogar ein direkter Zusammenhang zwischen PGE₂ und der vermehrten Expression von VEGF hergestellt werden (Ding et al., 2005). Die oben erwähnte inverse Korrelation von PGE₂ und den CXCR3-Liganden galt in den untersuchten Ovarialkarzinomzellen allerdings nur für die IFN- γ -abhängige Freisetzung der CXCR3-Liganden, nicht jedoch für die TNF- α -abhängige Freisetzung.

Um die unterschiedlichen Rollen von PGE₂ in Bezug auf die zytokinabhängige Freisetzung der CXCR3-Liganden im Ovarialkarzinom besser zu verstehen, müssten jedoch weiterführende Untersuchungen angestellt werden. Interessant wäre beispielsweise die Frage, über welchen Rezeptor PGE₂ seine Wirkung in diesem Zusammenhang entfaltet und in welcher Beziehung dieser Rezeptor mit den aktivierten Signalwegen von TNF- α bzw. IFN- γ steht. Darüber hinaus scheint es aber durchaus sinnvoll zu sein, nach Wegen der Beeinflussbarkeit der beobachteten PGE₂-Effekte zu suchen. Wie bereits durch die Versuche dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stellt IFN- γ das potentere Zytokin in Bezug auf die Freisetzung der CXCR3-Liganden dar, da es im Gegensatz zu TNF- α sowohl zur Freisetzung von CXCL9 als auch von CXCL10 führt.

4.4. Inhibition des Cyclooxygenasesystems

Der Einfluss des Cyclooxygenasesystems auf das Tumorgeschehen wurde bereits im Zusammenhang unterschiedlicher Tumoren untersucht (Bronger et al., 2012, Kundu et al., 2002, Li et al., 2012, Liu et al., 2012, Okada et al., 2012). Die Bedeutung der COX-Überexpression ist für eine Vielzahl von Tumoren bekannt (Uefuji et al., 2000), so auch für das Ovarialkarzinom (Gupta et al., 2003, Ferrandina et al., 2002a): sie ist mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung verbunden (Denkert et al., 2002, Liu et al., 2009, Zhu et al., 2017, Spizzo et al., 2003, Tian et al., 2003, Pomianowska et al., 2014). Einer der möglichen Gründe dafür könnte in der Tatsache liegen, dass COX-2-Überexpression im Ovarialkarzinom mit Chemoresistenz assoziiert ist (Ferrandina et al., 2002a, Ferrandina et al., 2002b). Auch im Mammakarzinom sind erhöhte intratumorale Konzentrationen von Cyclooxygenase und PGE₂ dafür bekannt, dass sie mit einer schlechteren Prognose und der Bildung von Fernmetastasen assoziiert sind (Ristimaki et al., 2002, Karmali et al., 1983, Ranger et al., 2004). NSAIDs als Inhibitoren des Cyclooxygenasesystems haben im Gegensatz zu den tumorfördernden Eigenschaften der Cyclooxygenasen (unter 4.5.3 ausführlicher erläutert) tumorunterdrückende Eigenschaften und sind beispielsweise

dafür bekannt, dass sie die Angiogenese von Tumorzellen hemmen (Thun et al., 2002). Auf Grund der Tatsache, dass es eine Vielzahl an Cyclooxygenaseinhibitoren gibt, deren pharmakologische Eigenschaften gut beschrieben sind, stellt das Cyclooxygenasesystem auch für das Ovarialkarzinom einen vielversprechenden Therapieansatz dar.

4.4.1. Indometacin

Durch den Einsatz von Indometacin kam es sowohl in OV-MZ-6 Zellen wie auch in SKOV-3 Zellen zu einer Erhöhung der IFN- γ -abhängigen CXCL9- und CXCL10-Freisetzung. Analog zu diesen in-vitro Ergebnissen sind die Beobachtungen aus Schnitten von HGSC, an denen eine inverse Korrelation von COX-2 und CXCL10 nachgewiesen werden konnte (Bronger et al., 2016) ebenso wie die inverse Korrelation von CXCL9 und COX-2 in Schnitten des Mammakarzinoms (Bronger et al., 2012). Diese Ergebnisse könnten Hinweise darauf liefern, dass die Ergebnisse des in-vitro-Modells in-vivo ebenfalls von Bedeutung sein könnten. Indometacin als nichtselektiver COX-Inhibitor führt zu einer unspezifischen Hemmung beider Isoenzyme der Cyclooxygenase in Tumorzellen und ist somit imstande, den negativen Effekt von PGE₂ auf die IFN- γ -abhängige Chemokinfreisetzung auszugleichen. In Bezug auf die TNF- α -abhängige CXCL10-Freisetzung kam es durch Indometacin zu einer Erhöhung in SKOV-3, nicht jedoch in OV-MZ-6 Zellen. Und das, obwohl PGE₂ wie bereits weiter oben ausgeführt, keinen negativen Einfluss auf die TNF- α -abhängige CXCL10-Freisetzung hatte.

Kommen somit für den beobachteten Zusammenhang zwischen PGE₂ und TNF- α COX-unabhängige Effekte in Frage? In Bezug auf die Wirkung von COX-Inhibitoren auf bösartige Neubildungen des Menschen werden sowohl COX-abhängige als auch COX-unabhängige Mechanismen diskutiert (Kundu et al., 2005) wie beispielsweise die Wirkung von NSAIDs auf NF- κ B-vermittelte Signale (Yiannakopoulou, 2015). So konnte beispielsweise auch für das NSAID Sulindac eine Wirkung auf die transiente NF- κ B-Aktivität in Mausmakrophagen nachgewiesen werden (Sakaeda et al., 2006). Um den genauen Zusammenhang von TNF- α und Indometacin im Ovarialkarzinom zu klären, müssten allerdings weiterführende Untersuchungen angestellt werden.

Indometacin kann also zu einer gesteigerten intratumoralen Konzentration der CXCR3-Liganden führen, von denen wiederum bekannt ist, dass sie die Rekrutierung von CXCR3 positiven T-Zellen und NK-Zellen in solide Tumoren vermitteln (Wendel et al., 2008, Yang et al., 2006, Gorbachev et al., 2007, Wennerberg et al., 2015). Am Mausmodell führte

Indometacin, vermittelt durch die Funktion von T-Zellen und NK-Zellen, zu einer Beeinträchtigung des Tumorwachstums sowie des Metastasierungspotentials von humanen Karzinomzellen (Kundu and Fulton, 2002, Kundu et al., 2005). Auf der Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergibt sich der Vorschlag, an den Möglichkeiten einer Immuntherapie des Ovarialkarzinoms durch Indometacin zu arbeiten, denn die Behandlung mit Indometacin scheint einen erfolgversprechenden Ansatz darzustellen. Allerdings lassen die Beobachtungen, die am Mausmodell des hepatozellulären Karzinoms (HCC) gewonnen wurden, zu dem Schluss kommen, dass es notwendig ist, die Auswirkungen von Indometacin auf das Ovarialkarzinom im klinischen Setting näher zu betrachten. Denn in Bezug auf das HCC konnte gezeigt werden, dass die Langzeitanwendung von Indometacin die Prognose des HCC verschlechtert (Xu et al., 2015). Somit wäre die Durchführung von prospektiven, randomisierten Studien mit Indometacin an Ovarialkarzinompatientinnen sinnvoll, um zu verstehen, ob die in-vitro beobachteten Zusammenhänge auch in-vivo gelten und welche Auswirkungen eine Langzeitanwendung auf das Krankheitsgeschehen hätte.

4.4.2. ASS

In Anlehnung an frühere Versuche an Brustkrebszellen wurde der Einfluss von ASS auf die IFN- γ abhängige CXCL10-Freisetzung untersucht. Die Versuche an OV-MZ-6 und SKOV-3 Zellen ergaben keinen positiven Zusammenhang zwischen ASS in der verwendeten Konzentration und der IFN- γ abhängigen CXCL10-Freisetzung. Im Gegenteil, es ergab sich sogar ein negativer Zusammenhang für ASS und die IFN- γ abhängige CXCL10-Freisetzung in SKOV-3. ASS als nichtselektiver COX-Inhibitor hemmt die Aktivität von COX-1 und COX-2 in Ovarialkarzinomzellen und damit die Synthese von PGE₂. Wie bereits ausgeführt, hat PGE₂ einen negativen Einfluss auf die IFN- γ abhängige CXCL10-Freisetzung sowohl in OV-MZ-6 als auch in SKOV-3. Somit wäre analog zu den beobachteten Effekten von Indometacin eine Steigerung der Chemokinfreisetzung durch ASS in den Ovarialkarzinomzellen zu erwarten gewesen. Da dieser Effekt jedoch ausblieb, liegt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Effekte von ASS in Bezug auf die IFN- γ -abhängige CXCL10-Freisetzung durch COX-unabhängige Effekte zustande kommen, die im Vergleich zu dem Einfluss der Cyclooxygenase zu überwiegen scheinen. Um die Zusammenhänge besser zu verstehen und die zugrunde liegenden Mechanismen zu klären, ist jedoch weitere Forschungsarbeit notwendig. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass der Einfluss von ASS auf das Ovarialkarzinom in der Literatur sehr kontrovers

diskutiert wird. Auf der einen Seite gibt es retrospektive klinische Studien, die Hinweise darauf liefern, dass die regelmäßige Einnahme von ASS invers mit dem Risiko, am Ovarialkarzinom zu erkranken, korrelieren könnte (Akhmedkhanov et al., 2001, Lo-Ciganic et al., 2012, Cramer et al., 1998, Tavani et al., 2000, Schildkraut et al., 2006). Auf der anderen Seite haben prospektive Untersuchungen an 76.821 Teilnehmerinnen der Nurses` Health Study (NHS) aus den USA ergeben, dass es keine Assoziation gibt zwischen der Anwendung von ASS und dem Risiko, am Ovarialkarzinom zu erkranken, und zwar unabhängig von Dosis und Länge der Anwendung (Fairfield et al., 2002). Eine dänische Studie an 4117 Ovarialkarzinompatientinnen ergab ebenfalls, dass durch die Einnahme einer niedrigen Konzentration von ASS nach Diagnosestellung die Mortalität der Patientinnen nicht gesenkt wird (Verdoodt et al., 2018). Somit kommt man zu dem Schluss, dass die Rolle von ASS in Bezug auf das Ovarialkarzinom bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte. Weder in Hinblick auf die Reduktion des Erkrankungsrisikos noch auf die Verbesserung der Prognose der bereits Erkrankten.

4.4.3. Celecoxib

Als nächstes wurde der Effekt des COX-2-spezifischen Inhibitors Celecoxib auf die Freisetzung der CXCR3-Liganden untersucht. Obwohl, wie bereits ausführlich erläutert, der Einsatz von COX-Inhibitoren im Zusammenhang verschiedener Tumoren keinen neuen Ansatz darstellt, ist Celecoxib der einzige COX-Inhibitor zu sein, dessen therapeutische Wirkung auf das Ovarialkarzinom bislang in einer prospektiven, randomisierten klinischen Studie untersucht wurde (Reyners et al., 2012). Im Gegensatz zu Indometacin kam es durch den Einsatz von Celecoxib in OV-MZ-6 sowie SKOV-3 Zellen zu keiner Zunahme der IFN- γ -abhängigen Freisetzung der CXCR3-Liganden. Der gleiche Effekt zeigte sich in Bezug auf die TNF- α -abhängige CXCL10-Freisetzung. In der Konzentration von 30 μ M führte Celecoxib sogar zu einer deutlichen Abnahme der zytokinabhängigen Freisetzung der CXCR3-Liganden. Ähnliche Ergebnisse brachte auch die Anwendung des in Deutschland nicht zugelassenen COX-Inhibitors *Sulindac* an Mausmakrophagen, durch dessen Anwendung es zu einer verminderten CXCL9 mRNA-Synthese kam (Sakaeda et al., 2006). Um die These zu stützen, dass die im Zusammenhang mit der Celecoxibanwendung beobachteten Einflüsse auf die Freisetzung der CXCR3-Liganden durch COX-unabhängige Effekte zustande kommen und eventuell mit einer Hemmung von NF- κ B in Verbindung stehen könnten, wurden Transfektionsversuche an OV-MZ-6 Zellen durchgeführt, um die TNF- α vermittelte NF- κ B-Aktivität in Verbindung mit und ohne Celecoxib zu detektieren. Dadurch konnte

eine Hemmung von NF-κB durch Celecoxib 30 μM, nicht jedoch durch Celecoxib 1 μM in Bezug auf die TNFα-abhängige NF-κB-Aktivierung nachgewiesen werden. Analoge Experimente, die an Brustkrebszellen durchgeführt wurden, haben ebenfalls ergeben, dass Celecoxib zu keiner Zunahme der IFN-γ-abhängigen Freisetzung der CXCR3-Liganden führt; in der Konzentration von 30 μM Celecoxib kam es in den Brustkrebszellen lediglich zu einer Hemmung der IFN-γ-abhängigen CXCL9-Freisetzung, nicht jedoch der CXCL10-Freisetzung (Bronger et al., 2012). Nicht geklärt wurde, wodurch die Unterschiede in der COX-unspezifischen Hemmung durch Indometacin und der COX-2-spezifischen Hemmung durch Celecoxib bei der zytokinabhängigen Chemokinfreisetzung zustande kommen. Die COX-unabhängigen Effekte von Celecoxib, die auch durch die Transfektionsversuche an OV-MZ-6 Zellen für das Ovarialkarzinom bestätigt werden konnten, sind in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (Grosch et al., 2006, Barlow et al., 2012, Arico et al., 2002, Zhang et al., 2004) und im Folgenden durch die Abbildung 29 dargestellt.

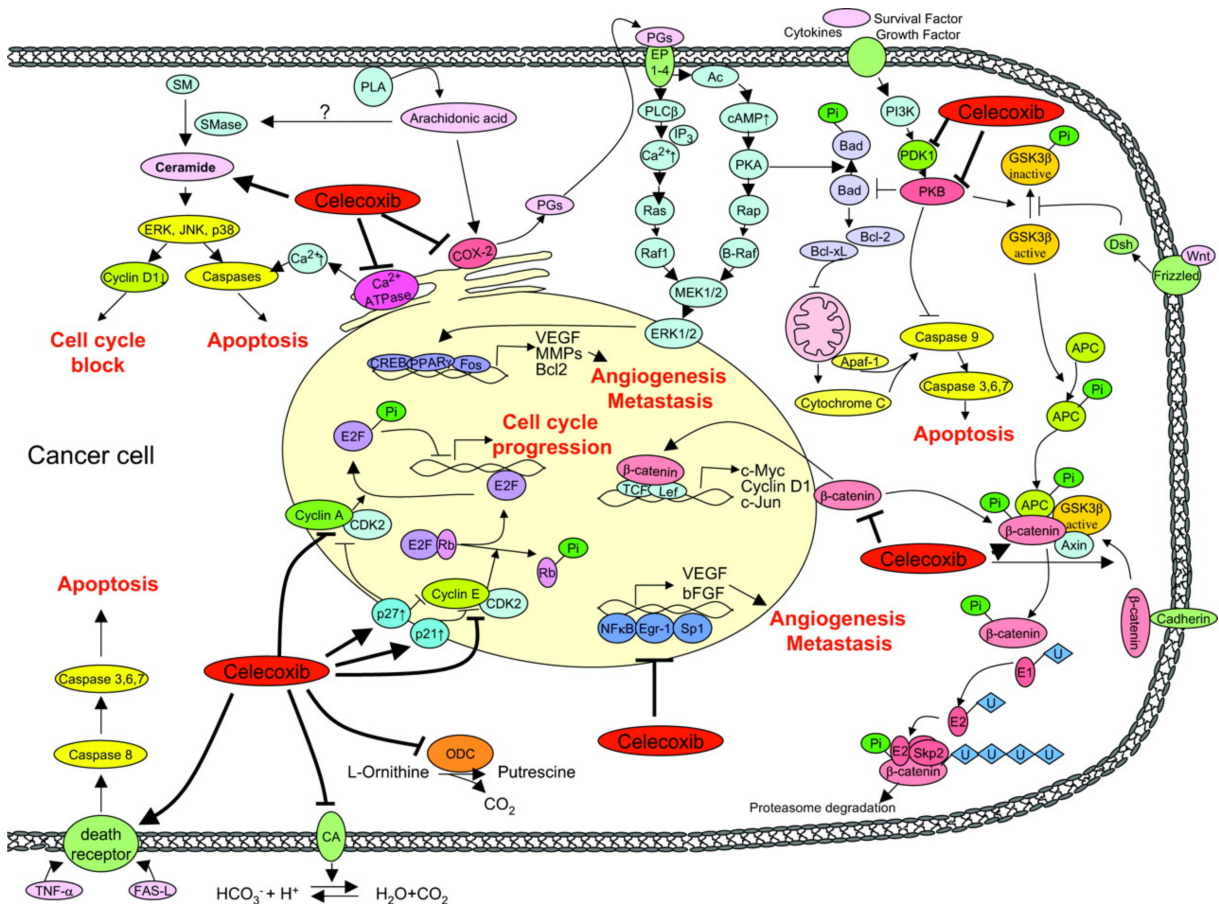


Abb. 28: Die vielfältigen Mechanismen von Celecoxib auf molekularer Ebene und seine antikarzinogenen Effekte

Direkte Ziele von Celecoxib sind Cyclooxygenase-2, Ca²⁺-ATPase, protein-dependent kinase 1 (PDK-1), cyclin-dependent kinases (CDKs) im Komplex mit Cyclinen sowie die Carboanhydrase (CA), die allesamt wichtige Bestandteile verschiedener Signalwege darstellen. Die Hemmung dieser Proteine

führt zur Induktion von Apoptose, Zellzyklusarrest, Angiogenese und Metastasierung, welches die wichtigsten Mechanismen darstellen, über die Celecoxib seine antikarzinogene Aktivität entfaltet.

SM = sphingomyelin; SMase = sphingomyelinase; ERK = extracellular signal-regulated kinase; JNK = c-Jun N-terminal kinase; PLA = phospholipase A; PGs = prostaglandins; EP = prostaglandin receptor; Ac = adenylate cyclase; PLC β = phospholipase C β ; IP₃ = inositol-1,4,5-trisphosphate; MEK1/2 = mitogen-activated protein kinase kinase 1/2; PKA = protein kinase A; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; Rap = Ras-associated protein; Raf = Raf protooncogene serine/threonine-protein kinase; B-Raf = B-raf protooncogene serine/threonine-protein kinase; BAD = Bcl2-antagonist of cell death; Bcl-2 = apoptosis regulator BCL-2; Bcl-xL = apoptosis regulator Bcl-xL; Apaf-1 = apoptotic protease activating factor; PKB = protein kinase B; PI3K = phosphatidylinositol 3-kinase; PDK-1 = phosphoinositide-dependent kinase 1; GSK-3 β = glycogen synthase kinase 3 β ; Dsh = disheveled; APC = adenomatous polyposis coli; TCF = T-cell factor; Lef = lymphoid enhancer factor 1; VEGF = vascular endothelial growth factor; bFGF = basic fibroblast growth factor; Rb = retinoblastoma; CDK = cyclin-dependent kinase; MMP = matrix metalloprotease; E2F = transcription factor E2F; Myc = myc protooncogene protein; PPAR = peroxisome proliferator activated receptor; Fos = protooncogene protein c-fos; NF- κ B = nuclear factor κ B; SP1 = transcription factor SP1; EGR-1 = early growth response protein 1; U = ubiquitin.

Übernommen von: Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Independent Anticarcinogenic Effects of Selektive COX-2 Inhibitors (Grosch et al., 2006).

In dem Wissen um die COX-unabhängigen Effekte von Celecoxib kommt man zu dem Schluss, dass die Ursache für die unterschiedliche Wirkung von Indometacin und Celecoxib darin begründet sein könnte, dass die COX-unabhängigen Effekte von Celecoxib gegenüber der COX-2-spezifischen Hemmung in den Versuchen überwogen haben. Man könnte davon ausgehen, dass in der Konzentration von 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M sich die COX-unabhängigen Effekte von Celecoxib – in diesem Fall die Hemmung von NF- κ B – und die Hemmung der COX-2 durch Celecoxib die Waage halten und Celecoxib somit keinen Einfluss auf die zytokinabhängige Freisetzung von CXCL9 und CXCL10 hat. Wird Celecoxib in einer höheren Konzentration von 30 μ M eingesetzt, überwiegt die Hemmung von NF- κ B zu Ungunsten der Synthese der CXCR3-Liganden. Im Einklang zu dieser Vermutung steht auch die Beobachtung von Grösch et al., dass die Konzentrationen von Celecoxib, die notwendig waren, um die in-vitro beobachteten COX-unabhängigen Effekte von Celecoxib (siehe Abbildung 7) zu aktivieren, höher waren als die Konzentrationen, mit denen die COX-2 gehemmt wurde (Grosch et al., 2006).

COX-2 Überexpression ist ein häufig beobachtetes Merkmal bösartiger Tumoren (Ferrandina et al., 2002a, Pomianowska et al., 2014, Spizzo et al., 2003). Die COX-2 wird

positiv assoziiert mit der Tumorentstehung, vermittelt durch die Unterstützung der Angiogenese (Tsuji et al., 1998, Gately, 2000), die Unterdrückung von Apoptose (Sheng et al., 1998, Grosch et al., 2006) und die Förderung der Invasivität sowie des Metastasierungspotentials von Zellen (Tsuji et al., 1997). Folglich scheint es ein sinnvoller Ansatz der Krebstherapie zu sein, die COX-2 selektiv zu hemmen. In Bezug auf das Ovarialkarzinom gehen jedoch die Daten bezüglich der vorherrschenden COX-Isoform auseinander. Manche berichten davon, dass COX-1 die vorherrschende Isoform im Ovarialkarzinom ist (Dore et al., 1998, Gupta et al., 2003), wohingegen andere Forschergruppen zu dem Schluss gekommen sind, dass die COX-2 die überwiegend exprimierte Isoform im Ovarialkarzinom darstellt (Klimp et al., 2001, Matsumoto et al., 2001). Dabei bleibt jedoch offen, wodurch die jeweilige COX-Überexpression zustande kommt. Denn es gibt Hinweise darauf, dass einige gängige Zytostatika, die auch in der Therapie des Ovarialkarzinoms eingesetzt werden, COX-2-aktivierende Eigenschaften besitzen (Cassidy et al., 2002, Subbaramaiah et al., 2000). Somit stellt sich die Frage, ob die COX-2-Überexpression eine Eigenschaft der Tumorzellen an sich darstellt oder durch die Zytostatika zustande kommt. Entscheidend ist in Bezug auf diese Fragestellung, ob immunhistochemische Färbungen zum Nachweis der vorherrschenden COX-Isoform an unbehandelten Ovarialkarzinomgeweben durchgeführt wurden oder aber an Geweben von Patientinnen, die vorher eine zytoreduktive Therapie durchlaufen haben. Gupta et al. stellen wegen ihrer Forschungsergebnisse, auf Grund derer sie zu dem Schluss gekommen sind, dass die COX-1 die vorherrschende Isoform im Ovarialkarzinom ist, die Hypothese auf, dass die selektive COX-1-Hemmung bzw. die nichtselektive COX-Hemmung effektiver sein könnte als die selektive COX-2-Hemmung (Gupta et al., 2003). Somit divergieren die Daten bezüglich der Sinnhaftigkeit von COX-1-Hemmung einerseits und COX-2-Hemmung andererseits in der Literatur.

In Bezug auf die zytokinabhängige Freisetzung der CXCR3-Liganden scheinen die COX-unabhängigen Effekte von Celecoxib in Summe zu überwiegen, was zu einer verminderten Freisetzung der antikarzinogenen Chemokine führt. Somit stellt sich die Frage, ob Celecoxib, dessen Einsatz bereits klinisch getestet wurde, wirklich einen geeigneten Therapieansatz des Ovarialkarzinoms darstellt. In klinischen Studien konnte bislang kein eindeutiger Nutzen einer Celecoxibtherapie in Bezug auf das Ovarialkarzinom festgestellt werden. Die DoCaCel Studie zeigte, dass die Zugabe von Celecoxib zu einer Standardchemotherapie bestehend aus Docetaxel und Carboplatin keinen Vorteil in

Hinblick auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen brachte. Im Gegenteil, die Anwendung von Celecoxib in der Dosis von 400 mg hatte schwere Nebenwirkungen wie Hautreaktionen, was in 24% der Fälle innerhalb der Studie zum vorzeitigen Absetzen von Celecoxib führte (Reyners et al., 2012). Außerdem werden kardiovaskuläre Nebenwirkungen bedingt durch die regelmäßige Einnahme von Celecoxib diskutiert (Solomon et al., 2005), was dazu geführt hat, dass die FDA Celecoxib zwar einerseits die Zulassung entzog, aber andererseits die Notwendigkeit des Hinweises auf diese Nebenwirkungen veranlasste (Grosch et al., 2006). In einem Mausmodell des Kolonkarzinoms zeigte Celecoxib zwar einerseits COX-unabhängige tumorunterdrückende Effekte; gleichzeitig kam es aber zu einer verminderten Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (de Heer et al., 2008). Das steht im Einklang mit der in-vitro beobachteten Reduktion der CXCR3-Liganden-Freisetzung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Celecoxib auf der einen Seite tumorunterdrückende Eigenschaften aufweist, auf der anderen Seite aber zu einer Reduktion der Freisetzung der antikarzinogenen CXCR3-Liganden führt, was wiederum zu einer verminderten Durchwanderung des Tumors mit Lymphozyten und somit zu einer schlechteren Überwachung des Tumors durch das Immunsystem führt (Yang et al., 2006). Nicht zuletzt sind die nicht zu unterschätzenden Nebenwirkungen von Celecoxib zu bedenken, die den Gastrointestinaltrakt, die Haut und das Herz-Kreislaufsystem betreffen.

Somit entsteht auf der Grundlage dieser Arbeit der Vorschlag, die Effekte von nichtselektiven COX-Inhibitoren, insbesondere solcher, die die Freisetzung der CXCR3-Liganden durch Tumorzellen positiv beeinflussen, in klinischen Studien hinsichtlich ihrer Beigabe zu Chemo- bzw. Immuntherapien des Ovarialkarzinoms weiter zu erforschen.

5. Zusammenfassung

Die beiden ELR-negativen Chemokine und CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 sind in Tumoren, so auch im Ovarialkarzinom, vornehmlich in den Tumorzellen lokalisiert und vermitteln zwei wesentliche Eigenschaften: einerseits die Chemotaxis von tumorsuppressiven Immunzellen entlang des Konzentrationsgefälles in den Tumor über den CXCR3A-Rezeptor, andererseits angiostatische Effekte über den CXCR3B-Rezeptor, was beides Tumorwachstum und Metastasierung hemmen kann. Im verwendeten in-vitro-Modell von drei verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien wurden die genannten Chemokine, vermittelt durch die beiden Zytokine TNF- α und IFN- γ , von den Tumorzellen in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration ausgeschüttet. Dabei kam es zu einer gegenseitigen Signalverstärkung von TNF- α und IFN- γ : die simultane Stimulation der Tumorzellen mit den beiden inflammatorischen Zytokinen führte zu einer um ein Vielfaches höhere Chemokinausschüttung im Vergleich zur alleinigen Stimulation der Tumorzellen mit TNF- α oder IFN- γ . Im Fortgang wurde die Beobachtung aus mehreren Forschungsarbeiten, dass COX-1- sowie COX-2-Überexpression im humanen Ovarialkarzinom invers korreliert mit der Anzahl an CD8⁺ TILs und dem Überleben der Patienten, weiter verfolgt. Auf der Grundlage dieser Beobachtung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Vermutung aufgestellt, dass die pharmakologische COX-Hemmung im Ovarialkarzinom zu einer verstärkten Durchsetzung des Tumors mit TILs führt und dieser Effekt im Zusammenhang mit der CXCR3-Liganden-Expression steht. Gleichzeitig wurde der Einfluss von PGE₂ als Hauptmetabolit des Cyclooxygenasesystems auf die Freisetzung der CXCR3-Liganden untersucht. PGE₂ hatte in den Versuchen dieser Arbeit einen negativen Einfluss auf die IFN- γ -abhängige CXCR3-Liganden-Freisetzung. Der Einsatz des unspezifischen COX-Inhibitors Indometacin führte zu einer Erhöhung der Chemokinfreisetzung aus den Tumorzellen. Dagegen reduzierte der Einsatz des COX-2-spezifischen Inhibitors Celecoxib konzentrationsabhängig die Chemokinfreisetzung aus den Ovarialkarzinomzellen, am wahrscheinlichsten durch COX-unabhängige Effekte, z.B. durch NF κ B-Hemmung.

Somit konnte in dieser Arbeit das COX-System als geeigneter pharmakologischer Angriffspunkt, um die intratumorale Chemokinkonzentration zu erhöhen, identifiziert werden: Die Beigabe von Indometacin, nicht jedoch von Celecoxib, zu Immuntherapien des Ovarialkarzinoms sollte in klinischen Studien weiter erforscht werden, mit dem Ziel der Verbesserung von Immuntherapien durch die Erhöhung der Anzahl an TILs im Tumor.

6. Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	Aqua destillata
BRCA- Gen	Breast Cancer Gene
BSA	Bovines Serumalbumin
CA 125	Cancer Antigen 125
CREB	cAMP response element-binding protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötale Kälberserum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HGSC	High-grade serous ovarian cancer
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HRT	Hormonersatztherapie (hormone replacement therapy)
IRF-1	interferon-regulatory factor 1
JAK	Janus-activated kinase
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSAID	non-steroidal antiinflammatory drug
PBS	Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ , Synonym Prostacyclin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
RT	Raumtemperatur
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TIL	Tumor- infiltrierende Lymphozyten
VEGF	vascular endothelial growth factor
3κB	Plasmid mit 3 Bindungsstellen für NFκB

Tabelle 2: Stadieneinteilung des OvarialkarzinomsFIGO-Klassifikation von 2014 (www.ago-online.de)

FIGO Stadium	Befundsituation
I	Tumor auf die Ovarien oder Tube(n) beschränkt
IA	Tumor auf ein Ovar/Tube beschränkt (Kapsel intakt), kein Tumor an Ovaroberfläche, keine malignen Zellen in Aszites oder Peritonealzytologie
IB	Tumor auf beide Ovarien/Tuben beschränkt (Kapsel intakt), kein Tumor an Ovarien- oder Tubenoberfläche, keine malignen Zellen in Aszites oder Peritonealzytologie
IC	Tumor auf ein oder beide Ovarien/Tube(n) beschränkt mit einem der folgenden Kriterien: IC1: intraoperative Kapselruptur IC2: präoperative Kapselruptur oder Tumor auf Ovar- oder Tubenoberfläche IC3: maligne Zellen in Aszites oder Peritonealzytologie
II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tube(n) mit Ausbreitung im Becken oder primäres Peritonealkarzinom
IIA	Ausbreitung und/oder Implantationen auf Uterus und/oder Tube(n) und/oder Ovar(ien)
IIB	Intraperitoneale Ausbreitung innerhalb des Beckens
III	Tumor in einem oder beiden Ovarien oder Tube(n) oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener peritonealer Metastasierung außerhalb des Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
IIIA1	Nur positive <i>retroperitoneale</i> Lymphknoten (zytologisch oder histologisch nachgewiesen) IIIA1(i): Metastasen bis 10 mm in größter Ausdehnung IIIA1(ii): Metastasen größer als 10 mm in größter Ausdehnung
IIIA2	Mikroskopisch nachgewiesene <i>peritoneale</i> Metastasen außerhalb des Beckens mit oder ohne positive retroperitoneale Lymphknoten
IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens von bis zu 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen (einschließlich Leberkapsel und Milzkapsel, aber ohne parenchymatöse Metastasen)
IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens größer als 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen (einschließlich Leberkapsel und

	Milzkapsel, aber ohne parenchymatöse Metastasen)
IV	Fernmetastasen (ausgenommen Peritonealmetastasen)
IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
IVB	Parenchymatöse Metastasen und Metastasen in extraabdominalen Organen (einschließlich inguinalen Lymphknoten und Lymphknoten außerhalb der Abdominalhöhle)

7. Literaturverzeichnis

- ABASTADO, J. P. 2012. The next challenge in cancer immunotherapy: controlling T-cell traffic to the tumor. *Cancer Res*, 72, 2159-61.
- ABULAFIA, O., TRIEST, W. E. & SHERER, D. M. 1999. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol*, 72, 220-31.
- AKHMEDKHANOV, A., TONIOLO, P., ZELENIUCH-JACQUOTTE, A., KATO, I., KOENIG, K. L. & SHORE, R. E. 2001. Aspirin and epithelial ovarian cancer. *Prev Med*, 33, 682-7.
- ARICO, S., PATTINGRE, S., BAUVY, C., GANE, P., BARBAT, A., CODOGNO, P. & OGIER-DENIS, E. 2002. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem*, 277, 27613-21.
- BAGGIOLINI, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392, 565-8.
- BALKWILL, F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4, 540-50.
- BANKHEAD, C. R., KEHOE, S. T. & AUSTOKER, J. 2005. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG*, 112, 857-65.
- BARLOW, M., EDELMAN, M., GLICK, R. D., STEINBERG, B. M. & SOFFER, S. Z. 2012. Celecoxib inhibits invasion and metastasis via a cyclooxygenase 2-independent mechanism in an in vitro model of Ewing sarcoma. *J Pediatr Surg*, 47, 1223-7.
- BAST, R. C., JR., XU, F. J., YU, Y. H., BARNHILL, S., ZHANG, Z. & MILLS, G. B. 1998. CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers*, 13, 179-87.
- BERCHICHE, Y. A. & SAKMAR, T. P. 2016. CXC Chemokine Receptor 3 Alternative Splice Variants Selectively Activate Different Signaling Pathways. *Mol Pharmacol*, 90, 483-95.
- BONETTI, B., VALDO, P., STEGAGNO, C., TANEL, R., ZANUSSO, G. L., RAMARLI, D., FIORINI, E., TURAZZI, S., CARNER, M. & MORETTO, G. 2000. Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59, 74-84.
- BRONGER, H., KRAEFT, S., SCHWARZ-BOEGER, U., CERNY, C., STOCKEL, A., AVRIL, S., KIECHLE, M. & SCHMITT, M. 2012. Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 14, R30.
- BRONGER, H., SINGER, J., WINDMULLER, C., REUNING, U., ZECH, D., DELBRIDGE, C., DORN, J., KIECHLE, M., SCHMALFELDT, B., SCHMITT, M. & AVRIL, S. 2016. CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer*, 115, 553-63.
- BRUUN, C., HEDING, P. E., RONN, S. G., FROBOSE, H., RHODES, C. J., MANDRUP-POULSEN, T. & BILLESTRUP, N. 2009. Suppressor of cytokine signalling-3 inhibits Tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis and signalling in beta cells. *Mol Cell Endocrinol*, 311, 32-8.
- BURGER, R. A., BRADY, M. F., BOOKMAN, M. A., FLEMING, G. F., MONK, B. J., HUANG, H., MANNEL, R. S., HOMESLEY, H. D., FOWLER, J., GREER, B. E., BOENTE, M., BIRRER, M. J., LIANG, S. X. & GYNECOLOGIC ONCOLOGY, G. 2011. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365, 2473-83.
- BURGES, A. & SCHMALFELDT, B. 2011. Ovarian Cancer: Diagnosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt*, 108(38)
- .
- BUYS, S. S., PARTRIDGE, E., GREENE, M. H., PROROK, P. C., REDING, D., RILEY, T. L., HARTGE, P., FAGERSTROM, R. M., RAGARD, L. R., CHIA, D., IZMIRLIAN, G., FOUAD, M., JOHNSON, C. C., GOHAGAN, J. K. & TEAM, P. P. 2005. Ovarian cancer screening in the

- Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening trial: findings from the initial screen of a randomized trial. *Am J Obstet Gynecol*, 193, 1630-9.
- CAMERON, S. 2009. Contraception and gynaecological care. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 23, 211-20.
- CASSIDY, P. B., MOOS, P. J., KELLY, R. C. & FITZPATRICK, F. A. 2002. Cyclooxygenase-2 induction by paclitaxel, docetaxel, and taxane analogues in human monocytes and murine macrophages: structure-activity relationships and their implications. *Clin Cancer Res*, 8, 846-55.
- CHARO, I. F. & RANSOHOFF, R. M. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*, 354, 610-21.
- CHE, D., ZHANG, S., JING, Z., SHANG, L., JIN, S., LIU, F., SHEN, J., LI, Y., HU, J., MENG, Q. & YU, Y. 2017. Macrophages induce EMT to promote invasion of lung cancer cells through the IL-6-mediated COX-2/PGE2/beta-catenin signalling pathway. *Mol Immunol*, 90, 197-210.
- CHO, K. R. & SHIH IE, M. 2009. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 287-313.
- CLARKE, D. L., CLIFFORD, R. L., JINDARAT, S., PROUD, D., PANG, L., BELVISI, M. & KNOX, A. J. 2010. TNFalpha and IFNgamma synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF-kappaB, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein. *J Biol Chem*, 285, 29101-10.
- CRAMER, D. W., HARLOW, B. L., TITUS-ERNSTOFF, L., BOHLKE, K., WELCH, W. R. & GREENBERG, E. R. 1998. Over-the-counter analgesics and risk of ovarian cancer. *Lancet*, 351, 104-7.
- CRAMER, D. W., WELCH, W. R., HUTCHISON, G. B., WILLETT, W. & SCULLY, R. E. 1984. Dietary animal fat in relation to ovarian cancer risk. *Obstet Gynecol*, 63, 833-8.
- DAGAN-BERGER, M., FENIGER-BARISH, R., AVNIEL, S., WALD, H., GALUN, E., GRABOVSKY, V., ALON, R., NAGLER, A., BEN-BARUCH, A. & PELED, A. 2006. Role of CXCR3 carboxyl terminus and third intracellular loop in receptor-mediated migration, adhesion and internalization in response to CXCL11. *Blood*, 107, 3821-31.
- DALY, M. & OBRAMS, G. I. 1998. Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer. *Seminars in Oncology*, 25, 255-264.
- DANNENBERG, A. J. & SUBBARAMAIAH, K. 2003. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell*, 4, 431-6.
- DE HEER, P., SANDEL, M. H., GUERTENS, G., DE BOECK, G., KOUDIJS, M. M., NAGELKERKE, J. F., JUNGGEURT, J. M., DE BRUIJN, E. A., VAN DE VELDE, C. J. & KUPPEN, P. J. 2008. Celecoxib inhibits growth of tumors in a syngeneic rat liver metastases model for colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62, 811-9.
- DENKERT, C., KOBEL, M., PEST, S., KOCH, I., BERGER, S., SCHWABE, M., SIEGERT, A., RELES, A., KLOSTERHALFEN, B. & HAUPTMANN, S. 2002. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol*, 160, 893-903.
- DENKERT, C., LOIBL, S., NOSKE, A., ROLLER, M., MULLER, B. M., KOMOR, M., BUDCZIES, J., DARB-ESFAHANI, S., KRONENWETT, R., HANUSCH, C., VON TORNE, C., WEICHERT, W., ENGELS, K., SOLBACH, C., SCHRADER, I., DIETEL, M. & VON MINCKWITZ, G. 2010. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 105-13.
- DING, Y. B., SHI, R. H., TONG, J. D., LI, X. Y., ZHANG, G. X., XIAO, W. M., YANG, J. G., BAO, Y., WU, J., YAN, Z. G. & WANG, X. H. 2005. PGE2 up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN28 gastric cancer cells via epidermal growth factor receptor signaling system. *Exp Oncol*, 27, 108-13.

- DORE, M., COTE, L. C., MITCHELL, A. & SIROIS, J. 1998. Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. *J Histochem Cytochem*, 46, 77-84.
- DUBOIS, R. N. 2004. Aspirin and breast cancer prevention: the estrogen connection. *JAMA*, 291, 2488-9.
- EINHORN, N., SJOVALL, K., KNAPP, R. C., HALL, P., SCULLY, R. E., BAST, R. C., JR. & ZURAWSKI, V. R., JR. 1992. Prospective evaluation of serum CA 125 levels for early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol*, 80, 14-8.
- EISENHAUER, E. L., ABU-RUSTUM, N. R., SONODA, Y., LEVINE, D. A., POYNOR, E. A., AGHAJANIAN, C., JARNAGIN, W. R., DEMATTEO, R. P., D'ANGELICA, M. I., BARAKAT, R. R. & CHI, D. S. 2006. The addition of extensive upper abdominal surgery to achieve optimal cytoreduction improves survival in patients with stages IIIC-IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 103, 1083-90.
- FAIRFIELD, K. M., HUNTER, D. J., FUCHS, C. S., COLDITZ, G. A. & HANKINSON, S. E. 2002. Aspirin, other NSAIDs, and ovarian cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*, 13, 535-42.
- FERLAY J, B. F., SANKILA R, PARKIN D 2004. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 2.0. Lyon, IARC Press.
- FERRANDINA, G., LAURIOLA, L., ZANNONI, G. F., FAGOTTI, A., FANFANI, F., LEGGE, F., MAGGIANO, N., GESSI, M., MANCUSO, S., RANELLETTI, F. O. & SCAMBIA, G. 2002a. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. *Ann Oncol*, 13, 1205-11.
- FERRANDINA, G., RANELLETTI, F. O., LAURIOLA, L., FANFANI, F., LEGGE, F., MOTTOLESE, M., NICOTRA, M. R., NATALI, P. G., ZAKUT, V. H. & SCAMBIA, G. 2002b. Cyclooxygenase-2 (COX-2), epidermal growth factor receptor (EGFR), and Her-2/neu expression in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 85, 305-10.
- FIERS, W. 1991. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett*, 285, 199-212.
- FUGUNT, R., GRISCHKE, E., SOLOMAYER, E. & FEHM, T. 2008. Die Nachsorge beim Ovarialkarzinom. *Der Frauenarzt*, 12.
- FULTON, A. M., MA, X. & KUNDU, N. 2006. Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Res*, 66, 9794-7.
- FURUYA, M., SUYAMA, T., USUI, H., KASUYA, Y., NISHIYAMA, M., TANAKA, N., ISHIWATA, I., NAGAI, Y., SHOZU, M. & KIMURA, S. 2007. Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. *Hum Pathol*, 38, 1676-87.
- GADDUCCI, A., COSIO, S., CARPI, A., NICOLINI, A. & GENAZZANI, A. R. 2004. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomed Pharmacother*, 58, 24-38.
- GADDUCCI, A., COSIO, S., ZOLA, P., LANDONI, F., MAGGINO, T. & SARTORI, E. 2007. Surveillance procedures for patients treated for epithelial ovarian cancer: a review of the literature. *Int J Gynecol Cancer*, 17, 21-31.
- GASPARRI, M. L., ATTAR, R., PALAIA, I., PERNIOLA, G., MARCHETTI, C., DI DONATO, V., FAROOQI, A. A., PAPADIA, A. & PANICI, P. B. 2015. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 3635-8.
- GATELY, S. 2000. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 19, 19-27.
- GORBACHEV, A. V., KOBAYASHI, H., KUDO, D., TANNENBAUM, C. S., FINKE, J. H., SHU, S., FARBER, J. M. & FAIRCHILD, R. L. 2007. CXC chemokine ligand 9/monokine induced

- by IFN-gamma production by tumor cells is critical for T cell-mediated suppression of cutaneous tumors. *J Immunol*, 178, 2278-86.
- GROSCHE, S., MAIER, T. J., SCHIFFMANN, S. & GEISSLINGER, G. 2006. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*, 98, 736-47.
- GUPTA, R. A., TEJADA, L. V., TONG, B. J., DAS, S. K., MORROW, J. D., DEY, S. K. & DUBOIS, R. N. 2003. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res*, 63, 906-11.
- HA, K. H., BYUN, M. S., CHOI, J., JEONG, J., LEE, K. J. & JUE, D. M. 2009. N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone inhibits NF-kappaB activation by blocking specific cysteine residues of IkappaB kinase beta and p65/RelA. *Biochemistry*, 48, 7271-8.
- HOLBROOK, J., LARA-REYNA, S., JAROSZ-GRIFFITHS, H. & MCDERMOTT, M. 2019. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res*, 8.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, W. H. O. 2014. World cancer report 2014.
- IRRERA, N., VACCARO, M., BITTO, A., PALLIO, G., PIZZINO, G., LENTINI, M., ARCORACI, V., MINUTOLI, L., SCURUCHI, M., CUTRONEO, G., ANASTASI, G. P., ETTARI, R., SQUADRITO, F. & ALTAVILLA, D. 2017. BAY 11-7082 inhibits the NF-kappaB and NLRP3 inflammasome pathways and protects against IMQ-induced psoriasis. *Clin Sci (Lond)*, 131, 487-498.
- JINDARAT, S., CLARKE, D. L., CLIFFORD, R. L., A.E., J. & KNOX, A. J. 2013. PP255—IFN-gamma interfere the effect of beta-2 agonist on tnf-alpha induced CXCL10 through creb phosphorylation in HASM cells. *Clinical Therapeutics*, 35, e97-e98.
- JOHNSON, H. M., NOON-SONG, E. & AHMED, C. M. 2011. Controlling Nuclear Jaks and Stats for Specific Gene Activation by Ifn gamma and Other Cytokines: A Possible Steroid-like Connection. *J Clin Cell Immunol*, 2.
- KANDA, N. & WATANABE, S. 2002. Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances whereas prostaglandin E2 inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa in epidermoid carcinoma A431. *J Invest Dermatol*, 119, 1080-9.
- KANDALAFT, L. E., POWELL, D. J., JR., SINGH, N. & COUKOS, G. 2011. Immunotherapy for ovarian cancer: what's next? *J Clin Oncol*, 29, 925-33.
- KARMALI, R. A., WELT, S., THALER, H. T. & LEFEVRE, F. 1983. Prostaglandins in breast cancer: relationship to disease stage and hormone status. *Br J Cancer*, 48, 689-96.
- KIEFER, F. & SIEKMANN, A. F. 2011. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2811-30.
- KIJOWSKI, J., BAJ-KRZYWORZEKA, M., MAJKA, M., RECA, R., MARQUEZ, L. A., CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M., JANOWSKA-WIECZOREK, A. & RATAJCZAK, M. Z. 2001. The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem Cells*, 19, 453-66.
- KLIMP, A. H., HOLLEMA, H., KEMPINGA, C., VAN DER ZEE, A. G., DE VRIES, E. G. & DAEMEN, T. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res*, 61, 7305-9.
- KOBAYASHI, E., UEDA, Y., MATSUZAKI, S., YOKOYAMA, T., KIMURA, T., YOSHINO, K., FUJITA, M., KIMURA, T. & ENOMOTO, T. 2012. Biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21, 1902-12.
- KOVRT, H. E., HOUOT, R., MARABELLE, A., CHO, H. J., OSMAN, K., GOLDSTEIN, M., LEVY, R. & BRODY, J. 2012. Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy*, 4, 511-27.

- KONDO, T., ITO, F., NAKAZAWA, H., HORITA, S., OSAKA, Y. & TOMA, H. 2004. High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol*, 171, 2171-5.
- KUNDU, N. & FULTON, A. M. 2002. Selective cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer. *Cancer Res*, 62, 2343-6.
- KUNDU, N., SMYTH, M. J., SAMSEL, L. & FULTON, A. M. 2002. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res Treat*, 76, 57-64.
- KUNDU, N., WALSER, T. C., MA, X. & FULTON, A. M. 2005. Cyclooxygenase inhibitors modulate NK activities that control metastatic disease. *Cancer Immunol Immunother*, 54, 981-7.
- KUNZ, J. & MAKEK, M. 2006. [Primary adenocarcinoma of the appendix as differential diagnosis of advanced ovarian carcinoma]. *Praxis (Bern 1994)*, 95, 1217-25.
- KUO, P. T., ZENG, Z., SALIM, N., MATTAROLLO, S., WELLS, J. W. & LEGGATT, G. R. 2018. The Role of CXCR3 and Its Chemokine Ligands in Skin Disease and Cancer. *Front Med (Lausanne)*, 5, 271.
- KUSCHEL, B., HAUENSTEIN, E., KIECHLE, M. & MEINDL, A. 2006. Hereditary breast and ovarian cancer - Current clinical guidelines in Germany. *Breast Care*, 1, 8-14.
- LASAGNI, L., FRANCALANCI, M., ANNUNZIATO, F., LAZZERI, E., GIANNINI, S., COSMI, L., SAGRINATI, C., MAZZINGHI, B., ORLANDO, C., MAGGI, E., MARRA, F., ROMAGNANI, S., SERIO, M. & ROMAGNANI, P. 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med*, 197, 1537-49.
- LI, H., RONG, S., CHEN, C., FAN, Y., CHEN, T., WANG, Y., CHEN, D., YANG, C. & YANG, J. 2019. Disparate roles of CXCR3A and CXCR3B in regulating progressive properties of colorectal cancer cells. *Mol Carcinog*, 58, 171-184.
- LI, T., ZHONG, J., DONG, X., XIU, P., WANG, F., WEI, H., WANG, X., XU, Z., LIU, F., SUN, X. & LI, J. 2016. Meloxicam suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by targeting COX-2/PGE2-regulated activation of the beta-catenin signaling pathway. *Oncol Rep*, 35, 3614-22.
- LI, W., XU, X. L., ZHANG, J., CAI, J. H. & TANG, Y. X. 2012. Effects of cyclooxygenase inhibitors on survival time in ovarian cancer xenograft-bearing mice. *Oncol Lett*, 4, 1269-1273.
- LIU, B., QU, L., YANG, Z. & TAO, H. 2012. Cyclooxygenase-2 inhibitors induce anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway. *Med Hypotheses*, 79, 98-100.
- LIU, M., MATSUMURA, N., MANDAI, M., LI, K., YAGI, H., BABA, T., SUZUKI, A., HAMANISHI, J., FUKUHARA, K. & KONISHI, I. 2009. Classification using hierarchical clustering of tumor-infiltrating immune cells identifies poor prognostic ovarian cancers with high levels of COX expression. *Mod Pathol*, 22, 373-84.
- LO-CIGANIC, W. H., ZGIBOR, J. C., BUNKER, C. H., MOYSICH, K. B., EDWARDS, R. P. & NESS, R. B. 2012. Aspirin, nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs, or acetaminophen and risk of ovarian cancer. *Epidemiology*, 23, 311-9.
- LOETSCHER, P., MOSER, B. & BAGGIOLINI, M. 2000. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol*, 74, 127-80.
- LUSTER, A. D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 338, 436-45.
- MANN, B., GELOS, M., SIEDOW, A., HANSKI, M. L., GRATCHEV, A., ILYAS, M., BODMER, W. F., MOYER, M. P., RIECKEN, E. O., BUHR, H. J. & HANSKI, C. 1999. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1603-8.

- MATHIEU, M. C., LORD-DUFOUR, S., BERNIER, V., BOIE, Y., BURCH, J. D., CLARK, P., DENIS, D., HAN, Y., MORTIMER, J. R. & THERIEN, A. G. 2008. Mutual antagonistic relationship between prostaglandin E(2) and IFN-gamma: Implications for rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 38, 1900-12.
- MATSUMOTO, Y., ISHIKO, O., DEGUCHI, M., NAKAGAWA, E. & OGITA, S. 2001. Cyclooxygenase-2 expression in normal ovaries and epithelial ovarian neoplasms. *Int J Mol Med*, 8, 31-6.
- MCILROY, A., CARON, G., BLANCHARD, S., FREMAUX, I., DULUC, D., DELNESTE, Y., CHEVAILLER, A. & JEANNIN, P. 2006. Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells. *Immunology*, 117, 507-16.
- MEINDL, A. 2013. Mutationen, Erbgänge und Erkrankungsrisiken. *Brustkrebsmagazin MammaMia!*
- MENON, U., GENTRY-MAHARAJ, A., HALLETT, R., RYAN, A., BURNELL, M., SHARMA, A., LEWIS, S., DAVIES, S., PHILPOTT, S., LOPES, A., GODFREY, K., ORAM, D., HEROD, J., WILLIAMSON, K., SEIF, M. W., SCOTT, I., MOULD, T., WOOLAS, R., MURDOCH, J., DOBBS, S., AMSO, N. N., LEESON, S., CRUICKSHANK, D., MCGUIRE, A., CAMPBELL, S., FALLOWFIELD, L., SINGH, N., DAWNAY, A., SKATES, S. J., PARMAR, M. & JACOBS, I. 2009. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol*, 10, 327-40.
- METZEMAEKERS, M., VANHEULE, V., JANSSENS, R., STRUYF, S. & PROOST, P. 2017. Overview of the Mechanisms that May Contribute to the Non-Redundant Activities of Interferon-Inducible CXC Chemokine Receptor 3 Ligands. *Front Immunol*, 8, 1970.
- MOBUS, V., GERHARZ, C. D., PRESS, U., MOLL, R., BECK, T., MELLIN, W., POLLOW, K., KNAPSTEIN, P. G. & KREIENBERG, R. 1992. Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 52, 76-84.
- MORCH, L. S., LOKKEGAARD, E., ANDREASEN, A. H., KRUGER-KJAER, S. & LIDEGAARD, O. 2009. Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA*, 302, 298-305.
- MUKAIDA, N. & BABA, T. 2012. Chemokines in tumor development and progression. *Exp Cell Res*, 318, 95-102.
- MULLER, A., HOMEY, B., SOTO, H., GE, N., CATRON, D., BUCHANAN, M. E., MCCLANAHAN, T., MURPHY, E., YUAN, W., WAGNER, S. N., BARRERA, J. L., MOHAR, A., VERASTEGUI, E. & ZLOTNIK, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410, 50-6.
- MURAKAMI, T., CARDONES, A. R. & HWANG, S. T. 2004. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J Dermatol Sci*, 36, 71-8.
- NAHHAS, W. A. 1997. Ovarian cancer: Current outlook on this deadly disease. *Postgraduate Medicine*, 102, 112-120.
- NESS, R. B. & MODUGNO, F. 2006. Endometriosis as a model for inflammation-hormone interactions in ovarian and breast cancers. *Eur J Cancer*, 42, 691-703.
- O'HAYRE, M., SALANGA, C. L., HANDEL, T. M. & ALLEN, S. J. 2008. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J*, 409, 635-49.
- OKADA, T., TAKIGAWA, N., KISHINO, D., KATAYAMA, H., KUYAMA, S., SATO, K., MIMOTO, J., UEOKA, H., TANIMOTO, M. & KIURA, K. 2012. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor

- prevents cisplatin-induced tumorigenesis in A/J mice. *Acta Med Okayama*, 66, 245-51.
- PARKIN, D. M. 1992. Studies of cancer in migrant populations: methods and interpretation. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 40, 410-24.
- PINE, R. 1997. Convergence of TNFalpha and IFNgamma signalling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/kappaB promoter element. *Nucleic Acids Res*, 25, 4346-54.
- POMIANOWSKA, E., SCHJOLBERG, A. R., CLAUSEN, O. P. & GLADHAUG, I. P. 2014. COX-2 overexpression in resected pancreatic head adenocarcinomas correlates with favourable prognosis. *BMC Cancer*, 14, 458.
- QIN, S., ROTTMAN, J. B., MYERS, P., KASSAM, N., WEINBLATT, M., LOETSCHER, M., KOCH, A. E., MOSER, B. & MACKAY, C. R. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*, 101, 746-54.
- RABINOWICH, H., SUMINAMI, Y., REICHERT, T. E., CROWLEY-NOWICK, P., BELL, M., EDWARDS, R. & WHITESIDE, T. L. 1996. Expression of cytokine genes or proteins and signaling molecules in lymphocytes associated with human ovarian carcinoma. *Int J Cancer*, 68, 276-84.
- RAIN CZUK, A., RAO, J., GATHERCOLE, J. & STEPHENS, A. N. 2012. The emerging role of CXC chemokines in epithelial ovarian cancer. *Reproduction*, 144, 303-17.
- RANGER, G. S., THOMAS, V., JEWELL, A. & MOKBEL, K. 2004. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with distant metastases in breast cancer. *Anticancer Res*, 24, 2349-51.
- REYNSERS, A. K., DE MUNCK, L., ERDKAMP, F. L., SMIT, W. M., HOEKMAN, K., LALISANG, R. I., DE GRAAF, H., WYMENGA, A. N., POLEE, M., HOLLEMA, H., VAN VUGT, M. A., SCHAAPVELD, M., WILLEMSE, P. H. & DOCACEL STUDY, G. 2012. A randomized phase II study investigating the addition of the specific COX-2 inhibitor celecoxib to docetaxel plus carboplatin as first-line chemotherapy for stage IC to IV epithelial ovarian cancer, Fallopian tube or primary peritoneal carcinomas: the DoCaCel study. *Ann Oncol*, 23, 2896-902.
- RISTIMAKI, A., SIVULA, A., LUNDIN, J., LUNDIN, M., SALMINEN, T., HAGLUND, C., JOENSUU, H. & ISOLA, J. 2002. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*, 62, 632-5.
- RKI Berlin. Robert- Koch- Institut, Bundesinstitut im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit.
- ROLLINS, B. J. 1997. Chemokines. *Blood*, 90, 909-28.
- ROMAGNANI, P., LASAGNI, L., ANNUNZIATO, F., SERIO, M. & ROMAGNANI, S. 2004. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol*, 25, 201-9.
- ROSSI, D. & ZLOTNIK, A. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 18, 217-42.
- RUNNEBAUM, I. B., MOLLENKOPF, A., KREIENBERG, R. & MEERPOHL, H. G. 1998. Epidemiological and molecular genetic risk factors in ovarian cancer. *Onkologe*, 4, 1096-1100.
- RUSTIN, G. J., VAN DER BURG, M. E., GRIFFIN, C. L., GUTHRIE, D., LAMONT, A., JAYSON, G. C., KRISTENSEN, G., MEDIOLA, C., COENS, C., QIAN, W., PARMAR, M. K., SWART, A. M., MRC, O. V. & INVESTIGATORS, E. 2010. Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet*, 376, 1155-63.

- SAKAEDA, Y., HIROI, M., SHIMOJIMA, T., IGUCHI, M., KANEGAE, H. & OHMORI, Y. 2006. Sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, selectively inhibits interferon-gamma-induced expression of the chemokine CXCL9 gene in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 339-44.
- SATO, E., OLSON, S. H., AHN, J., BUNDY, B., NISHIKAWA, H., QIAN, F., JUNGBLUTH, A. A., FROSINA, D., GNJATIC, S., AMBROSONE, C., KEPNER, J., ODUNSI, T., RITTER, G., LELE, S., CHEN, Y. T., OHTANI, H., OLD, L. J. & ODUNSI, K. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18538-43.
- SCHILDKRAUT, J. M., MOORMAN, P. G., HALABI, S., CALINGAERT, B., MARKS, J. R. & BERCHUCK, A. 2006. Analgesic drug use and risk of ovarian cancer. *Epidemiology*, 17, 104-7.
- SEIDMAN, J. D., SHERMAN, M. E., BELL, K. A., KATABUCHI, H., O'LEARY, T. J. & KURMAN, R. J. 2002. Salpingitis, salpingoliths, and serous tumors of the ovaries: is there a connection? *Int J Gynecol Pathol*, 21, 101-7.
- SHEN, J., XIAO, Z., ZHAO, Q., LI, M., WU, X., ZHANG, L., HU, W. & CHO, C. H. 2018. Anti-cancer therapy with TNFalpha and IFNgamma: A comprehensive review. *Cell Prolif*.
- SHENG, H., SHAO, J., MORROW, J. D., BEAUCHAMP, R. D. & DUBOIS, R. N. 1998. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 58, 362-6.
- SHIMOMURA, O., GOTO, T. & JOHNSON, F. H. 1977. Source of oxygen in the CO(2) produced in the bioluminescent oxidation of firefly luciferin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 2799-802.
- SINGER, G., STÖHR, R., COPE, L., DEHARI, R., HARTMANN, A., CAO, D. F., WANG, T. L., KURMAN, R. J. & SHIH, I. M. 2005. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: A mutational analysis with immunohistochemical correlation. *American Journal of Surgical Pathology*, 29, 218-224.
- SMITH, J. S., ALAGESAN, P., DESAI, N. K., PACK, T. F., WU, J. H., INOUE, A., FREEDMAN, N. J. & RAJAGOPAL, S. 2017. C-X-C Motif Chemokine Receptor 3 Splice Variants Differentially Activate Beta-Arrestins to Regulate Downstream Signaling Pathways. *Mol Pharmacol*, 92, 136-150.
- SOLOMON, S. D., MCMURRAY, J. J., PFEFFER, M. A., WITTES, J., FOWLER, R., FINN, P., ANDERSON, W. F., ZAUBER, A., HAWK, E., BERTAGNOLLI, M. & ADENOMA PREVENTION WITH CELECOXIB STUDY, I. 2005. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med*, 352, 1071-80.
- SPIZZO, G., GASTL, G., WOLF, D., GUNSILIUS, E., STEURER, M., FONG, D., AMBERGER, A., MARGREITER, R. & OBRIST, P. 2003. Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer*, 88, 574-8.
- STEGHENS, J. P., MIN, K. L. & BERNENGO, J. C. 1998. Firefly luciferase has two nucleotide binding sites: effect of nucleoside monophosphate and CoA on the light-emission spectra. *Biochem J*, 336 (Pt 1), 109-13.
- STRIETER, R. M., BELPERIO, J. A., PHILLIPS, R. J. & KEANE, M. P. 2004. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol*, 14, 195-200.
- SUBBARAMAIAH, K., HART, J. C., NORTON, L. & DANNENBERG, A. J. 2000. Microtubule-interfering agents stimulate the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for

- involvement of ERK1/2 AND p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 275, 14838-45.
- SUYAMA, T., FURUYA, M., NISHIYAMA, M., KASUYA, Y., KIMURA, S., ICHIKAWA, T., UEDA, T., NIKAIIDO, T., ITO, H. & ISHIKURA, H. 2005. Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXCR3 in human renal cell carcinoma. *Cancer*, 103, 258-67.
- TAKEYAMA, H., WAKAMIYA, N., O'HARA, C., ARTHUR, K., NILOFF, J., KUFE, D., SAKARAI, K. & SPRIGGS, D. 1991. Tumor necrosis factor expression by human ovarian carcinoma in vivo. *Cancer Res*, 51, 4476-80.
- TAVANI, A., GALLUS, S., LA VECCHIA, C., CONTI, E., MONTELLA, M. & FRANCESCHI, S. 2000. Aspirin and ovarian cancer: an Italian case-control study. *Ann Oncol*, 11, 1171-3.
- THAKUR, R. & MISHRA, D. P. 2013. Pharmacological modulation of beta-catenin and its applications in cancer therapy. *J Cell Mol Med*, 17, 449-56.
- THUN, M. J., HENLEY, S. J. & PATRONO, C. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst*, 94, 252-66.
- TIAN, F., WANG, T. Y., GONG, M., LU, X. M., HU, J., WANG, J. & ZHANG, C. H. 2003. [Overexpression of COX-2 and its clinical significance in non-small cell lung cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 41, 407-10.
- TO, S. Q., KNOWER, K. C. & CLYNE, C. D. 2013. NFkappaB and MAPK signalling pathways mediate TNFalpha-induced Early Growth Response gene transcription leading to aromatase expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 433, 96-101.
- TSUJII, M., KAWANO, S. & DUBOIS, R. N. 1997. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3336-40.
- TSUJII, M., KAWANO, S., TSUJI, S., SAWAOKA, H., HORI, M. & DUBOIS, R. N. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93, 705-16.
- UEFUJI, K., ICHIKURA, T. & MOCHIZUKI, H. 2000. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 135-8.
- URRA, S., FISCHER, M. C., MARTINEZ, J. R., VELIZ, L., ORELLANA, P., SOLAR, A., BOHMWALD, K., KALERGIS, A., RIEDEL, C., CORVALAN, A. H., ROA, J. C., FUENTEALBA, R., CACERES, C. J., LOPEZ-LASTRA, M., LEON, A., DROPELMANN, N. & GONZALEZ, H. E. 2018. Differential expression profile of CXCR3 splicing variants is associated with thyroid neoplasia. Potential role in papillary thyroid carcinoma oncogenesis? *Oncotarget*, 9, 2445-2467.
- VAN NAGELL, J. R. & PAVLIK, E. J. 2012. Ovarian cancer screening. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 55, 43-51.
- VAN RAEMDONCK, K., VAN DEN STEEN, P. E., LIEKENS, S., VAN DAMME, J. & STRUYF, S. 2015. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26, 311-27.
- VANG, R., SHIH IE, M. & KURMAN, R. J. 2009. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*, 16, 267-82.
- VERDOODT, F., KJAER, S. K., DEHLENDORFF, C. & FRIIS, S. 2018. Aspirin use and ovarian cancer mortality in a Danish nationwide cohort study. *Br J Cancer*, 118, 611-615.
- WEN, W. H., RELES, A., RUNNEBAUM, I. B., SULLIVAN-HALLEY, J., BERNSTEIN, L., JONES, L. A., FELIX, J. C., KREIENBERG, R., EL-NAGGAR, A. & PRESS, M. F. 1999. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol*, 18, 29-41.

- WENDEL, M., GALANI, I. E., SURI-PAYER, E. & CERWENKA, A. 2008. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Res*, 68, 8437-45.
- WENNERBERG, E., KREMER, V., CHILDS, R. & LUNDQVIST, A. 2015. CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo. *Cancer Immunol Immunother*, 64, 225-35.
- WHITWORTH, J. M. & ALVAREZ, R. D. 2011. Evaluating the role of IL-12 based therapies in ovarian cancer: a review of the literature. *Expert Opin Biol Ther*, 11, 751-62.
- WU, Q., DHIR, R. & WELLS, A. 2012. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. *Mol Cancer*, 11, 3.
- XU, P., SUN, Z., WANG, Y. & MIAO, C. 2015. Long-term use of indomethacin leads to poor prognoses through promoting the expression of PD-1 and PD-L2 via TRIF/NF-kappaB pathway and JAK/STAT3 pathway to inhibit TNF-alpha and IFN-gamma in hepatocellular carcinoma. *Exp Cell Res*, 337, 53-60.
- YANG, X., CHU, Y., WANG, Y., ZHANG, R. & XIONG, S. 2006. Targeted in vivo expression of IFN-gamma-inducible protein 10 induces specific antitumor activity. *J Leukoc Biol*, 80, 1434-44.
- YIANNAKOPOULOU, E. 2015. Aspirin and NSAIDs for breast cancer chemoprevention. *Eur J Cancer Prev*, 24, 416-21.
- YOUNG, H. A. & BREM, J. H. 2007. IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 316, 97-117.
- YUAN, Y. H., TEN HOVE, T., THE, F. O., SLORS, J. F., VAN DEVENTER, S. J. & TE VELDE, A. A. 2001. Chemokine receptor CXCR3 expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 7, 281-6.
- ZAIDI, M. R. & MERLINO, G. 2011. The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clin Cancer Res*, 17, 6118-24.
- ZHAN, T., RINDTORFF, N. & BOUTROS, M. 2017. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36, 1461-1473.
- ZHANG, L., CONEJO-GARCIA, J. R., KATSAROS, D., GIMOTTY, P. A., MASSOBRIO, M., REGNANI, G., MAKRIGIANNAKIS, A., GRAY, H., SCHLIENGER, K., LIEBMAN, M. N., RUBIN, S. C. & COUKOS, G. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, 348, 203-13.
- ZHANG, Z., LAI, G. H. & SIRICA, A. E. 2004. Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology*, 39, 1028-37.
- ZHU, Y. P., LIU, Z., FU, Z. X. & LI, D. C. 2017. Smad3 mutant mice develop colon cancer with overexpression of COX-2. *Oncol Lett*, 13, 1535-1538.

Danksagung

PD Dr. Holger Bronger, für die zuverlässigste Betreuung, die man sich für eine Doktorarbeit wünschen kann, die fachliche Kompetenz, die Hilfe bei den Entwürfen der Versuche, die Publikation und die Korrektur meiner Dissertationsschrift.

Prof. Dr. Manfred Schmitt für die Möglichkeit meine Arbeit in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik des Klinikums rechts Isar durchzuführen.

Prof. Dr. Ute Reuning für die guten Ratschläge bezüglich der Durchführung der transienten Transfektionen.

Alexandra Stöckel für die Einarbeitung und die viele Hilfe am Anfang meiner Laborarbeit.

Anke Bengel für die Zellkultur-Tipps und die Hilfe bei der Durchführung der transienten Transfektionen.

Und zu guter Letzt meinem Mann Johannes, für die tatkräftige Unterstützung und die unaufhörliche Motivation.