

**Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung
von Wachstums- und Gerinnungsfaktoren
bei der Entstehung maligner Ergüsse**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MATHEMATISCHEN-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT

ZU KIEL

VORGELEGT VON

LARS-FABIAN BLUME

KIEL 2010

Referent:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Korreferent:

Prof. Dr. Heiner Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung:

26.05.2010

Zum Druck genehmigt:

01.06.2010

Prof. Dr. L. Kipp (Dekan)

In Liebe für meine Familie

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
(V/V)	(Volumen/Volumen)
(W/V)	(Masse/Volumen)
AMPS	Ammoniumpersulfat
AT3	Antithrombin 3
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Karzinom
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre DNA
CEA	Karziñoembryonales Antigen
CISH	Chromogenic in situ hybridization
CRP	C-reaktives Protein
DG	Deckgläschen
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F ₁₊₂	Prothrombinfragment
FAB-Fragment	Antigen-bindendes Fragment
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung
FCS	Fetales Kälberserum
Fe	Eisen
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FIIa	Thombin
FISH	Flourescence in situ hybridization
FITC	Flouresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
FXa	Faktor Xa

Abkürzungsverzeichnis

GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
Gyn	gynäkologisch
h	Stunde
Her-2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
HGB	Hämoglobin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP 90	Heat Shock Protein 90
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial cells (Nabelschnurendothelzellen)
i.v.	Intravenös
IL-8	Interleukin-8
K	Kalium
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Männlich
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
Na	Natrium
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PAGE	Polyacylamid-Gelelektrophorese
P _{APP}	Permeabilitätskoeffizient
PAR	Proteinase-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor
PLT	Thrombozyten
PSG	Penicillin Streptomycin L-Glutamin
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
RITC	Rhodamin B-isothiocyanat
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SLIGKV	PAR-2 Agonist
SSC	Seitwärtsstreulicht
TBP	TATA-Box Binding Protein
<i>t</i> cTEER	Temperatur-korrigierter TEER
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β 1	Transformierender Wachstumsfaktor β 1
TMB	Tetramethylbenzidin
TNM	Tumor Lymphknoten Metastasen
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor
W	Weiblich
WBC	Leukozyten

1. Einführung	1
1.1 Maligne Ergüsse	1
1.2 Transudate und Exsudate	2
1.3 Physiologie der Pleura	3
1.4 Zell-Zell-Verbindungen	5
1.5 Pathophysiologie der Pleura	6
1.6 Gegenwärtige Therapien von Pleuraergüssen	6
1.6.1 Punktion	6
1.6.2 Thorakotomie	7
1.6.3 Thorakoskopie.....	7
1.6.4 Videoassistierte Thorakoskopie.....	7
1.6.5 Pleuro-Peritoneale Shunts.....	7
1.6.6 Pleurale Dauerkatheter	8
1.6.7 Pleurektomie	8
1.6.8 Chemotherapie und Diuretika.....	8
1.7 Ziele der Arbeit	8
2. Patientenkollektiv und Ergüsse	10
2.1 Einleitung	10
2.2 Material und Methoden	11
2.2.1 Auswahl der Patienten	11
2.2.2 Erstellung einer Datenbank	11
2.2.3 Datenerhebung	12
2.3 Ergebnisse	12
2.3.1 Alter, Geschlecht und Lokalisierung des Ergusses.....	12
2.3.2 Den Ergüssen zugrunde liegende Primärerkrankung	13
2.3.3 TNM-Klassifikation der Primärerkrankungen	14
2.3.4 Laborparameter.....	14
2.3.4.1 Plasmaproteine.....	14
2.3.4.2 Enzyme	15
2.3.4.3 Hämatologie und Hämostasiologie	15
2.3.4.4 Nierenfunktion und Elektrolyte	16
2.3.4.5 VEGF-Konzentration in den Ergüssen	16
2.4 Diskussion	17

3. Bestimmung des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes	19
3.1 Einleitung	19
3.2 Material und Methoden	20
3.2.1 Caco-2-und HPDE-Zellkultur	20
3.2.2 Bestimmung der Viskosität verschiedener Kulturmedien	20
3.2.3 Konstruktion der benötigten Apparaturen und Elektroden	21
3.2.3.1 Stativ für STX2 und STX3.....	21
3.2.3.2 Elektroden	21
3.2.3.3 Halterung für Elektroden.....	21
3.2.4 TEER-Messung von Inserts mit unterschiedlicher Porengröße.....	22
3.2.5 TEER-Messung an Caco-2-Monolayern	22
3.2.5.1 Mit STX2-Elektrode.....	22
3.2.5.2 Mit Endohm-12-Elektrode	23
3.2.6 TEER-Messung von HPDE Monolayern mit STX2	23
3.2.7 Bestimmung der Korrelation von TEER und der Permeabilität von RITC-Dextran 70 kDa.....	23
3.2.7.1 Kalibrierung einer Lösung von RITC-Dextran 70kDa in phenolrotfreiem DMEM ...	23
3.2.7.2 Bestimmung der Permeabilität von RITC-Dextran 70 kDa und dem TEER Wert...24	24
3.2.8 Bestimmung der Korrelation zwischen Zeit und Temperatur des Mediums.....	25
3.3 Ergebnisse	25
3.3.1 Physikalischer Hintergrund.....	25
3.3.2 Viskosität verschiedener Kulturmedien.....	28
3.3.3 Apparaturen und Elektroden.....	29
3.3.3.1 Stativ für STX2 und STX3.....	29
3.3.3.2 Elektroden	29
3.3.3.3 Halterung für Elektroden.....	31
3.3.4 TEER-Werte von 12-Well Inserts mit unterschiedlicher Porengröße.....	32
3.3.4.1 Blank-korrigierter Einheitsflächen-Widerstand	32
3.3.4.2 Berechnung der TEER-Werte von Inserts.....	32
3.3.5 TEER-Werte von Caco-2-Monolayer	34
3.3.5.1 mit STX2.....	34
3.3.5.2 Berechnung des TEER-Wertes von Caco-2-Monolayern	35
3.3.5.3 mit Endohm-Elektrode	36

Inhaltsverzeichnis

3.3.6	Berechnung des TEER-Wertes von HPDE-Monolayern	37
3.3.7	Korrelation von TEER und der Permeabilität von RITC-markierten Dextran 70 kDa	37
3.3.7.1	Kalibrierung einer Lösung von RITC-Dextran 70 kDa in DMEM.....	37
3.3.7.2	Korrelation des temperaturkorrigierten TEER-Wertes mit der Permeabilität von RITC-markierten Dextran 70 kDa.....	38
3.3.8	Korrelation der Zeit mit der Temperatur des Mediums.....	38
3.4	Diskussion	39
4.	Bedeutung von VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse	42
4.1	Einleitung	42
4.1.1	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	42
4.1.2	VEGF-Isoformen	42
4.1.3	VEGF-Rezeptoren.....	43
4.1.4	Die Bedeutung von VEGF in der Physiologie	45
4.1.5	Die Bedeutung von VEGF in der Pathophysiologie	45
4.1.6	Regulation der Permeabilität	46
4.1.7	VEGF als therapeutische Zielstruktur	46
4.1.8	Ziele der Arbeit.....	48
4.2	Material und Methoden	49
4.2.1	Sammeln und Aufarbeiten des klinischen Materials.....	49
4.2.1.1	Aufarbeitung der Ergüsse	49
4.2.1.2	Kultivierung der Zellen aus den Ergüssen.....	49
4.2.1.3	Aufarbeitung der Serumproben.....	49
4.2.2	Bestimmung der VEGF-Konzentration mittels ELISA in:.....	49
4.2.2.1	Ergüssen und Sera	50
4.2.2.2	den Überständen von Patientenzellen	50
4.2.2.3	den Überständen von Zelllinien	51
4.2.2.4	den Überständen von unterschiedlichen Caco-2-Zellzahlen	51
4.2.3	Untersuchungen an der Pleura parietalis vom Schwein.....	51
4.2.3.1	Konstruktion einer „Ussing-Kammer“	51
4.2.3.2	Präparation der Pleura parietalis.....	52
4.2.3.3	Bestimmung der Permeabilität von FITC-Dextran-Molekülen unterschiedlicher Größe durch die Pleura parietalis	53
4.2.3.3.1	Kalibrierung der FITC-Dextran-DMEM-Lösung	53
4.2.3.3.2	Bestimmung der Permeabilität	53

Inhaltsverzeichnis

4.2.3.4	Bestimmung der VEGF-Sekretion der Pleura parietalis	54
4.2.4	Nachweis der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 auf Caco-2-Zellen.....	54
4.2.4.1	Transfektion von Caco-2-Zellen mit siRNA gegen VEGF-Rezeptor 2	54
4.2.4.2	Konventionelle PCR.....	54
4.2.4.2.1	RNA-Isolierung	54
4.2.4.2.2	RNA-Quantifizierung.....	55
4.2.4.2.3	Reverse Transkription (RT).....	56
4.2.4.2.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	56
4.2.4.2.5	DNA-Gelelektrophorese.....	57
4.2.4.3	Western Blot.....	57
4.2.4.3.1	Aufarbeitung des Gesamtproteinlysats und Proteingehaltsbestimmung.....	57
4.2.4.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
4.2.4.3.3	„Wet-Blotting“.....	58
4.2.4.3.4	Detektion der Proteinbanden	59
4.2.4.4	Immunzytochemie	60
4.2.5	Detektion von Permeabilitätsveränderungen des Caco-2-Monolayers mittels TEER-Messung in Abhängigkeit von:.....	61
4.2.5.1	Chitosan	61
4.2.5.2	Bevacizumab, Rituximab und humanem IgG1	62
4.2.5.3	Tyrosinkinase-Inhibitor (SU5416).....	63
4.2.5.4	siRNA gegen den VEGF-Rezeptor 2	64
4.2.5.4.1	Transfektion der Monolayer	64
4.2.5.4.2	Applikation von VEGF.....	64
4.2.6	Detektion der Permeabilitätsänderung von FITC-Dextran 4 kDa	64
4.2.6.1	Kalibrierung einer Lösung von FITC-Dextran 4 kDa in PBS	64
4.2.6.2	Effekte von Bevacizumab oder humanem IgG1 auf die Permeabilität von FITC-markierten Dextran 4 kDa	65
4.2.6.2.1	Bestimmung der Eigenfluoreszenz von Bevacizumab und humanem IgG1	66
4.2.6.2.2	Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{APP})	66
4.2.7	Leitfähigkeitsuntersuchungen.....	66
4.2.7.1	Bestimmung der Zellkonstanten der Messzelle.....	66
4.2.7.2	Bestimmung der Leitfähigkeit von Kulturmedien und malignen Ergüssen	67
4.2.8	Detektion von Permeabilitätsveränderungen des Caco-2-Monolayers mittels TEER in Abhängigkeit von Ergüssen.....	68
4.2.8.1	Bestimmung des VEGF-Gehaltes vor und nach Filtration	68

Inhaltsverzeichnis

4.2.8.2	Bestimmung von Permeabilitätsveränderungen.....	68
4.2.9	Dokumentation des Wachstums von Caco-2-Monolayern	69
4.2.10	Bestimmung der Permeabilität von Bevacizumab und Paracetamol über den Caco-2-Monolayer.....	69
4.2.10.1	Kalibrierung von Bevacizumab und humanem IgG1 mit dem „Easy Titer IgG Assay“.....	69
4.2.10.2	Bestimmung der Permeabilität von Bevacizumab über den Caco-2-Monolayer	70
4.2.10.3	Bestimmung der Permeabilität von Paracetamol über den Caco-2-Monolayer.....	70
4.2.10.3.1	Kalibrierung einer Lösung von Paracetamol in PBS	71
4.2.10.3.2	Bestimmung der Permeabilität von Paracetamol über den Caco-2-Monolayer ..	71
4.2.10.3.3	Bestimmung der Wiederfindungsrate	71
4.3	Ergebnisse	72
4.3.1	Klinisches Material	72
4.3.2	VEGF-Konzentration in:	72
4.3.2.1	Ergüssen und Sera	72
4.3.2.2	Überständen von Patientenzellen	74
4.3.2.3	in den Überständen von Zelllinien.....	75
4.3.2.4	in den Überständen von unterschiedlichen Caco-2 Zellzahlen.....	76
4.3.3	Untersuchungen an der Pleura parietalis vom Schwein.....	77
4.3.3.1	Konstruktion einer „Ussing-Kammer“	77
4.3.3.2	Bestimmung der Permeabilität von FITC-Dextran-Molekülen unterschiedlicher Größe durch die Pleura parietalis	77
4.3.3.3	Bestimmung der VEGF-Sekretion der Pleura parietalis	78
4.3.4	Nachweis von VEGF-Rezeptoren 1 und 2 auf Caco-2-Zellen.....	79
4.3.4.1	Konventionelle PCR.....	79
4.3.4.2	Western Blot.....	80
4.3.4.3	Immunzytochemie	80
4.3.5	Permeabilitätsveränderungen des Caco-2-Monolayers mittels TEER-Messung in Abhängigkeit von:.....	81
4.3.5.1	Chitosan	81
4.3.5.2	Bevacizumab, Rituximab und humanem IgG1	82
4.3.5.3	Tyrosinkinase-Inhibitor (SU5416).....	83
4.3.5.4	siRNA gegen den VEGF-Rezeptor 2	83
4.3.6	Effekte von Bevacizumab oder humanem IgG1 auf die Permeabilität von FITC-Dextran 4 kDa durch den Caco-2-Monolayer.....	84
4.3.6.1	Kalibrierung einer Lösung von FITC-Dextran 4 kDa in PBS.....	84

Inhaltsverzeichnis

4.3.6.2	Eigenfluoreszenz von Bevacizumab und humanem IgG1	85
4.3.6.3	Permeabilitätskoeffizienten (P_{APP}) von FITC-Dextran in Abhängigkeit von Bevacizumab oder humanem IgG1.....	85
4.3.7	Leitfähigkeitsuntersuchungen.....	86
4.3.7.1	Zellkonstanten der Messzellen.....	86
4.3.7.2	Leitfähigkeiten von Kulturmedien und Ergüssen	87
4.3.8	Permeabilitätsveränderungen des Caco-2-Monolayers mittels TEER	88
	in Abhängigkeit von Ergüssen	88
4.3.8.1	VEGF-Gehalt in den Ergüssen vor und nach Filtration (0,2 μ m)	88
4.3.8.2	Permeabilitätsveränderungen	88
4.3.9	Entwicklung eines Caco-2-Monolayers.....	88
4.3.10	Permeabilität von Bevacizumab und Paracetamol über den Caco-2-Monolayer.....	89
4.3.10.1	Analytik von Bevacizumab und humanem IgG1 mit dem „Easy Titer IgG1 Assay“	89
4.3.10.2	Analytik von Paracetamol	90
4.3.10.3	Permeabilitätskoeffizient (P_{APP}) von Bevacizumab und Paracetamol	92
4.4	Diskussion	93
4.4.1	VEGF-Konzentrationen in Ergüssen und Sera sowie in den Überständen von Patientenzellen und Zelllinien	93
4.4.2	Entwicklung eines Modells zur Untersuchung VEGF-vermittelter Permeabilität.....	95
4.4.3	Hemmung der VEGF-vermittelten Permeabilität mit:	96
4.4.3.1	einem Tyrosinkinase-Inhibitor oder VEGF-R2-spezifischer siRNA.....	96
4.4.3.2	Bevacizumab	97
4.4.3.2.1	durch Bestimmung des TEER-Wertes	99
4.4.3.2.2	durch Bestimmung der Permeabilität von FITC-markierten Dextran 4kDa	100
4.4.4	Effekte von Ergüssen auf die Permeabilität des Caco-2-Monolayers.....	101
4.4.5	Toxizitätsuntersuchungen von Bevacizumab.....	101
4.4.6	Permeabilitätsuntersuchungen von Bevacizumab	102
4.4.7	Zusammenfassung.....	103
5	Regulation der VEGF-Produktion	105
5.1	Einleitung	105
5.1.1	Regulation der VEGF-Produktion	105
5.1.2	Der Wachstumsfaktor TGF- β	105
5.1.3	Das Chemokin IL-8	106
5.1.4	Die Gerinnungsfaktoren Thrombin und FXa	107
5.2	Material und Methoden	108

Inhaltsverzeichnis

5.2.1	Einfluss der Gerinnungsfaktoren auf die VEGF-Expression.....	108
5.2.1.1	Bestimmung von Gerinnungsfaktoren in Ergüssen.....	108
5.2.1.2	Durchflusszytometrie.....	109
5.2.1.2.1	Aufbereitung der Proben.....	109
5.2.1.2.2	Detektion von PAR-1 und PAR-2 auf Patientenzellen und Tumorzelllinien mittels FACS (<i>fluorescence activated cell sorter</i>).....	109
5.2.1.3	Einfluss von FXa und FIIa auf die VEGF-Produktion von Panc-1 und Patientenzellen.....	110
5.2.1.3.1	VEGF-mRNA Realtime PCR.....	110
5.2.1.3.1.1	Stimulation der Zellen.....	110
5.2.1.3.1.2	Quantifizierung der VEGF-mRNA.....	111
5.2.1.3.1.3	Auswertung.....	112
5.2.1.3.2	VEGF-ELISA.....	112
5.2.2	Einfluss von TGF- β 1 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen.....	112
5.2.2.1	Bestimmung der TGF- β 1-Konzentration in den Ergüssen.....	112
5.2.2.2	Bestimmung der TGF- β 1-Konzentration in den Überständen von Zelllinien und Patientenzellen.....	113
5.2.2.3	Einfluss von TGF- β 1 auf die VEGF-Produktion von Zelllinien und Patientenzellen.....	113
5.2.2.3.1	VEGF-mRNA Realtime PCR.....	113
5.2.2.3.1.1	Stimulation der Patientenzellen.....	113
5.2.2.3.1.2	Quantifizierung der VEGF-mRNA.....	114
5.2.2.3.2	VEGF-ELISA.....	114
5.2.2.3.2.1	Stimulation der Zellen mit TGF- β 1.....	114
5.2.2.3.2.2	Inhibierung des endogenen TGF- β 1.....	114
5.2.3	Einfluss von IL-8 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen.....	115
5.2.3.1	Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Ergüssen.....	115
5.2.3.2	Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Überständen von Zelllinien und Patientenzellen.....	115
5.2.3.3	Einfluss von IL-8 auf die VEGF-Produktion von Zelllinien und Patientenzellen.....	115
5.2.3.3.1	VEGF-mRNA Realtime PCR.....	115
5.2.3.3.1.1	Stimulation der Zellen.....	115
5.2.3.3.1.2	Quantifizierung der VEGF-mRNA.....	116
5.2.3.3.2	VEGF-ELISA.....	116
5.2.4	Bestimmung von Permeabilitätsveränderungen des Caco-2 Monolayers mittels TEER-Messung in Abhängigkeit von:.....	116

Inhaltsverzeichnis

5.2.4.1	FIIa und FXa	117
5.2.4.2	IL-8.....	117
5.2.4.3	TGF- β 1 oder eines TGF- β 1 neutralisierenden Antikörpers.....	118
5.2.4.4	TGF- β 1 oder der Kombination aus TGF- β 1 und Bevacizumab.....	118
5.3	Ergebnisse	119
5.3.1	Einfluss der Gerinnungsfaktoren auf die VEGF-Expression.....	119
5.3.1.1	Bestimmung von Gerinnungsfaktoren in Ergüssen	119
5.3.1.2	PAR-1- und PAR-2-Expression auf Patientenzellen und Tumorzelllinien im FACS (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)	119
5.3.1.3	Einfluss von FXa und FIIa auf die VEGF-Produktion von Panc-1 und Patientenzellen.....	120
5.3.1.3.1	VEGF-mRNA Realtime PCR.....	120
5.3.1.3.2	VEGF-ELISA	121
5.3.2	Einfluss von TGF- β 1 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen.....	122
5.3.2.1	Bestimmung der TGF- β 1-Konzentration in Ergüssen	122
5.3.2.2	Bestimmung der TGF- β 1-Konzentration in den Überständen von Zelllinien und Patientenzellen.....	122
5.3.2.3	Einfluss von TGF- β 1 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen	123
5.3.2.3.1	VEGF-mRNA Realtime PCR.....	123
5.3.2.3.2	VEGF-ELISA	124
5.3.3	Einfluss von IL-8 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen	126
5.3.3.1	Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Ergüssen	126
5.3.3.2	Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Überständen von Zelllinien und Patientenzellen.....	126
5.3.3.3	Einfluss von IL-8 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen	126
5.3.3.3.1	VEGF-mRNA Realtime PCR.....	126
5.3.3.3.2	VEGF-ELISA	127
5.3.4	Bestimmung von Permeabilitätsveränderungen des Caco-2 Monolayers mittels TEER-Messung in Abhängigkeit von:	128
5.3.4.1	FIIa, FXa, TGF- β 1 und IL-8.....	128
5.3.4.2	TGF- β 1 oder eines TGF- β 1 neutralisierenden Antikörpers.....	128
5.3.4.3	TGF- β 1 oder der Kombination aus TGF- β 1 und Bevacizumab.....	129
5.4	Diskussion	130
5.4.1	Effekte von FIIa und SLIGKV auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen.....	130

Inhaltsverzeichnis

5.4.2	Effekte von TGF- β 1 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen	131
5.4.3	Effekte von IL-8 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen.....	133
5.4.4	Permeabilitätsveränderungen des Caco-2 Monolayers in Abhängigkeit von FXa, FIIa, IL-8 und TGF- β 1.....	134
5.4.5	Zusammenfassung.....	135
6.	Zusammenfassung	137
7.	Material	140
7.1	Antikörper	140
7.2	Chemikalien	140
7.3	Peptide.....	142
7.4	gebrauchsfertige Kits	142
7.5	Geräte	142
7.6	Verbrauchsmaterial.....	144
7.7	Primer	145
7.8	siRNA	145
7.9	Lösungen und Puffer	145
7.10	Zellmaterial	146
7.10.1	Primärkulturen.....	146
7.10.2	Zelllinien.....	147
8.	Literaturverzeichnis	148

1. Einführung

1.1 Maligne Ergüsse

Die Aufzeichnungen des statistischen Bundesamtes besagen, dass im Jahr 2008 neoplastische Erkrankungen mit 26 %, nach den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (42 %), die zweithäufigste Todesursache in Deutschland gewesen sind. Im Jahr 2004 erkrankten nach Angaben des Robert Koch Institutes 230.500 Männer und 206.000 Frauen an einer Krebserkrankung. Jede Krebsart kann in seröse Körperhöhlen metastasieren und dort maligne Ergüsse verursachen, indem Flüssigkeit aus dem Blut- oder den Lymphgefäßen austritt [Olopade et al., 1991]. Ein Erguss seröser Körperhöhlen ist daher definiert als eine anormale Flüssigkeitsakkumulation in der Pleura-, Perikard- oder Peritonealhöhle [Runyon, 1994]. Eine Studie hat ergeben, dass 15 % aller Tumorpatienten Pleuraergüsse ausbilden [Rodriguez-Panadero et al., 1989]. Damit stellen Neoplasien mit ungefähr 22 % eine der bedeutendsten Ursachen für die Entstehung von Pleuraergüssen dar [Marel et al., 1993, Valdes et al., 1996]. Demgegenüber beruhen nur 10 % aller klinisch manifesten Aszitesformen auf einer malignen Grunderkrankung. Die Inzidenz eines peritonealen Ergusses im Rahmen einer Krebserkrankung liegt bei 20 % [Seeber, 2003]. Insgesamt 13 % aller perikardialen Ergüsse sind malignen Ursprungs [Sagrista-Sauleda et al., 2000]. Die mitunter großen Flüssigkeitsmengen bereiten den Betroffenen, die ohnehin schon unter den Folgen ihrer Grunderkrankung leiden, weitere große Beschwerden. Aufgrund des gesteigerten Drucks bewirkt ein Aszites starke abdominale Schmerzen, Darmverschluss, Kurzatmigkeit, Appetitlosigkeit mit einhergehender Kachexie und Erschöpfung, Übelkeit und verminderte Beweglichkeit. Das gravierendste Symptom von Pleuraergüssen ist die mit der Ergussmenge zunehmende Atemnot. In Anbetracht der kurzen Überlebenszeit von im Mittel 20 Wochen [Garrison et al., 1986, Zebrowski et al., 1999], ist die Beseitigung der Symptome das zentrale therapeutische Ziel, das mit der Verbesserung der Lebensqualität und einer möglichen Lebensverlängerung des Patienten verknüpft ist [Rosenberg, 2006]. Die Häufigsten Grunderkrankungen seröser Ergüsse sind in den Tabelle 1.1A und 1.1B zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Häufigsten Grunderkrankungen benigner Ergüsse

Art des Ergusses	Grunderkrankung	Häufigkeit (%)	Studie
Aszites	Leberzirrhose	68	[Mahmood et al., 2009]
	Peritonitis	9	
	Herzinsuffizienz	6	
Pleuraerguss	Herzinsuffizienz	67	[Leers et al., 2007]
	Niereninsuffizienz	17	
	Hypalbuminämie	9	
	Leberzirrhose	6	

Tabelle 1.2: Häufigsten Grunderkrankungen maligner Ergüsse

Art des Ergusses	Grunderkrankung	Häufigkeit (%)	Studie
Aszites	Pankreas-Ca	19	[Garrison et al., 1986]
	Ovarial-Ca	18	
	Colon-Ca	18	
Pleuraerguss	Bronchial-Ca	33	[Valdes et al., 1996]
	Mamma-Ca	12	
	Lymphom	11	
Perikarderguss	Bronchial-Ca	37	[Thurber et al., 1962]
	Mamma-Ca	22	
	Lymphom	17	

1.2 Transudate und Exsudate

Die Klassifizierung eines Pleuraergusses als Transsudat oder Exsudat gibt Hinweise auf die möglichen Ursachen. Um zwischen Exsudat und Transsudat zu differenzieren, können die von Light 1972 aufgestellten Unterscheidungsmerkmale herangezogen werden. Demnach ist ein Pleuraerguss ein Exsudat, wenn ein oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllt ist: 1) Der Proteingehalt in der Pleuraflüssigkeit dividiert durch den Proteingehalt im Serum ist größer als 0,5; 2) Der Quotient aus der Konzentration von Erguss-LDH und Serum-LDH ist größer 0,6; 3) die LDH-Konzentration in der Pleuraflüssigkeit übersteigt 200 IU/L [Light, 1997]. Da die Methode nach Light keinen wirklichen Vorteil mit sich bringt, können auch vereinfacht die in Tabelle 1.3 angegebenen Kriterien zur Unterscheidung von Exsudat und Transsudat herangezogen werden [Matthys et al., 2008]. Transsudative Pleuraergüsse entstehen durch Veränderungen der systemischen Bedingungen, die das Gleichgewicht von Bildung und Absorption der Pleuraflüssigkeit kontrollieren, ohne dass die Pleura selber erkrankt beziehungsweise ihre Integrität gestört ist. Ätiologisch kommen in der Hauptsache folgende Grunderkrankungen in Betracht: Herzinsuffizienz, Leberzirrhose, Nierenerkrankungen und Eiweißmangelsyndrome. Exsudate entstehen durch Permeabilitäts-erhöhung der Pleura oder Behinderung des

Lymphabflusses aus dem Pleuraraum. Ätiologisch sollte in erster Linie an entzündliche und neoplastische Erkrankungen gedacht werden. Die überwiegenden Ursachen für Exsudate sind neoplastische Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten und gastrointestinale Erkrankungen.

Tabelle 1.3: Unterscheidungskriterien beim unklaren Pleuraerguss

Art des Ergusses	Unterscheidungskriterien		
	Protein (g/dl)	Cholesterin (mg/dl)	LDH (IU/L)
Transsudat	< 3	< 60	< 160
Exsudat	> 3	> 60	> 160

1.3 Physiologie der Pleura

Der Pleuraspalt ist ein 10-20 µm weiter Hohlraum zwischen der Pleura parietalis und der Pleura visceralis [Agostoni et al., 2007]. Die viscerale Pleura bedeckt die gesamte Lunge. Die parietale Pleura kleidet die Thoraxinnenwand, das Mediastinum und das Diaphragma aus. Am Lungenhilus gehen beiden Pleuren ineinander über. Die Pleurablätter bestehen aus je zwei Gewebsschichten: eine Bindegewebsschicht mit Kapillaren und ein auf dieser aufliegendes, dem Pleuraspalt zugewandtes, einzellschichtiges Pleuramesothel. Die Pleuramesothelschicht hat einerseits eine mechanische Funktion, andererseits spielt sie durch Sekretion von Mediatoren eine entscheidende Rolle beim Flüssigkeits- und Zelltransport über die Pleurahöhle [Mutsaers, 2004]. Das Bindegewebe ist mit Kapillaren und Lymphgefäßen durchzogen. Letztere erweitern sich submesothelial zu lymphatischen Lakunen, die über 2-5 µm große Öffnungen (Stomata) mit dem Pleuraspalt in Verbindung treten. Diese Stomata befinden sich ausschließlich auf parietaler Seite [Matthys et al., 2008].

Der Pleuraspalt ist mit 0,1 bis 0,3 ml einer klaren, transparenten Pleuraflüssigkeit pro Kilogramm Körpergewicht gefüllt [Noppen et al., 2000]. Das entspricht beim Erwachsenen absolut 30-50 ml eines eiweißarmen Transsudats [Frank, 2004]. Die Pleuraflüssigkeit dient als Gleitmittel zwischen Thoraxwand und Lunge und erlaubt eine reziproke Verschiebung beider während der Atembewegung [Zocchi, 2002]. Es finden sich pro Mikroliter ca. 1500 bis 4500 Zellen, vorwiegend Monozyten, wenige Makrophagen und Lymphozyten, vereinzelt auch Granulozyten, aber keine Erythrocyten [Noppen, 2004].

Abbildung 1.1 zeigt das Fließgleichgewicht der Pleuraflüssigkeit unter physiologischen Bedingungen. Die Pleuraflüssigkeit wird durch Starling-Kräfte aus den Kapillaren der Pleura parietalis in das Interstitium und von dort in den Pleuraspalt filtriert [Agostoni et al., 2007]. Der Flüssigkeitseinstrom beruht auf dem Nettodruck von -6 cmH₂O, der sich aus dem Pleuradruck, dem onkotischen Druck und dem hydrostatischen Druck zusammensetzt. Der Pleuradruck entsteht durch zwei gegenseitig

Einführung

wirkende Mechanismen: die expandierende Kraft der Thoraxwand und die elastische Retraktionskraft der Lunge. Im Mittel beträgt dieser Unterdruck $-5 \text{ cmH}_2\text{O}$. Der onkotische Druck ist in den Kapillaren der viszeralen und parietalen Seite mit $34 \text{ cmH}_2\text{O}$ identisch, während er in der Pleuraflüssigkeit aufgrund ihres geringeren Proteingehalts nur bei $5 \text{ cmH}_2\text{O}$ liegt. Unterschiede zwischen den beiden Seiten ergeben sich aufgrund des hydrostatischen Drucks. Auf parietaler Seite beträgt der Druck $30 \text{ cmH}_2\text{O}$, auf der viszeralen Seite wird er mit $24 \text{ cmH}_2\text{O}$ etwas niedriger kalkuliert, da die viszerale Kapillaren in die Pulmonalvenen drainieren (Abb. 1.1A). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass 89 % der Flüssigkeit den Pleuraraum über die lymphatischen Stromata der parietalen Seite verlassen (Abb. 1.1B) [Agostoni et al., 2007]. Die parietalen Lymphabflüsse sind mit klappenähnlichen Ventilen versehen und garantieren daher einen unidirektionalen Abfluss [Wang, 1975]. Die Regulation der Pleuraflüssigkeit erfolgt durch die enorme Anpassungsfähigkeit dieses lymphatischen Systems, das Flussmengen bis zu $500 \text{ ml}/24 \text{ h}$ pro Hemithorax ermöglicht, ohne dass ein Erguss entsteht.

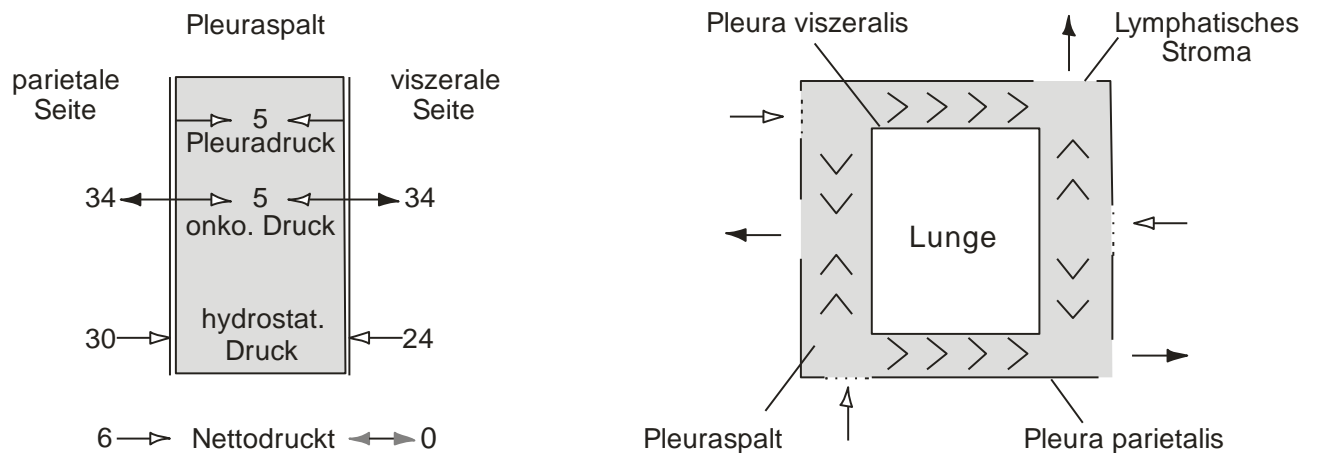


Abb. 1.1: (A) Modell der Druckverhältnisse am Pleuraspalt (Angaben in cmH_2O). (B) Schematische Darstellung des Pleuraraums mit den wesentlichen Hauptachsen des Flüssigkeitseinstroms über die Pleura parietalis \rightarrow , der intrapleurale Flüssigkeitszirkulation $>>$ und des Abflusses über parietale Stromata \rightarrow . Unter Normalbedingungen findet kein nennenswerter Austausch über die viszerale Pleura statt.

1.4 Zell-Zell-Verbindungen

Spezialisierte Verbindungen ermöglichen der Pleura parietalis, Barrieren zu bilden, die die Bewegung von Wasser, gelösten Material und Zellen aus den Gefäßen in den Pleuraspalt verhindern. Die generelle Struktur der Zell-Zell-Verbindungen ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Zell-Zell-Verbindungen können in drei funktionelle Gruppen unterteilt werden: 1) Undurchlässige Verbindungen, die Zellen in einem Epithel gegeneinander abdichten. Diese Barrierefunktion wird in Vertebraten von Tight Junctions (auch Zona occludens genannt) übernommen [Harhaj et al., 2004]. Dabei kontrollieren Tight Junctions zum einen die Diffusion von gelösten Substanzen („Schleusenfunktion“). Zum anderen bewirken sie die Polarität der Zelle, indem sie verhindern, dass Lipide und Proteine von der einen Seite des Epithels durch die Tight Junctions auf die andere Seite hindurchtreten können („Schrankenfunktion“) [Diamond, 1977]. Tight Junctions bestehen aus Claudinen und Occludinen, die über intrazelluläre Proteine, sogenannte Zona occludens-Proteine, mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind [Fanning et al., 1998]. 2) Die zweite funktionelle Gruppe umfasst die Ankerverbindungen. Sie verbinden Zellen mechanisch mit ihren Nachbarzellen, indem sie starke, membrandurchspannende Strukturen bilden, die innerhalb der Zelle mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Zu den Ankerverbindungen zählen die Adhäsionsverbindungen (auch Zona adherens oder Adherence Junction genannt) und die Desmosomen. Sie verbinden die Zellen durch transmembrane Adhäsionsproteine, die zur Familie der Cadherine gehören [Green et al., 2010]. Die intrazellulären Domänen der Adherence Junction binden an das Aktinfilament, die der Desmosomen an das Intermediärfilament. Adhäsionsverbindungen können die Permeabilität indirekt beeinflussen, indem ihre Bildung eine Voraussetzung für die Expression von Tight Junctions ist [Ohsugi et al., 1997]. Durch Phosphorylierung des Cadherins können die Adherens Junctions die Permeabilität aber auch direkt beeinflussen [Dejana et al., 2008]. 3) Die dritte Gruppe der Zell-Zell-Verbindungen wird von sogenannten kommunizierenden Verbindungen gebildet. Diese Gap Junctions ermöglichen den Austausch von anorganischen Ionen und kleinen wasserlöslichen Molekülen zwischen den Zellen, sodass eine metabolische und elektrische Verbindung entsteht. Jede Gap Junction besteht aus zwei Connexonen, die sich wiederum aus je sechs Connexinen zusammensetzen [Yeager et al., 2007].

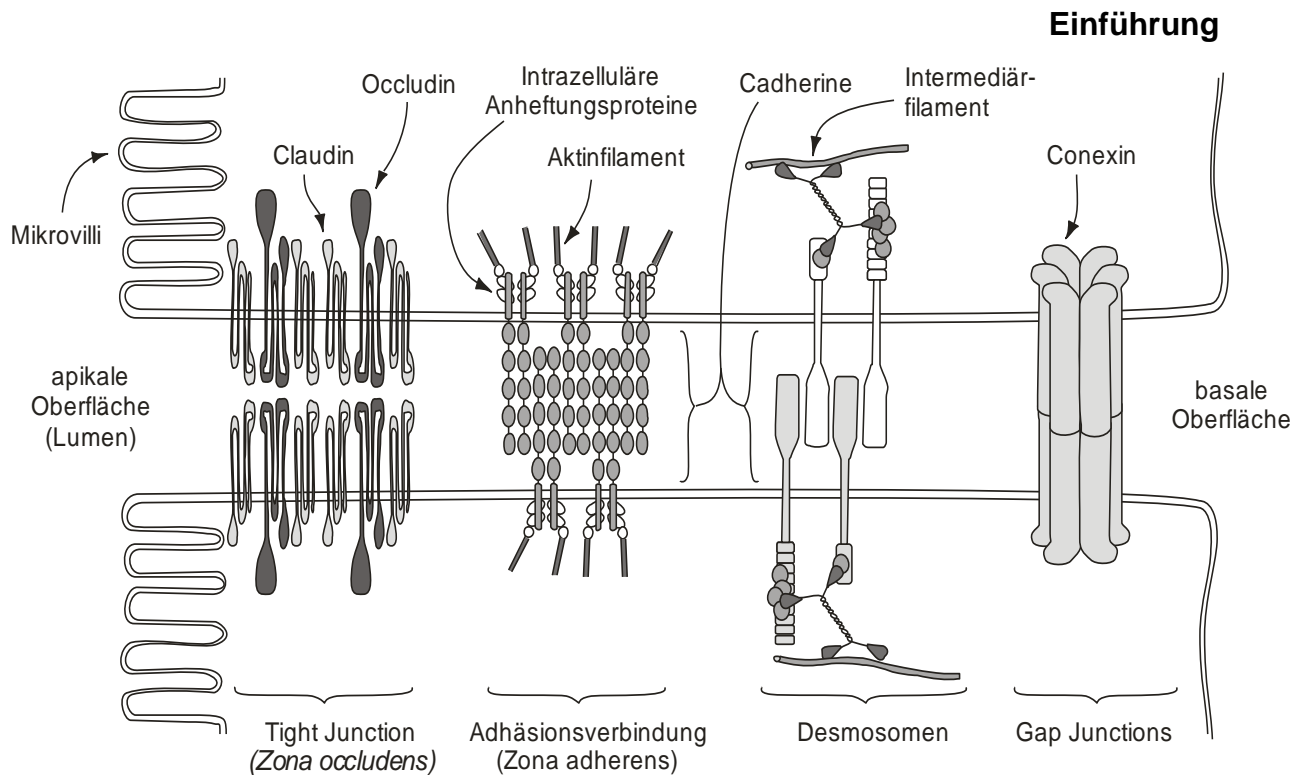


Abb. 1.2: Schematische Zusammenfassung der unterschiedlichen Zell-Zell-Verbindungen

1.5 Pathophysiologie der Pleura

Ein oder mehrere Mechanismen des Fließgleichgewichts sind bei der Bildung eines Pleuraergusses gestört. Die Ursachen für die Entstehung eines Pleuraergusses werden von Zocchi in drei Gruppen unterteilt.

1. Ursachen, die den transpleuralen Druckgradienten ändern
2. Ursachen, die den lymphatischen Drainageweg verlegen
3. Ursachen, die die mesotheliale und kapilläre Permeabilität erhöhen [Zocchi, 2002].

1.6 Gegenwärtige Therapien von Pleuraergüssen

Bei der Wahl der Therapie maligner Ergüsse müssen Symptome und Zustand des Patienten, dessen Lebenserwartung und die Art des zugrundeliegenden Tumors berücksichtigt werden.

1.6.1 Punktion

Bei Patienten mit einer schlechten Prognose und die nicht in der Lage sind, sich einem invasivem Eingriff zu unterziehen, könnte die Punktion eine therapeutische Option darstellen. Die Punktion ist ausschließlich palliativ und nur indiziert, wenn der Patient durch das Ablassen der Ergussflüssigkeit einen symptomatischen Nutzen erfährt. In jedem Fall sollte der Betroffene über das Risiko einer Infektion, Blutung oder eines Pneumothorax aufgeklärt sein. Für die Punktion, bei der eine Nadel nach Lokalanästhesie in die Pleurahöhle eingestochen wird, wird empfohlen, lediglich 1,0-1,5 Liter Ergussflüssigkeit abzulassen [Antony et al., 2001]. Die Punktion ist für die Langzeittherapie ungeeignet, da die Pleuraflüssigkeit immer schneller reakkumuliert. So konnte in

einer Studie gezeigt werden, dass sich der Erguss im Mittel alle 4,2 Tage neu gebildet hatte [Rodriguez-Panadero et al., 2006].

1.6.2 Thorakotomie

Thorakotomie und die chemische Pleurodese mit Talkum ist die am häufigsten eingesetzte Therapie maligner Ergüsse. Dabei wird durch den geöffneten Thorax ein Schlauch in den Pleuraspalt des Patienten eingebracht. Die Ergussflüssigkeit wird abgesaugt und anschließend eine Pleurodese durchgeführt. Die Pleurodese kann bei entfalteter Lunge per Instillation einer Talkumsuspension über den liegenden Drainageschlauch erfolgen. Durch das Talkum wird in der Pleurahöhle künstlich eine Entzündung hervorgerufen, die in einer Verklebung von Pleura visceralis und Pleura parietalis resultiert.

1.6.3 Thorakoskopie

Medizinische Thorakoskopie wird zunehmend eine weitere Option zur schnellen Diagnose und Behandlung von malignen und nicht-malignen Ergüssen. Dem lokalanästhesierten Patienten wird über einen kleinen Hautschnitt ein Trokar (Führungshülse) zwischen die Rippen in die Brusthöhle eingebracht. Anschließend erfolgt bei kollabierter Lunge über den Trokar mit einem Pleuroskop die Inspektion der Pleura parietalis. Als krankhaft diagnostiziertes Gewebe wird zur weiteren Untersuchung entnommen. Am Ende des Eingriffs wird eine Pleurodese durchgeführt.

1.6.4 Videoassistierte Thorakoskopie

Die *Video assisted thoracic surgery* (VATS) erfordert im Vergleich zur medizinischen Thorakoskopie einen größeren apparativen und logistischen Aufwand. Über einen Port wird die Pleuraflüssigkeit abgelassen und im Anschluss die Pleurahöhle untersucht. VATS erlaubt im Vergleich zur medizinischen Thorakoskopie einen sichereren Zugang zur Pleura visceralis und dem Lungenparenchym zwecks Diagnose und Therapie. Am Ende des Eingriffs wird eine Pleurodese durchgeführt. Die Methode ist effektiv, sicher und führt mit sehr hohen Erfolgsraten zu einer Kontrolle des malignen Ergusses.

1.6.5 Pleuro-Peritoneale Shunts

Verstopfung mit Blutgerinnseln und Infektionen haben die Popularität der pleuroperitonealen Shunts vermindert. Shunts sind indiziert bei wiederkehrenden Pleuraergüssen und bei Patienten, die aufgrund ihres Gesundheitszustandes keinen chirurgischen Eingriff über sich ergehen lassen können. Der Wirkmechanismus beruht darauf, dass Pleuraflüssigkeit aus dem Pleuraspalt in die Peritonealhöhle transportiert wird.

1.6.6 Pleurale Dauerkatheter

Dauerkatheter haben sich in den letzten Jahren in der palliativen Therapie von malignen Ergüssen etabliert. Nachdem die Drainage in der Pleurahöhle positioniert worden ist, wird mittels Vakuum Flüssigkeit aus dem Pleuraspalt gesaugt. Die Drainage kann gewöhnlich jeden Tag oder häufiger erfolgen, dauert 10-15 Minuten und kann sogar von dem Patienten selbst durchgeführt werden. Innerhalb von 4-6 Wochen kommt es bei 42-58 % der Patienten zu einer spontanen Pleurodese, sobald der Flüssigkeitsaustritt über drei aufeinanderfolgende Drainagen weniger als 50 ml beträgt [Musani et al., 2004]. Weiterhin können Pleurakatheter in der Zukunft dazu genutzt werden, Zytostatika oder neuartige Substanzen in den Pleuraspalt einzubringen [Musani, 2009].

1.6.7 Pleurektomie

Die Pleurektomie ist wegen ihres erheblichen operativen Aufwands nur für eine kleine Patientenzahl geeignet, da die meisten Betroffenen nicht gesund genug sind, um einen ausgeprägten chirurgischen Eingriff zu überstehen. Die Pleurektomie bezeichnet die partielle oder vollständige Entfernung der Pleuren.

1.6.8 Chemotherapie und Diuretika

Da die in dem Erguss befindlichen Tumorzellen kausal für die Ergussbildung sind, stellt die Beseitigung der Tumorzellen durch intrakavitäre Chemotherapie auch eine wahrscheinliche Lösung zur Vermeidung von Rezidiven dar. In einigen Studien konnte auf diesem Wege auch eine Verbesserung gezeigt werden, andere Studien dokumentierten intolerable Toxizität. Weiterhin wird verminderte Natrium-Aufnahme in Kombination mit einem Diuretikum häufig zur Behandlung maligner Ergüsse eingesetzt, obwohl die Wirksamkeit strittig ist [Lee et al., 1998]. Rosenberg et al. vertreten wie einige andere Autoren den Standpunkt, dass die Therapie maligner Ergüsse mit einem Diuretikum unwirksam sei [Rosenberg, 2006].

1.7 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse untersucht werden. Dazu wurde die Ätiologie von 80 Ergüssen epidemiologisch untersucht. Weiterhin wurde mit Caco-2-Zellen (humane Colon-Adenokarzinomzellen) ein Monolayer-Modell validiert, an dem VEGF-vermittelte Permeabilitätsveränderungen gemessen werden konnten. Desweiteren sollte die Analytik zur Bestimmung von Permeabilitätsveränderungen etabliert werden. Die Temperaturabhängigkeit der Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) musste dazu in dieser Arbeit quantifiziert werden, sodass temperaturunabhängige TEER-Messungen möglich wurden. Die VEGF-vermittelte Permeabilität sollte mittels eines neutralisierenden Antikörpers (Bevacizumab), eines Tyrosinkinaseinhibitors (SU5416) und VEGF-R2 spezifischer siRNA gehemmt werden. In diesem Zusammenhang war beabsichtigt, die bis dahin undefinierte Dosierung von Bevacizumab im Rahmen der Therapie

Einführung

maligner Ergüsse aufzuklären. Es wurde untersucht, in welchem Umfang Bevacizumab einen epithelialen Monolayer passieren kann, um die Frage nach der Applikationsart zu beantworten. In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, ob aus dem Erguss isolierte Zellen unter Kulturbedingungen VEGF freisetzen. Weiterhin sollte der Effekt von verschiedenen Faktoren (Thrombin, FXa, TGF- β 1 und IL-8), die in den Ergüssen nachweisbar waren, auf die Regulation der VEGF-Sekretion untersucht werden. Letztendlich war zu überprüfen, ob die genannten Faktoren VEGF-unabhängig die Permeabilität des Caco-2 Monolayers beeinflussen können.

2. Patientenkollektiv und Ergüsse

2.1 Einleitung

Die Epidemiologie beschäftigt sich mit der Verteilung von Krankheiten innerhalb von Populationen und Populationsgruppen sowie deren zeitlichen Bewegungen und zugrundeliegenden Ursachen [Fletcher et al., 2007, Böhning, 1998]. Es werden zwei Typen von epidemiologischen Studien unterschieden: beobachtende und experimentierende Studien, wobei in letzteren durch Intervention gegen Faktoren mit vermeintlicher ursächlicher Bedeutung geprüft wird, ob dadurch die Krankheitsentwicklung beeinflusst werden kann. Bei beobachtenden Studien kann zwischen deskriptiven Studien, die eine Krankheit sehr allgemein beschreiben, und analysierenden Studien, denen eine spezielle Fragestellung zugrunde liegt, unterschieden werden [Heinemann, 1994]. Eine Untergruppe der beobachtenden Studien sind die Querschnittsstudien, die eine Krankheit zu einem bestimmten Zeitpunkt, zum Beispiel hinsichtlich ihrer Häufigkeit oder Schwere innerhalb der Bevölkerung, charakterisieren. Auf diese Weise lassen sich Angaben zur Prävalenz der Krankheit in verschiedenen Bevölkerungsgruppen ermitteln. Demgegenüber wird bei Longitudinalstudien, einer weiteren Untergruppe der deskriptiven Studien, die Krankheitsentwicklung von zunächst gesunden Menschen betrachtet. Den Übergang zwischen Längs- und Querschnittsstudien bilden die Fall-Kontroll-Studien. Ihr Ziel ist die Identifizierung von Fakten, die kausal für eine Krankheit sind. Dabei wird von bereits erkrankten Personen ausgegangen und retrospektiv nach ursächlich beteiligten Faktoren gesucht. Dazu werden Patienten mit manifester Krankheit (Fälle) solche Personen gegenübergestellt, welche die Krankheit nicht haben. Die für beobachtende epidemiologische Studien erforderlichen Daten können auf verschiedenen Wegen erlangt werden. Die weitläufigsten Methoden sind dabei die Befragung von Patienten anhand von Fragebögen oder die Zusammenstellung bereits bestehender Daten aus konventionellen Patientenakten oder computerunterstützten Datenbanken. Die Erhebung, Speicherung, Verarbeitung oder Veröffentlichung patientenbezogener Daten bedarf aufgrund des in Artikel 1 Absatz 1 und Artikel 2 Absatz 2 Grundgesetz garantierten Rechts des Einzelnen, seine Privatsphäre nach außen zu schützen, besonderer Regelungen. Dem Recht des Patienten steht aber das durch Artikel 5 Absatz 3 Grundgesetz gewährleistete Recht auf Forschungsfreiheit gegenüber [Meier, 2003]. Somit ist der Umgang mit Patientendaten im Rahmen der Forschung vom Gesetzgeber im Vergleich zur Datenverwaltung im Zusammenhang mit der Untersuchung und Behandlung von Patienten vereinfacht. Es kann zum Beispiel der Fall auftreten, dass Daten, die zu Therapiezwecken gespeichert wurden, zu Forschungszwecken verwendet werden sollen. Um eine solche Zweckänderung auch ohne die Einwilligung des Betroffenen zu rechtfertigen, enthalten die Datenschutzgesetze sogenannte Forschungsklauseln, deren Hintergrund es ist, dass die wissenschaftliche

Patientenkollektiv und Ergüsse

Forschung grundsätzlich als im öffentlichen Interesse liegend angesehen wird. Eine derartige Rechtfertigung setzt allerdings voraus, dass das öffentliche beziehungsweise wissenschaftliche Interesse an der Durchführung des Forschungsvorhabens die schutzwürdigen Belange des Betroffenen überwiegt (Zentrale Ethikkommission). Voraussetzung für die Nutzung personenbezogener Daten zu Forschungszwecken ist aber deren Anonymisierung (§ 40 Bundesdatenschutzgesetz). Dabei darf allerdings unter bestimmten Umständen eine Reidentifizierung des Betroffenen möglich sein. Derartige Umstände können zum Beispiel gegeben sein, wenn bestehenden Datensätzen eines Patienten neue Daten, die sich erst später ergeben haben, hinzugefügt werden sollen oder die Richtigkeit vorhandener Informationen überprüft werden muss. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, um die Ursachen maligner Ergüsse zu erforschen.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Auswahl der Patienten

Als Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden Daten von Patienten und deren Ergüssen gesammelt. Berücksichtigt wurden 20 Patienten mit Ergüssen, basierend auf einer benignen Primärerkrankung, und 60 Patienten mit Ergüssen, die auf eine Tumorerkrankung zurückzuführen sind. Die malignen Grunderkrankungen konnten weiter in je 20 gastrointestinale, pulmonale und gynäkologische Karzinome unterschieden werden. Die Patienten hatten sich in den Jahren 2003 - 2006 im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel vorgestellt. Die Archivierung der Daten wurde von der Ethik-Kommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter dem Aktenzeichen AZ D421/04 am 30.06.2004 genehmigt.

2.2.2 Erstellung einer Datenbank

Zunächst wurden die Parameter festgelegt, die ermittelt werden sollten, um den Patienten und seinen Erguss möglichst gut zu charakterisieren. Für Fragen, bei denen verschiedene oder auch mehrere Antworten möglich waren, wurden die denkbaren Alternativen definiert, um die Auswertung zu standardisieren und die Beantwortung durch ankreuzen zu vereinfachen. Zum Beispiel sind die Antwortmöglichkeiten für die Frage nach der angewendeten Therapie beziehungsweise dem Ansprechen auf diese Therapie in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Teil des Fragebogens zur Charakterisierung des Patienten- und Ergusskollektivs

Frage	Antwortmöglichkeiten					
Art der Therapie	nicht mehr möglich	vom Patienten abgelehnt	palliativ	Bestrahlung	Medikation	Operation
Ansprechen auf die Therapie	Complete Response (CR)	Partial Response (PR)	Progressive Disease (PD)	Stable Disease (SD)		

Patientenkollektiv und Ergüsse

Die Excel-Datei, in die die erhobenen Daten eingetragen werden sollten, ist in Tabelle 2.2 dargestellt. Die Informationen über die Patienten wurden mithilfe einer fortlaufenden Nummer anonymisiert und gespeichert.

Tabelle 2.2: Excel-Mappe zur Charakterisierung des Patienten und dessen Erguss (Beispiel)

Ergussnummer:	646	Geschlecht:	w	stationär:	1
Geburtsdatum:	18.08.1948	Alter:	58	ambulant:	
Diagnose:	Mamma-Ca	Erguss	Pleura	Station:	Gyn
Histologische Klassifizierung:	Adeno	benigne:	0	maligne:	1
Datum der Erstdiagnose:	01.04.2004	Datum der Punktion:	19.01.2006	Todesdatum:	14.12.2006
Überleben seit Erstdiagnose:		Überleben seit Punktion (Tagen):	329	Abstand Punkt./Erstd.:	658
Histologische Differenzierung	G2				
Stadieneinteilung:					
pT	1	pN	3		
pM	0	Stadium:	3		
Resektionsränder	R0			FIGO-Klassifikation:	.
Begleiterkrankungen:	Magen/Darm	Herz/Kreislauf/Gefäße	Lunge		
Therapie	Medikation	.	.		
Chemotherapie:	Trastuzumab	.	.		
Arzneistoff:		0	0		
Ansprechen auf Therapie	.			0	
Laborparameter					
WBC	7,38	CA 15-3	22,5		
GRAN	0	CEA	1,1	Fibrinogen	0
HGB	10,9	GesEiw (g/dl)	0	Her2-neu Status	3
PLT	164	LDH	0	FISH / CISH	0
Quick (%)	100	CRP	87,9	Estrogenrezeptor	12
PTT	31	D-Dimere	120	Progesteronrezeptor	8
VEGF (pg/ml):	34,15	2. Parameter		3. Parameter	

2.2.3 Datenerhebung

Die Datenerhebung sollte retrospektiv unter Zuhilfenahme von konventionellen und digitalisierten Patientenakten erfolgen. Für die computerunterstützte Recherche wurde das Krankenhaus-Informationen-System ORBIS von Agfa HealthCare verwendet. Demgegenüber sollten die benötigten Parameter prospektiv mittels eines Fragebogens erfasst werden.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Alter, Geschlecht und Lokalisierung des Ergusses

Die in Tabelle 2.3 dargestellten Parameter lassen keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen (benigne Erkrankungen sowie gastrointestinale, pulmonale und gynäkologische Tumore) erkennen. Lediglich die Häufigkeit von Pleuraergüssen ist bei gastrointestinalen Tumoren in Richtung der Aszitesbildung verschoben (60 % / 40 %). Die in der Tabelle 2.3 gezeigte Prävalenz der Ergussbildung bei Frauen ist durch die 20 Ergüsse, basierend auf gynäkologischen Tumoren,

Patientenkollektiv und Ergüsse

bedingt. Wenn diese Ergüsse bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden, ist die Ergussbildung unabhängig vom Geschlecht.

Tabelle 2.3: Alter und Geschlecht der Patienten sowie Lokalisierung des Ergusses

Alter (Jahren)	Geschlecht (%)		Lokalisation (%)		
	Frauen	Männer	Pleuraerguss	Aszites	Perikarderguss
65 ± 15	61	39	75	21	4

2.3.2 Den Ergüssen zugrunde liegende Primärerkrankung

Abbildung 2.1A verdeutlicht, dass Transsudate am häufigsten durch Herzinsuffizienz bedingt sind. Der meist rechtsseitige oder beidseitige Erguss entsteht, indem sich durch die verringerte Pump-leistung des Herzens Flüssigkeit in Körperhöhlen, wie z.B. dem Pleuraspalt, ansammelt. Eine Pneumonie ist die zweithäufigste Ursache benigner Ergüsse. Meistens entwickelt sich zunächst eine trockene Rippenfellentzündung und nachfolgend ein Erguss. Abbildung 2.1A zeigt weiterhin, dass auch eine Leberzirrhose einen Erguss hervorrufen kann. Ein solcher Erguss ist dann meist durch die Hypalbuminämie und dem damit einhergehenden Abfall des intravasalen onkotischen Drucks bedingt. Bei gastrointestinalen (Abb. 2.1B) und pulmonalen (Abb. 2.1C) Tumoren korreliert keine Erkrankung auffallend häufig mit der Ergussentstehung. Demgegenüber ist ein solcher Zusammenhang bei Ergüssen, beruhend auf einer gynäkologischen Primärerkrankung, ersichtlich. Insgesamt 80 % der Ergüsse basieren in diesem Fall auf einem Mamma-Karzinom.

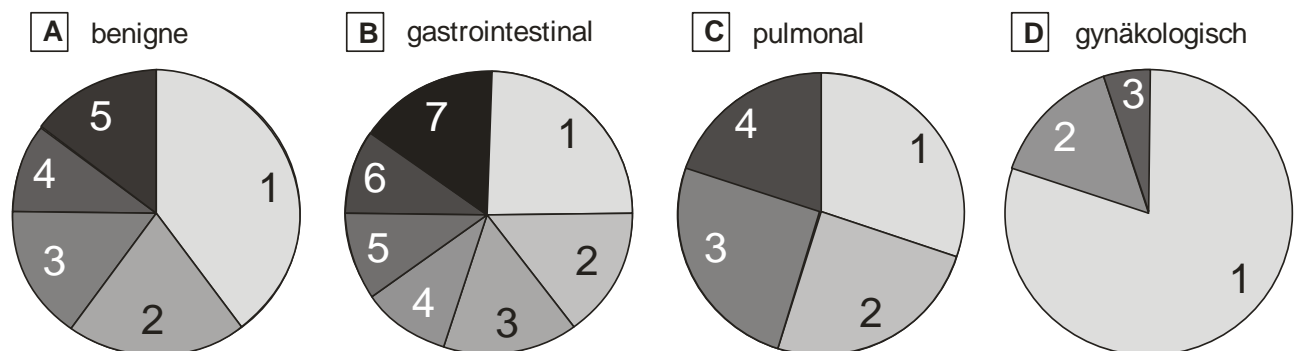


Abb. 2.1: Den Ergüssen zugrunde liegende Primärerkrankungen im Uhrzeigersinn:
(A) (1) Herzinsuffizienz, (2) Pneumonie, (3) Leberzirrhose, (4) Pankreatitis und (5) sonstige
(B) (1) Karzinome des Pankreas, (2) Magens, (3) Ösophagus, (4) Colons, (5) Rektums, (6) Siegelrings und (7) sonstige
(C) (1) NSCLC, (2) SCLC, (3) Pleuramesotheliom und (4) Bronchial-Ca
(D) (1) Karzinome der Mamma, (2) des Ovarial und (3) Uterus

2.3.3 TNM-Klassifikation der Primärerkrankungen

Die TNM-Klassifikation beschreibt die anatomische Größe eines Tumors. T bezeichnet die Ausdehnung des Tumors. Dabei wird zwischen vier Untergruppen T1-T4, entsprechend der Größe des Primärtumors oder des Befalls weiterer Gewebe unterschieden. N (Nodes) kennzeichnet das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. Insgesamt vier Untergruppen charakterisieren den Lymphknotenbefall. N0 bedeutet, dass kein Lymphknoten befallen ist, und N3, dass alle untersuchten Lymphknoten befallen sind. Die Existenz von Metastasen wird durch M1 angegeben, M0 zeigt das Fehlen von Metastasen an [Greene et al., 2008]. In Tabelle 2.4 ist das TNM-Stadium von 35 der insgesamt 60 Tumorpatienten zusammengefasst. Das vierte Stadium charakterisiert Tumore, die bereits Metastasen gebildet haben. Insbesondere Patienten mit gastrointestinalen und pulmonalen Tumoren befanden sich in diesem weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Andererseits mussten nur 15 % der Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren TNM-Stadium 4 zugeteilt werden. Der Grund hierfür liegt nicht in der Tumorgöße, sondern im Fehlen von Metastasen.

Tabelle 2.4: TNM-Stadium von 35 Patienten mit malignen Ergüssen. TNM-Klassifikation gastrointestinaler Tumore nach [Wittekind et al.,2010, Rindi et al., 2006], pulmonaler Tumore nach Goldstraw [Goldstraw, 2009] und gynäkologischer Tumore nach [Duraker et al., 2005, Horn et al., 2010]

Tumorlokalisation	Stadiengruppierung (Häufigkeit (%))			
	I	II	III	IV
gastrointestinal (n = 13)		8	38	54
pulmonal (n =9)		11		89
gynäkologisch (n =13)	15	31	38	15

2.3.4 Laborparameter

2.3.4.1 Plasmaproteine

Veränderungen des Anteils der einzelnen Plasmaproteine am Gesamteiweiß äußern sich nur selten in einer Erhöhung oder Erniedrigung der Gesamteiweißkonzentrationen. So zeigt auch Tabelle 2.5 einen normalen Gesamteiweißgehalt trotz verminderter Albumin-Konzentration. Demgegenüber ist das C-reaktive Protein (CRP) deutlich erhöht, wobei die Unterschiede zwischen den Patienten erheblich sind. CRP dient als Marker zur Verlaufskontrolle von akut-entzündlichen Erkrankungen. Auch ausgedehnte Tumore sind in der Lage, den CRP-Wert auf über 100 mg/l zu erhöhen.

Tabelle 2.5: Proteingehalt im Blut. * Normwerte aus [Dörner et al., 2001]

	Albumin	Eiweis ges.	CRP
	(g/dl)	(g/dl)	(mg/l)
	2,82 ± 0,76 ↓	6,64 ± 1,18	96,6 ± 86,98 ↑↑
Normwerte*:	(3,52-5,02)	(6,6-8,3)	(10)

2.3.4.2 Enzyme

Erhöhte Blutkonzentrationen der Glutamatoxalacetattransaminase (GOT) und der Glutamatpyruvattransaminase (GPT), wie sie in Tabelle 2.6 gezeigt sind, deuten auf eine Schädigung der Leber hin. Aber nicht nur bei Leberzirrhose als Primärerkrankung fanden sich deutlich erhöhte GOT- (47 ± 7 U/l) und GPT-Werte (60 ± 45 U/l), sondern auch bei diversen Tumoren. Auch die Laktatdehydrogenase (LDH), als Indiz für das Absterben von Zellen, ist leicht über den Normwert erhöht.

Tabelle 2.6: Enzymkonzentrationen im Blut. (GOT = Glutamatoxalacetattransaminase; GPT = Glutamatpyruvattransaminase; LDH = Laktatdehydrogenase)

	GOT	GPT	LDH
	U/l	U/l	U/l
	22,81 ± 23,8 ↑	34,25 ± 39,55 ↑	286,48 ± 169,68 ↑
Normwerte:	(5-19)	(5-23)	(80-240)

2.3.4.3 Hämatologie und Hämostasiologie

Der erhöhte Bilirubin-Wert, der in Tabelle 2.7A aufgeführt wird, weist wie auch die erhöhte GOT und GPT (Tabelle 2.6) auf eine Leberschädigung hin.

Tabelle 2.7A: Hämatologie

	Leukozyten	Hämoglobin	Erythrocyten	Hämatokrit	Bilirubin
	(x/nl)	(g/dl)	($10^6/\mu\text{l}$)	(Vol %)	(mg/dl)
	9,92 ± 4,46	11,83 ± 2,09	4,02 ± 0,75	35,74 ± 6,19	2,84 ± 1,25 ↑
Normwerte:	(4,3-10,0)	(11,7-17,7)	(3,8-5,9)	(35-52)	(< 1,1)

Patientenkollektiv und Ergüsse

Die in Tabelle 2.7B dargestellte Konzentration der Gerinnungsfaktoren ist wie auch die plasmatische Gerinnung unauffällig.

Tabelle 2.7B: Gerinnungsfaktoren und plasmatische Gerinnung

	Thrombozyten	AT3	F ₁₊₂	INR	PTT
	(G/l)	(% der Norm)	(nmol/l)	(% der Norm)	(sec)
	319,39 ± 167,53	75,97 ± 18,19 ↓	1,60 ± 0,83 ↑	81,91 ± 16,94	35,36 ± 9,77
Normwerte:	(150-350)	(80-120)	(0,3-1,2)	(70-130)	(35-40)

2.3.4.4 Nierenfunktion und Elektrolyte

Der Creatinin-Wert dient der Überprüfung der Nierenfunktion. Bei der Auswertung der Messwerte ist zu berücksichtigen, dass die Creatininkonzentration im Serum erst ansteigt, wenn die glomeruläre Filtrationsrate um mindestens 50 % reduziert ist. Mit $1,02 \pm 0,66$ mg/dl liegen die Creatinin-Werte des untersuchten Patientenkollektivs innerhalb der Normwerte (0,81-1,44 mg/dl). Die in Tabelle 2.8 zusammengefassten Elektrolyt-Konzentrationen befinden sich ebenfalls alle innerhalb der Normwerte.

Tabelle 2.8: Elektrolytkonzentrationen

	[Na]	[K]	[Ca]	[Fe]
	(mmol/l)	(mmol/l)	(mmol/l)	(µg/dl)
	136,76 ± 5,81	4,14 ± 0,63	2,29 ± 0,19	59,19 ± 52,82
Normwerte:	(135-145)	(3,5-5,1)	(2,2-2,6)	(60-180)

2.3.4.5 VEGF-Konzentration in den Ergüssen

Frühere Studien haben gezeigt, dass VEGF (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) ein wichtiger Parameter bei der Entstehung maligner Ergüsse ist [Zebrowski et al., 1999]. In Abbildung 2.2 sind die VEGF-Spiegel der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ergüsse nach den Primärerkrankungen unterteilt. Es wird deutlich, dass die VEGF-Konzentration bei Tumorpatienten im Vergleich zu Patienten mit benignen Grunderkrankungen signifikant erhöht ist ($p < 0,02$). Zwischen gastrointestinalen, pulmonalen und gynäkologischen Tumoren sind keine signifikanten Unterschiede des VEGF-Gehaltes feststellbar.

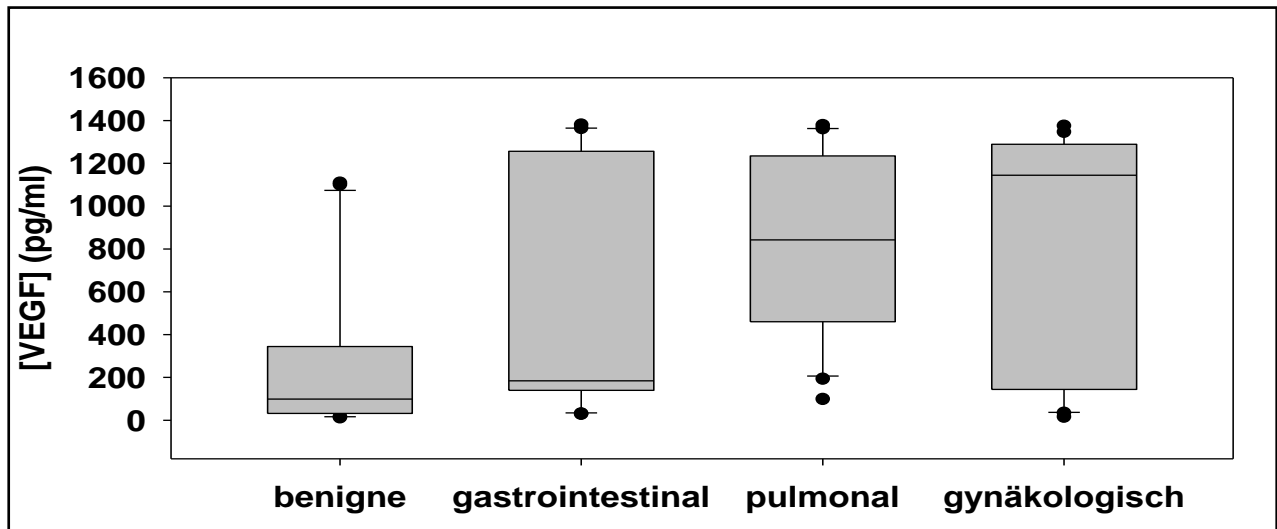


Abb. 2.2: VEGF-Konzentration in den Ergüssen in Abhängigkeit von der Tumoridentität (je n = 20).

2.4 Diskussion

Der Vorteil einer klinisch-epidemiologischen Probandenauswahl besteht darin, dass sie vergleichsweise wenig aufwendig ist. Weiterhin ist es möglich auch größere Fallzahlen seltenerer Krankheiten zu untersuchen, indem entsprechende Fälle über einen längeren Zeitraum gesammelt werden. Positiv zu bewerten ist ferner, dass ein weites Spektrum möglicher Faktoren untersucht werden kann [Heinemann, 1994]. Problematisch werden klinisch-epidemiologische Studien allerdings, wenn die Daten so wie in dieser Arbeit retrospektiv erhoben werden müssen. In diesem Fall kann die oftmals nur sehr eingeschränkte Information über mögliche Störfaktoren zu Schwierigkeiten führen. Dieser Umstand führt dazu, dass bei der Interpretation von Studienergebnissen, die anhand von Routinedaten gewonnen werden, immer kritisch hinterfragt werden muss, ob die gefundenen Ergebnisse auf unkontrollierte Störfaktoren zurückzuführen sind. Ferner weisen Routinedaten in einzelnen Variablen häufig große Anteile an fehlenden Werten auf, da bei ihnen, anders als bei Primärdatenerhebungen, keine besonderen Anstrengungen unternommen werden, um für Vollständigkeit der Erfassung zu sorgen [Pigeot et al., 2006]. Es konnte in der vorliegenden Arbeit zum Beispiel nur von 58 % der untersuchten Tumorpatienten das TNM-Stadium recherchiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass 48 % der einen Erguss ausbildenden Patienten TNM-Stadium vier zuzuordnen sind. War die Grunderkrankung ein pulmonaler Tumor wurde dieser zu 89 % TNM-Stadium vier zugeteilt. Ein derartiger Zusammenhang wurde auch schon von Mountain benannt, indem er Lungenkarzinome mit TNM-Stadium vier mit der Bildung maligner Ergüsse assoziierte [Mountain, 1997]. Ein fortgeschrittenes TNM-Stadium korreliert mit einer verminderten Überlebenszeit. Samowitz et al. zeigten, dass die Hälfte aller Patienten mit einem Stadium drei klassifizierten Colon-Karzinom eine Überlebenszeit von mindestens 60 Monate nach Diagnosestellung besaßen. Demgegenüber waren 50 % der Patienten mit einem Stadium vier bewerteten Colon-Karzinom nach 10 Monaten bereits verstorben

Patientenkollektiv und Ergüsse

[Samowitz et al., 2001]. Die dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass die Entstehung maligner Ergüsse ein Teil des Endstadiums einer Tumorerkrankung ist und unter Berücksichtigung aller Krebsarten mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 20 Wochen einhergeht. Das mittlere Alter der Patienten, in dem sie einen Erguss ausbilden, verwundert vor dem Hintergrund nicht, dass Krebs im Durchschnitt bei 69-jährigen Männern und 63-jährigen Frauen diagnostiziert wird (Tabelle 2.3). In Abbildung 2.1D wurde gezeigt, dass bei 80 % der Patientinnen mit einer gynäkologischen Primärerkrankung ein Mamma-Karzinom kausal für den Erguss zu sein scheint. Überlegungen, warum gerade diese Karzinomart maligne Ergüsse zur Folge hat, können verworfen werden, da das Mamma-Karzinom mit 68 % den deutlich größten Anteil bei den gynäkologischen Karzinomen ausmacht. Tabelle 2.5 lässt eine im Mittel verminderte Albuminkonzentration erkennen. Für eine Hypoproteinämie ist eine Albuminsynthesestörung, die zum Beispiel durch eine Leberzellschädigung bedingt sein kann, die häufigste Ursache. Für eine Erkrankung der Leber finden sich in den gesteigerten GOT-, GPT- und Bilirubin-Konzentrationen deutliche Hinweise. Die Folge ist ein Albuminmangelsyndrom mit Serumalbuminwerten unter 2,0-2,5 g/dl wie sie bei einigen Patienten zu finden waren und einem signifikantem Abfall des intravasal-onkotischen Drucks. Letztendlich kommt es zur extravasalen Flüssigkeitsakkumulation zum Beispiel im Pleuraspalt [Matthys et al., 2008]. Dennoch scheint keiner der bis hierher diskutierten Faktoren, die Entstehung einer solchen Vielzahl von Ergüsse erklären zu können. Abbildung 2.2 zeigt allerdings, dass die VEGF-Spiegel bei allen 80 Patienten zum Teil signifikant über die Werte beim gesunden Menschen (66,8-183,3 pg/ml) [Kim et al., 2004] erhöht waren. Die Bedeutung von VEGF bei der Entstehung seröser Ergüsse sollte daher weiter untersucht werden.

3. Bestimmung des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes

3.1 Einleitung

Die Bestimmung des *transepithelial electrical resistance* (TEER) wird routinemäßig zur Charakterisierung der Integrität von Monolayern im Rahmen von Zell-Monolayer-Permeabilitätsexperimenten verwendet. Daneben kommt diese Methode auch bei der Quantifizierung von Permeabilitätsveränderungen, z.B. als Folge von *Enhancern* zum Einsatz [Masungi et al., 2009, [Jonker-Venter et al., 2006]. Als funktioneller Parameter wird die TEER-Messung epithelialer Monolayer häufig für die Analytik von Tight Junctions verwendet [Nagumo et al., 2008]. Auf molekularer Ebene ist die Expression und Funktion von Occludin der entscheidende Faktor für Änderungen des TEER-Wertes [Hombach et al., 2008].

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass TEER-Messungen erheblich von der Temperatur beeinträchtigt werden [Matter et al., 2003, Torres et al., 2007]. Daher ist es unerlässlich, wenn die TEER-Messung nicht im Inkubator durchgeführt wird, die Temperatur vor der TEER-Messung auf die Messtemperatur zu equilibrieren. Auf diese Weise können temperaturbedingte Änderungen des TEER-Wertes umgangen werden, die auf dem Unterschied zwischen der Temperatur im Inkubator (37 °C) und der Raumtemperatur beruhen [Kaitu'u-Lino et al., 2007]. Wenn der TEER-Wert bei Raumtemperatur bestimmt werden soll, besteht das Hauptproblem bei dieser Vorgehensweise darin, dass mehr als 20 min vergehen, bis konstante TEER-Werte resultieren. Nicht nur daher, sondern auch um physiologische Bedingungen zu imitieren, sollte die TEER-Messung idealer Weise bei 37 °C im Brutschrank durchgeführt werden. In diesem Fall ist es allerdings erforderlich, dass die Elektrode im Brutschrank in konstanter Position fixiert werden kann. Daher ist es schwierig eine Chopstick-Elektrode, die gewöhnlich für TEER-Messungen gebraucht wird, ohne ein Stativ zu verwenden. Alternativ könnten für eine Messung des TEER-Wertes im Brutschrank auch komplexere Messeinrichtungen wie z.B. eine Endohm-Elektrode [Feighery et al., 2008] oder eine Ussing-Kammer [Sawai et al., 2002] verwendet werden. Beide Messapparaturen sind geeignet. Dennoch haben sie bedeutende Nachteile im Vergleich zu Chopstick-Elektroden. Diese Nachteile bestehen darin, dass die Monolayer beschädigt werden könnten, wenn sie aus der Kulturplatte in die Apparatur überführt werden und wenn das Medium gewechselt wird. Weiterhin ist die Bestimmung nur einer deutlich kleineren Anzahl von Monolayern in der gleichen Zeit möglich. Alternativ zu einer Messung im Brutschrank wäre auch die Bestimmung des TEER-Wertes bei 37 °C unter Zuhilfenahme einer Heizplatte eine Option [Tippin et al., 2008].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Temperatur auf den TEER-Wert quantifiziert und eine mathematische Lösung erarbeitet, mit der temperaturunabhängige TEER-Werte unter

verschiedenen experimentellen Bedingungen möglich werden. Als Zellmodelle wurden dafür die Zelllinien Caco-2 und HPDE (Tabelle 7.2, Seite 147) verwendet, die beide einen epithelialen Monolayer ausbilden.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Caco-2- und HPDE-Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C sowie 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Die Caco-2-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Nachdem die Caco-2-Zellen in der Kulturflasche zu 90 % konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einer Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ in 0,5 ml Medium in ein Insert (Porengröße 0,4 µm) einer 12-Wellplatte ausgesät. Die Kulturfläche betrug 1,1 cm². Die Wells wurden mit je 1,5 ml Medium befüllt. Das Kultumedium für Caco-2 war Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4500 mg/L D-Glucose, GlutaMax und Phenolrot (Invitrogen, Karlsruhe), 10 % Fötalem Kälberserum (FCS) South American Origin (Lonza, Basel, Schweiz) und 1 % Penicillin-Streptomycin- Glutamin 100x (PSG) (Invitrogen). In beiden Kammern wurde das Medium dreimal pro Woche gewechselt. Die immortalisierte pankreatische Gangepithelzelllinie (HPDE) [Radulovich et al., 2008] wurden in gleicher Weise wie Caco-2-Zellen kultiviert. Das HPDE-Medium setzte sich aus zwei Medien, die zu gleichen Teilen gemischt wurden, zusammen. Das eine Medium war RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin. Das andere Medium war keratinocyten-serumfreies Komplettmedium (KSFM), das mit 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (Invitrogen) und 5 ng/ml epitheliale Wachstumsfaktor (EGF) versetzt war. Caco-2- und HPDE-Zellen wurden für drei bis 14 Tage kultiviert, um unterschiedlich dichtgewachsene Monolayer zu erhalten. Unterschiedliche Kulturzeiträume waren erforderlich, um die Bedeutung verschiedener Dichten von Monolayern auf die Temperaturabhängigkeit der TEER-Messung und der Bestimmung des parazellulären Flusses zu untersuchen.

3.2.2 Bestimmung der Viskosität verschiedener Kulturmedien

Die Viskosität zweier Kulturmedien für Caco-2- und HPDE-Zellen wurde mittels eines Ubbelohde-Viskosimeter (Schott Kapillarviskosimeter CT 42) mit einer 0C-Kapillare (0,46 mm im Durchmesser) entsprechend den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Die Kapillare wurde vorsichtig mit Medium befüllt, um Blasen, die durch das FCS verursacht wurden, zu vermeiden. Das Viskosimeter wurde für mindestens 20 Minuten in ein Wasserbad mit der erforderlichen Temperatur überführt. Die Viskosität des Mediums wurde bei jedem Grad Celsius zwischen 22 °C und 35 °C bestimmt. Um die kinematische Viskosität der Medien nach der Gebrauchsanweisung zu bestimmen, wurde die Dichte von Wasser zugrundegelegt.

3.2.3 Konstruktion der benötigten Apparaturen und Elektroden

3.2.3.1 Stativ für STX2 und STX3

Eine 3 mm dicke Platte aus nichtrostendem Stahl (V2A) wurde auf 250 mm x 350 mm zugeschnitten. In einem Abstand von zwei Zentimeter von der Längsseite wurde ein 87 mm x 207 mm großes Rechteck ausgesägt. An der gegenüberliegenden Längsseite wurde ein quadratisches Kernrohr (15 mm x 15 mm x 245 mm) aus V2A senkrecht durch Wickschweißen mit der Platte verbunden. Horizontal zu diesem Rohr ist ein weiteres quadratisches Kernrohr (15 mm x 15 mm x 245 mm) über einen senkrecht verstellbaren Reiter verbunden. An dem horizontalen Rohr befindet sich ein weiterer in der Ebene verstellbarer Reiter mit einer Halterung für die STX2 oder STX3. Alle Reiter können mit Flügelschrauben in ihrer Position fixiert werden.

3.2.3.2 Elektroden

Der zylindrische Grundkörper der Elektroden wurde aus hartem Polyvinylchlorid (Richter, Kiel) mit einer Drehbank (Nardini) und einer Fräsmaschine (Imatec) angefertigt. In den Grundkörper wurden in einem Dreieck angeordnete Poren gebohrt. In zwei dieser Bohrungen wurde je ein Silberstab festgeklebt. Die Silberstäbe waren 60 mm lang und hatten einen Durchmesser von 1 mm. Im oberen Teil der Elektrode ist der Silberstab über eine Lüsterklemme mit einem Kardeel eines vieradrigen Kabels mit Westernanschluss verbunden.

Die Elektroden wurden hinsichtlich Richtigkeit und Präzision der gemessenen Widerstände validiert. Dazu wurde 1,5 ml Flüssigkeit [DMEM, PBS und KCl (0,01mM)] in das Well einer 12-Wellplatte pipettiert, ein Insert (0,4 µm, transparent) (Greiner) eingesetzt und dieses mit 500 µl Flüssigkeit gefüllt. Anschließend wurde ein Thermoelement in die Flüssigkeit im Well eingetaucht und die Temperatur mit einem Thermometer (K102, Voltcraft) bestimmt. Sowohl mit der STX2 in der unter 3.2.3.1 beschriebenen Halterung als auch mit den konstruierten Elektroden in der unter 3.2.3.3 beschriebenen Halterung wurden die Widerstände bei 22, 25, 30 und 35 °C im Brutschrank gemessen. Durch die verschiedenen Temperaturen wurden unterschiedliche Widerstände der Flüssigkeiten realisiert.

3.2.3.3 Halterung für Elektroden

Die Halterung der Elektroden wurde aus dem Deckel einer 12-Wellplatte (Greiner) gefertigt. Auf diesen wurden drei kleine Zylinder (10 mm Höhe, 8 mm Radius) aus Plexiglas (Richter, Kiel) aufgeklebt, sodass sie sich bei aufgesetztem Deckel über dem Spalt zwischen Well und Insert befanden. Drei höhere Zylinder (12 mm Höhe, 8 mm Radius) wurden daneben über dem Insert fixiert. Alle sechs Zylinder und die Platte wurden so durchbohrt, dass die Silberstäbe der Elektrode durchgesteckt werden konnten. Eine dritte Bohrung bildete mit der Elektrode einen durchgehenden Kanal.

3.2.4 TEER-Messung von Inserts mit unterschiedlicher Porengröße

Der TEER-Wert von vier 6-Well Inserts (Greiner bio-one, Solingen) mit Gesamtporengrößen zwischen $0,01 \text{ cm}^2$ und $0,32 \text{ cm}^2$ wurde mit den unter 3.2.3.2 beschriebenen Elektroden bestimmt. Dazu wurden die Elektroden in die unter 3.2.3.3 dargestellte Halterung eingesetzt. Es wurde je ein Typ K Thermoelement (Votcraft, Hirschau) durch die Pore in der Elektrode in das Medium eingetaucht und die Temperatur mit einem digitalem Thermometer (K102, Voltcraft,) gemessen. Die gesamte Apparatur wurde in den Brutschrank gestellt. Sobald das Medium eine Temperatur von $35 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht hatte, wurde der experimentelle Aufbau aus dem Brutschrank entnommen und mit der TEER-Messung begonnen. Der TEER-Wert wurde bei jedem Grad Celsius zwischen $35 \text{ }^\circ\text{C}$ und $22 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einem Voltohmmeter [Evom, World Precision Instruments (WPI), Berlin, Deutschland] gemessen. Das Gerät arbeitet mit $20 \text{ }\mu\text{A}$ Wechselstrom ($12,5 \text{ Hz}$), um eine Elektrolyse des Mediums zu verhindern. Je 4 verschiedene Inserts mit identischer Gesamtporengröße wurden in unabhängigen Experimenten vermessen.

3.2.5 TEER-Messung an Caco-2-Monolayern

3.2.5.1 Mit STX2-Elektrode

Der TEER-Wert von zwanzig 12-Well Caco-2-Monolayern mit unterschiedlicher Integrität wurde bestimmt. Dazu wurde eine Standard Chopstick-Elektrode [STX2, (WPI)] und ein Voltohmmeter [Evom, (WPI)] entsprechend der Gebrauchsanleitung des Herstellers verwendet (Abb. 3.1). Die Temperatur wurde mit einem digitalen Thermometer [K102, (Voltcraft)], das mit einem Typ K Thermoelement ausgestattet war, bestimmt. Ein Thermoelement wurde im apikalen Medium positioniert, ohne die Integrität des Monolayers zu beeinträchtigen. Ein anderes Thermoelement wurde in das Medium im Well eingebracht. Die STX2-Elektrode wurde in dem unter 3.2.3.1 beschriebenen Stativ eingespannt, um eine konstante Position während der Messung zu gewährleisten, unabhängig ob die Apparatur im Brutschrank oder auf der Arbeitsplatte aufgebaut war. Der gesamte Versuchsaufbau wurde in den Inkubator überführt. Sobald das Medium $35 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht hatte, wurde mit der TEER-Messung begonnen und die Apparatur aus dem Brutschrank genommen. Die TEER-Werte wurden bei jedem Grad zwischen $35 \text{ }^\circ\text{C}$ und $22 \text{ }^\circ\text{C}$ erfasst. Um eine mögliche Beschädigung der Monolayern aufgrund von unphysiologischen Temperaturen wie zum Beispiel $22 \text{ }^\circ\text{C}$ zu vermeiden, wurden die Experimente bei fallender Temperatur durchgeführt. Die TEER-Messung aller Monolayer erfolgte binnen elf aufeinanderfolgender Tage.

TEER-Messung

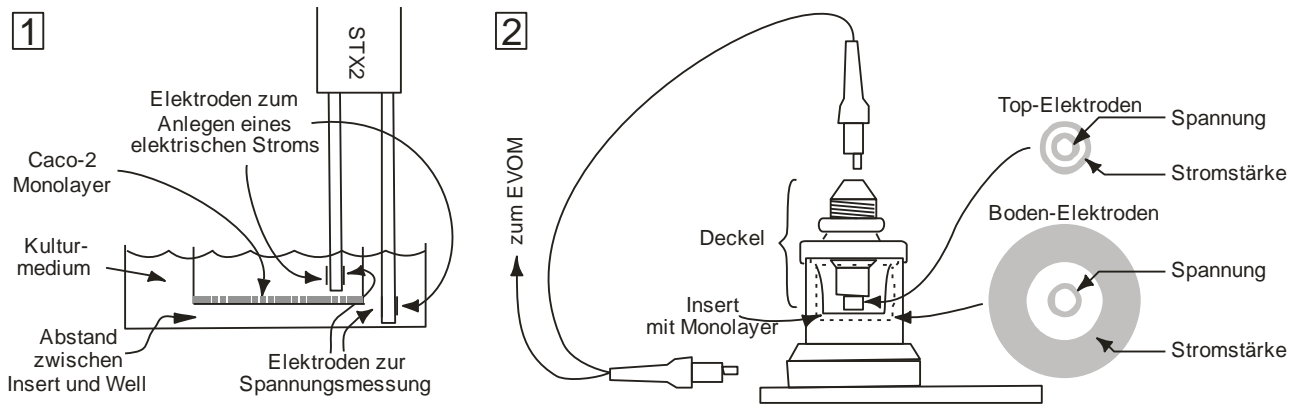


Abb. 3.1: TEER-Messung mit STX2

Abb. 3.2: TEER-Messung mit Endohm

3.2.5.2 Mit Endohm-12-Elektrode

Der TEER-Wert von sechs individuellen 12-Well Caco-2-Monolayern mit unterschiedlicher Dichtigkeit wurde mit einer Endohm-12 Elektrode (WPI) bestimmt (Abb. 3.2). Für die TEER-Messung wurde das Insert in die mit 2,2 ml DMEM gefüllte Messkammer überführt. Die Top-Elektrode tauchte nach Aufsetzen des Deckels in das 340 μ l enthaltende Insert ein. Zwei Thermoelemente wurden durch Öffnungen im Deckel in das Medium in der Kammer eingebracht. Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie bereits unter 3.2.5.1 für STX2 beschrieben.

3.2.6 TEER-Messung von HPDE Monolayern mit STX2

Die TEER-Werte von zehn individuellen HPDE Monolayern mit unterschiedlicher Integrität wurden, wie unter 3.2.5.1 für Caco-2-Monolayer mit STX2 beschrieben, ermittelt. Die TEER-Messung der zehn HPDE-Monolayer erfolgte binnen neun Tagen.

3.2.7 Bestimmung der Korrelation von TEER und der Permeabilität von RITC-Dextran 70 kDa

3.2.7.1 Kalibrierung einer Lösung von RITC-Dextran 70kDa in phenolrotfreiem DMEM

Zur Durchführung einer quantitativen Bestimmung von Rhodamin B-isothiocyanat (RITC)-Dextran 70 kDa (Sigma) (Abbildung 3.3) in DMEM ohne Phenolrot (Invitrogen) mussten zunächst Stamm- und Arbeitslösungen hergestellt werden. Die Stammlösung wurde durch Einwaage von 10 mg RITC-Dextran 70 kDa in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner) und Auffüllung mit 20 ml phenolrotfreiem DMEM hergestellt. Die Konzentration von RITC-Dextran 70 kDa betrug somit 0,5 mg/ml. Ausgehend von der Stammlösung wurden dann Arbeitslösungen der Konzentrationen 1,11; 0,88; 0,86; 0,66; 0,5; 0,33; 0,2; 0,14; 0,11; 0,09 und 0 μ g/ml durch Verdünnung mit DMEM angefertigt. Je 100 μ l der Arbeitslösungen wurden auf eine 96-Wellplatte (Greiner) pipettiert und die Dextran-Konzentration in den Proben mit einem Fluorometer (infinite F200, Tecan, Männedorf,

Schweiz) mit den in Tabelle 3.1 beschriebenen Einstellungen bestimmt. Während der Kalibrierung wurden die Stammlösungen vor Licht geschützt aufbewahrt.

Tabelle 3.1: Einstellungen des Fluorometers (infinite F200)

Anregungs-		Emissions-		Empfindlichkeit	Messungen (Anzahl)
wellenlänge (nm)	filterbreite	wellenlänge (nm)	filterbreite		
540	25	590	10	115	15

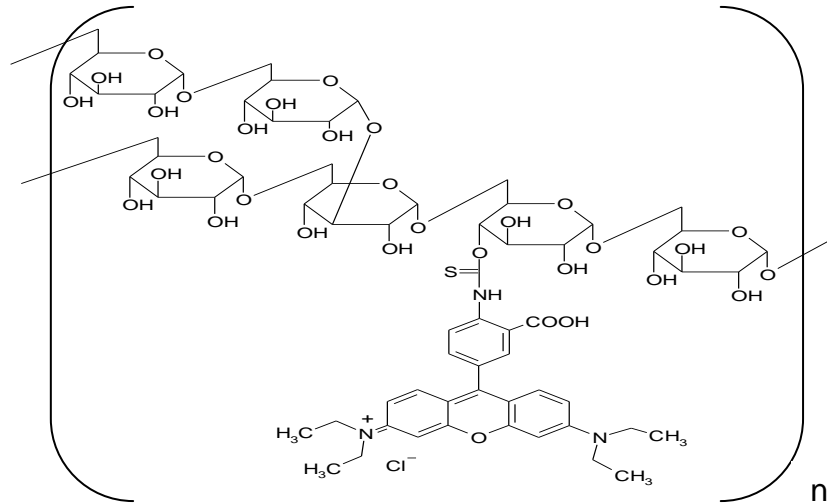


Abb. 3.3: Strukturformel von Rhodamin B-isothiocyanat (-thiourethan)

3.2.7.2 Bestimmung der Permeabilität von RITC-Dextran 70 kDa und dem TEER Wert

Der Fluss von RITC- konjugiertem Dextran 70 kDa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) über 12-Well Caco-2-Monolayer mit unterschiedlicher Dichtigkeit wurde bestimmt. Die Monolayer wurden wie unter 3.2.1 beschrieben kultiviert. Eine Lösung mit 0,5 mg/ml RITC-Dextran in DMEM ohne Phenolrot (Invitrogen) wurde für jedes Experiment frisch hergestellt. Insgesamt wurden 1200 µl DMEM ohne Phenolrot in das Akzeptorkompartiment einer 12-Well Kulturplatte gegeben. Ein Volumen von 500 µl RITC-Dextran haltiges Medium wurde, nachdem das Kulturmedium entfernt worden war, in das Insert pipettiert. Die Zeitmessung wurde gestartet und der Versuchsaufbau in den Brutschrank überführt. Nach 1,5 Stunden wurde das Insert aus dem Well entfernt und die Flüssigkeit mit einer Pipette homogenisiert. Es wurden dreimal 100 µl des Mediums in je ein Well einer 96-Wellplatte (Greiner) pipettiert. Die Dextran-Konzentration in den Proben wurde mit einem Fluorometer (infinite F200, Tecan, Männedorf, Schweiz) mit den in Tabelle 3.1 beschriebenen Einstellungen bestimmt. Das entnommene Volumen wurde direkt durch vorgewärmtes DMEM ohne Phenolrot ersetzt. Diese Proben dienen als Leerwert (Blank). Der Versuchsaufbau wurde für weitere 2,5 Stunden in den Brutschrank gestellt. Während dieser Zeit wurde wie unter 3.2.5.1

beschrieben der TEER-Wert und die Temperatur neunmal gemessen. Die temperaturkorrigierten TEER-Werte wurden gemittelt. Anschließend wurden erneut Proben aus dem Well entnommen und die Dextran-Konzentration fluorimetrisch bestimmt.

3.2.8 Bestimmung der Korrelation zwischen Zeit und Temperatur des Mediums

Je 4 ml DMEM wurde in zwei Wells einer 6-Well Kulturplatte (Greiner) pipettiert, Thermoelemente im Medium positioniert und die Kulturplatte in den Brutschrank gestellt. Sobald das Medium 35 °C erreicht hatte, wurde mit der Zeit und Temperaturmessung begonnen und die Kulturplatte unter den Laminar Flow gestellt. Die Temperatur des Mediums wurde jede Minute dokumentiert. Während des Versuchs wurde mittels eines zweiten Thermometers die Temperatur in dem Laminar Flow erfasst. Daneben wurde das Experiment auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Dazu wurde mit den Zeit-Temperatur-Messungen begonnen, nachdem eine Kulturplatte, mit Medium bei Raumtemperatur, in den Brutschrank gestellt worden war.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Physikalischer Hintergrund

Wenn zwei Elektroden in eine ionische Lösung eingebracht werden und eine elektrische Spannung angelegt wird, kommt es zum Stromfluss zwischen den Elektroden [Berry et al., 1980]. Dabei ist der elektrische Strom abhängig von der Beweglichkeit der Ionen. Ein z-wertiges Ion mit der Ladung ze (e = Elementarladung), das durch die elektrische Feldstärke E beschleunigt wird, ist der Reibungskraft F , die mit der Geschwindigkeit v zunimmt, ausgesetzt. Dieser Zusammenhang wird für ein sphärisches Ion mit dem Radius r durch die Stokes-Gleichung, $F = 6\pi\eta r v$, beschrieben. Die Viskosität des Mediums ist hier η [Hamann et al., 2007]. Im Gleichgewicht zwischen der elektrischen und der reibenden Kraft gilt

$$zeE = 6\pi\eta r v \quad (3.1)$$

und somit ist die Geschwindigkeit gegeben durch

$$v = \frac{zeE}{6\pi\eta r} \quad (3.2)$$

Die elektrische Stromdichte j kann beschrieben werden als

$$j = z_+ n_+ v_+ e + z_- n_- v_- e \quad (3.3)$$

Dabei sind n_+ , n_- die Anzahl der Kationen und Anionen, v_+ , v_- sind die korrespondierenden Geschwindigkeiten der Ionen und z_+e , z_-e die jeweiligen Ladungen. Die Ionenbeweglichkeit u_+ , u_- in dem angelegten elektrischen Feld E ist durch die beiden folgenden Gleichungen beschrieben

$$v_+ = u_+ E \quad (3.4a)$$

und

$$v_- = u_- E \quad (3.4b)$$

Daraus ergibt sich für die Stromdichte

$$j = (z_+ n_+ u_+ + z_- n_- u_-) e E \quad (3.5)$$

Der Widerstand eines Leiters ist proportional zu seiner Länge l und antiproportional zu seinem Durchmesser A

$$R = \frac{l}{\kappa A} \quad (3.6)$$

wobei κ die Leitfähigkeit darstellt. Das Ohmsche Gesetz kann somit wie folgt umgeschrieben werden

$$\frac{U}{I} = \frac{l}{\kappa A} \quad (3.7)$$

Wenn die Spannung zwischen den Elektroden U ist und der Abstand zwischen den Elektroden l beträgt, dann ergibt sich daraus für das elektrische Feld

$$E = \frac{U}{l} \quad (3.8)$$

[Hamann et al., 2007]. Die Stromdichte j ist das Verhältnis zwischen der Stromstärke I und der von deren Ladungsträger senkrecht durchflossenen Fläche A .

$$j = \frac{I}{A} \quad (3.9)$$

[Haas, 1988]. Aus den Gleichungen 3.8 und 3.9 folgt, dass das Ohmsche Gesetz, in der Form von Gleichung 3.7 zu

$$\kappa = \frac{j}{E} = (z_+ n_+ u_+ + z_- n_- u_-) e \quad (3.10)$$

modifiziert werden kann.

Die Länge der Poren eines Inserts ist l und ihr Durchmesser ist A . In dem Fall, in dem beide Variablen während der Messung konstant sind, resultieren Veränderungen des Widerstandes aus Veränderungen der spezifischen Leitfähigkeit (κ) (Gleichung 3.6). Die spezifische Leitfähigkeit einer Flüssigkeit ist umso höher, je größer die Konzentration und die Beweglichkeit der Ionen sind (Gleichung 3.10). Die Beweglichkeit der Ionen hängt von der Größe der Hydrathülle, die die Ionen umgibt, und von der Viskosität der Flüssigkeit ab (Gleichung 3.2) [Atkins et al., 2010]. Nach der Walden-Regel ist das Produkt aus der Viskosität und der molaren Leitfähigkeit annähernd konstant [Johansson et al., 2008]. Der Zusammenhang zwischen der Viskosität und der Temperatur wird durch die Andrade-Gleichung beschrieben,

$$\ln \eta = a + \frac{b}{T} \quad (3.11)$$

in der η die Viskosität und T die Temperatur darstellen. Die Koeffizienten a und b sind für das verwendete Medium unbekannt [Wang et al., 2007].

Daher sind, während eines einzelnen Experimentes, in dem alle Parameter, die den Widerstand beeinträchtigen, mit Ausnahme der Temperatur konstant sind, Veränderungen des TEER-Wertes eine Folge von Temperaturveränderungen. In diesem Fall können Gleichung 3.6 und Gleichung 3.11 wie folgt vereinfacht werden.

$$R = e \frac{a + \frac{b}{T}}{\kappa} \frac{l}{A} \quad (3.12)$$

Die Länge der Poren eines Inserts ist während eines Experimentes konstant. Weiterhin haben frühere Studien gezeigt, dass die Dicke eines Monolayers unabhängig von seinem TEER-Wert ist [Lu et al., 1996]. Daher verhält sich der TEER-Wert reziprok zu dem Produkt aus Temperatur und Porendurchmesser.

3.3.2 Viskosität verschiedener Kulturmedien

Die Temperaturabhängigkeit der Viskosität veranschaulicht Abbildung 3.4 für die Kulturmedien von Caco-2-Zellen und HPDE-Zellen. Der Vergleich der beiden Flüssigkeiten lässt keine Unterschiede hinsichtlich des Einflusses der Temperatur auf die Viskosität erkennen. Die Viskositätsänderung innerhalb des untersuchten Temperaturbereichs beträgt $0,018 \text{ mm}^2/\text{s}\cdot\text{K}$ für Caco-2-Medium und $0,017 \text{ mm}^2/\text{s}\cdot\text{K}$ für HPDE-Medium. Dies entspricht der Temperaturabhängigkeit der Viskosität von Wasser.

Der von Andrade in Gleichung 3.11 dargestellte logarithmische Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Viskosität kann für den Bereich zwischen $22 \text{ }^\circ\text{C}$ und 35°C auch durch eine lineare Regression beschrieben werden [$R^2=0,993$ (Caco-2) und $R^2=0,997$ (HPDE)]. Demnach kann bei den folgenden Berechnungen für diesen Temperaturbereich von einer linearen Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur ausgegangen werden.

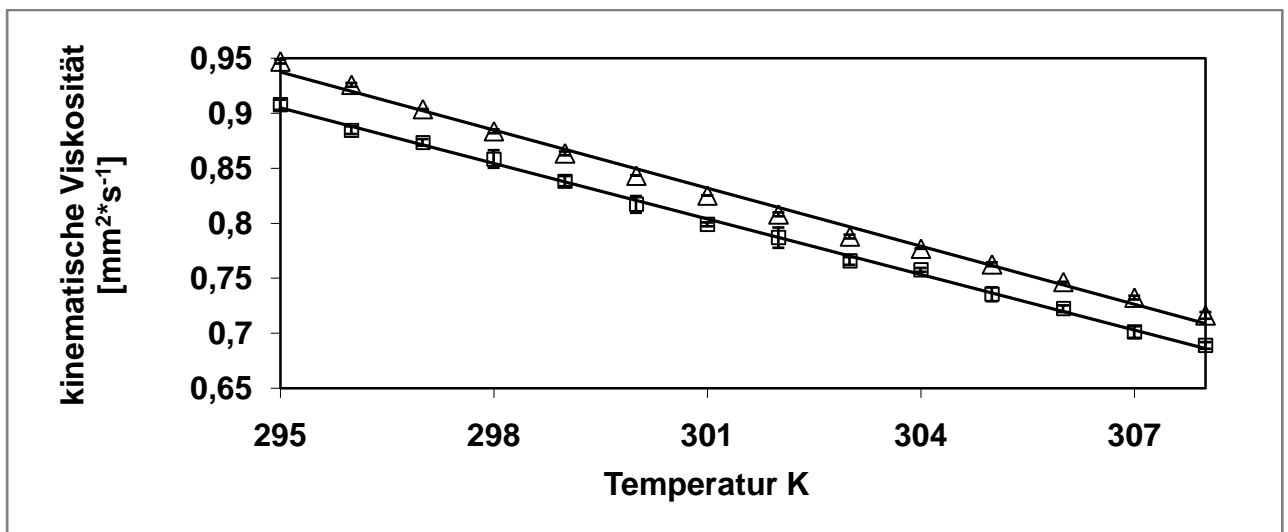


Abb.3.4: Temperaturabhängigkeit der Viskosität der Kulturmedien von Caco-2- (Δ) und HPDE-Zellen (\square). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.3 Apparaturen und Elektroden

3.3.3.1 Stativ für STX2 und STX3

Mit dem in Abbildung 3.5 gezeigten Stativ können STX2 und STX3 fixiert werden (1). Da die Position der Elektrode über den horizontalen Reiter (2) und den vertikalen Reiter (3) verstellbar ist, kann das Stativ zur TEER-Messung in jedem Well einer 6- oder 12-Wellplatte genutzt werden. Dazu ist erforderlich, dass die Platte in der Aussparung (4) in jeder Position mit Stempeln (5) festgestellt werden kann. Kulturplatten von Greiner und Costar sind mit der Apparatur kompatibel. Filzplättchen unter der Stahlplatte vermindern Vibrationen und verhindern ein Zerkartzen der Arbeitsfläche. Mit der Arretierung (6) kann eine reproduzierbare Messposition sichergestellt werden, auch wenn der horizontale Arm zwischenzeitlich in seiner Höhe verstellt wurde.

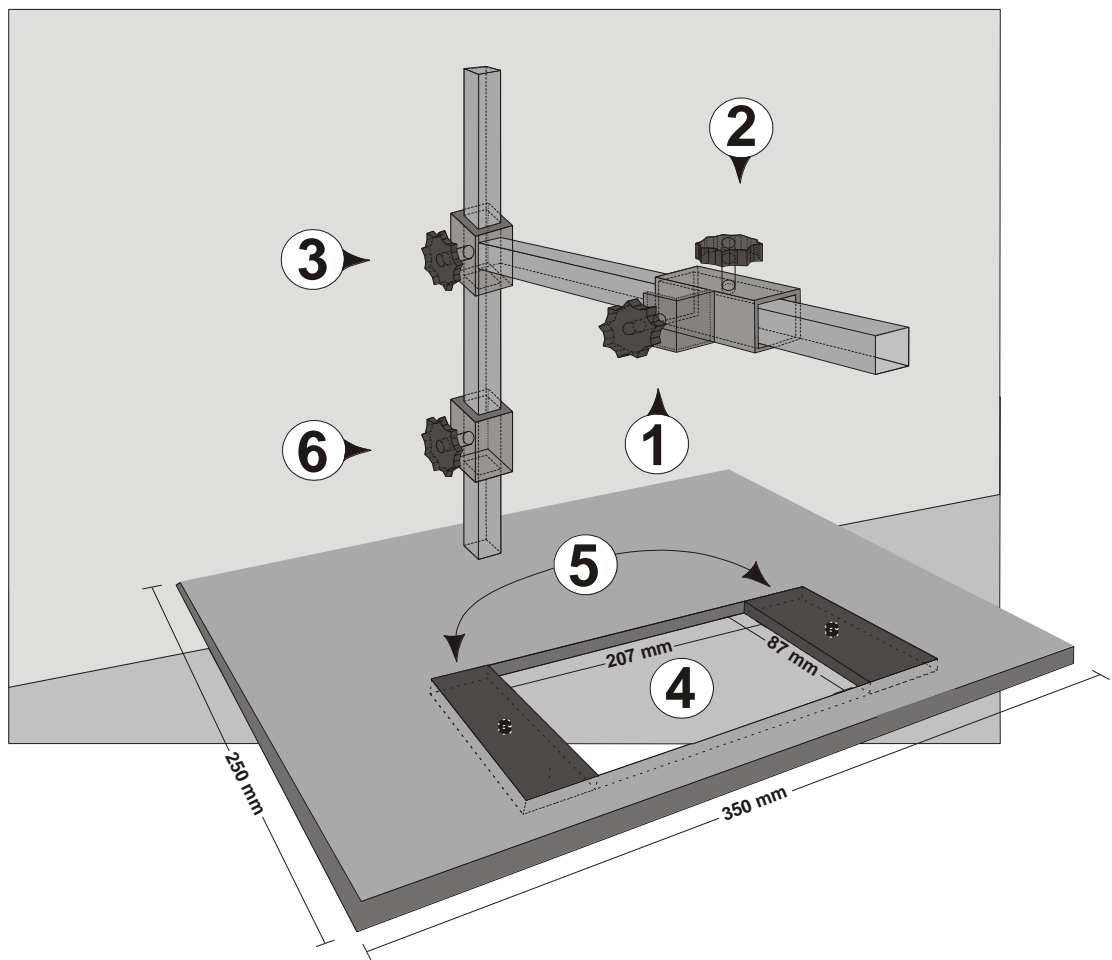


Abb. 3.5: Stativ zum Fixieren von STX2 und STX3

3.3.3.2 Elektroden

Die in Abbildung 3.6 gezeichneten Elektroden wurden so konstruiert, dass sie sich für die TEER-Messung sowohl an Inserts (6- oder 12-Well) als auch für die unter 4.3.3.1 beschriebene „Ussing-Kammer“ eignen. Eine Pore in der Elektrode erlaubt es, ein Thermoelement durch die Elektrode in

TEER-Messung

das Kulturmedium einzubringen. Dabei bleibt die Zellkulturplatte fast vollständig geschlossen, sodass auch über einen längeren Versuchszeitraum die Kontaminationsgefahr gering bleibt. Alternativ können durch die Pore in der Elektrode auch Substanzen über eine Nadel appliziert werden, ohne dass dazu die Position der Elektrode verändert werden müsste.

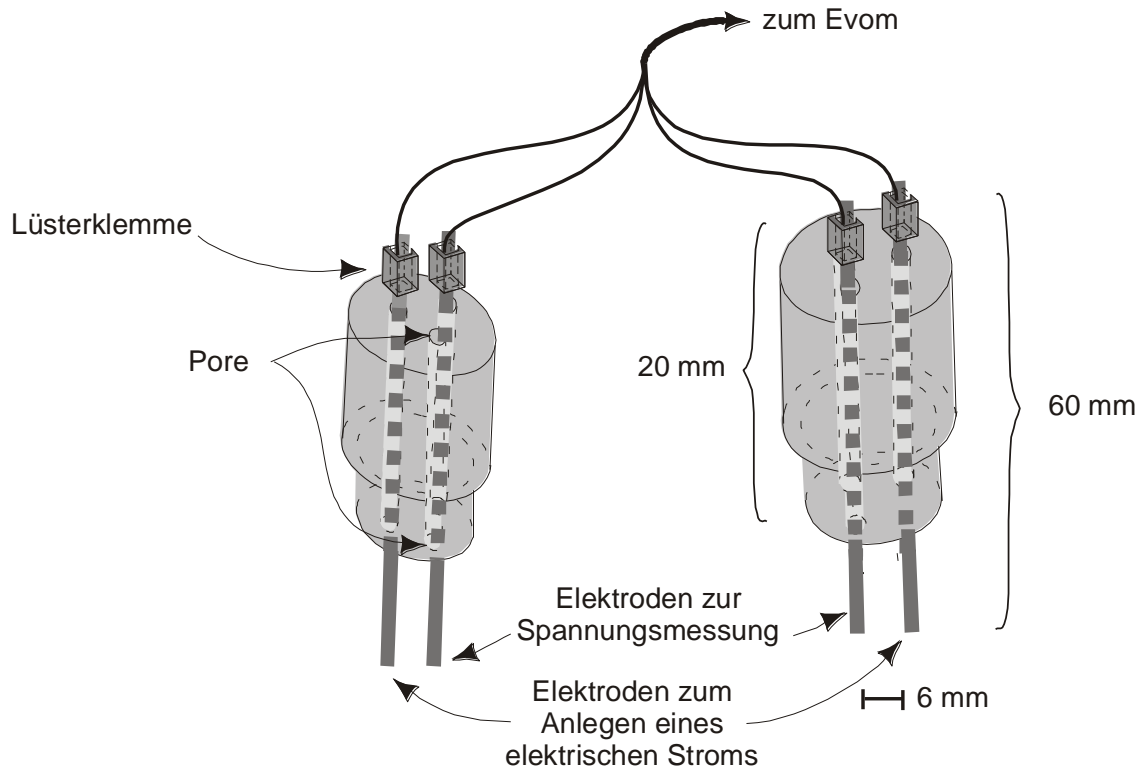


Abb. 3.6: Konstruierte Elektroden zur TEER-Messung

Die Ergebnisse der Validierung der konstruierten Elektrode sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Da bei diesen Elektroden, aufgrund des größeren Abstandes der Elektroden (17 mm) im Vergleich zur STX2 (4 mm), ein höherer TEER-Wert resultiert, sind in der Tabelle relative Veränderungen bezogen auf den TEER-Wert bei 22 °C angegeben. Die Elektroden eignen sich daher auch nur zur Bestimmung relativer TEER-Veränderungen. Mit der STX2, die hier als Referenz dienen soll, lassen sich Widerstandsveränderungen aufgrund von Temperaturveränderungen mit einer Präzision von $\pm 1,2\%$ erfassen. Bei den konstruierten Elektroden beträgt die Präzision $\pm 1,1\%$. Folglich messen die konstruierten Elektroden Widerstandsveränderungen der drei Flüssigkeiten mit einer Genauigkeit, die derjenigen der STX2 vergleichbar ist. Wenn der Messwert der STX2 als richtiger Wert angenommen wird, beträgt die relative Abweichung (Richtigkeit) der konstruierten Elektroden im Mittel 2,6 %.

TEER-Messung

Tabelle 3.2: Validierung der konstruierten Elektroden durch Vergleichsmessungen mit der STX2 in drei verschiedenen Flüssigkeiten. Widerstandsveränderungen wurden durch Temperaturveränderungen bewirkt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Elektrode	DMEM			PBS			KCl			Präzision
	25 °C	30 °C	35 °C	25 °C	30 °C	35 °C	25 °C	30 °C	35 °C	
	(% vom TEER ^{22°C})			(% vom TEER ^{22°C})			(% vom TEER ^{22°C})			
STX2	96,9	92,7	82,8	94,5	87,9	80,1	95,7	88,9	78,0	1,2
konstruierte Elektroden	95,0	86,8	79,1	94,1	85,6	78,0	94,2	85,9	78,2	1,1
Richtigkeit (relative Abweichung)	1,9638	6,3877	4,5003	0,4373	2,5346	2,6553	1,6155	3,4338	0,316	

3.3.3.3 Halterung für Elektroden

Mit der in Abbildung 3.7 gezeigten Halterung, für die unter 3.3.3.2 beschriebenen Elektroden, kann gleichzeitig der TEER-Wert von drei 12-Well-Monolayern gemessen werden. Diejenige Elektrode, die in der höheren (12 mm) der beiden Halterungen positioniert ist, taucht in die Flüssigkeit im Insert ein, ohne den Monolayer zu berühren. Die andere Elektrode wird in der kleineren (10 mm) Halterung fixiert und schließt den Stromkreis über die Flüssigkeit im Well. Die Pore der Elektrode und die Pore der Halterung bilden einen Kanal, durch den ein Thermoelement in die Flüssigkeit eingeführt werden kann.

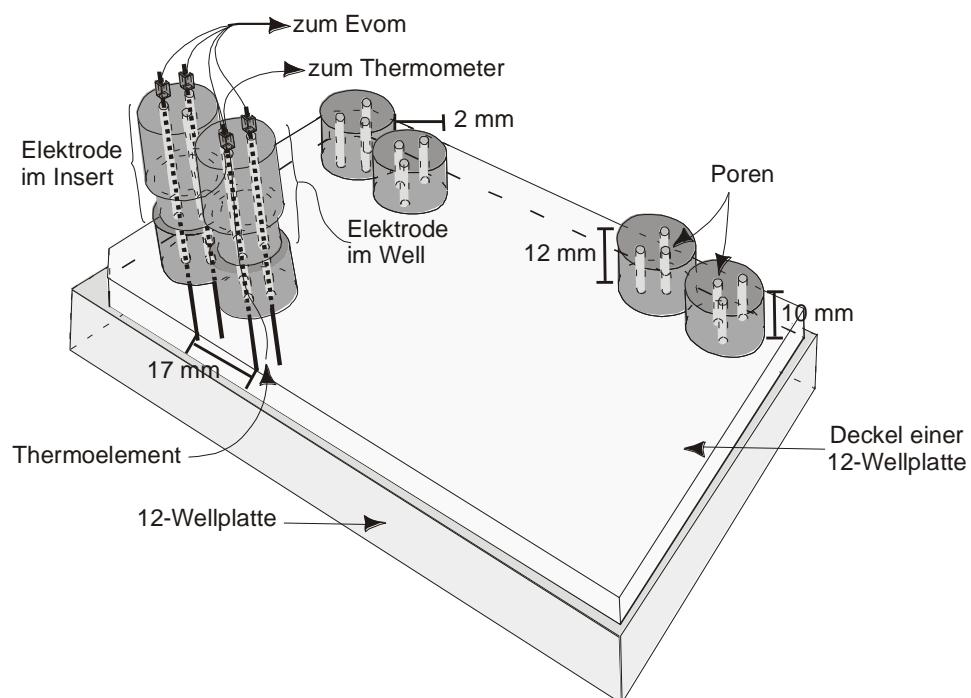


Abb. 3.7: Halterung für Elektroden zur TEER-Messung an 12-Well-Monolayern

3.3.4 TEER-Werte von 12-Well Inserts mit unterschiedlicher Porengröße

3.3.4.1 Blank-korrigierter Einheitsflächen-Widerstand

Der Gesamtwiderstand eines Zellkultur-Monolayers setzt sich aus dem Widerstand eines leeren Inserts (Blank) und dem Zellmonolayer zusammen. Um den Widerstand des Monolayers zu berechnen, muss der Blank von dem Gesamtwiderstand subtrahiert werden. Dazu ist es erforderlich, dass der Blank und der Gesamtwiderstand bei derselben Temperatur ($T\alpha$) gemessen werden. Wenn z.B. der TEER-Wert eines 12-Well Monolayers bei Raumtemperatur (295 K) gemessen wird, so sind als Blank 174 Ω von dem Gesamtwiderstand zu subtrahieren. Für eine TEER-Messung bei 308 K muss jedoch ein kleinerer Blank von nur 139 Ω subtrahiert werden (Tabelle 3.3). Desweiteren muss das Produkt aus dem Gewebewiderstand und der Kulturfläche berechnet werden, um den Einheitsflächen-Widerstand zu erhalten. Dieser wird im Folgenden als $TEER_{(tissue)}$ bezeichnet. $TEER_{(tissue)}$ ist von dem verwendeten Insert unabhängig und kann verwendet werden, um TEER-Werte, die auf Inserts mit unterschiedlicher Kulturfläche basieren, vergleichbar zu machen.

$$TEER_{(tissue)} = (TEER_{(total)T\alpha} - TEER_{(blank)T\alpha}) \cdot culture\ area \quad (3.13)$$

Tabelle 3.3: Eigenschaften von hängenden Inserts (ohne Zellen)

Well- größe	Poren-				TEER			
	durchmesser (μm)	größe (μm^2)	dichte (Poren/ cm^2)	größe (gesamt) ($cm^2/insert$)	Änderung / K (ΩK^{-1})	bei 295 K (Ω)*	bei 301 K (Ω)*	bei 308 K (Ω)*
6	0,4	0,1257	$2 * 10^6$	0,0107	3,13	180	158	140
6	1	0,7854	$2 * 10^6$	0,0668	2,62	155	138	122
6	3	7,0686	$0,6 * 10^6$	0,1804	2,46	149	131	118
6	8	50,2656	$0,15 * 10^6$	0,3207	2,27	144	127	114
12	0,4	0,1257	$1 * 10^8$	0,1257	2,69	174	157	139

3.3.4.2 Berechnung der TEER-Werte von Inserts

Abbildung 3.8A und 3.8B auf Seite 34 veranschaulichen den Zusammenhang zwischen TEER-Wert und der Temperatur für vier 6-Well Inserts mit unterschiedlichen Eigenschaften, die in Tabelle 3.3 beschrieben sind. Es ist ersichtlich, dass die Korrelation zwischen dem TEER-Wert und der Temperatur von der Porengröße der Inserts beeinflusst wird. Je kleiner die Gesamtporengröße ist, desto höher ist der TEER-Wert und desto größer ist die Änderung des TEER / K. Auf diesen Ergebnissen basierend können *temperature corrected* TEER (*tcTEER*)-Werte errechnet werden. Die TEER-Änderung / K kann mit der folgenden Gleichung berechnet werden.

$$\frac{\Delta TEER}{\Delta T} = [\alpha_{295K} + \beta(T\alpha - 295K)] TEER_{T\alpha}^{-\gamma} \quad (3.14)$$

$T\alpha$ = aktuelle Temperatur

$TEER_{T\alpha}$ = gemessener TEER bei der aktuellen Temperatur

$\gamma = 1,0618 \Omega \cdot K^{-1}$, dies ergibt sich aus dem durchschnittlichen Ordinatenabstand der Regressionsgeraden in Abbildung 3.8B. $\alpha_{295K} = 0,022K^{-1}$, was der Steigung der linearen Regression bei 295 K (●) (Abb. 3.8B) entspricht.

$$\beta = \frac{0,032K^{-1} - 0,022K^{-1}}{13K} = 7,692 \times 10^{-4} K^{-2} \quad (3.15)$$

In Gleichung 3.15 entspricht $0,032 K^{-1}$ der Steigung der linearen Regression bei 308 K (◆) (Abb. 3.8B). Dementsprechend bezeichnet β die Änderung der Steigung bei jedem Grad zwischen 308 K und 295 K.

Somit lässt sich der TEER-Wert zum Beispiel bei 300 K ($TEER_{300K}$) aus dem bei der aktuellen Temperatur gemessenen TEER-Wert mit Gleichung 3.16 berechnen.

$$TEER_{300K} = TEER_{T\alpha} - \frac{\Delta TEER}{\Delta T} (300K - T\alpha) \quad (3.16)$$

3.3.5 TEER-Werte von Caco-2-Monolayer

3.3.5.1 mit STX2

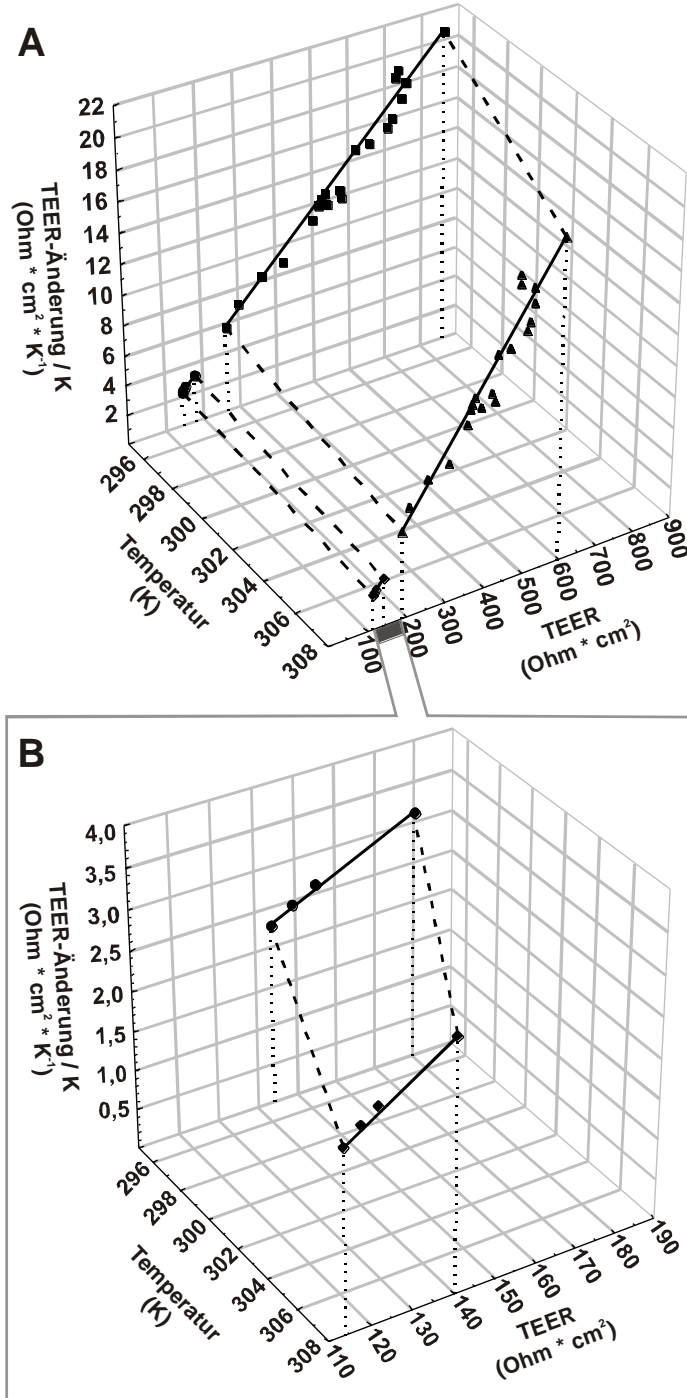


Abb. 3.8: Abhängigkeit der TEER-Änderung/K vom TEER-Wert. (A) Lineare Regression für die TEER-Änderung/K von zwanzig unterschiedlich dichten Caco-2-Monolayern bei 308 K (\blacktriangle) ($R^2=0,9145$) und bei 295 K (\blacksquare) ($R^2=0,9608$). Die Temperaturabhängigkeit des TEER-Wertes ist für den Caco-2-Monolayer mit dem höchsten und dem niedrigsten TEER-Wert gezeigt (---). (B) Lineare Regression für die TEER-Änderung/K von vier 6-Well-Inserts mit unterschiedlicher Gesamtporengröße (Tabelle 3.3) bei 308 K (\blacklozenge) ($R^2=0,986$) und bei 295 K (\bullet) ($R^2=0,985$). Die Temperaturabhängigkeit des TEER-Wertes ist für die Inserts mit der größten und der kleinsten Gesamtporengröße gezeigt (---).

3.3.5.2 Berechnung des TEER-Wertes von Caco-2-Monolayern

Abbildung 3.8A zeigt die Abhängigkeit der TEER-Änderung / K von dem absoluten TEER-Wert von zwanzig individuellen Caco-2-Monolayern. Auch hier gilt wiederum, je dichter der Monolayer, desto höher der TEER-Wert und desto größer die TEER-Änderungen / K. Die $TEER_{(tissue)}$ -Werte in Abbildung 3.8A sind mit Gleichung 3.13 berechnet worden.

$$\beta = \frac{0,0361 K^{-1} - 0,0251 K^{-1}}{13 K} = 8,461 \times 10^{-4} K^{-2} \quad (3.17)$$

In Gleichung 3.17 entspricht $0,0361 K^{-1}$ der Steigung der linearen Regression bei 308 K (\blacktriangle) und $0,0251 K^{-1}$ der Steigung bei 295 K (\blacksquare) (Abb. 3.8A). Dementsprechend bezeichnet β die Änderung der Steigung bei jedem Grad zwischen 308 K und 295 K. Wenn β aus Gleichung 3.15 mit β aus Gleichung 3.17 verglichen wird, dann wird offensichtlich, dass die Konstanten für Monolayer mit denen für Inserts ohne Zellen annähernd identisch sind. Aus diesem Grund sind das große Trapez (TEER-Werte von zwanzig individuellen Caco-2-Monolayern) und das kleine Trapez (TEER-Werte von vier Inserts mit unterschiedlicher Porengröße) beinahe komplanar (Abb. 3.8A). Daher ist die Berechnung von $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten auch nahezu identisch mit der Berechnung von $tcTEER$ -Werten für Inserts ohne Zellen. Der entscheidende Unterschied besteht darin, dass es im Fall von Monolayern erforderlich ist, mittels Gleichung 3.13 $TEER_{(tissue)}$ bei der aktuellen Temperatur (T_α) zu berechnen. Die TEER-Änderung / K ist daher bei Monolayern durch Gleichung 3.18 gegeben.

$$\frac{\Delta TEER}{\Delta T} = [\alpha_{295 K} + \beta(T_\alpha - 295 K)] TEER_{(tissue)} - \gamma \quad (3.18)$$

$\alpha_{295 K} = 0,0251 K^{-1}$, was der Steigung der linearen Regression bei 295 K (\bullet) (Abb. 3.8A) entspricht. γ ist $0,8445 \Omega K^{-1}$.

Tabelle 3.4 vergleicht die mit Gleichung 3.13 errechneten $TEER_{(tissue)}$ -Werte mit den dazugehörigen *temperature corrected* $TEER_{(tissue)}$ -Werten von fünf individuellen Caco-2-Monolayern. Die $tc-TEER_{(tissue)}$ -Werte bei 308 K, die in diesem Beispiel auf den $TEER_{(tissue)}$ -Werten bei 301 K beruhen, sind annähernd identisch mit den $TEER_{(tissue)}$ -Werten bei 308 K. Der relative Fehler zwischen $TEER_{(tissue)}$ -Werten und $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten bei 308 K beträgt 2,3 %.

Tabelle 3.4: Vergleich von gemessenem TEER, berechnetem $TEER_{(tissue)}$ und berechnetem temperaturkorrigierten $TEER_{(tissue)}$ bei fünf individuellen Caco-2 Monolayern (gemessen mit STX2)

Caco-2-Monolayer	gemessener TEER (Ω)		berechneter $TEER_{(tissue)}$ ($\Omega\ cm^2$)		
	301 K	308 K	301 K	308 K	temperaturkorrigiert 308 K
1	296	252	153	124	127
2	334	284	195	160	160
3	359	299	222	176	181
4	398	326	265	206	215
5	415	345	284	227	230

Die Methode zur Berechnung der $tcTEER_{(tissue)}$ -Werte ist im Folgenden am Beispiel des Caco-2-Monolayer 1 aus Tabelle 3.4 erläutert.

Berechnung des $TEER_{(tissue)}$ -Wertes mit Gleichung 3.13:

$$(296\Omega - 157\Omega) \times 1,1\ cm^2 = 153\Omega$$

Berechnung der TEER-Änderung / K mit Gleichung 3.18:

$$[0,025\ K^{-1} + 8,461 \times 10^{-4}\ K^{-2} \times (301\ K - 295\ K)] \times 153\Omega - 0,8445\Omega K^{-1} = 3,757\Omega K^{-1}$$

Berechnung der temperaturkorrigierten TEER-Werte mit Gleichung 3.16:

$$153\Omega - 3,757\Omega K^{-1} \times (308\ K - 301\ K) = 127\Omega$$

3.3.5.3 mit Endohm-Elektrode

Die TEER-Werte von sechs Caco-2-Monolayern mit Endohm-12 sind in Tabelle 3.5 veranschaulicht. Bei der Endohm-12 beträgt der Blank-Widerstand annähernd Null, weil sich die Elektroden direkt oberhalb und unterhalb des Inserts befinden. Die Berechnung von $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten beruht auf den Ergebnissen, die für Caco-2-Monolayer mit STX2 erhalten wurden. Die $tcTEER_{(tissue)}$ -Werte bei 308 K, die in diesem Beispiel auf den $TEER_{(tissue)}$ -Werten bei 301 K beruhen, sind nahezu identisch mit den $TEER_{(tissue)}$ -Werten bei 308 K. Der relative Fehler zwischen $TEER_{(tissue)}$ -Werten und $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten bei 308 K beträgt 2,1 %.

TEER-Messung

Tabelle 3.5: Vergleich von gemessenem TEER, berechneten $TEER_{(tissue)}$ und berechneten temperaturkorrigierten $TEER_{(tissue)}$ bei sechs individuellen Caco-2-Monolayern (gemessen mit Endohm)

Caco-2-monolayer	gemessener TEER (Ω)		berechneter $TEER_{(tissue)}$ ($\Omega \text{ cm}^2$)		
	301 K	308 K	301 K	308 K	temperaturkorrigiert 308 K
1	157	133	173	146	142
2	387	311	426	342	342
3	479	382	527	420	422
4	571	454	628	499	502
5	909	708	1000	779	795
6	935	698	1029	768	818

3.3.6 Berechnung des TEER-Wertes von HPDE-Monolayern

Tabelle 3.6 zeigt ähnliche Ergebnisse für HPDE-Monolayer wie für Caco-2-Monolayer. Die Berechnung von $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten beruht auf den Ergebnissen, die für Caco-2-Monolayer erhalten wurden. Die $tcTEER_{(tissue)}$ -Werte bei 308K, die in diesem Beispiel auf den $TEER_{(tissue)}$ -Werten bei 301 K beruhen, sind nahezu identisch mit den $TEER_{(tissue)}$ -Werten bei 308 K. Der relative Fehler zwischen $TEER_{(tissue)}$ -Werten und $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten bei 308 K beträgt 2,3 %.

Tabelle 3.6: Vergleich von gemessenem TEER, berechneten $TEER_{(tissue)}$ und berechneten temperaturkorrigierten $TEER_{(tissue)}$ bei fünf individuellen HPDE Monolayern

HPDE-monolayer	gemessener TEER (Ω)		berechneter $TEER_{(tissue)}$ ($\Omega \text{ cm}^2$)		
	301 K	308 K	301 K	308 K	temperaturkorrigiert 308 K
1	200	179	47	40	43
2	632	531	523	431	418
3	1005	815	933	744	742
4	1345	1059	1307	1012	1037
5	1650	1342	1642	1323	1302

3.3.7 Korrelation von TEER und der Permeabilität von RITC-markierten Dextran 70 kDa

3.3.7.1 Kalibrierung einer Lösung von RITC-Dextran 70 kDa in DMEM

Die bei der 11-Punkt-Kalibrierung von RITC-Dextran 70 kDa durch lineare Regression erhaltene Ausgleichsgerade ist in Abbildung 3.9 gezeigt. Der Korrelationskoeffizient für die lineare Regression beträgt 0,989.

TEER-Messung

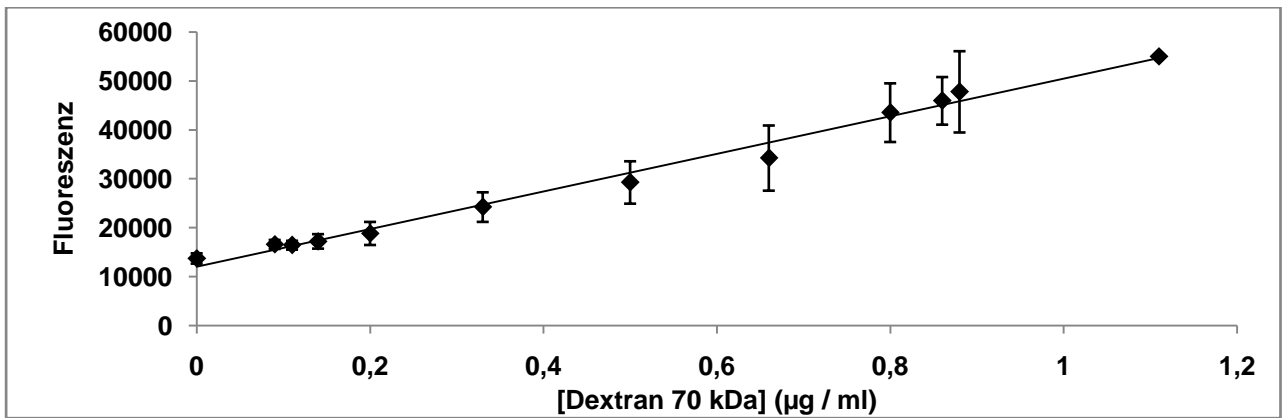


Abb. 3.9: Kalibrierung einer Lösung von RITC-Dextran 70 kDa in DMEM ohne Phenolrot. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.7.2 Korrelation des temperaturkorrigierten TEER-Wertes mit der Permeabilität von RITC-markierten Dextran 70 kDa

Die Mengen an RITC-Dextran, die binnen 2,5 h durch Caco-2-Monolayer permeieren, sind in Abbildung 3.10 für zehn individuelle Caco-2-Monolayer dargestellt. Eine direkte Korrelation zwischen $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten und RITC-Dextran Permeabilität wird ersichtlich ($R^2=0,9599$).

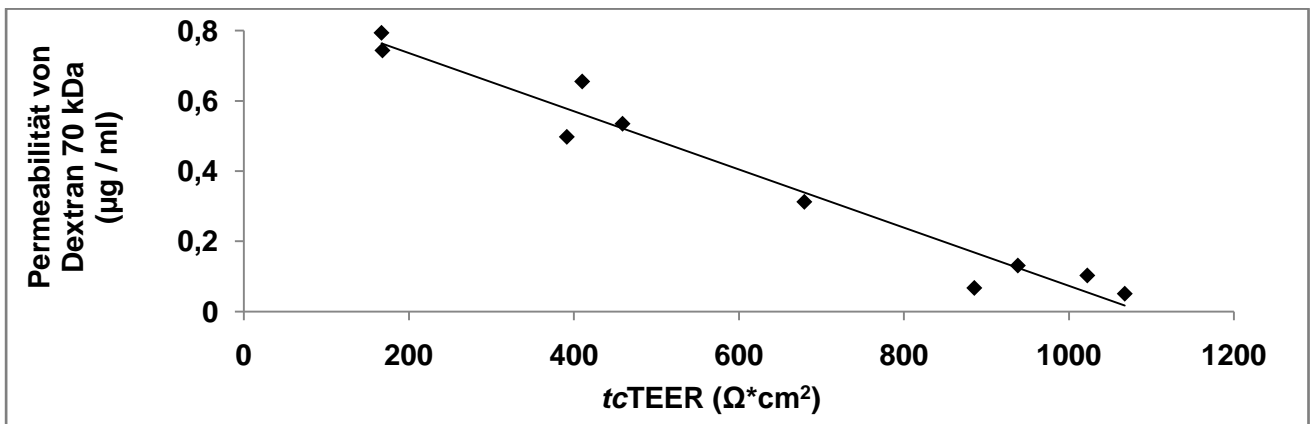


Abb. 3.10: Menge RITC-Dextran 70 kDa, die binnen 2,5 h durch zehn Caco-2-Monolayer ♦ mit unterschiedlichem TEER-Wert permeiert ist

3.3.8 Korrelation der Zeit mit der Temperatur des Mediums

Die Geschwindigkeit, in der sich die Temperatur des Mediums ändert, nachdem die Kulturplatte aus dem Brutschrank unter den Laminar Flow transportiert wurde, wird in Abbildung 3.11A veranschaulicht. Konstante Temperaturen werden nach ca. 20 Minuten erreicht. Vergleichbare Ergebnisse wurden für den umgekehrten Prozess erhalten (Abb. 3.11B).

TEER-Messung

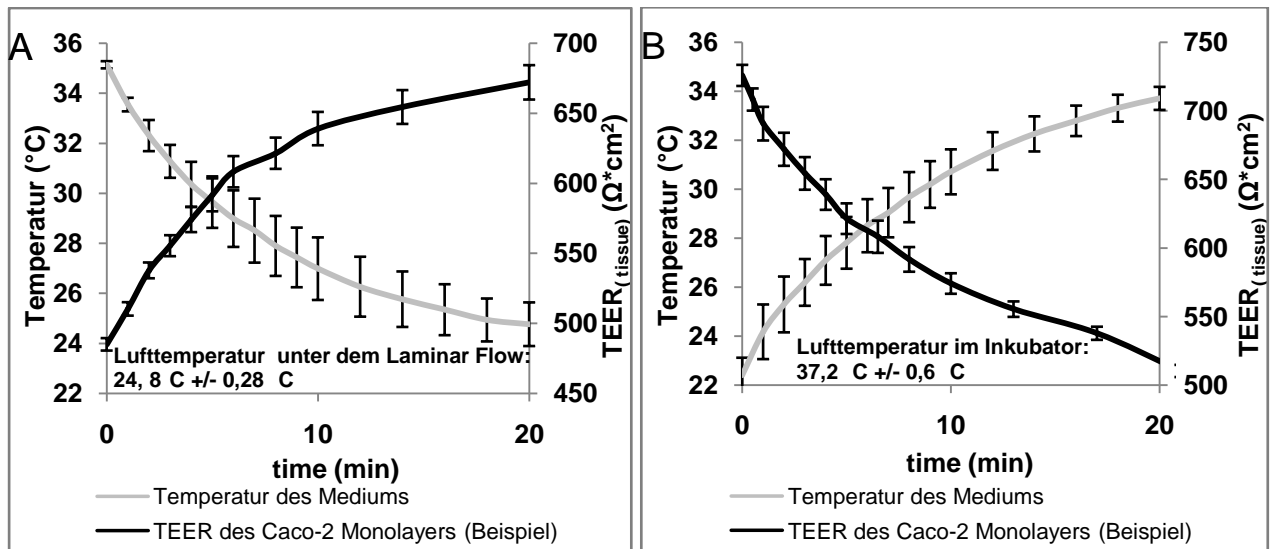


Abb. 3.11: (A) Änderung der Temperatur des Mediums und der korrespondierenden TEER_(tissue)-Werte von Caco-2-Monolayern nach dem Transfer aus dem Brutschrank unter den Laminar Flow und (B) umgekehrt dem Transfer aus dem Laminar Flow in den Brutschrank. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.4 Diskussion

Die TEER-Messung ist eine geeignete Methode, um biophysikalische Veränderungen von Monolayern zu untersuchen. Diese Veränderungen können zum Beispiel eine Folge von VEGF [Antonov et al., 2008], Nikotin [McGilligan et al., 2007] und Thrombin [Trojanovsky et al., 2008] sein. Daneben kann auch das permeabilitätserhöhende Potential von *Enhancern* wie zum Beispiel Chitosan [Thanou et al., 2001] oder Dodecylmaltosid [Tirumalasetty et al., 2005] bestimmt werden. Da der TEER-Wert temperaturabhängig ist, werden Messungen idealerweise bei konstanter Temperatur durchgeführt. Dies kann aber zu praktischen Problemen führen, wenn die Messung bei 37 °C im Brutschrank durchgeführt werden soll, da zum Beispiel eine Chopstick-Elektrode in diesem Fall nur mithilfe eines Stativs verwendet werden kann. Daneben zeigt Abbildung 3.11B, dass auch bei TEER-Messungen im Brutschrank konstante TEER-Werte erst nach mindestens 20 Minuten zu erwarten sind. Alternativ könnte die Messung auch bei konstanter Raumtemperatur durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist in erster Linie der hohe Zeitaufwand, da die Equilibrierung des Mediums von 37 °C bis auf Raumtemperatur mindestens zwanzig Minuten dauert (Abb. 3.11A). Aus diesem Grunde könnten Messungen, die vor der vollständigen Equilibrierung des Mediums durchgeführt werden, fehlerhaft sein. Dies schließt die Detektion von Permeabilitätsveränderungen, die durch Substanzen binnen der ersten zwanzig Minuten hervorgerufen werden, aus. Um die genannten Probleme zu umgehen, ist in der vorliegenden Arbeit eine mathematische Methode entwickelt worden, mit der bei einer bestimmten Temperatur

TEER-Messung

gemessene TEER-Werte umgerechnet werden können. Die so erhaltenen Werte werden als *temperature corrected* TEER (*tcTEER*) bezeichnet.

TEER-Messungen werden routinemäßig zur Bestimmung der Integrität und Dichtigkeit von Zell-Monolayern verwendet. Um für diesen Zweck *tcTEER*-Werte verwenden zu können, ist die Dokumentation der Temperatur während des gesamten Experiments unerlässlich. Die Verwendung von *tcTEER* erlaubt es TEER-Werte, die in unabhängigen Experimenten bei unterschiedlichen Temperaturen und sogar unterschiedlichen Laboratorien generiert worden sind, besser vergleichen zu können.

Permeabilitätsveränderungen als Konsequenz von Hitzeeinwirkungen auf einen Monolayer werden häufig mittels TEER quantifiziert [Yang et al., 2007]. Wenn der Einfluss der Temperatur auf die TEER-Messung berücksichtigt wird, könnte die Berechnung von $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten vorteilhaft sein. Verschiedene Studien wurden durchgeführt, um den *Carrier*-vermittelten, aktiven Transport über den Caco-2-Monolayer zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass der aktive Transport mit der Temperatur abnimmt [Laloo et al., 2004]. Demnach wäre es denkbar, dass diese Effekte auch verantwortlich für die temperaturbedingten TEER-Änderungen sind. Weiterhin kann auch ein Einfluss der Temperatur auf parazelluläre Porengrößen nicht definitiv ausgeschlossen werden. Wenn aber aktiver Transport oder Änderungen in der parazellulären Porengröße entscheidende Faktoren für temperaturbedingte Änderungen des TEER-Wertes wären, müsste die Temperaturabhängigkeit eines Monolayers größer sein als die eines Inserts. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass sich Monolayer und Inserts ohne Zellen in diesem Punkt identisch verhalten (Abb. 3.8). Demnach könnten die $tcTEER_{(tissue)}$ -Werte aus Tabelle 3.4, die mit den Gleichungen für Monolayer ermittelt wurden, auch mit den Gleichungen für leere Inserts errechnet werden. In diesem Fall betrüge der relative Fehler 5.4 %. Daher scheint die Temperaturabhängigkeit von aktivem Transport und der parazellulären Porengröße nicht entscheidend für die Temperaturabhängigkeit der TEER-Messung zu sein. In der Forschung wird häufig der Fluss von löslichen Substanzen über den Monolayer bestimmt, um diesen zu charakterisieren. Die Messung des Dextran-Flusses wird *in vitro* [Bonferoni et al., 2008] und *in vivo* [Yoshida et al., 2008] für Permeabilitäts- und Absorptionsstudien verwendet. Diverse Untersuchungen haben gezeigt, dass kleine TEER-Werte mit hoher parazellulärer Permeabilität einhergehen [Hashimoto et al., 2008] [Catalioto et al., 2009]. Allerdings ist die Permeabilität von transzellulären Markern unabhängig vom TEER-Wert [Neuhaus et al., 2008]. Dies ist dadurch bedingt, dass TEER-Werte in erster Linie von dem Widerstand des epithelialen Gewebes auf den parazellulären Ionenfluss abhängen, da der Widerstand für passiven transzellulären Ionenfluss zu hoch ist, um mittels TEER detektierbar zu sein [Lu et al., 1996]. Caco-2-Monolayer sind bereits in diversen Studien als Modell für intestinalen Arzneistofftransport und Permeabilitätsstudien validiert worden. Diese Arbeit beschreibt eine direkte Korrelation zwischen $tcTEER_{(tissue)}$ -Werten und dem Fluss von Dextran 70 kDa (Abb. 3.10).

TEER-Messung

Daher kann die TEER-Messung als äquivalente Methode neben der Bestimmung des löslichen parazellulären Transports angesehen werden. Die gezeigten Ergebnisse sind von Bedeutung, da die TEER-Messung einfacher und schneller durchzuführen ist als die Determination des Flusses von parazellulären Markern.

Die Messung des TEER-Wertes von Monolayern außerhalb des Brutschranks und ohne Wärmeplatte ist schwierig durchzuführen, da sich die Temperatur und damit die TEER-Werte schnell ändern (Abb. 3.11A). Dies fällt insbesondere dann ins Gewicht, wenn der TEER-Wert von mehreren Monolayern bei 37 °C bestimmt werden soll. Wenn $tcTEER_{(tissue)}$ -Werte verwendet werden, ist es nicht erforderlich die Temperatur auf einen konstanten Wert zu halten. Daraus ergibt sich ein entscheidender Vorteil, weil die Messung in kürzerer Zeit durchzuführen ist und die Zellen weniger Temperaturschwankungen ausgesetzt werden, wie es der Fall wäre, sollte Messung bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Weiterhin kann aus Abbildung 3.11A abgeleitet werden, dass auch vorgewärmtes Medium schnell abkühlt. Daher kann der Effekt auf temperaturbedingte TEER-Veränderungen mit vorgewärmtem Medium lediglich reduziert werden.

Die in dieser Arbeit dargestellte mathematische Lösung wurde durch die Messung des TEER-Wertes bei HPDE-Monolayern überprüft. Die Berechnung der $tcTEER_{(tissue)}$ -Werte für HPDE-Monolayer erfolgte in derselben Weise, wie es zuvor für Caco-2-Monolayer etabliert wurde. Der relative Fehler zwischen $TEER_{(tissue)}$ und $tcTEER_{(tissue)}$ bei 308K (Tabelle 3.6) ist mit 2,3 % so klein wie bei Caco-2-Monolayern. Demnach kann angenommen werden, dass die Gleichungen zur Berechnung temperaturunabhängiger TEER-Werte auf verschiedene Zellen und Kulturmedien anwendbar ist.

Weiterhin haben TEER-Messungen an Caco-2-Monolayern mit der Endohm-12 nachgewiesen, dass die ermittelten Formeln nicht auf die Verwendung von STX2 beschränkt sind. Der relative Fehler zwischen $TEER_{(tissue)}$ und $tcTEER_{(tissue)}$ bei 308K (Tabelle 3.5) liegt bei nur 2,1 %.

Die hier beschriebene Methode ermöglicht die Bereitstellung von validen TEER-Werten bei der Erfassung der Integrität von Monolayern und der Detektion von schnell auftretenden Veränderungen der parazellulären Permeabilität.

4. Bedeutung von VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

4.1 Einleitung

4.1.1 Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

Zu Beginn der 80er Jahre wurde in verschiedenen Laboratorien unabhängig von einander eine bioaktive Verbindung isoliert, die jeweils nach dem durch sie hervorgerufenen Effekt unterschiedlich benannt wurde. So reinigten Senger et al. aus dem Aszites und dem Überstand einer Tumorzelllinie vom Meerschweinchen ein Protein auf, das die vaskuläre Permeabilität nach Injektion in die Haut im Miles Assay erhöhte [Senger et al., 1983]. Seitdem ist dieser Faktor als Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bekannt [Connolly et al., 1989]. Fünf Jahre später publizierten Ferrara et al., dass sie in Kulturüberständen von bovinen hypophysären follikulären Zellen einen Wachstumsfaktor des vaskulären Endothels isoliert hätten, den sie erstmalig als Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) bezeichneten [Ferrara et al., 1989]. Zeitgleich charakterisierten Plouet et al. einen Wachstumsfaktor des vaskulären Endothels aus dem Kulturmedium von AtT-20 hypophysäre Zellen [Plouet et al., 1989] und benannten diesen als Vasculotropin [Plouet et al., 1990]. Im darauffolgenden Jahr konnten Senger et al. die Aminosäuresequenz von VPF ermitteln [Senger et al., 1990]. Es stellte sich heraus, dass VEGF, Vasculotropin und VPF dasselbe Protein bezeichnen [Connolly, 1991].

4.1.2 VEGF-Isoformen

VEGF besteht aus zwei antiparallelen Homodimeren, die über zwei Disulfidbrücken zwischen Cys-51 und Cys-60 verbunden sind [Muller et al., 1997]. Damit ist es signifikant homolog zum Blutplättchen abgeleiteten Faktor (PDGF) [Keck et al., 1989]. Die VEGF-Familie umfasst mit VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, dem Plazenta Wachstumsfaktor (PlGF) und VEGF-F sieben Glykoproteine [Otrock et al., 2007], wobei VEGF ein Molekulargewicht von 34-43 kDa aufweist.

VEGF-A (im folgenden VEGF genannt) ist das am besten charakterisierte und am meisten untersuchte Mitglied der VEGF-Familie. Das für VEGF kodierende Gen setzt sich aus acht Exons, die durch sieben Introns unterbrochen sind, zusammen [Houck et al., 1991]. Alternierendes Spleißen führt hauptsächlich zu vier Isoformen (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆) [Tischer et al., 1991]. Die Nummer kennzeichnet die Anzahl an Aminosäuren im Molekül. VEGF₁₆₅ ist die vorherrschende Isoform [Houck et al., 1992]. VEGF₁₂₁ bindet als einzige Isoform nicht an Heparinsulfat und die Extrazellulärmatrix (EZM) und ist daher frei diffusibel [Cross et al., 2003]. Das Fehlen der Heparin-bindenden Domäne resultiert in einer verminderten mitogenen Aktivität [Key et al., 1996]. VEGF₁₆₅ wird zum Teil sezerniert, liegt aber auch an die EZM gebunden vor [Park et al., 1993]. Daher verfügt VEGF₁₆₅ auch über optimale Eigenschaften hinsichtlich seiner

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Bioverfügbarkeit und mitogenen Aktivität. Die an die EZM gebundenen Isoformen können durch Heparin oder Heparinasen sowie deutlich schneller durch Plasmin oder Urokinasen freigesetzt werden [Plouet et al., 1997]. Die EZM kann daher als VEGF-Speicher dienen.

VEGF-B wird durch alternierendes Spleißen mit VEGF-B₁₆₇ (an die EZM gebunden) und VEGF-B₁₈₆ (frei diffundierbar) in zwei Isoformen gebildet [Takahashi et al., 2005]. VEGF-B wird in vielen Geweben, vor allem aber im Herzen und im Skelettmuskel sezerniert [Olofsson et al., 1999]. Die Promotor-Region des VEGF-B weist entscheidende Unterschiede zu der des VEGF-A auf, wodurch es zu Variationen bei der Regulation durch physiologische Stimuli kommt [Silins et al., 1997]. Daher wird unter hypoxischen Bedingungen nur VEGF-A, nicht aber VEGF-B induziert [Forsythe et al., 1996].

VEGF-C und -D bilden eine eigene Subfamilie. Isoformen entstehen hier nicht durch alternierendes Spleißen, sondern durch differentielle Proteolyse von Vorläuferproteinen [Tammela et al., 2005].

VEGF-E zeigt mit VEGF-A nur noch eine 20-25 prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz. [Ogawa et al., 1998, Meyer et al., 1999].

Der Plazenta Wachstumsfaktor (PlGF) wird in der Plazenta sowie im Herzen und in der Lunge exprimiert [Persico et al., 1999]. Die Kristallstruktur von PlGF verdeutlicht eine große Ähnlichkeit zu VEGF-A [Iyer et al., 2001].

VEGF-F wurde erst vor wenigen Jahren im Schlangengift der Viper entdeckt [Otrock et al., 2007].

4.1.3 VEGF-Rezeptoren

VEGF bindet auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran an sogenannte Tyrosinkinase-Rezeptoren. Die ligandenbindende Domäne setzt sich aus sieben Immunglobulin-ähnlichen Fragmenten zusammen. Die zytosolische Domäne hat eine eigene Kinaseaktivität. Jede Untereinheit der Tyrosinkinase-Rezeptoren hat nur ein Transmembransegment. In Abbildung 4.1 ist gezeigt, wie die Bindung des extrazellulären VEGF an seinen Rezeptor die Kinasedomäne auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran aktiviert (a). Indem das VEGF an zwei benachbarte Rezeptormonomere bindet, werden diese zu einem Dimer quervernetzt (b). Dies hat zur Folge, dass sich die Kinasedomänen benachbarter Rezeptoren gegenseitig phosphorylieren (c). Die Transphosphorylierung und anschließende Cis-Autophosphorylierung stimuliert einerseits die Kinaseaktivität, andererseits werden Andockstellen für benachbarte Proteine erzeugt (d) [Stutfeld et al., 2009].

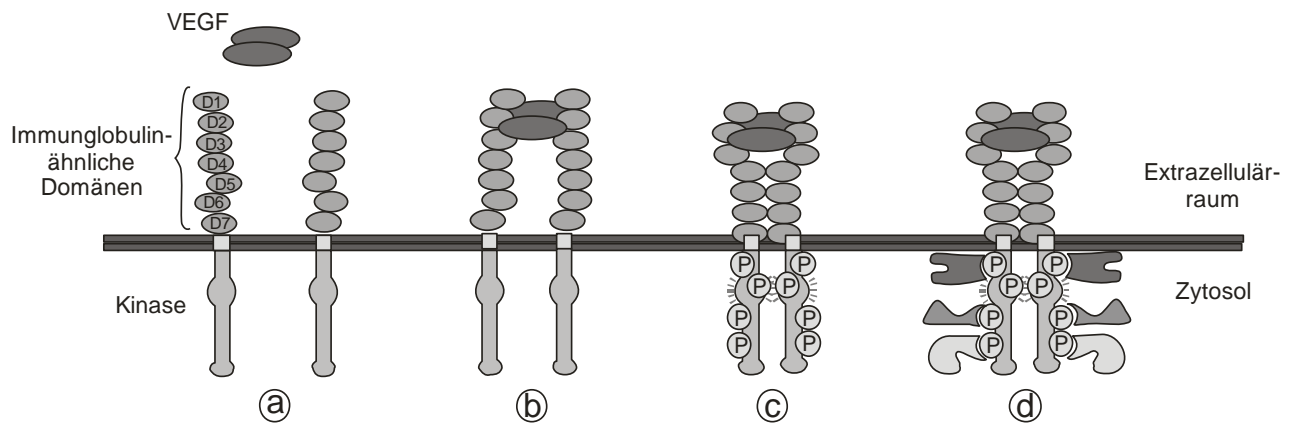


Abb. 4.1 Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors durch VEGF

Der VEGF-Rezeptor 1 (VEGF-R1, auch fms-like tyrosine kinase, flt-1) vermittelt nur geringe mitogene Signale [Ferrara et al., 2003]. Dieser 132 kDa große Rezeptor bindet VEGF-A zwar mit einer 10-fach höheren Affinität als VEGF-R2 ($K_d=10-30 \text{ pM}$) [Ferrara et al., 1997], wobei die Aktivierung aber nur zu einer schwachen Kinaseaktivität führt. Eine lösliche Form des VEGF-R1 (sVEGF-R1), bestehend aus der extrazellulären Domäne des VEGF-R1, kann die VEGF-vermittelten Effekte durch Komplexbildung des VEGF hemmen [Kendall et al., 1993]. Aufgrund der genannten Eigenschaften wird der VEGF-R1 auch als negativer Regulator der VEGF-Signaltransduktion bezeichnet [Park et al., 1994]. VEGF-R1 kann allerdings mit VEGF-R2 heterodimerisieren, wobei ein Komplex mit starker Signaltransduktion entsteht [Huang et al., 2001]. Die Effekte, die durch Stimulation der VEGF-Rezeptoren hervorgerufen werden, sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: VEGF-Rezeptoren-vermittelte Effekte

Effekt	Angiogenese	Proliferation	Migration	Permeabilität	Überleben
Rezeptor	R2, R3	R2, R3	R2, R3	R2	R2, R3

Der VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2, auch Kinase domain region, KDR, beim Menschen; flk-1, bei der Maus) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa. Durch anschließende Glykosylierung erlangt es ein Molekulargewicht von 200-230 kDa [Takahashi et al., 1997]. VEGF-R2 bindet VEGF mit einem K_d von 75-125 pM [Terman et al., 1992]. Eine Aktivierung des KDR führt in der Folge zur Phosphorylierung von Mediatoren der Signaltransduktion, die über eine SH2-Domäne (Src homologe Region) verfügen [Guo et al., 1995]. Die SH2-Domäne ermöglicht den sie enthaltenden Proteinen an Tyrosin-phosphoryliertes Protein zu binden.

VEGF-Rezeptor 3 (VEGF-R3, auch Flt-4) ist ein 196 kDa Rezeptor, der aus zwei Teilen aufgebaut ist, da er proteolytisch an der fünften Immunglobulin-Schleife in einen 120 kDa und einen 75 kDa

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Teil getrennt wird. Beide Teile sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden [Lohela et al., 2003].

Die Neuropiline (NRP-1 und NRP-2) sind transmembranäre Glykoproteine, die alleine keine Signaltransduktion vermitteln, da ihre intrazellulären Domänen zu kurz sind. NRP-1 ist aber für die VEGF-vermittelte Hyperpermeabilisierung des vaskulären Endothels notwendig [Becker et al., 2005]. Dazu müssen KDR und NRP-1 einen Komplex bilden [Soker et al., 2002].

An welche Rezeptoren die einzelnen Liganden binden und die Lokalisation der Rezeptoren ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Lokalisierung der VEGF-Rezeptoren und ihre Liganden.

Rezeptor	Plasma	Hämatopoetische Stammzellen Makrophagen und Monozyten	vaskuläres Endothel	lymphatisches Endothel
löslicher VEGF-R1	VEGF-A, VEGF-B, PlGF			
VEGF-R1	VEGF-A, VEGF-B, PlGF			
VEGF-R2		VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E		
VEGF-R3				VEGF-C, VEGF-D
NRP-1			VEGF-A, VEGF-B	
NRP-2				VEGF-A, VEGF-C

4.1.4 Die Bedeutung von VEGF in der Physiologie

VEGF ist an der Vaskulogenese, Angiogenese und Lymphangiogenese während der embryonalen und postnatalen Entwicklung beteiligt [Carmeliet et al., 1996]. Beim Erwachsenen ist VEGF beim follikulären Wachstum und der Entwicklung des Corpus luteum involviert [Fraser, 2006]. Weiterhin spielt VEGF eine Rolle bei der enchondralen Ossifikation, der Geweberegulation, dem Überleben von hämatopoetischen Stammzellen und der Regulation von Erythropoetin.

4.1.5 Die Bedeutung von VEGF in der Pathophysiologie

VEGF wird in den meisten Tumoren erhöht exprimiert und korreliert mit der Tumorprogression [Ferrara et al., 1992]. Die Freisetzung von VEGF ist bei Tumorzellen unter Hypoxie am höchsten, resultierend in dem Wachstum neuer Blutgefäße in den Tumor. Diabetes mellitus und eine Okklusion der Vena centralis retinae können mit einer retinalen Ischämie und intraokulärer Neovaskularisation assoziiert sein, die zu Hämorrhagie, Retinaablösung, Glaukom und Blindheit führen kann [Patz, 1980]. Weiterhin ist die VEGF-Konzentration bei vielen inflammatorischen

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Erkrankungen erhöht. Auch im malignen Aszites [Luo et al., 1998] und im Pleuraerguss [Zebrowski et al., 1999] ist der VEGF-Gehalt signifikant gesteigert. Daher kann vermutet werden, dass VEGF eine entscheidende Rolle bei der Entstehung maligner Ergüsse besitzt. Ein Mechanismus stellt dabei die VEGF-induzierte vaskuläre Permeabilität dar.

4.1.6 Regulation der Permeabilität

Es wurde gezeigt, dass eine Hyperpermeabilisierung des vaskulären Endothels eine Folge der Stimulation von VEGF-R2, nicht aber von VEGF-R1 ist [Gille et al., 2001, Bates et al., 2002]. Für die nachfolgende Signaltransduktion werden in der Literatur viele Wege aufgezeigt, von denen aber keiner vollständig verifiziert wurde. In Abbildung 4.2 sind drei der bereits postulierten Mechanismen zusammengefasst.

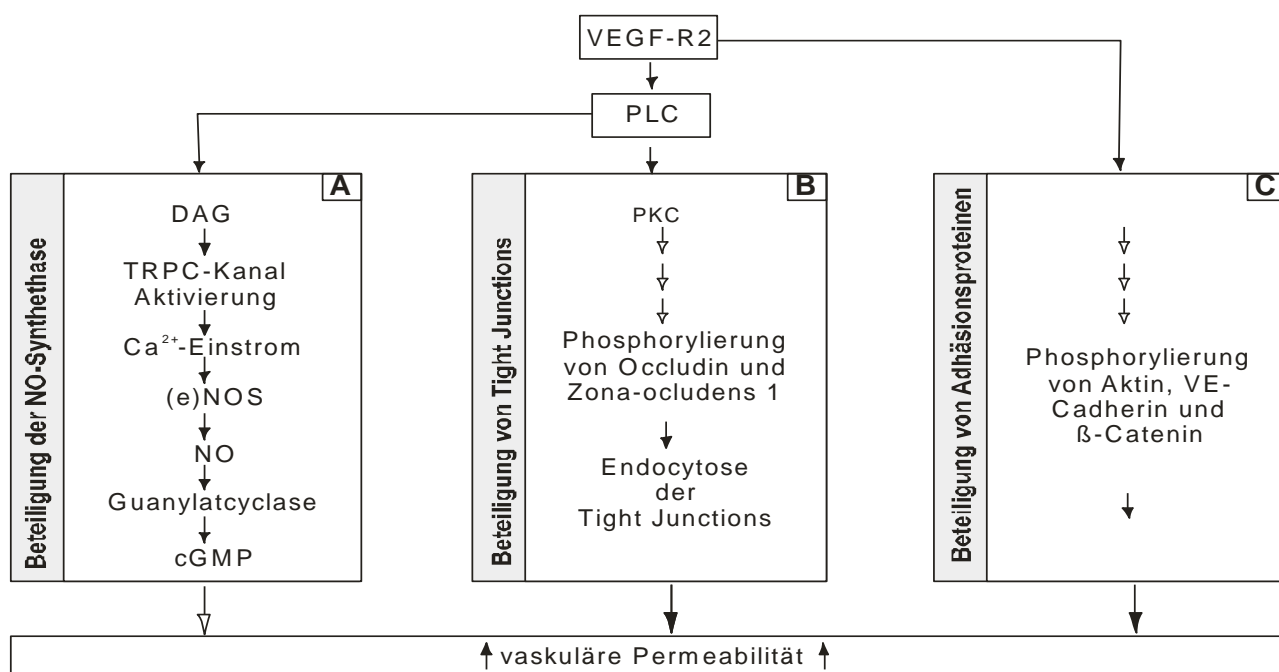


Abb. 4.2 Postulierte Mechanismen der VEGF-vermittelten Hyperpermeabilisierung. A: [Bates et al., 2002, Aramoto et al., 2004] B: [Harhaj et al., 2004, Antonetti et al., 1999] C: [Pedram et al., 2002, Esser et al., 1998] Abkürzungen: —▷ Unbekannter, —▶ bekannter Mechanismus, DAG: Diacylglycerin, PLC: Phospholipase C, PKC: Proteinkinase C, TRP-Kanal: DAG-sensitiver Ionenkanal, (e)NOS: (endotheliale) Stickstoffmonoxid-Synthetase, NO: Stickstoffmonoxid, cGMP: Cyclisches Guanosinmonphosphat, VE-Cadherin: Cadherin des vaskulären Endothels.

4.1.7 VEGF als therapeutische Zielstruktur

In Abbildung 4.3 sind die gegenwertigen therapeutischen Strategien gegen VEGF-vermittelte Signaltransduktion zusammengefasst. Aflibercept (VEGF-Trap) besteht aus Teilen der extrazellulären Ig-Domäne von VEGF-R1 und VEGF-R2, die mit dem Fc-Teil eines IgG1-

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Antikörpers fusioniert sind [Hsu et al., 2009]. Aflibercept zeigt eine hohe Affinität zu allen VEGF-A Isoformen. Es wird derzeit in Phase III-Studien getestet.

Small molecule-Inhibitoren der VEGF-Rezeptoren haben in klinischen Studien ihre Wirksamkeit bewiesen. Die Substanzen sind oral applizierbar und weisen ein breites Wirkungsspektrum gegen zahlreiche Kinasen auf [Ho et al., 2007]. Sunitinib (Sutent[®]) ist für die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen. Sorafenib (Nexavar[®]) wird beim Leber- und Nierenzellkarzinom eingesetzt. Semaxanib (SU5416) wird wegen eines negativen Nutzen-Risiko-Verhältnisses nur noch zu Forschungszwecken eingesetzt.

Ramucirumab ist ein vollständig humanisierter monoklonaler Antikörper, der selektiv an die extrazelluläre Domäne des VEGF-R2 bindet [Krupitskaya et al., 2009]. Es verhindert die Ausbildung des VEGF-Rezeptor-Komplexes [Mackey et al., 2009]. Mit Ramucirumab soll die off-target Toxizität der weniger selektiven Tyrosinkinase-Inhibitoren vermieden werden. Der Antikörper befindet sich momentan in Phase III-Studien.

Aptamere sind kurze einzelsträngige Oligonukleotide, die ein spezielles Molekül aufgrund ihrer 3D-Struktur erkennen [Ellington et al., 1990]. Der Aptamer-Protein-Komplex zeigt eine hohe Selektivität und Stabilität [Dausse et al., 2009]. Bei den von Gold und Szostack beschriebenen Verfahren (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, SELEX) werden die Sequenzen aus einer Oligonukleotid-Datenbank herausgefiltert, die das Ziel-Molekül am stärksten binden [Tuerk et al., 1990]. Pegaptamid ist ein pegyliertes modifiziertes Oligonukleotid, das hochspezifisch und mit großer Affinität an das extrazelluläre VEGF₁₆₅ bindet und dessen Wirkung hemmt [Ruckman et al., 1998]. Zugelassen ist Pegaptamid für die Therapie der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration.

Bevacizumab (Avastin[®]) ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler 149 kDa großer Antikörper, der mittels DNA-Technologie aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) gewonnen wird [Presta et al., 1997]. Der Antikörper setzt sich aus 93 % humanen und 7 % murinen Proteinsequenzen zusammen, wobei der murine Anteil auch die Antigenbindungsstelle umfasst. Bevacizumab bindet alle humanen VEGF-A Isoformen und hemmt dadurch die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren. Untersuchungen der Kristallstruktur des VEGF haben gezeigt, dass die Bindungsstellen des VEGF für Bevacizumab beziehungsweise seinen Rezeptor nicht identisch sind. Es wird vermutet, dass die Bindung von VEGF an dessen Rezeptor sterisch behindert wird [Muller et al., 1998]. Die pharmakokinetischen Eigenschaften entsprechen denen typischer humanisierter monoklonaler Antikörper [Lin et al., 1999]. Avastin[®] ist zugelassen für die Therapie des metastasierten Kolon- oder Rektumkarzinom, des metastasierten Mammakarzinoms, des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms sowie des renalen Nierenzellkarzinoms. Die Therapie erfolgt immer in Kombination mit einem Zytostatikum. Auch Ranibizumab (Lucentis[®]) ist von

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

demselben VEGF-bindenden Maus-Antikörper wie Bevacizumab abgeleitet. Im Gegensatz dazu handelt es sich allerdings nicht um den vollständigen humanisierten Antikörper, sondern nur um das FAB-Fragment. Das Molekulargewicht beträgt daher auch nur 48 kDa. Darüberhinaus wurde die VEGF-Inhibierung von Ranibizumab durch selektive Mutation gegenüber Bevacizumab noch erhöht. Das FAB-Fragment von Ranibizumab unterscheidet sich in sechs Aminosäuren von dem FAB-Fragment des Bevacizumab. Ranibizumab ist zur Therapie der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration zugelassen [Steinbrook, 2006, Chen et al., 1999].

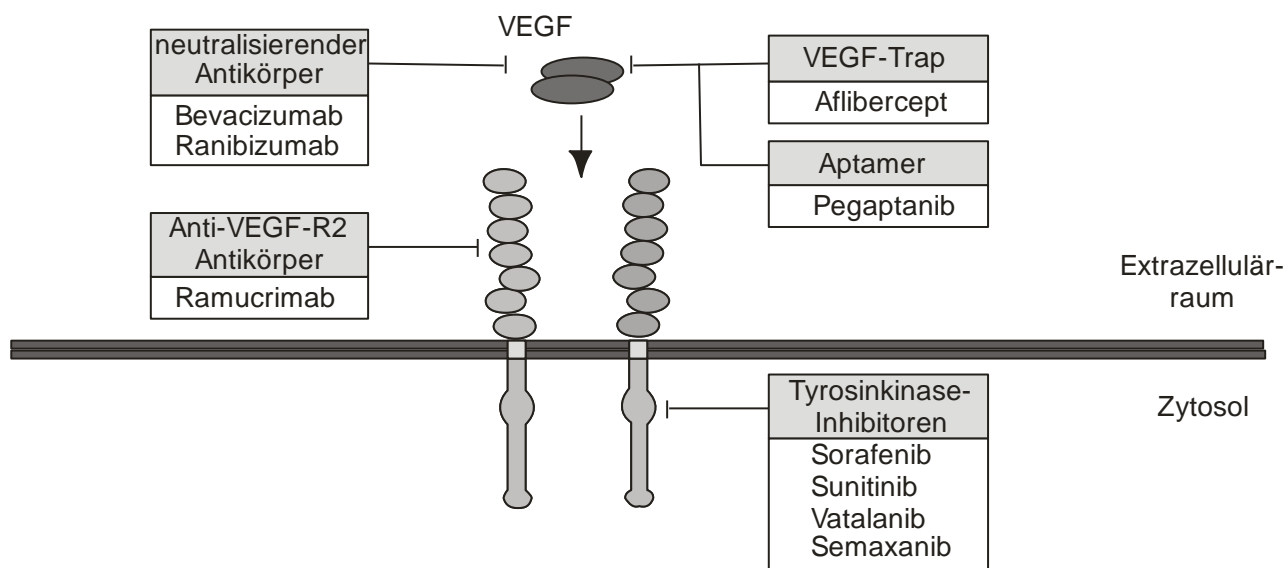


Abb. 4.3: Inhibition der VEGF-vermittelter Signaltransduktion

4.1.8 Ziele der Arbeit

In dem folgenden Teil der Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob VEGF eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Ergüsse zukommt und ob in diesem Falle eine Therapie mit Bevacizumab die Ergussbildung vermindern könnte. Dazu sollte die Bevacizumab-Konzentration ermittelt werden, die die VEGF-vermittelte Permeabilität neutralisieren kann. Ferner sollte untersucht werden, ob eine intrakavitäre Applikation einer intravenösen Gabe vorzuziehen ist.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Sammeln und Aufarbeiten des klinischen Materials

4.2.1.1 Aufarbeitung der Ergüsse

Der Erguss wurde im Laminar Flow aus dem Ergussbeutel in 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner) pipettiert. Diese wurden bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert (Varifuge 20 RS, Heraeus). Die Überstände wurden in 50 ml Zentrifugationsröhrchen pipettiert und bei -30 °C aufbewahrt.

4.2.1.2 Kultivierung der Zellen aus den Ergüssen

Das Zellpellet, das bei der Aufarbeitung der Ergüsse (4.2.1.1) gewonnen worden war, wurde mit 3 ml Erguss resuspendiert. Diese Zell-Erguss-Suspension wurde in 250 ml Kulturflaschen (Greiner) pipettiert. Die Zellen, die im folgenden „Patientenzellen“ genannt werden, wurden in 18 ml RPMI-Medium, das mit 10 % FCS, 10 % PSG sowie 10 % Erguss versetzt war, kultiviert.

4.2.1.3 Aufarbeitung der Serumproben

Am Tag der Punktion wurde den Patienten Serumproben entnommen. Die Serum-Monovetten (Sarstedt) wurden bei 4000 U/min für 10 min zentrifugiert (Varifuge 20 RS, Heraeus Sepatech), bevor 1 ml Aliquots in einem Reaktionsgefäß bei -30 °C eingefroren wurden.

4.2.2 Bestimmung der VEGF-Konzentration mittels ELISA in:

Zur Bestimmung der VEGF-Konzentrationen in Ergüssen und Sera sowie in den Überständen von Patientenzellen und Zelllinien wurde der ELISA „Quantikine Human VEGF Imunoassay“ von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) verwendet. Für die quantitative Analytik wurde ein VEGF₁₆₅ - Standard auf die Konzentrationen 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 und 15,6 ng/ml verdünnt. Die Proben wurden 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Es wurden 200 µl der Proben (100 µl bei Serum-Proben) in jedes Well pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert (Schritt 1). Nachdem ungebundene Substanzen durch Waschen entfernt worden waren, wurden 200 µl eines polyklonalen, HRP-konjugierten Antikörpers gegen VEGF hinzugegeben und für weitere zwei Stunden inkubiert (Schritt 2). Ungebundene Zweitantikörper wurden aus den Wells gewaschen und 200 µl einer Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung als Substrat für die HRP in die Wells pipettiert. Nach 20 min wurde die enzymatische Reaktion mit 2 N Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm mit einem Plattenphotometer (Carry 50 Mikroplattenreader, Varian) bestimmt (Schritt 3).

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

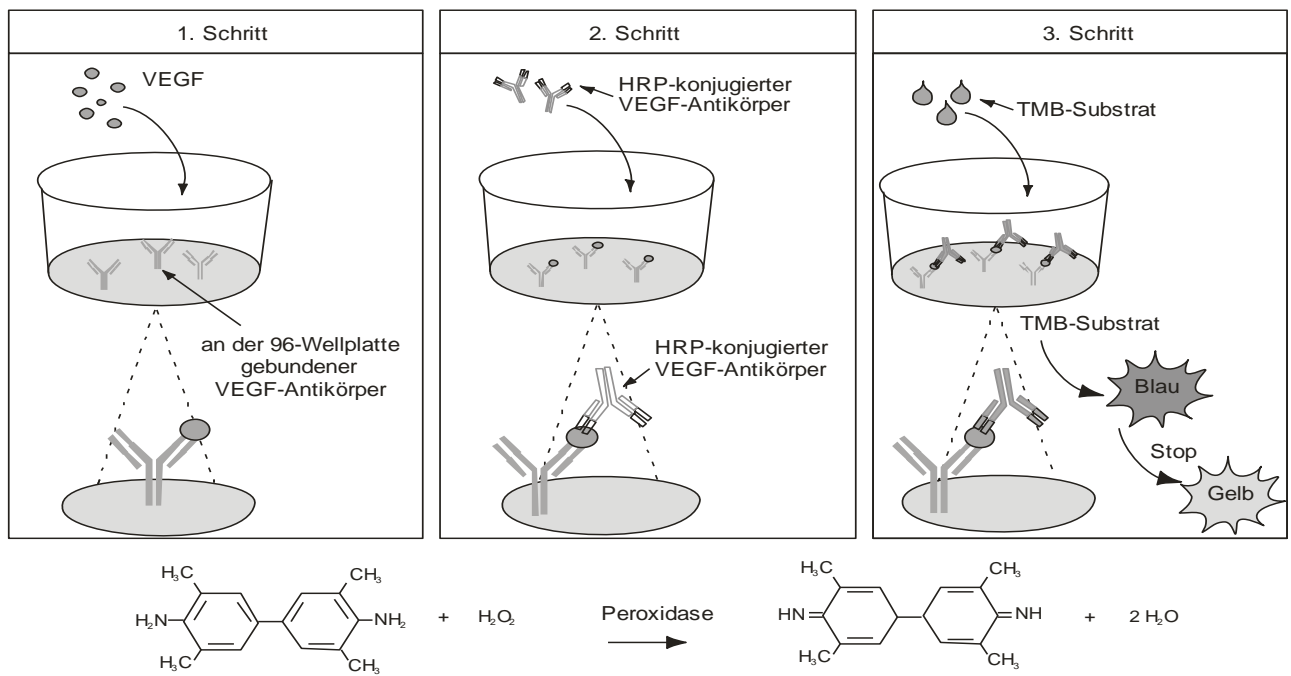


Abb. 4.4: Prinzip des VEGF-ELISAs

4.2.2.1 Ergüssen und Sera

Insgesamt wurde in 35 Erguss- und den dazugehörigen Serumproben, die wie unter 4.2.1 beschrieben gesammelt und aufgearbeitet worden waren, der VEGF-Gehalt bestimmt. Den Ergüssen lagen sowohl benigne (z.B. Herzinsuffizienz und Leberzirrhose) als auch maligne Primärerkrankungen (Karzinome) zugrunde. Es handelte sich um pleurale und peritoneale Ergüsse (siehe Kapitel 2).

4.2.2.2 den Überständen von Patientenzellen

Aus sieben Ergüssen, denen unterschiedliche Primärerkrankungen zugrundelagen, wurden Patientenzellen, wie unter 4.2.1.2 beschrieben, isoliert. Von jeder Patientenzelle wurde in je drei Wells einer 6-Wellplatte (Greiner) 1×10^5 Zellen ausgesät und mit 6 ml Medium (RPMI, 10 % FCS und 10 % PSG) kultiviert. Alle 24 h wurde 1 ml Medium entnommen und zur späteren VEGF-Gehaltsbestimmung bei $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Das entnommene Volumen wurde durch vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Probenentnahme erfolgte über fünf Tage, um die Zeitabhängigkeit der VEGF-Freisetzung zu untersuchen. Am Ende des Experiments wurden die Zellen, zwecks Normalisierung des bestimmten VEGF-Gehalts, mit einer Neubauer-Kammer gezählt. Dazu wurden die $10 \text{ } \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $90 \text{ } \mu\text{l}$ Trypanblaulösung (Fluka, Sigma) in ein Reaktionsgefäß pipettiert, um die vitalen von den nicht vitalen Zellen zu unterscheiden. Drei weitere Patientenzellen wurden mit gleicher Zelldichte ausgesät, in diesem Fall aber für 72 Stunden bis zur Probenentnahme kultiviert. Anschließend wurde wiederum die Zellzahl bestimmt.

4.2.2.3 den Überständen von Zelllinien

Die zeitabhängige VEGF-Sekretion von vier in Tabelle 7.2 beschriebenen Zelllinien (HPDE, BxPC₃, Caco-2 und Panc-89) wurde bestimmt. Dazu wurden 5×10^4 Zellen in jeweils drei Wells einer 6-Wellplatte (Greiner) ausgesät und mit 6 ml Medium (Tabelle 7.2, Seite 147) kultiviert werden. Alle 24 h wurde 1 ml Medium entnommen und zur späteren VEGF-Gehaltsbestimmung bei -30°C eingefroren. Dazu wurde das Medium über den Zellen mit einer Pipette homogenisiert. Das entnommene Volumen wurde durch vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Probenentnahme erfolgte über 5 Tage. Am Ende des Experiments wurde die Zellzahl wie unter 4.2.2.2 beschrieben bestimmt.

4.2.2.4 den Überständen von unterschiedlichen Caco-2-Zellzahlen

Caco-2-Zellen wurden mit unterschiedlicher Zelldichte [(1,0; 1,5; 2,0 und 2,5) $\times 10^5$] in Kulturflaschen (250 ml) (Greiner) ausgesät und mit 18 ml Medium (siehe Tabelle 7.2, Seite 147) kultiviert. Alle 24 h wurde 1 ml Medium entnommen und zur späteren VEGF-Gehaltsbestimmung bei -30°C eingefroren. Zuvor wurde das Medium durch Schwenken der Flaschen homogenisiert. Das entnommene Volumen wurde durch vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Proben wurden über sechs aufeinanderfolgende Tage gesammelt.

4.2.3 Untersuchungen an der Pleura parietalis vom Schwein

4.2.3.1 Konstruktion einer „Ussing-Kammer“

Ein rechteckiges 44 mm x 29 mm Duran[®] 50 (D50)-Flachglas von Schott wurde mittig mit dem Bunsenbrenner auf $1040\text{-}1050^\circ \text{C}$ erhitzt. Mit Hilfe eines Glasstabes wurde aus der Mitte des Flachglases ein Stück herausgezogen. Die so erhaltene Spitze wurde abgeschnitten und anschließend das entstandene Loch geweitet. Ein 5 cm langes D50-Rohr, mit einem Innendurchmesser von 8 mm und einem Außendurchmesser von 12 mm wurde in der Flamme des Bunsenbrenners rechtwinklig gebogen. Um das Ende des Rohres mit dem Lochrand des Flachglases zu verschmelzen, musste es sehr stark erhitzt werden. Zwei 4 mm dicke Silikonplatten wurden zwischen zwei Flachgläsern positioniert, um die Glasplatten gegeneinander abzudichten. Für einen durchgehenden Kanal, erhielten die Silikonplatten mit einem Handbohrer ein Loch mit einem Durchmesser von 8 mm. Die technischen Arbeiten wurden von der Firma Eydam in Kiel durchgeführt.

4.2.3.2 Präparation der Pleura parietalis

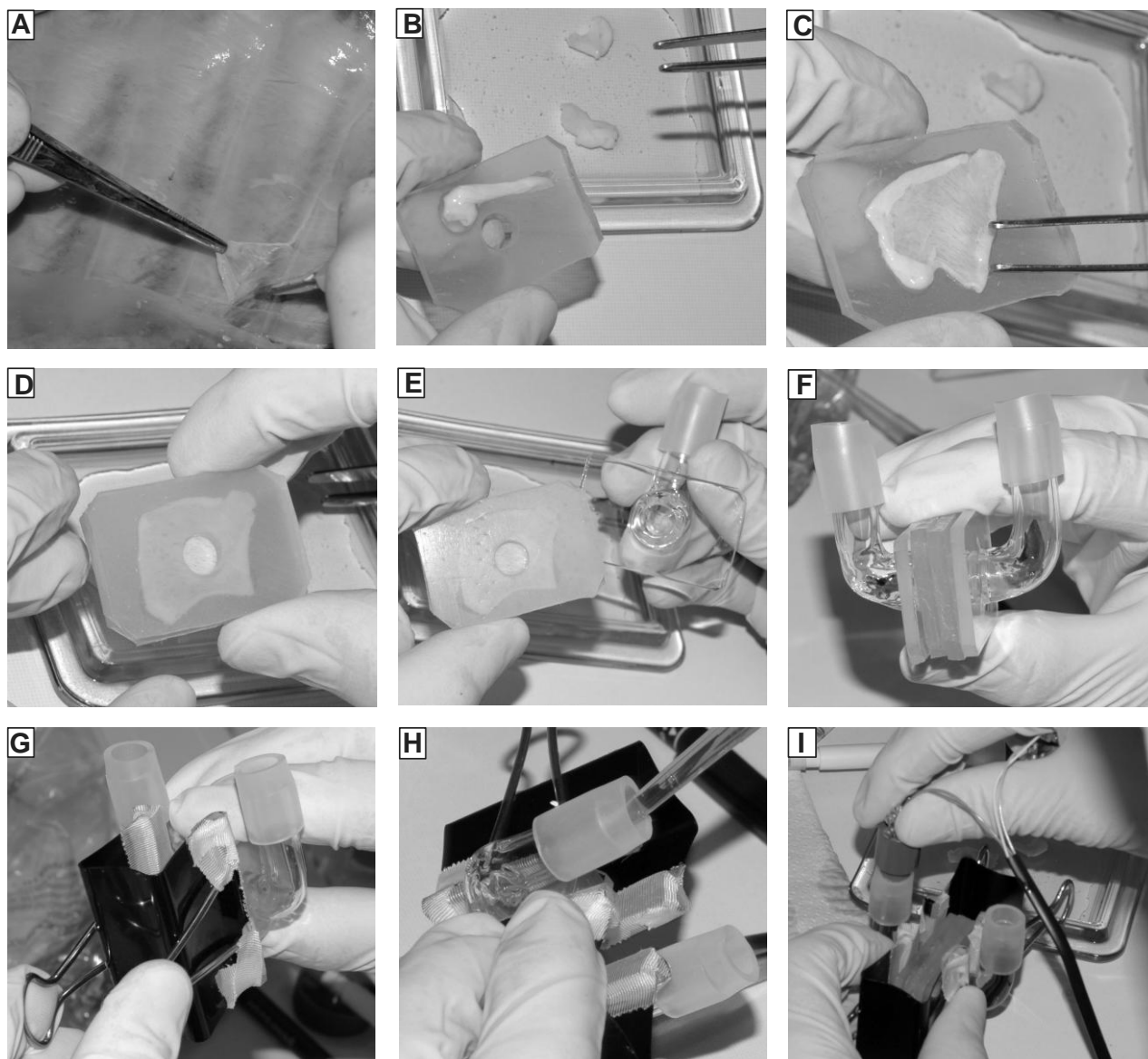


Abb. 4.5: Präparation der Pleura parietalis vom Schwein

In Abschnitt 1.3 wird beschrieben, dass die Pleura parietalis die Thoraxwand von innen auskleidet. Daher wurden, um die parietale Pleura zu präparieren, die Rippen von 120-140 kg schweren und 6-7 Monate alten Schweinen verwendet. Sie wurden von der Schlachtereier Bracker in Bordschholm zur Verfügung gestellt. Die Pleura parietalis wurde zu 1,5 cm x 1,5 cm großen Stücken mit Pinzette und Skalpell vorsichtig von der Brusthöhle (cavitas thoracis) abgelöst (A) und in eine Schale mit PBS gegeben. Anschließend wurde die Pleura auf ein gelochtes Silikonplättchen gelegt (B) und vorsichtig mit der Pinzette über dem Loch entrollt (C). Eine zweite gelochte Silikonplatte wurde passgenau auf die erste Silikonplatte gelegt, sodass die beiden Löcher einen durch die Pleura unterbrochenen Kanal bildeten (D). Mit den beiden Schenkeln des U-Rohres wurde der Kanal nach oben verlängert (E und F). Die Glasplatten wurden auf beiden Seiten mit Klammern fixiert (G). Die Apparatur wurde schräg gehalten, sodass die beiden Schenkel luftblasenfrei mit Medium gefüllt

werden konnten (H). Zuletzt wurden die unter 3.3.3.2 beschriebenen Elektroden auf die Glasschenkel aufgesetzt und mit diesen über einen Silikonschlauch mit 10 mm Innendurchmesser und 14 mm Außendurchmesser) fest verbunden (I).

4.2.3.3 Bestimmung der Permeabilität von FITC-Dextran-Molekülen unterschiedlicher Größe durch die Pleura parietalis

4.2.3.3.1 Kalibrierung der FITC-Dextran-DMEM-Lösung

Die Stammlösungen wurde durch Einwaage von je 5 mg Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran unterschiedlicher Größe in ein Reaktionsgefäß und Auffüllung mit phenolrotfreiem DMEM auf eine Konzentration von 5 mg/ml hergestellt. Ausgehend von der jeweiligen Stammlösung wurden dann Arbeitslösungen, entsprechend dem in Tabelle 4.3 angegebenen Verdünnungsschema angefertigt.

Tabelle 4.3: Verdünnungsschema verschiedengroßer FITC-Dextran-Moleküle

Dextran kDa	Verdünnungen (µg/ml)						
4	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0,0
10	0,9	0,7	0,6	0,4	0,3	0,1	0,0
40	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,0
70	2,4	1,6	1,4	1,2	1,0	0,6	0,0

Je 150 µl der Verdünnungen wurden auf eine 96-Wellplatte (Greiner) pipettiert und die Dextran-Konzentration in den Proben mit einem Fluorometer (Infinite F200, Tecan) mit den in Tabelle 4.4 beschriebenen Einstellungen bestimmt. Während der Kalibrierung wurden die Stammlösungen vor Licht geschützt aufbewahrt.

Tabelle 4.4: Einstellungen des Fluorometers zur Quantifizierung von FITC-Dextran in phenolrotfreiem DMEM

Anregungs-		Emissions-		Verstärkung	Messungen
wellenlänge	filterbreite	wellenlänge	filterbreite		
485	20	535	25	60	15

4.2.3.3.2 Bestimmung der Permeabilität

Die Pleura parietalis wurde wie in Abschnitt 4.2.3.2 dargestellt in die Glasapparatur eingespannt. In den Donor-Schenkel der Apparatur wurden jeweils Lösungen unterschiedlich großer FITC-Dextrane (4, 10, 40 und 70 kDa) in phenolrotfreiem DMEM pipettiert. Der andere Schenkel (Akzeptor-Schenkel) wurde nur mit phenolrotfreiem DMEM gefüllt. Anschließend wurden die Apparaturen in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurde der Inhalt des Akzeptor-Schenkels entnommen und gevortext. Die Dextran-Konzentration wurde wie unter 4.2.3.3.1 beschrieben bestimmt.

4.2.3.4 Bestimmung der VEGF-Sekretion der Pleura parietalis

Mit Handbohrern wurden drei verschiedene Größen der Pleura parietalis vom Schwein ausgestanzt, in sterile Reaktionsgefäße überführt und darin gewogen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit 1 ml Medium (DMEM, 1 % PSG) gefüllt und in den Brutschrank überführt. Nach 1, 4 und 8 Tagen wurde das Medium in den Reaktionsgefäßen mit einer Pipette homogenisiert. Insgesamt wurden 200 µl Medium pro Ansatz entnommen und zur späteren VEGF-Bestimmung gemäß Abschnitt 4.2.2. bei -30 °C eingefroren. Das entnommene Volumen wurde ersetzt.

4.2.4 Nachweis der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 auf Caco-2-Zellen

4.2.4.1 Transfektion von Caco-2-Zellen mit siRNA gegen VEGF-Rezeptor 2

Es wurden 1×10^5 Caco-2-Zellen pro Well einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml Medium (Tabelle 7.2, Seite 147) für 24 Stunden kultiviert. Für die anschließende Transfektion wurde mit HiPerFect® (Qiagen) ein Lipidkomplex aus kationischen und neutralen Lipiden verwendet.

Tabelle 4.5: Transfektionsbedingungen für VEGF-R2-spezifische siRNA

Platte	Optimem	HiPerFect®	siRNA (10 µM)	Caco-2 - Medium
12-Well	100 µl	6 µl	0,6 µl	1000 µl

Zunächst musste der Transfektionsansatz angefertigt werden, indem Optimem, HiPerFect® und die VEGF-R2-spezifische siRNA (Qiagen) entsprechend Tabelle 4.5 in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt wurden. Nach 15 min wurden 100 µl des Transfektionsansatzes tröpfchenweise in jedes Well gegeben. Als Kontrolle wurden äquivalente Volumina Kontroll-siRNA eingesetzt, die identisch behandelt wurde. Zuletzt wurde die Kulturplatte leicht geschwenkt, um die siRNA zu verteilen. Die Transfektion wurde über drei Tage alle 24 Stunden wiederholt. Vor jeder Transfektion wurde das Medium gewechselt. Insgesamt 24 Stunden nach der letzten Transfektion wurde entweder die RNA isoliert (Abschnitt 4.2.4.2.1) oder ein Gesamtzelllysat hergestellt (Abschnitt 4.2.4.3.1).

4.2.4.2 Konventionelle PCR

4.2.4.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Minikits von Qiagen isoliert. Dazu wurde von den adhären gewachsenen Zellen das Medium abgenommen, bevor sie mit 2 ml PBS (PAA) gewaschen wurden. Ein Volumen von 350 µl eines Lysepuffers wurde in jedes Well gegeben. Der Puffer enthält 25 mM Natriumcitrat und 3,5 M Guanidinthiocyanat, das als chaotropes Salz die Proteine und Nukleinsäuren denaturiert. Desweiteren wurde zu dem Puffer 1 % β-Mercaptoethanol

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

zugesetzt (1). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Nunc) abgekratzt, die entstandene Zellsuspension in einen „Qiashredder“ pipettiert und bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Unter den Pufferbedingungen wird die doppelsträngige DNA an die Silica-Matrix des „Qiashredders“ adsorbiert und die einzelsträngige RNA gelangt in den Säulendurchfluss (2). Dieser wurde mit 350 µl 70 % (V/V) Ethanol vermischt (3). Die kompletten 700 µl wurden auf eine RNeasy-Säule gegeben und bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert. In Gegenwart entsprechender Alkoholkonzentrationen wird in diesem Schritt auch die RNA an die Silica-Matrix der RNeasy-Säulen gebunden, sodass hier der Säulendurchfluss verworfen werden konnte. Insgesamt wurden 700 µl eines Guanidinthiocyanat, TRIS, HCl sowie Ethanol enthaltenden Waschpuffers auf die RNeasy-Säule pipettiert und bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert, um kontaminierende Zellbestandteile zu entfernen. Die Silica-Matrix-gebundene RNA wurde durch zweimaliges Waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer salzfrei gewaschen. Anschließend wurde die RNeasy-Säule zweimal für je 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, um das Ethanol vollständig zu entfernen (4). Zuletzt wurden 35 µl RNase-freies Wasser auf die RNeasy-Säule pipettiert und bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert, um die RNA von der Säule zu eluieren (5). Die erhaltene RNA wurde entweder eingefroren oder direkt quantifiziert.

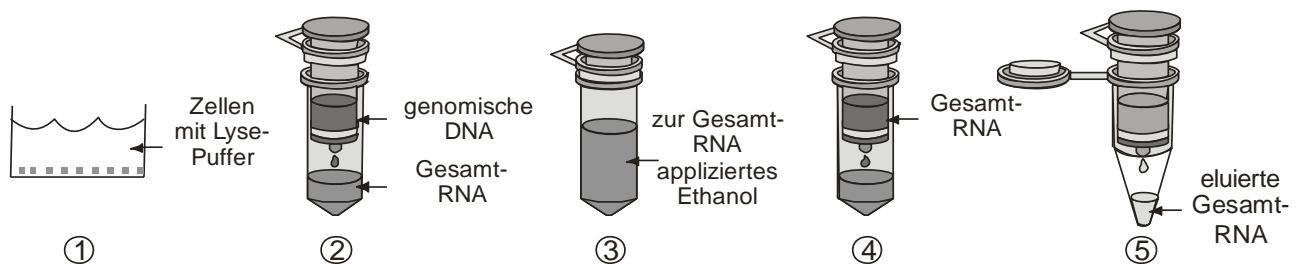


Abb. 4.6: Prinzip der RNA-Isolierung mit Hilfe des „RNeasy“ RNA-Isolierungskits

4.2.4.2.2 RNA-Quantifizierung

Der RNA-Gehalt wurde mit einem Nanodrop-Photometer (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) bestimmt. Dazu wurden 2 µl Probe auf das eine Ende eines unterbrochenen Glasfaserkabels pipettiert, deren anderes Ende von oben in die Probe eingetaucht wurde, sodass die Flüssigkeit die Lücke zwischen den beiden Enden des Glasfaserkabels schloss. Die Lücke hat mit 0,1 cm immer die gleiche Länge (d). Es wurde die Absorption eines Xenonblitzes durch die Probe bei 260 nm gemessen und diese mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz in die RNA-Konzentration (c) (ng/µl) umgerechnet. Dabei wurde von einem Extinktionskoeffizienten (e) von 40 ng x cm/µl ausgegangen.

$$c = \frac{A \times e}{d} \quad (4.1)$$

4.2.4.2.3 Reverse Transkription (RT)

Für die Generierung von cDNA wurden 0,5-2 µg RNA pro Ansatz zusammen mit 2 µl Oligo-dT-Primer (500 µg/ml) (Promega) in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit RNase-freiem Aqua bidest. (Qiagen) auf 11,4 µl aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min bei 70 °C im Thermomixer 5436 (Eppendorf) denaturiert und sofort danach für 1 min auf Eis gestellt. Zu jeder Probe wurden 11,6 µl Mastermix (Tabelle 4.6) gegeben und der Ansatz für 1,5 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank (Heraeus) inkubiert.

Tabelle 4.6: Mastermix für die Reverse Transkription

Volumen (µl)	Reagenz	Firma
5	MMLV-5x Puffer	Invitrogen
5	dNTPs (2,5 mM/dNTP)	Applied Biosystems
0,6	RNAsin (4 U/µl)	Promega
1	MMLV-RT (200 U/µl)	Invitrogen
11,6		

Die erhaltene cDNA wurde entweder eingefroren oder direkt für die PCR verwendet.

4.2.4.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Insgesamt wurden 2 µl der cDNA in ein PCR-Tube vorgelegt und 28 µl Mastermix hinzugefügt.

Tabelle 4.7: Mastermix für die konventionelle PCR

10-fach PCR-Puffer	MgCl ₂ (50 mM)	dNTP-Mix (2,5 mM / Base)	Taq-Polymerase (5 U/µl)	F/R-Primer (0,1 nmol/µl)	H ₂ O
3 µl	0,9 µl	2,4 µl	0,3 µl	je 0,15µl	20,8 µl

Die Ansätze wurden kurz zentrifugiert und in den entsprechend programmierten Cycler gestellt.

Tabelle 4.8: Bedingungen der konventionelle PCRs (*touch down PCR).

Amplifikat	Größe	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
β-Aktin	850 bp	95 °C; 60 s	58 °C; 45 s	72 °C; 30 s	14
VEGF-R1	305 bp	95 °C; 60 s	58 °C; 45 s	72 °C; 30 s	35
VEGF-R2*	126 bp	95 °C; 60 s	62 °C; 30 s	72 °C; 30 s	4
		95 °C; 60 s	60 °C; 30 s	72 °C; 30 s	36

4.2.4.2.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur Detektion der amplifizierten DNA wurden die 11 cm x 11 cm großen Gelplatten und der Gelkamm gründlich mit 70 % (V/V) Ethanol gereinigt und zusammengebaut. Das frisch angefertigte 10 prozentige Polyacrylamid-Gel (Tabelle 4.9) wurde zwischen die Platten pipettiert und der Kamm eingesteckt.

Tabelle 4.9: Zusammensetzung des Polyacrylamid-Gels für die DNA-Gelelektrophorese

PAA- Stocklösung	5x TBE-Puffer	H ₂ O	AMPS 10%	TEMED
10 ml	5ml	35 ml	150 µl	15 µl

Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde es in die Gelkammer gespannt und diese mit 0,5 x TBE-Laufpuffer aufgefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit einer Spritze gespült, um unpolymerisierte Gelreste zu entfernen. Insgesamt wurden 10 µl Probe mit 2 µl Auftragspuffer (5x) gemischt und auf das Gel aufgetragen. In eine weitere Tasche wurden 0,7 µl des Längenstandards (100 bp-Marker) pipettiert. Nach der Elektrophorese (45-75 min / 250 V) wurde das Gel in eine 0,01 (V/V) prozentige Ethidiumbromidlösung für 10 min gelegt. Das Ethidiumbromid interkalierte in die DNA-Fragmente, die so bei 254 nm im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden konnten.

4.2.4.3 Western Blot

4.2.4.3.1 Aufarbeitung des Gesamtproteinlysats und Proteingehaltsbestimmung

In 6- oder 12-Wellplatten ausgesäten Zellen wurde das Medium abgesaugt, bevor sie mit PBS gewaschen wurden. Das PBS wurde wieder abgesaugt und in jedes Well 300 µl RIPA-Puffer pipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Nunc) abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde mit dem Tube-Rotator (neolab) bei 4°C homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat bei 13.000 U/min für 5 min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Der Proteingehalt im Überstand wurde mit dem DC-Proteinassay (Biorad), der auf der von Lowry entwickelten Methode basiert [Lowry et al., 1951], bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Absorption bei 630 nm mit dem Opsys-Plattenphotometer von Dynex gemessen.

4.2.4.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Minigelplatten (8,5 cm x 8,5 cm) wurden mit Ethanol 70 % (V/V) gereinigt, mit Aqua bidest abgewaschen und getrocknet. Die ebenfalls gereinigten Spacer wurden zwischen den beiden Glasplatten mit Klammern befestigt. Das frisch angefertigte Trenngel (Tabelle 4.10) wurde bis 5 mm unterhalb der späteren Taschen zwischen die Platten pipettiert. Mit wenigen Tropfen Isopropanol 70 % (V/V) wurde das Trenngel überschichtet, um eine glatte und blasenfreie

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Gelkante zu erhalten und um das Gel vor Austrocknung zu schützen. Das Gel polymerisierte für ca. 30 min aus. Nachdem das Isopropanol abgegossen und das frisch hergestellte Sammelgel (Tabelle 4.10) auf das Trenngel pipettiert worden waren, wurde der Kamm in das noch flüssige Gel blasenfrei eingesetzt. Nach weiteren 30 min war auch das Sammelgel polymerisiert. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad), welche danach mit SDS-Puffer 1x gefüllt wurde, eingespannt. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit einer Spritze gespült, um unpolymersierte Gelreste zu entfernen.

Tabelle 4.10: Zusammensetzung des Gels für die SDS-PAGE

Gel	Aqua dest. (ml)	Gelpuffer I (ml)	Gelpuffer II (ml)	PAA 30% (ml)	AMPS 10 % (µl)	TEMED (µl)
Sammelgel 4 %	5,45	2,8		3,0	37,5	15,0
Trenngel 8 %	1,5		0,625	0,325	13,5	2,5

Die Proteinproben wurden mit Tris-Glycerin-SDS-Probenpuffer 2x (Invitrogen) und 5 µl Dithiotrietol, um die Reduktion der SH-Gruppen zu gewährleisten, auf eine Konzentration von 1,5-3 µg Protein / 10 µl Probe verdünnt. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert, bevor sie kurz auf Eis gestellt und zentrifugiert wurden. Insgesamt wurden 30 µl Probe und 0,8 µl eines Biotin-markierten Molekulargewichtsmarkers (Cell Signaling) aufgetragen. Die Stromstärke wurde auf 30 mA eingestellt. Sobald das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau die untere Gelkante erreicht hatte, konnte die Elektrophorese beendet werden.

4.2.4.3.3 „Wet-Blotting“

Die Polyvinylidendifluorid-Membran wurde zunächst 2 min in 96 % Methanol aktiviert und danach in Transferpuffer gewaschen. Die Blotting Schwämme wurden ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer genommen und das überschüssige Sammelgel abgeschnitten. Anschließend wurde die einzelnen Schichten entsprechend der Abbildung 4.7 luftblasenfrei aufeinander gelegt und die Blot-Kammer zusammengebaut. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,5 mA/cm² für 4 Stunden.

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

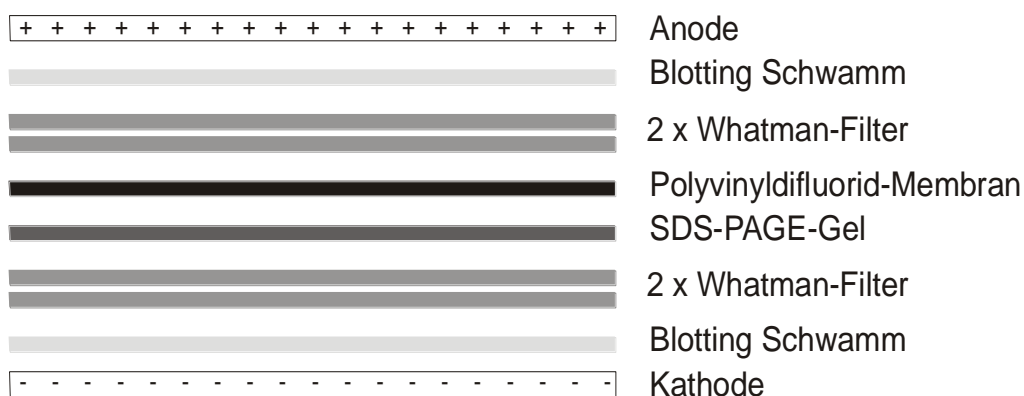


Abb. 4.7: Aufbau des Wet-Blots

4.2.4.3.4 Detektion der Proteinbanden

Zunächst wurde die Membran für 10 min in TBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde die Membran in einer fünfprozentigen Lösung von Milchpulver in TBS-T (Blotto) für zwei Stunden blockiert. Insgesamt mussten 5 ml einer Antikörper-Blottolösung (Tabelle 4.11) in entsprechender Verdünnung im 50 ml Zentrifugationsröhrchen angefertigt und die Membran über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmixer inkubiert werden. Danach wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges, jeweils zehnminütiges Waschen mit TBS-T auf dem Schüttler entfernt. Die darauffolgende Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der wiederum 1:2000 in Blotto verdünnt war, erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur im 50 ml Zentrifugationsröhrchen auf dem Rollenmixer.

Abb. 4.11: Bedingungen der im Western Blot verwendeten Antikörper

Antikörper	Art	Verdünnung	Sekundär-Antikörper
VEGFR-1 / flt-1	Kaninchen polyklonal	1:200	HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen
VEGFR-2 / KDR	Maus monoklonal	1:200	HRP-konjugierter Kaninchen anti-Maus
HSP 90	Kaninchen polyklonal	1:2000	HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen

Danach wurde die Membran wiederum dreimal für 10 min gewaschen. Die anschließende Detektion erfolgte mit einem Zwei-Komponenten-Chemilumineszenz-Verstärkersystem (Thermo Scientific) nach folgendem Prinzip:

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

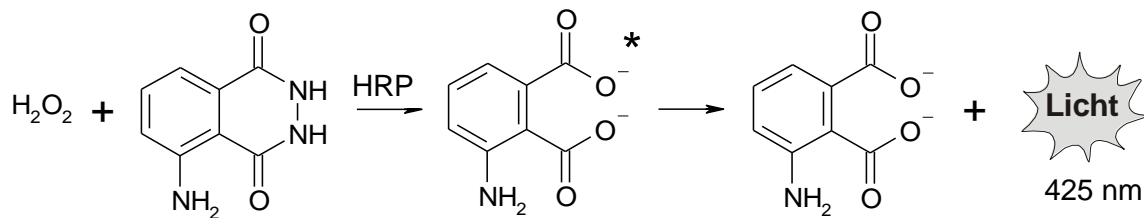


Abb. 4.8: Prinzip der Detektion von Proteinbanden im Western Blot, (* = angeregter Zustand)

Das zyklische Diacylhydrazid Luminol wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP) zu 3-Aminophthalat oxidiert. Dieses Zwischenprodukt fällt auf ein niedrigeres Energieniveau zurück, wobei die freiwerdende Energie in Form von Licht emittiert wird. Die beiden Komponenten des SuperSignal®-Kits wurden zu gleichen Teilen gemischt. Insgesamt wurden 300-500 μ l Reagenz auf eine Glasplatte pipettiert, die Membran durch die Flüssigkeit gezogen und weitere 500-1000 μ l Reagenz auf der Membran verteilt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte im ChemiDoc XRS System von Biorad mit der Quantity One 1-D Software.

Nach der Detektion wurde eine Ladekontrolle des Proteingehalts durch Detektion von HSP90 durchgeführt. Dazu wurden zunächst die gebundenen Antikörper mit Re-Blot Plus Strong (Millipore) von der Membran gewaschen. Anschließend wurde mit einem Antikörper gegen HSP 90 sowie dem entsprechenden Zweitantikörper wie oben beschrieben die Membran inkubiert.

4.2.4.4 Immunzytochemie

Je Well wurden 1×10^5 Caco-2-Zellen auf Deckgläschen (DG) in einer 12 Wellplatte ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Eine Glasplatte wurde mit Parafilm überzogen, in die entsprechende Anzahl an Feldern für die DG unterteilt und in eine Feuchtekammer gelegt. Das Medium wurde aus den Wells mit den DG abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die DG in einen Waschräger überführt. Die Fixierung erfolgte bei RT in Aceton + 0,3 % (V/V) H_2O_2 in einem Glasbehälter für 10 min. Der Träger mit den DG wurde für 5 min in PBS überführt und gewaschen. Es folgte die Blockierung mit 4 % (W/V) BSA in PBS für 20 min. Dazu wurden 100 μ l der Blockierlösung blasenfrei auf den Parafilm aufgebracht und die DG mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Um die DG abzulösen, wurde mit einer Pipette 150 μ l PBS unter die DG gespült. Die DG wurden zum Waschen in den Träger mit PBS gestellt. Die Blockierlösung wurde vom Parafilm entfernt und 100 μ l eine 20 μ g/ml-haltigen Lösung des VEGF-R2-Antikörpers (Acris) oder der Isotyp-Kontrolle pro DG auf den Parafilm aufgebracht. Anschließend wurden die DG mit der Zellseite nach unten aufgelegt und für 45 min bei RT inkubiert. Die DG wurden vom Parafilm abgelöst und dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem Tropfen EnVision-POX anti Maus für 45 min, bevor die DG erneut vom Parafilm abgelöst wurden, um sie für jeweils 5 min dreimal in PBS zu waschen. Die Substratlösung für die Peroxidase (1

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Tropfen Puffer, 2 Tropfen DAB Stock, 1 Tropfen Hydrogenperoxid-Lösung und Aqua dest. ad 2,5 ml) (Peroxidase Substrat Kit DAB, Vector Laboratories) wurde angefertigt und jeweils 100 µl auf den Parafilm aufgebracht. Nach 7 min wurden die DG in PBS überführt und dreimal für 5 min gewaschen. Die Kernfärbung wurde in 50 % Hämalaunlösung für 1 min durchgeführt. Die DG wurden solange in fließendem Leitungswasser gewaschen, bis keine blaue Farbe mehr ausgespült wurde. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen angewärmte Kaisers Glyceringelatine getropft und das DG mit der Zellseite nach unten aufgebracht. Die Zellen wurden im Axioplan 2-Mikroskop (Zeiss) betrachtet.

4.2.5 Detektion von Permeabilitätsveränderungen des Caco-2-Monolayers mittels TEER-Messung in Abhängigkeit von:

4.2.5.1 Chitosan

Chitosan wird in der Literatur schon seit langem die Fähigkeit zugesprochen, die Permeabilität des Caco-2-Monolayers durch Neuordnung von F-Aktin und dem Tight Junction Protein Zonulae occludentes zu erhöhen [Thanou et al., 2001]. Es wird in dieser Arbeit als Referenz zur Validierung des Caco-2-Monolayer-Modells und der Analytik verwendet. Eine Stammlösung wurde durch Einwaage von 100 mg Chitosan-HCl (Abb. 4.9) (Heppe Medical Chitosan GmbH) in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner) und Auffüllung mit 10 ml Wasser für die Chromatographie (Merck) angefertigt. Die Konzentration von Chitosan-HCl betrug somit 10 mg/ml. Ausgehend von der Stammlösung wurden Arbeitslösungen der Konzentrationen 0,1 und 0,001 % durch Verdünnung mit DMEM hergestellt. Caco-2-Monolayer, die wie unter 3.2.1 beschrieben 17 Tage kultiviert worden waren und einen $TEER_{308K} > 550 \Omega$ aufwiesen, wurden für das Experiment ausgewählt. Das Medium wurde in Well und Insert gewechselt und der TEER-Wert wie unter 3.2.4 erklärt gemessen. Sobald der TEER-Wert über 40 min konstant war, wurde das Medium im Insert durch Dekantieren entfernt und 500 µl der jeweiligen Chitosan-HCl-Lösung appliziert. Anschließend wurde der TEER-Wert und die Temperatur über eine Stunde alle 10 min dokumentiert, bevor die Zellen im Insert trypsiniert und ihre Viabilität mit Trypanblau überprüft wurde. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung (Fluka, Sigma) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und die Zahl der nichtgefärbten (lebenden) und gefärbten Zellen mit der Neubauer-Kammer bestimmt.

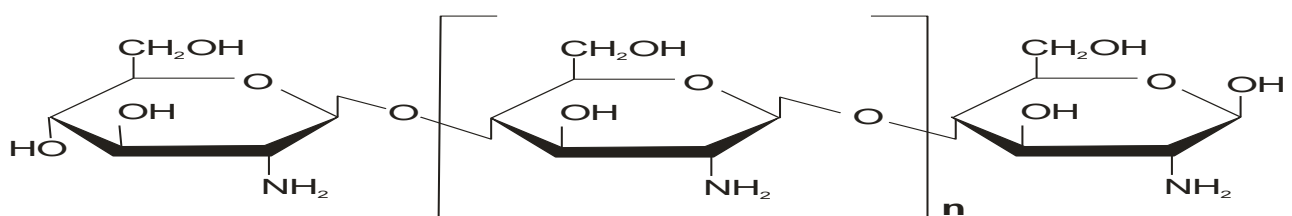


Abb. 4.9: Chitosan (Polymer von β -(1-4)-D-Glukosamineinheiten)

4.2.5.2 Bevacizumab, Rituximab und humanem IgG1

Die Caco-2-Monolayer wurden, wie unter 3.2.1 geschildert über 15-18 Tage kultiviert. Vor dem Versuch wurde das Medium in Well und Insert entnommen und zur späteren VEGF-Bestimmung bei -30 °C eingefroren. Nachdem die Inserts in ein 1,5 ml vorgewärmtes Medium enthaltendes Well eingebracht worden waren, wurden sie mit 0,5 ml Medium gefüllt. Ein Deckel, der über dem Insert eine Öffnung für die STX2 besaß, wurde auf die 12-Wellplatte aufgesetzt. Sobald der Versuchsaufbau für 1,5 Stunden im Brutschrank temperiert worden war, wurden der TEER-Wert und die Temperatur, wie unter 3.2.5.1 beschrieben, alle 20 min gemessen. Erst als der TEER-Wert über drei Messungen konstant war, konnte mit dem Versuch fortgefahren werden. Die Antikörper-Lösungen wurden dem in Tabelle 4.12 gezeigten Schema entsprechend in Well und Insert appliziert. Der TEER-Wert wurde unmittelbar vor jeder Antikörper-Applikation gemessen.

Tabelle 4.12A: Applikationsschema für Bevacizumab (Konzentration der Stammlösung: 25 mg/ml).

Zeit (min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390
Bevacizumab-Konzentration	mg/ml													
	0,25		2,5		25,0									
appliziertes Volumen (µl) in Well und Insert	10	20	10	20	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Bevacizumab-Konzentration (mg/ml) nach der Applikation	0,002	0,01	0,03	0,08	0,31	0,77	1,22	1,66	2,10	2,53	2,95	3,36	3,77	4,17

Tabelle 4.12B: Applikationsschema für Rituximab (Konzentration der Stammlösung: 10 mg/ml).

Zeit (min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390
Rituximab-Konzentration	mg/ml													
	10													
appliziertes Volumen (µl) in Well und Insert	10	10	20	20	50	50	50	50	50	50	50	100	100	100
Rituximab-Konzentration (mg/ml) nach der Applikation	0,11	0,22	0,43	0,64	1,13	1,61	2,06	2,49	2,9	3,3	3,68	4,39	5,05	5,67

Tabelle 4.12C: Applikationsschema für humanes IgG1 (Konzentration der Stammlösung: 25 mg/ml)

Zeit (min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390
humanes IgG1-Konzentration	mg/ml													
	0,25		2,5		25,0									
appliziertes Volumen (µl) in Well und Insert	10	20	10	20	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20
humanes IgG1-Konzentration (mg/ml) nach der Applikation	0,002	0,01	0,03	0,08	0,31	0,77	1,22	1,66	2,10	2,53	2,95	3,36	3,77	4,17

4.2.5.3 Tyrosinkinase-Inhibitor (SU5416)

Die Caco-2-Monolayer wurden, wie unter 3.2.1 geschildert über 15-18 Tage kultiviert. Die unter 3.3.3.2 beschriebenen Elektroden wurden zusammen mit den Thermoelementen in der Halterung fixiert und in mit Ethanol gefüllte Wells einer 12-Wellplatte für 45 min eingetaucht. Der Tyrosinkinase-Inhibitor (SU5416) (Abb. 4.10) wurde in DMSO gelöst, sodass eine Konzentration von 5 mg/ml resultierte. Das Medium wurde in Well und Insert erneuert, sodass sich 1,5 ml Medium im Well und 0,5 ml Medium im Insert befanden. Nachdem der Versuchsaufbau für 1,5 Stunden im Brutschrank temperiert worden war, wurden der TEER-Wert und die Temperatur, wie unter 3.2.4 erklärt, alle 20 min gemessen. Sobald der TEER-Wert über drei Messungen konstant war, wurden aus dem Insert 200 µl und aus dem Well 600 µl Medium entnommen und durch eine Lösung von SU5416 in DMSO und DMEM ersetzt. Es resultierte eine 100 mikromolare Lösung von SU5416 in Well und Insert. Äquivalente Volumina DMSO dienten als Kontrolle. Die TEER-Messung erfolgte alle 60 min, wie unter 3.2.4 beschrieben.

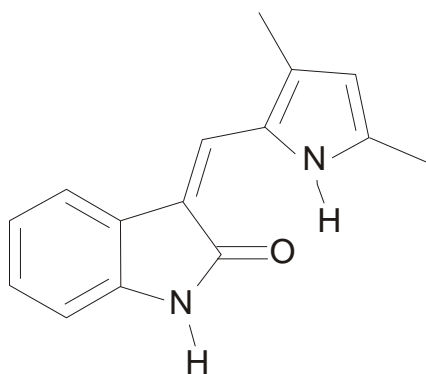


Abb. 4.10: Strukturformel des Tyrosinkinase-Inhibitors SU5416

4.2.5.4 siRNA gegen den VEGF-Rezeptor 2

4.2.5.4.1 Transfektion der Monolayer

Der Transfektionsansatz wurde wie in Abschnitt 4.2.4.1 beschrieben angefertigt. Insgesamt je drei 16 Tage alte Caco-2-Monolayer wurden mit VEGF-R2-oder Kontroll-siRNA transfiziert, nachdem das Medium (DMEM mit 4,5 g Glukose pro Liter, 10 % FCS) im Well (1,5 ml) und Insert (0,5 ml) gewechselt worden war. Dazu mussten 40 µl Transfektionsansatz tröpfchenweise auf das Medium im Insert und 60 µl in das Well pipettiert werden. Zuletzt wurde die Kulturplatte leicht geschwenkt, um die siRNA zu verteilen. Die Transfektion wurde über drei Tage alle 24 Stunden wiederholt. Vor jeder Transfektion wurde das Medium gewechselt.

4.2.5.4.2 Applikation von VEGF

Insgesamt 24 Stunden nach der letzten Transfektion wurde der TEER-Wert bestimmt. Dazu wurden, unmittelbar nachdem die Monolayer aus dem Brutschrank genommen worden waren, der TEER-Wert mit einer sterilen STX2 unter dem Laminar Flow gemessen. Gleichzeitig wurde die Temperatur des Mediums dokumentiert, um später *tc*TEER-Werte (Abschnitt 3.3.5.3) berechnen zu können. Die Messungen erfolgten für jeden Monolayer in Doppelbestimmung. Im Anschluss wurden 100 µl Medium aus dem Insert gegen 100 µl Medium, dem 6 ng VEGF zugesetzt waren, ausgetauscht. Es resultierte eine VEGF-Konzentration im Insert von 12 ng/ml. TEER und Temperatur wurden nach drei Stunden und in der Folge fünfmal alle sechs Stunden gemessen.

4.2.6 Detektion der Permeabilitätsänderung von FITC-Dextran 4 kDa

4.2.6.1 Kalibrierung einer Lösung von FITC-Dextran 4 kDa in PBS

Zur Durchführung einer quantitativen Bestimmung von Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran 4 kDa (Sigma) in PBS (PAA) mussten zunächst Stamm- und Arbeitslösungen hergestellt werden. Die Stammlösung wurde durch Einwaage von 5 mg FITC-Dextran 4 kDa in ein Zentrifugationsröhrchen (50 ml) (Greiner) und Auffüllung mit 5 ml PBS hergestellt. Die Konzentration von FITC-Dextran 4 kDa betrug somit 1,0 mg/ml. Ausgehend von der Stammlösung wurden dann Arbeitslösungen der Konzentrationen 1000, 500, 100, 50, 10, 5 und 1 ng/ml durch Verdünnung mit PBS angefertigt. Je 100 µl der Arbeitslösungen wurden auf eine 96-Wellplatte (Greiner) pipettiert und die Dextran-Konzentration in den Proben mit einem Fluorometer (Infinite F200, Tecan, Männedorf, Schweiz) mit den in Tabelle 4.13 beschriebenen Einstellungen bestimmt. Während der Kalibrierung wurden die Stammlösungen vor Licht geschützt aufbewahrt.

Tabelle 4.13: Einstellung des Fluorometers zur Quantifizierung von FITC-Dextran 4 kDa in PBS

Anregungs-		Emissions-		Verstärkung	Messungen (Anzahl)
wellenlänge	filterbreite	wellenlänge	filterbreite		
(nm)		(nm)			
485	20	535	25	100	25

4.2.6.2 Effekte von Bevacizumab oder humanem IgG1 auf die Permeabilität von FITC-markierten Dextran 4 kDa

Durch Einwaage von 5 mg FITC-Dextran 4 kDa in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner) und Auffüllung mit 10 ml PBS, wurde eine Lösung der Konzentration 0,5 mg/ml hergestellt. Caco-2-Monolayer mit einem $TEER_{308K} > 500 \Omega$ wurden gewaschen, indem das apikale Medium dekantiert und das Insert in ein 1,5 ml vorgewärmtes PBS enthaltendes Well eingebracht wurde. Ein Volumen von 0,5 ml PBS wurde vorsichtig in das Insert pipettiert und der Monolayer bei leichtem Schütteln (IKA-Schüttler 100 U/min) im Brutschrank für 20 min gewaschen. Das PBS wurde aus dem Insert entfernt, bevor dieses in das mit 1,0 ml PBS gefüllte Well einer 12-Wellplatte überführt wurde. Ohne die Integrität des Monolayers zu beeinträchtigen, wurden 700 μ l der FITC-Dextran-Lösung in das Insert pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurde das Insert aus dem Well entfernt und die Flüssigkeit im Well mit einer Pipette homogenisiert. Es wurden dreimal 100 μ l der Flüssigkeit in je ein Well einer 96-Wellplatte (Greiner) pipettiert. Die Dextran-Konzentration in den Proben wurde wie unter 4.2.6.1 beschrieben bestimmt. Das entnommene Volumen wurde umgehend durch vorgewärmtes PBS ersetzt. Auch nach zwei und drei Stunden wurden Proben genommen. Nach drei Stunden wurde das entnommene Medium nicht durch PBS ersetzt. Stattdessen wurden 200 μ l physiologischer NaCl-Lösung (Kontrolle), Bevacizumab oder humanes IgG1 in Well und Insert und weitere 100 μ l in das Well gegeben. Das Volumen im Well blieb folglich konstant, während das Volumen im Insert auf 900 μ l anstieg (Abb. 4.11). Die Endkonzentration von Bevacizumab und humanem IgG1 betrug 2 mg/ml. Nach insgesamt vier Stunden wurden drei Proben mit jeweils 100 μ l aus dem Well entnommen und fluorimetrisch vermessen.

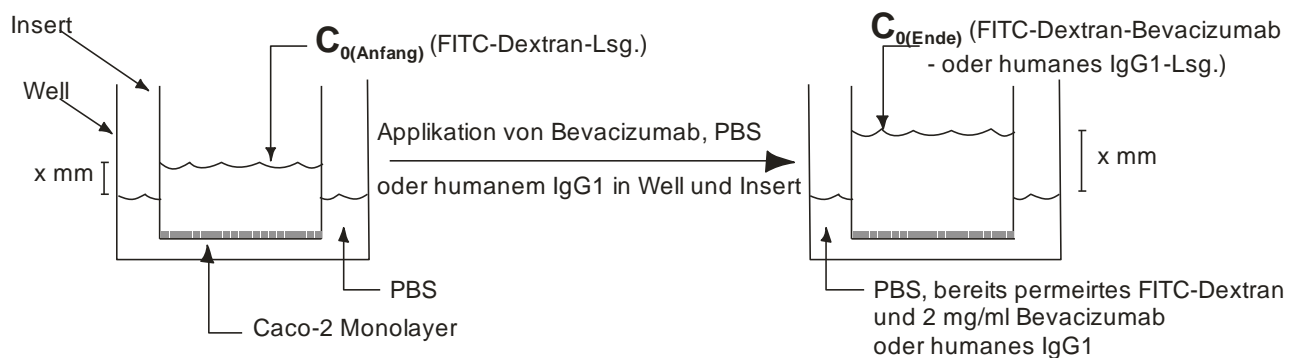


Abb. 4.11: Versuchsbedingungen während der Detektion der FITC-Dextran-Permeabilität in Gegenwart von Bevacizumab oder humanem IgG1

4.2.6.2.1 Bestimmung der Eigenfluoreszenz von Bevacizumab und humanem IgG1

Ausgehend von den Stammlösungen (25 mg/ml) wurden Arbeitslösungen der Konzentrationen 3, 2 und 1 mg/ml durch Verdünnung mit PBS angefertigt. Je 100 µl der Arbeitslösungen wurden auf eine 96-Wellplatte (Greiner) pipettiert und die Fluoreszenz der Proben mit einem Fluorometer (Infinite F200, Tecan, Männedorf, Schweiz) mit den in Tabelle 4.13 beschriebenen Einstellungen bestimmt.

4.2.6.2.2 Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{APP})

In allen Experimenten wurde die Permeabilität von Substanzen über einen Monolayer bestimmt, indem die kumulativ permeierte Konzentration der Substanz gegen die Zeit der Probennahme aufgetragen wurde, sodass sich eine Gerade mit definierter Steigung ergab. Der Permeabilitätskoeffizient wurde anschließend mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$P_{APP} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{1}{A \times C_0} \quad (4.2)$$

wobei $\Delta Q/\Delta t$ der Steigung der oben beschriebenen Geraden ($\mu\text{g/s}$), A der Oberfläche des Inserts (cm^2) und C_0 der Ausgangskonzentration in der Donor-Kammer entsprach. Wie Abbildung 4.11 verdeutlicht, änderte sich $C_{0(\text{Anfang})}$ während des Versuchs, da durch die Applikation von Bevacizumab oder humanem IgG1 in das Insert die FITC-Dextran-Konzentration vermindert wurde ($C_{0(\text{Ende})}$). Um $C_{0(\text{Anfang})}$ und $C_{0(\text{Ende})}$ zu bestimmen, wurde die unter 4.2.6.2 hergestellte FITC-Dextran-Lösung vor dem Versuch und nach entsprechender Verdünnung mit Bevacizumab und humanem IgG1 im Reaktionsgefäß fluorometrisch vermessen.

4.2.7 Leitfähigkeitsuntersuchungen

4.2.7.1 Bestimmung der Zellkonstanten der Messzelle

Nachdem eine 0,01 molare Kaliumchlorid-Lösung (CertiPur, Merck, Darmstadt) mit einer definierten Leitfähigkeit von 1,41 mS/cm im Wasserbad auf 25 °C erwärmt worden war, wurden je 2 ml in die Wells einer 12-Wellplatte pipettiert. Die unter 3.3.3.2 beschriebenen Elektroden wurden in der unter 3.3.3.3 dargestellten Halterung fixiert. Es wurde je ein Typ K Thermoelement (Votcraft, Hirschau) durch die Pore in der Elektrode in das Medium eingetaucht und die Temperatur mit einem digitalem Thermometer (K102, Voltcraft) gemessen. Die gesamte Apparatur wurde in den Brutschrank gestellt und der Widerstand bei 25 °C bestimmt. Mit Gleichung 4.3 konnte aus den gemessenen Widerständen (R) und der bekannten Leitfähigkeit (σ) die Zellkonstanten (K) der drei Elektroden errechnet werden.

$$\sigma(\Omega^{-1} \times \text{cm}^{-1}) \times R(\Omega) = K(\text{cm}^{-1}) \quad (4.3)$$

Die Zellkonstante ist, wie in Abbildung 4.12 gezeigt, der Quotient aus dem Abstand der Elektroden und ihrer Fläche.

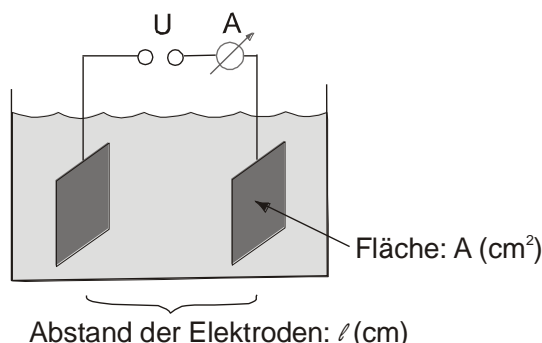


Abb. 4.12: Schematischer Aufbau der Messzelle

4.2.7.2 Bestimmung der Leitfähigkeit von Kulturmedien und malignen Ergüssen

Es wurde die Leitfähigkeit von vier verschiedenen Ergüssen (459, 671, 837 und 841 (Tabelle 7.1, Seite 147), denen unterschiedliche Primärerkrankungen zugrundelagen, bestimmt. Dazu wurden die Ergüsse zunächst durch einen 0,2 μm Filter (Minisart, Sartorius) mit einer 10 ml Spritze (BD Discardit) passiert. Anschließend wurden 2 ml filtrierter Erguss in die benötigten Wells pipettiert und der Widerstand wie unter 4.2.7.1 erläutert bestimmt. Parallel wurde der Widerstand verschiedener Lösungen von DMEM (Tabelle 4.14) gemessen.

Tabelle 4.14: Verschiedene Lösungen von DMEM, die bei der Leitfähigkeitsmessung eingesetzt wurden

DMEM mit						
0,8 mg/ml				100 μM	0,1 %	10 %
Bevacizumab	Rituximab	Trastuzumab	humanem IgG1	SU5416	Chitosan	FCS

Die Stammlösungen von Mabthera[®] (Rituximab) (10 mg/ml), Herceptin[®] (Trastuzumab) (20 mg/ml), sowie Avastin[®] (Bevacizumab) und humanem IgG1 (25 mg/ml) wurden mit DMEM auf 0,8 mg/ml verdünnt. Weiterhin wurden 5 mg des Tyrosinkinase-Inhibitors SU5416 in 1 ml DMSO gelöst und anschließend mit DMEM verdünnt, sodass eine 100 mikromolare Lösung resultierte. Eine 0,1 (V/V) prozentige Chitosan-Lösung wurde durch Einwaage von 100 mg Chitosan in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen, Auffüllung mit 10 ml Wasser für die Chromatographie (Merck) und Verdünnung der so erhaltenen Lösung mit DMEM angefertigt. Der Widerstand der in Tabelle 4.13 aufgeführten Lösungen wurde wie unter 4.2.7.1 beschrieben gemessen. Neben DMEM wurde auch der Widerstand von HPDE-Medium und RPMI (Tabelle 7.2, Seite x) sowie von PBS (PAA)

bestimmt. Aus den gemessenen Widerständen und unter Berücksichtigung der unter 4.2.7.1 bestimmten Zellkonstante konnte mit Gleichung 4.4 die spezifische Leitfähigkeit der Flüssigkeiten berechnet werden.

$$\frac{K(cm^{-1})}{R(\Omega)} = \sigma(\Omega^{-1} \times cm^{-1}) \quad (4.4)$$

4.2.8 Detektion von Permeabilitätsveränderungen des Caco-2-Monolayers mittels TEER in Abhängigkeit von Ergüssen

4.2.8.1 Bestimmung des VEGF-Gehaltes vor und nach Filtration

Die Ergüsse wurden durch Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm passiert. Der VEGF-Gehalt wurde anschließend in filtrierten und unfiltrierten Ergüssen mittels ELISA (Abschnitt 4.2.2) bestimmt.

4.2.8.2 Bestimmung von Permeabilitätsveränderungen

Die Caco-2-Monolayer wurden, wie unter 3.2.1 geschildert über 15-18 Tage kultiviert. Nachdem die zuvor entleerten Inserts in ein 1,5 ml vorgewärmtes Medium enthaltendes Well eingebracht worden waren, wurden sie mit 0,5 ml Medium gefüllt. Sobald der Versuchsaufbau für 1,5 Stunden im Brutschrank temperiert worden war, wurden der TEER-Wert und die Temperatur, wie unter 3.2.4 beschrieben, alle 20 min gemessen. Erst als der TEER-Wert über drei Messungen konstant war, wurde mit dem Versuch fortgefahren, indem 750 µl Medium aus dem Well und 200 µl Medium aus dem Insert gegen die in Tabelle 4.15 angegebenen Lösungen ausgetauscht wurden.

Tabelle 4.15: Applikationsschema verschiedener Versuchsreihen zur Bestimmung des Effektes von Ergüssen auf die Permeabilität des Caco-2-Monolayers. Die den Ergüssen zugrundeliegenden Primärdiagnosen sind in Tabelle 7.1 auf Seite 147 zusammengefasst.

Versuchsreihe	Erguss	Elektrode		
		1	2	3
1	641	DMEM	Erguss	Erguss
2	641	DMEM	DMEM	Erguss
3	671	Erguss	Erguss	DMEM
4	841	Erguss	DMEM	Erguss:DMEM (1:3)
5	628	DMEM	Erguss: PBS (15:1)	Erguss: Bevacizumab (25 mg/ml) (15:1)

4.2.9 Dokumentation des Wachstums von Caco-2-Monolayern

Je $2,5 \times 10^5$ Caco-2-Zellen wurden in vier 12-Well-Inserts ausgesät. In den darauffolgenden 19 Tagen wurden alle 24 Stunden der TEER-Wert mit der dazu in 70 % (V/V) Ethanol unter dem Laminar Flow aufbewahrten STX2 bestimmt. Das Medium wurde alle 3 Tage in Well und Insert gewechselt.

4.2.10 Bestimmung der Permeabilität von Bevacizumab und Paracetamol über den Caco-2-Monolayer

4.2.10.1 Kalibrierung von Bevacizumab und humanem IgG1 mit dem „Easy Titer IgG Assay“

Zur Bestimmung der Bevacizumab-Konzentration wurde der „Easy Titer IgG Assay“ von Pierce verwendet. Die Untersuchung basiert darauf, dass monodisperse Polystyren-Beads, die Licht bei 340 nm absorbieren, mit einem Anti-IgG-Antikörper beschichtet sind. Abbildung 4.13 zeigt, dass die Beads in Gegenwart von IgG aggregieren und die Absorption abnimmt. Hohe IgG-Konzentrationen haben eine niedrige Absorption zur Folge, während ein niedriger IgG-Gehalt in einer hohen Absorption resultiert.

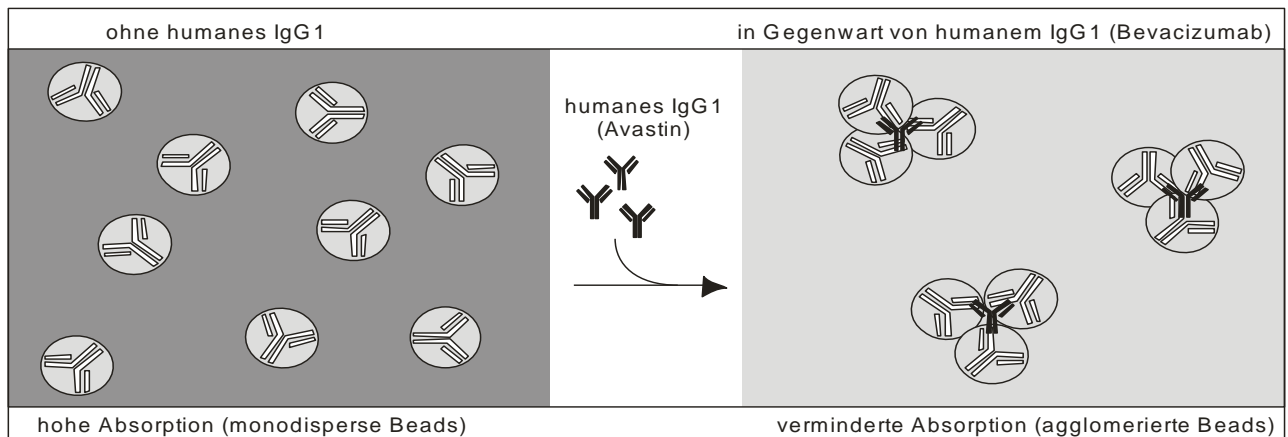


Abb. 4.12: Prinzip des „Easy Titer IgG Assay“ zur quantitativen Bestimmung von Bevacizumab

Für die quantitative Analytik wurden sowohl von humanem IgG1 als auch von Bevacizumab Standardlösungen der Konzentrationen 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 ng/ml durch Verdünnung mit PBS hergestellt. Die mit Anti-IgG-Antikörpern beschichteten Beads wurden mit dem Vortexer gründlich dispergiert und je 20 μ l in die benötigte Anzahl an Wells pipettiert. In diese Wells wurden auch 20 μ l Probe oder Standard gegeben und die Mikrotiterplatte 5 min gevortext (1300 /min) (MS2 Minishaker IKA). Nachdem 100 μ l Blockier-Puffer in die Wells gegeben worden waren, wurde die Platte erneut 5 min gevortext (800 /min). Vor der Absorptionsmessung bei 340 nm im Carry 50 Mikroplattenphotometer mussten alle Luftblasen entfernt werden.

4.2.10.2 Bestimmung der Permeabilität von Bevacizumab über den Caco-2-Monolayer

Es wurden $2,5 \times 10^5$ Caco-2-Zellen in 0,5 ml Medium (Tabelle 7.2, Seite 147) auf 12-Well-Inserts ausgesät, sodass die Monolayer am Tag des Experimentes 21 Tage alt waren. Das Well wurde mit 1,5 ml Medium gefüllt. Unmittelbar vor dem Experiment wurde die Donor-Lösung hergestellt, indem die Bevacizumab-Stammlösung (25 mg/ml) mit PBS auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt wurde. Ein Monolayer mit einem $TEER_{308K} > 600 \Omega$ wurde gewaschen, indem das Medium im Insert dekantiert und der Monolayer in ein 1,5 ml vorgewärmtes PBS enthaltendes Well eingebracht wurde. Ein Volumen von 0,5 ml PBS wurde vorsichtig in das Insert pipettiert und der Monolayer bei leichtem Schütteln (IKA-Schüttler 100 U/min) im Brutschrank für 20 min gewaschen. Anschließend wurde der TEER-Wert bei 308 K mit einer STX2 erneut bestimmt. Das PBS wurde aus dem Insert entfernt, ohne dabei die Integrität des Monolayers zu beeinträchtigen. Die Transport-Experimente wurden sowohl von apikal nach basolateral (AB) als auch in umgekehrter Richtung (BA) durchgeführt. Hydrostatische Unterschiede wurden vermieden, indem im Fall von (AB)-Experimenten 0,4 ml Donor-Lösung in das Insert und 1,2 ml PBS in das Akzeptorkompartiment pipettiert wurden. Eine Probe der Donor-Lösung wurde für die spätere Konzentrationsbestimmung (C_0) bei 6 °C im Kühlschrank gelagert. Die Monolayer wurden bei 200 U/min auf dem Orbitalshaker für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Insgesamt wurden 900 µl Probenvolumen aus dem Well und 300 µl aus dem Insert entnommen und im Kühlschrank zur späteren Gehaltsbestimmung aufbewahrt. Der TEER-Wert wurde gemessen, nachdem die entnommenen Volumina wieder durch vorgewärmtes PBS ersetzt worden waren. Die Konzentration in den Proben wurde wie unter 4.2.10.1 beschrieben bestimmt. Der Permeabilitätskoeffizient wurde mit Gleichung 4.2 berechnet.

4.2.10.3 Bestimmung der Permeabilität von Paracetamol über den Caco-2-Monolayer

Das durch den Caco-2-Monolayer permeierte Paracetamol wurde mittels HPLC-Analytik quantifiziert.

HPLC-System: Waters™ 600 Pumpe, Waters™ 600 Controller, Waters™ 712 Autosampler, Waters™ 2487 Absorptions-Detektor, Integrator EZChrom Elite Software Version 2.8.3 (science software Inc., San Ramon, CA,USA)

Stationäre Phase: Supelcosil LC-18 (15 cm x 4,6 mm), Partikelgröße 5 µm, Vorsäule: Phenomenex C-18

Mobile Phase: Aqua bidest. 80 % (V/V), Methanol 20 % (V/V), ad pH 2,8 mit 85 prozentiger Phosphorsäure

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Detektion:	245 nm (Absorption), wurde zuvor an einer 80 µM Lösung von Paracetamol mit dem Carry 50 Mikroplattenreader (Varian) bestimmt
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Retentionszeit:	270 Sekunden
Begasung:	N ₂

Das mit 85 prozentiger Phosphorsäure auf pH 2,8 angesäuerte Aqua bidest. wurde durch einen 0,45 µm Membranfilter (Whatmann) mit einem Durchmesser von 47 mm filtriert und anschließend in einem Ultraschalbad (Bandelin) für 20 min entgast. Zuletzt wurden 20 % (V/V) Methanol zugesetzt.

4.2.10.3.1 Kalibrierung einer Lösung von Paracetamol in PBS

Um die Konzentration von Paracetamol (Merck) in PBS (PAA) mit der HPLC zu bestimmen, musste zunächst eine Stammlösung durch Einwaage von 100 mg Paracetamol in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner) und Auffüllung mit 30 ml PBS angefertigt werden. Die Konzentration von Paracetamol betrug somit 3,3 mg/ml. Ausgehend von der Stammlösung wurden dann Arbeitslösungen der Konzentrationen 50; 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5 und 0,1 µg/ml durch Verdünnung mit PBS angefertigt.

4.2.10.3.2 Bestimmung der Permeabilität von Paracetamol über den Caco-2-Monolayer

Die Permeabilität von Paracetamol wurde in ähnlicher Weise wie unter 4.2.10.2 für Bevacizumab beschrieben bestimmt. Als Donor-Lösung wurde eine 2 mg/ml Paracetamol-PBS-Lösung eingesetzt. Die Permeabilität wurde über zwei Stunden bestimmt.

4.2.10.3.3 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Es wurden $2,5 \times 10^5$ Caco-2-Zellen in die Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und für 72 Stunden kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und je 1 ml der unter 4.2.10.3.1 hergestellten Paracetamol-Lösungen in die Wells pipettiert. Nach zwei Stunden wurden die Paracetamol-Lösungen wieder entnommen, zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus) und mittels HPLC quantifiziert. Die Wiederfindungsrate wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$WFR (\%) = \frac{\text{gefundene Paracetamol - Konzentration}}{\text{eingesetzte Paracetamol - Konzentration}} \times 100\% \quad (4.5)$$

4.3 Ergebnisse

Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der t-Test nach Student in Excel durchgeführt.

4.3.1 Klinisches Material

In den meisten Ergüssen kommt es nach der Punktion zu einer spontanen Fibrinbildung.

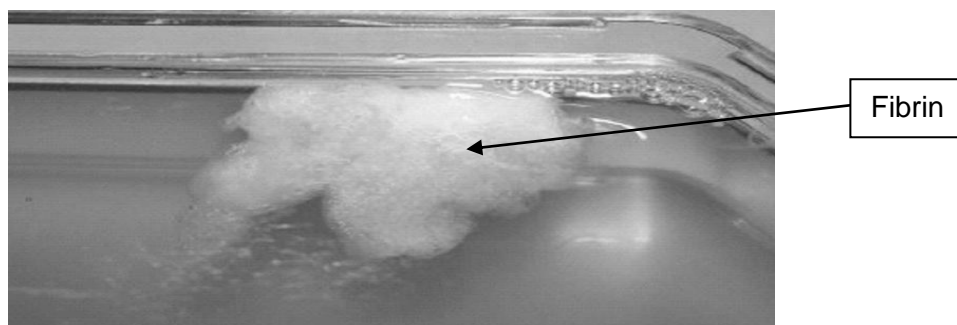


Abb. 4.14: Fibrinbildung in Ergüssen

4.3.2 VEGF-Konzentration in:

4.3.2.1 Ergüssen und Sera

Die Ergebnisse der VEGF-Konzentrationen im Serum und im Erguss von 35 Patienten mit benignen und malignen Primärerkrankungen sind in Tabelle 4.16 und Abbildung 4.15 korreliert.

Tabelle 4.16: Korrelation der VEGF-Konzentrationen im Serum und Erguss (n=35)

	pg/ml	[VEGF]-serum	
		< 920	> 920
[VEGF]-effusion	< 1425	19 (a)	5 (b)
	> 1425	5 (c)	6 (d)

Mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson (www.quantitativeskills.com/sisa/) wurde die Unabhängigkeit der VEGF-Konzentration im Serum von der VEGF-Konzentration im Erguss bestimmt. Die Prüfgröße wurde mit Gleichung 4.6 berechnet.

$$Chi^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a + b)(a + c)(c + d)(b + d)} \quad (4.6)$$

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit des Tests von 5 % sind die Merkmale unabhängig voneinander, wenn $\text{Chi}^2 > 3,841$ ist. Die VEGF-Konzentrationen im Serum und im Erguss sind mit einem Chi^2 -Wert von 3,978 ($p < 0,05$) unabhängig voneinander. So kommt es zum Beispiel vor, dass in 15 % der Ergüsse sehr hohe VEGF-Konzentrationen (Mittelwert: 2017 pg/ml) gemessen wurden, bei denen im dazugehörigen Serum ein eher niedrigerer VEGF-Gehalt (611 pg/ml) detektiert wurde (Abbildung 4.15, Feld A). Desweiteren verdeutlicht Abbildung 4.15, dass bei zugrundeliegender benigner Erkrankung die VEGF-Spiegel sowohl im Erguss als auch im Serum deutlich niedriger sind als dies bei malignen Grunderkrankungen der Fall ist.

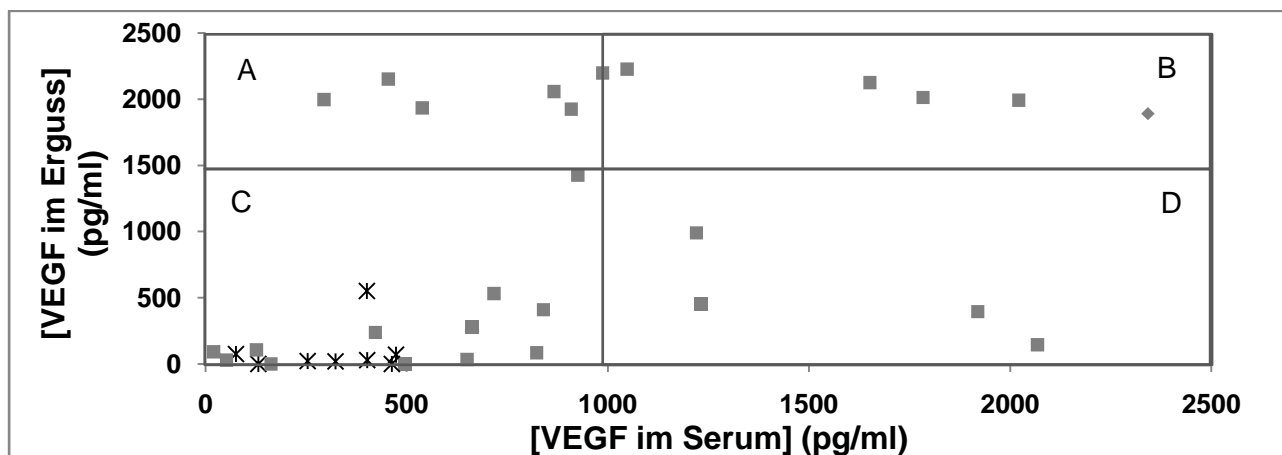


Abb. 4.15: Korrelation der VEGF-Konzentrationen im Serum und Erguss (n=35) (* = benigner Grunderkrankung, ■ = maligne Grunderkrankung)

In Abbildung 4.16A wird zwischen benignen (9 Patienten) und malignen (26 Patienten) Primärerkrankungen unterschieden und zwar sowohl hinsichtlich der VEGF-Konzentration im Serum als auch im Erguss. Es zeigt sich, dass die VEGF-Konzentration in Serum und Erguss bei malignen Grunderkrankungen (Mittelwert: 1028 ± 801 pg/ml) gegenüber benignen Grunderkrankungen (Mittelwert: 252 ± 242 pg/ml) deutlich erhöht ist. Daneben lässt sich erkennen, dass die VEGF-Spiegel innerhalb der einzelnen Gruppen sehr heterogen sind. Aus der Grafik kann ferner abgeleitet werden, dass bei malignen Primärerkrankungen die VEGF-Konzentration im Erguss höher ist als im Serum. Dieses Ergebnis wird deutlicher, wenn berücksichtigt wird, dass sich das Verhältnis bei benignen Grunderkrankungen gegenteilig darstellt. Abbildung 4.16B zeigt, dass die VEGF-Konzentration im Aszites (1635 ± 693 pg/ml) signifikant höher ist als in Pleuraergüssen (634 ± 839 pg/ml) ($p < 0,002$).

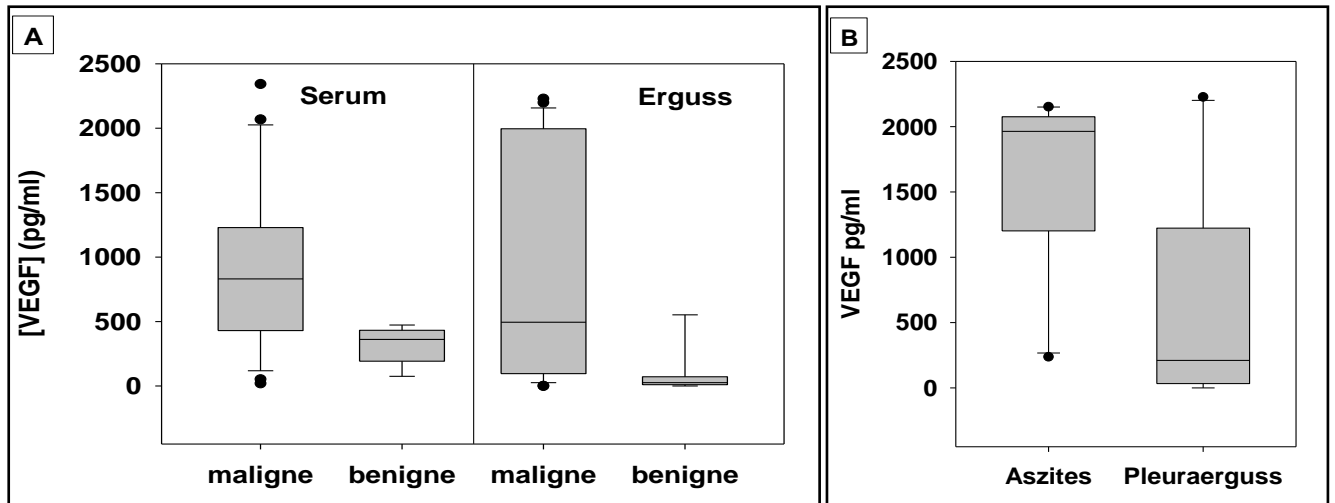
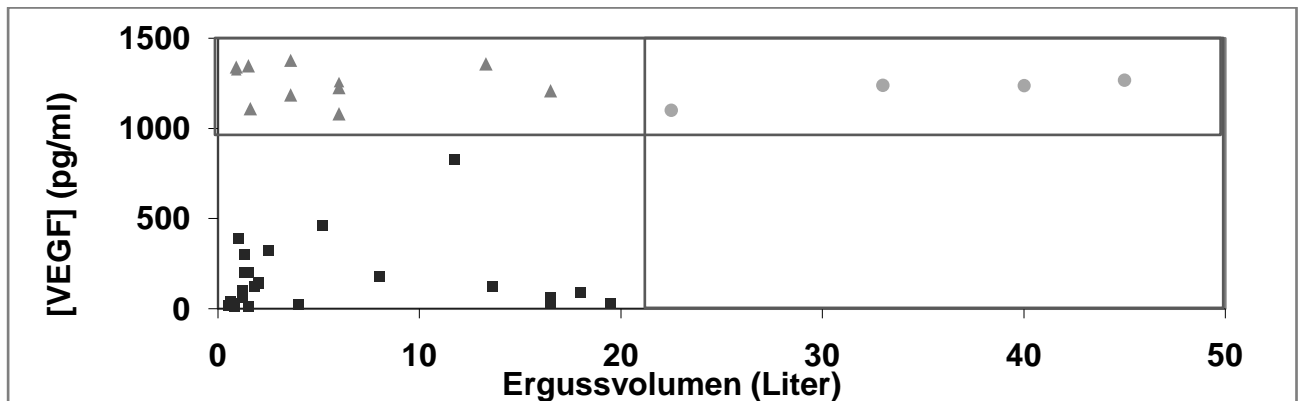


Abb. 4.16: (A) VEGF-Konzentrationen im Erguss und Serum in Abhängigkeit von der Dignität der Primärerkrankung. (B) VEGF-Konzentrationen in Aszites und Pleuraerguss

In Abbildung 4.17 wird die VEGF-Konzentration mit dem kumulativen Ergussvolumen korreliert. Es wird deutlich, dass kumulative Erguss-Volumina > 20 Liter nur bei Patienten mit VEGF-Spiegeln im Erguss > 1000 pg/ml auftreten ($p=0,015$). Zur Berechnung des kumulativen Ergussvolumens die Ergusshäufigkeit mit durchschnittlichen Ergussvolumen multipliziert.



		Ergussvolumen (Liter)	
		< 20	> 20
VEGF-Konzentration (pg/ml)	> 1000	11	4
	< 1000	25	0

Abb. 4.17: Korrelation der VEGF-Spiegel im Erguss mit dem kumulativen Ergussvolumen (n=35).

4.3.2.2 Überständen von Patientenzellen

Im Kulturüberstand von primären Patientenzellen, die aus zehn verschiedenen Ergüssen gewonnen worden waren, wurde der VEGF-Gehalt bestimmt. Dazu wurde bei drei verschiedenen primären Patientenzellen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden das Medium entnommen. Wie

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Tabelle 4.17 veranschaulicht, zeigten alle drei untersuchten Patientenzellen eine deutliche Freisetzung von VEGF. Im zellfreien Kulturmedium wurde kein VEGF nachgewiesen.

Tabelle 4.17: VEGF-Freisetzung von Patientenzellen (NSCLC = Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)

Primärerkrankung	Leberzirrhose	Mamma-Ca (841)	NSCLC (459)
VEGF-Konzentration (fg/Zelle)	0,41 ± 0,09	0,76 ± 0,05	5,52 ± 2,98

Für sieben weitere Patientenzellen wurde die Freisetzungskinetik von VEGF bestimmt. Abbildung 4.18 zeigt für P800-, P815- und P826-Zellen, eine deutliche VEGF-Sekretion. Bei P715-, P747-, P742- und P811-Zellen erreichte die VEGF-Freisetzung unter den Versuchsbedingungen nicht die Nachweisgrenze des ELISAs von 15,6 pg/ml. Die VEGF-Freisetzung pro Zelle beträgt nach 120 Stunden $8,1 \pm 0,8$ fg für P815 sowie $3,6 \pm 0,3$ fg für P826 und 1,5 fg für P800. Die den Patientenzellen zugrundeliegenden Primärerkrankungen sind in Tabelle 7.1 auf Seite 147 zusammengefasst. „P“ kennzeichnet, dass es sich um aus Ergüssen isolierte „Patientenzellen“ handelt. Die Nummer benennt den Erguss, aus dem die Zellen gewonnen wurden.

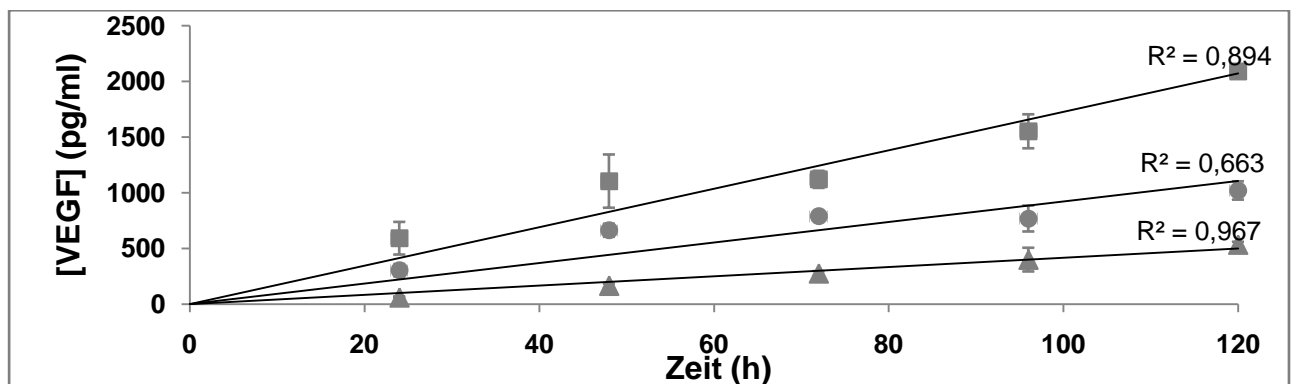


Abb.4.18: VEGF-Freisetzungskinetik von Patientenzellen, die aus Ergüssen mit unterschiedlichen Primärerkrankungen isoliert wurden: ■ Ovarial- Ca (815), ● Pankreas-Ca (826) und ▲ Ovarial- und Mamma-Ca (800).

4.3.2.3 in den Überständen von Zelllinien

In dem Säulendiagramm 4.19 wird die VEGF-Freisetzungskinetik verschiedener Tumorzelllinien gezeigt. Zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer VEGF-Freisetzung nachgewiesen. Nach 120 Stunden betrug die VEGF-Sekretion pro Zelle bei HPDE 0,0066 pg/Zelle, bei BxPC3 0,0068 pg/Zelle, bei Caco-2 0,0074 pg/Zelle und bei Panc-89 0,0042 pg/Zelle.

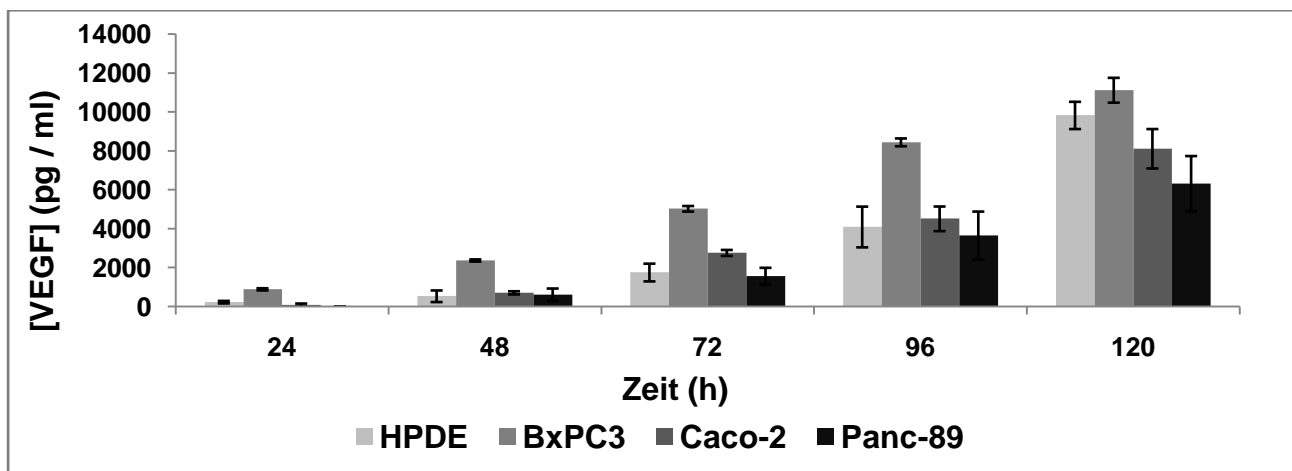


Abb. 4.19: VEGF-Freisetzungskinetik verschiedener Tumorzelllinien

4.3.2.4 in den Überständen von unterschiedlichen Caco-2 Zellzahlen

Die in Abbildung 4.20 dargestellte Freisetzungskinetik von VEGF aus Caco-2-Zellen demonstriert die Abhängigkeit der VEGF-Konzentration von der Zeit und der Zellzahl. Ein Grund für die im Vergleich zu Abbildung 4.19 deutlich niedrigeren VEGF-Konzentrationen kann darin zu sehen sein, dass die Zellen unterschiedlich dicht ausgesät waren. In dem in Abbildung 4.19 gezeigten Experiment wurden die Zellen in 6-Wellplatten kultiviert. Demgegenüber wurde der in Abbildung 4.20 demonstrierte Versuch in 250 ml Kulturflaschen durchgeführt.

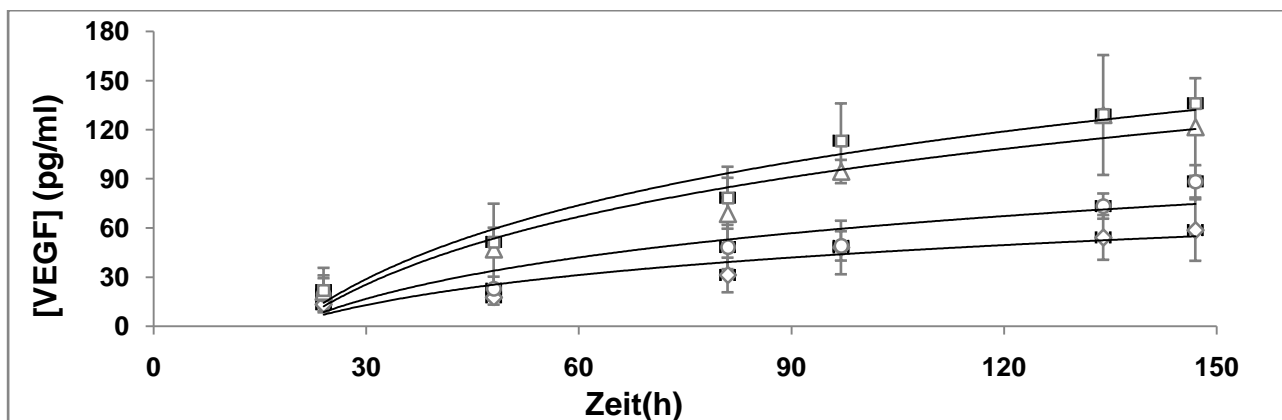


Abb. 4.20: VEGF-Sekretion von unterschiedlich dicht ausgesäten Caco-2-Zellen. (◇ 1,0*10⁵; ○ 1,5*10⁵; Δ 2,0*10⁵ und □ 2,5*10⁵ Zellen)

4.3.3 Untersuchungen an der Pleura parietalis vom Schwein

4.3.3.1 Konstruktion einer „Ussing-Kammer“

Während des Versuchs ist die Pleura zwischen die beiden Silikonplatten gespannt, sodass sie den Kanal zwischen den beiden Schenkeln unterbricht.

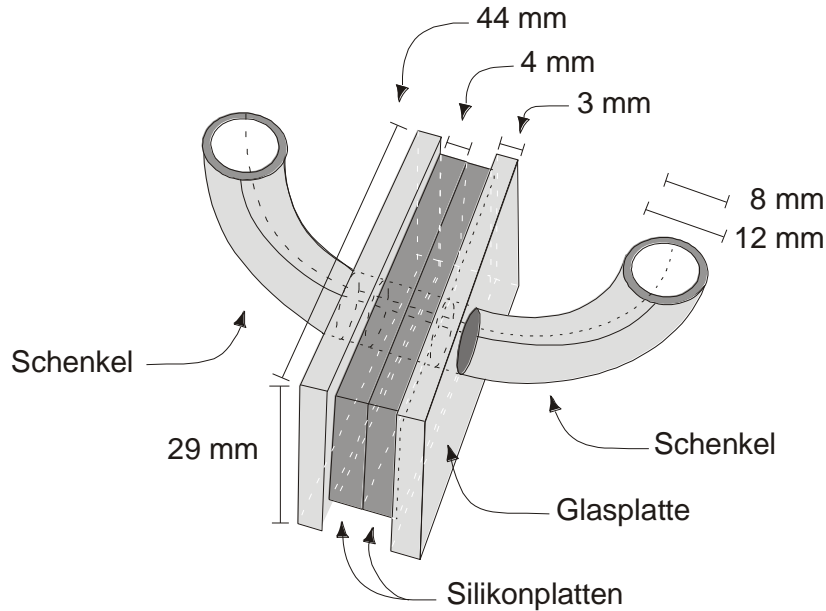


Abb. 4.21: „Ussing-Kammer“

4.3.3.2 Bestimmung der Permeabilität von FITC-Dextran-Molekülen unterschiedlicher Größe durch die Pleura parietalis

Die Durchmesser der Dextranmoleküle sind in Tabelle 4.18 zusammengefasst.

Tabelle 4.18: Stokes´ Radii von Dextran-Molekülen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts (Angaben von Sigma-Aldrich, München)

Dextran (kDa)	4	10	40	70
Durchmesser (Å)	14	23	45	60

Die bei der 7-Punkt-Kalibrierung von unterschiedlich großen FITC-Dextran-Molekülen in PBS durch lineare Regression erhaltenen Ausgleichsgeraden sind in Abbildung 4.22A gezeigt. Die Abweichungen in den Steigungen der einzelnen Kalibriergeraden sind darauf zurückzuführen, dass die Dextrane unterschiedlich stark mit FITC-Molekülen substituiert sind. Die Kalibrierung wurde in phenolrotfreiem Medium durchgeführt werden, da Phenolrot bei den Messbedingungen eine starke Eigenfluoreszenz aufweist. Die durch die Pleura parietalis permeierte Menge FITC-Dextran ist in Abbildung 4.22B gegen die Größe der Dextranmoleküle dargestellt. Es wird deutlich, dass Dextran mit einem Durchmesser von 14 Å im Vergleich zu größeren Dextranen den Monolayer relativ gut

passieren kann. Bei Molekülen mit einem Durchmesser von 30-60 Å ist die Permeabilität allerdings nur minimal verändert.

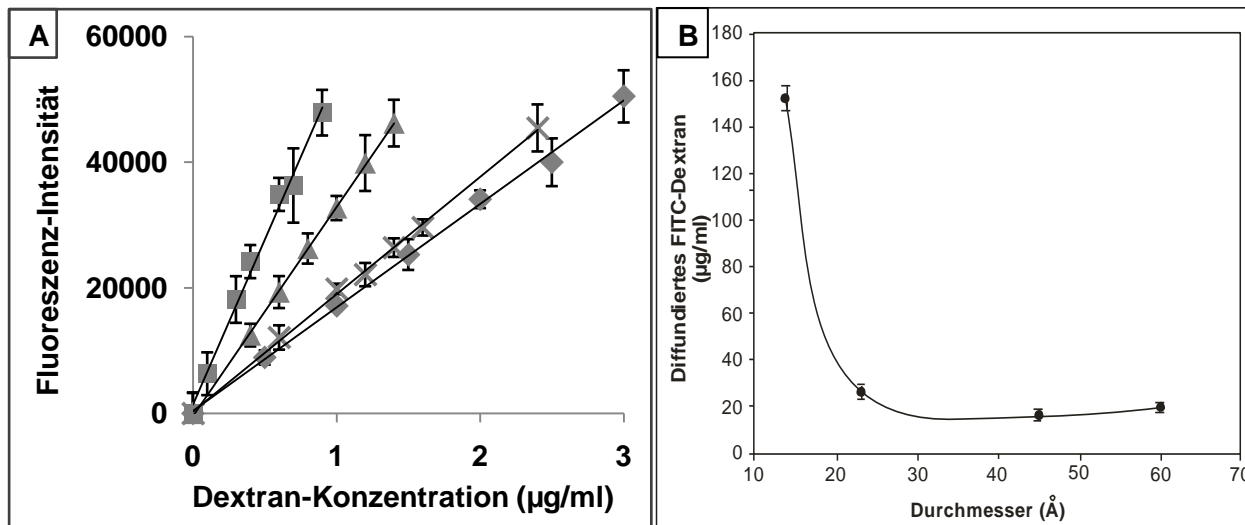


Abb. 4.22: (A) Kalibrierung von FITC-Dextranen unterschiedlicher Größe (◆ 4 kDa, $R^2=0,998$; ■ 10 kDa, $R^2=0,992$; ▲ 40 kDa, $R^2=0,999$ und ● 70 kDa, $R^2=0,998$) in phenolrotfreiem DMEM. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Permeabilität von FITC-Dextran-Molekülen unterschiedlicher Größe durch die Pleura parietalis vom Schwein. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3.3.3 Bestimmung der VEGF-Sekretion der Pleura parietalis

Die Ergebnisse der Freisetzung von VEGF aus unterschiedlich großen Stücken der Pleura parietalis vom Schwein sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Unter der Annahme, dass die mittlere Zellmasse bei Eukaryoten in der Größenordnung von 2 ng liegt [Buselmaier, 2009], wurde aus dem durchschnittlichen Gewicht auf die Zellzahl geschlossen. Das Diagramm zeigt sowohl eine Abhängigkeit der VEGF-Freisetzung von der Zellzahl als auch von der Zeit. Ferner wird deutlich, dass es schon zwischen dem ersten und dem vierten Tag unabhängig von der Zellzahl zu einer Sättigung der VEGF-Freisetzung kommt. Die auf die Zellzahl normalisierte VEGF-Sekretion beträgt im Mittel $7,93 \times 10^{-3}$ fg / Zelle nach 24 Stunden und $2,021 \times 10^{-2}$ fg / Zelle nach 96 Stunden.

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

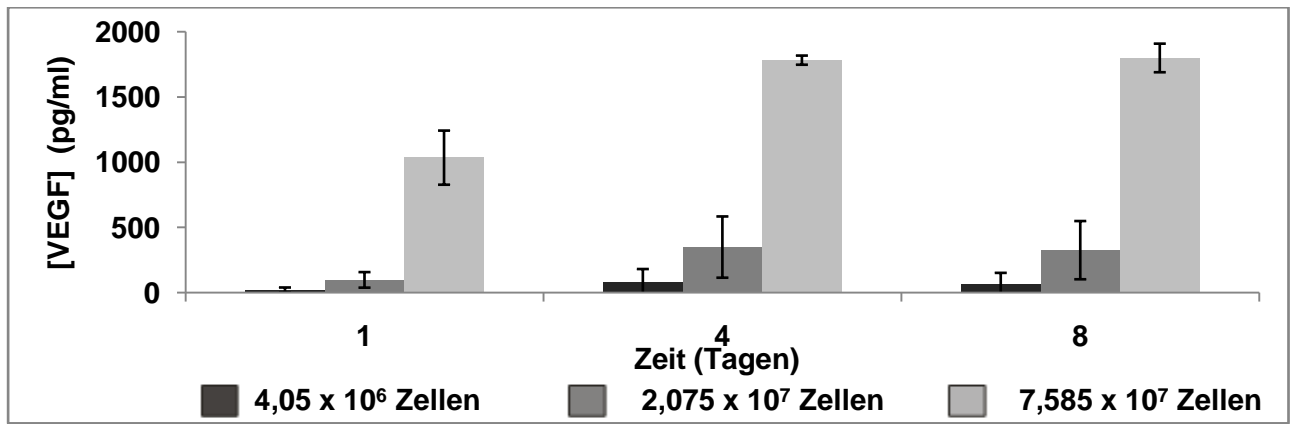


Abb. 4.23: VEGF-Freisetzung der Pleura parietalis vom Schwein in Abhängigkeit von der Zellzahl

4.3.4 Nachweis von VEGF-Rezeptoren 1 und 2 auf Caco-2-Zellen

4.3.4.1 Konventionelle PCR

Die Ergebnisse der mRNA-Expression von VEGF-R1 in Caco-2-Zellen sowie in HUVEC, die als Positivkontrolle verwendet wurden [Sawano et al., 2001, Liu et al., 2006], sind in Abbildung 4.24A dargestellt. HUVEC zeigen bei 305 bp die für die eingesetzten VEGF-R1 Primer zu erwartende Bande. Für Caco-2-Zellen konnte hingegen keine Expression von VEGF-R1-mRNA nachgewiesen werden. Abbildung 4.24B zeigt den positiven Nachweis der VEGF-R2-mRNA in Caco-2-Zellen. Es wird deutlich, dass die unter 4.2.4.1 beschriebene Transfektion von Caco-2-Zellen mit VEGF-R2-spezifischer siRNA zu einer Hemmung der Expression der VEGF-R2-mRNA in der konventionellen PCR führt. Demgegenüber resultierte die Transfektion mit Kontroll-siRNA in keiner Veränderung der VEGF-R2-mRNA-Expression. Auch HUVEC, die als Positivkontrolle dienten, zeigen die für die eingesetzten VEGF-R2-Primer charakteristische Bande.

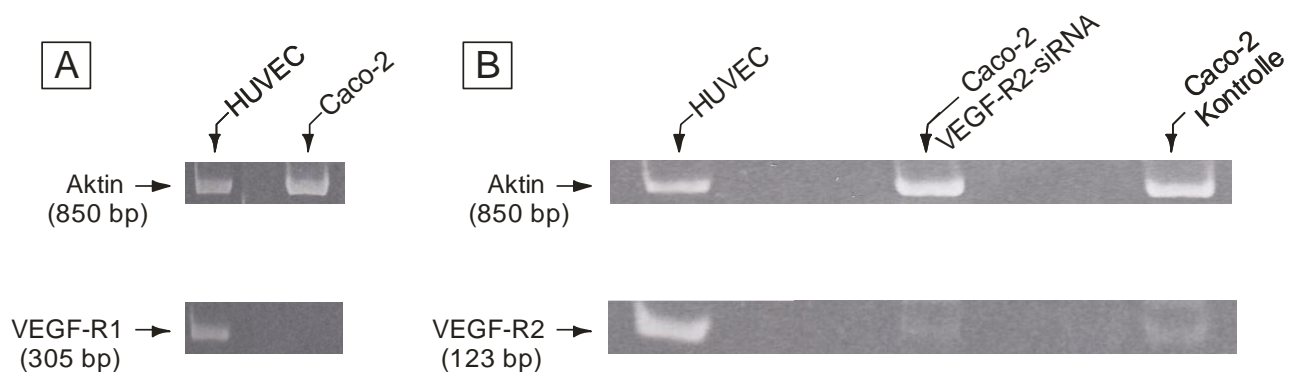


Abb. 4.24: Polyacrylamid-Gelelektrophorese: (A) Expression der VEGF-R1-mRNA (B) Hemmung der Expression der VEGF-R2-mRNA bei Caco-2 nach Transfektion mit VEGF-R2-spezifischer siRNA. Durch direkte Sequenzierung konnte das PCR-Produkt als VEGF-R2 identifiziert werden.

4.3.4.2 Western Blot

Das Ergebnis der konservativen PCR konnte im Western Blot bestätigt werden. In Abbildung 4.25A ist bei HUVEC mit dem Antikörper gegen VEGF-Rezeptor 1 eine schwache Bande bei 132 kDa im Western Blot zu sehen. Demgegenüber exprimieren Caco-2-Zellen keinen VEGF-R1. In Abbildung 4.25B wird die Wirksamkeit der siRNA gegen den VEGF-R2-Rezeptor ersichtlich. Die densitometrische Auswertung des Blots ergab für das glykosylierte Protein (220 kDa) und das nicht glykosylierte Protein (150 kDa) ein Protein-knock down nach Transfektion mit VEGF-R2-spezifischer siRNA im Vergleich zur Kontroll-siRNA von 42 %.

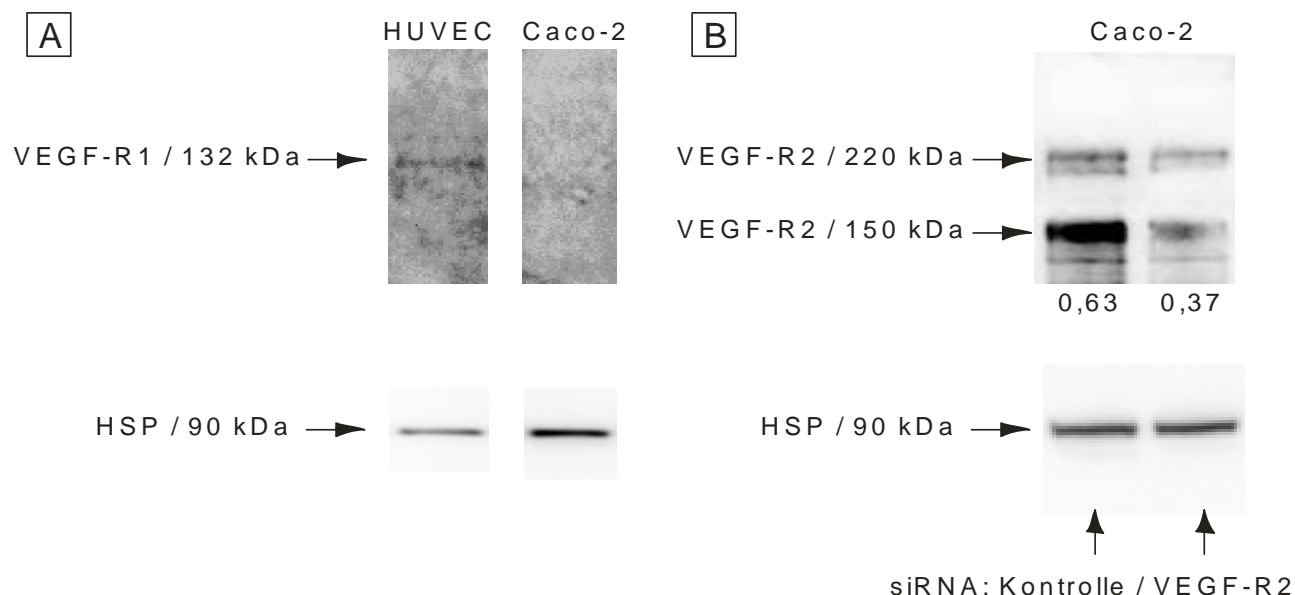


Abb.4.25: (A) Western-Blot zum Nachweis der VEGF-Rezeptor 1-Expression auf HUVEC und Caco-2- Zellen. (B) Western Blot zum Nachweis des Silencing des VEGF-R2-Gens durch VEGF-R2-spezifische siRNA. Western Blots jeweils mit HSP 90 als Ladekontrolle. Die angegebenen Werte sind das Ergebnis der densitometrischen Auswertung. Normalisiert auf die Ladekontrollen ist ein Protein-knock down von 42 % ersichtlich.

4.3.4.3 Immunzytochemie

Abbildung 4.26 zeigt die immunzytochemische Färbung von Caco-2-Zellen. Dargestellt ist die 20-fache Vergrößerung der Präparate. Es wird im Vergleich mit der Isotyp-Kontrolle deutlich, dass Caco-2-Zellen für den VEGF-Rezeptor 2 immunopositiv sind.

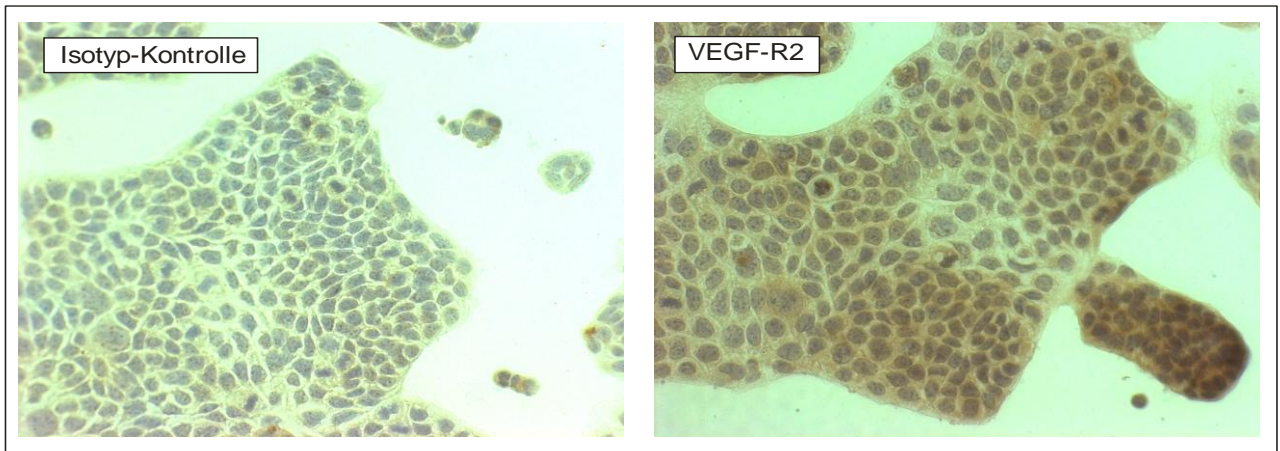


Abb. 4.26: Immunzytochemischer Nachweis von VEGF-Rezeptor 2 auf Caco-2-Zellen

4.3.5 Permeabilitätsveränderungen des Caco-2-Monolayers mittels TEER-Messung in Abhängigkeit von:

4.3.5.1 Chitosan

Der Effekt verschiedener Chitosan-HCl-Konzentrationen, die auf der apikalen Seite appliziert wurden auf den TEER-Wert des Caco-2-Monolayers, ist in Abbildung 4.27 veranschaulicht. Da die Temperatur während des Messzeitraums von einer Stunde noch nicht konstant war, wurde für die Auswertung der in Abschnitt 3.3.5.3 beschriebene t_c TEER-Wert berechnet. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozent vom Ausgangswert zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Chitosan-Konzentrationen von 0,001 % (W/V) bewirkten einen im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verminderten TEER-Wert ($p > 0,1$). Demgegenüber erhöht eine 0,1 (W/V) prozentige Chitosan-Lösung die Permeabilität des Monolayers signifikant. Dabei trat der maximale Effekt auf den TEER-Wert schon nach 20 min auf. In den darauffolgenden 40 min des Experimentes war keine weitere signifikante Änderung des TEER-Wertes detektierbar. Eine Trypanblau-Färbung zeigte $95,9 \pm 1,4$ % vitale Zellen nach Beendigung des Experimentes.

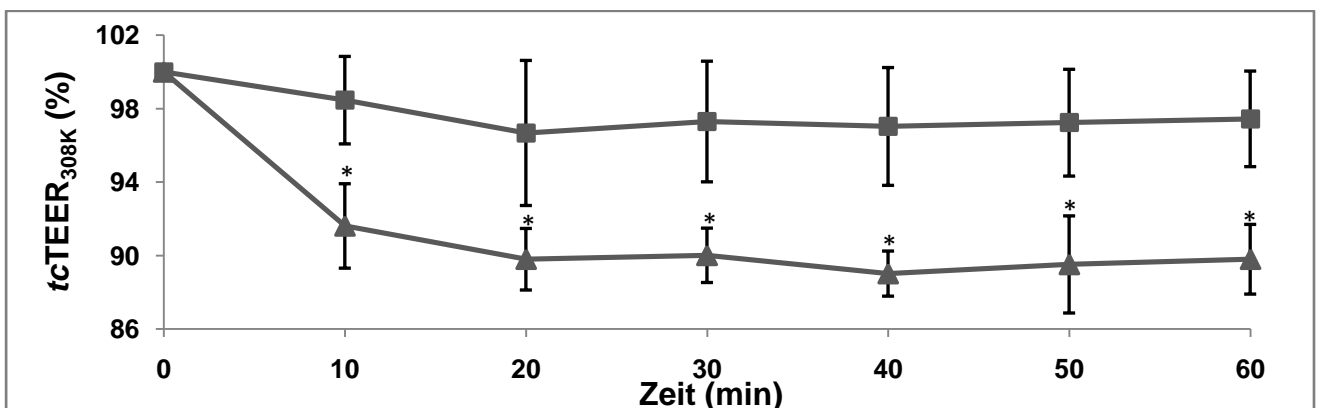


Abb. 4.27: Effekte von unterschiedlichen Chitosan-Hydrochlorid-Konzentrationen [■ 0,01 % (V/V) und ▲ 0,1% (V/V)] auf den t_c TEER-Wert von Caco-2 Monoalylern. (* $p < 0,005$).

4.3.5.2 Bevacizumab, Rituximab und humanem IgG1

Um zu untersuchen, ob Bevacizumab die VEGF-vermittelte Permeabilität des Caco-2-Monolayers spezifisch neutralisieren kann, wurde es kumulativ zum Monolayer pipetiert. Die Auswirkungen von Bevacizumab, Rituximab und humanen IgG1 auf die Permeabilität des Caco-2-Monolayers sind in Abbildung 4.28 zusammengefasst. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozent vom Ausgangswert (TEER bei 308 K ohne applizierten Antikörper). Der VEGF-Gehalt in den Überständen betrug vor der Antikörper-Applikation $2456,7 \text{ pg/ml} \pm 151,9 \text{ pg/ml}$. Bei einer Bevacizumab-Konzentration von 0,31 mg pro Milliliter beidseits des Monolayers, zeigte sich ein signifikanter Anstieg des TEER-Wertes auf 104 % vom Ausgangswert. Der TEER-Wert konnte durch weitere Aufkonzentrierung bis 2,5 mg/ml Bevacizumab im Mittel noch auf 123 % des Ausgangswertes gesteigert werden. Tabelle 4.19 verdeutlicht die Signifikanz, mit der Bevacizumab die VEGF-vermittelte Permeabilität des Caco-2-Monolayers aufheben kann. Fortschreitende Applikation von Bevacizumab, über eine Konzentration von 2,5 mg/ml hinaus, führte zu keiner weiteren Permeabilitätsverminderung. Aus den Messwerten konnte eine ED_{50} von 0,7 mg Bevacizumab pro ml errechnet werden. Demgegenüber bewirkten äquivalente Konzentrationen Rituximab und humanes IgG1 keine signifikanten Änderungen des TEER-Wertes. Der Versuch demonstriert, dass Bevacizumab die VEGF-vermittelte Permeabilität vollständig und spezifisch aufheben kann.

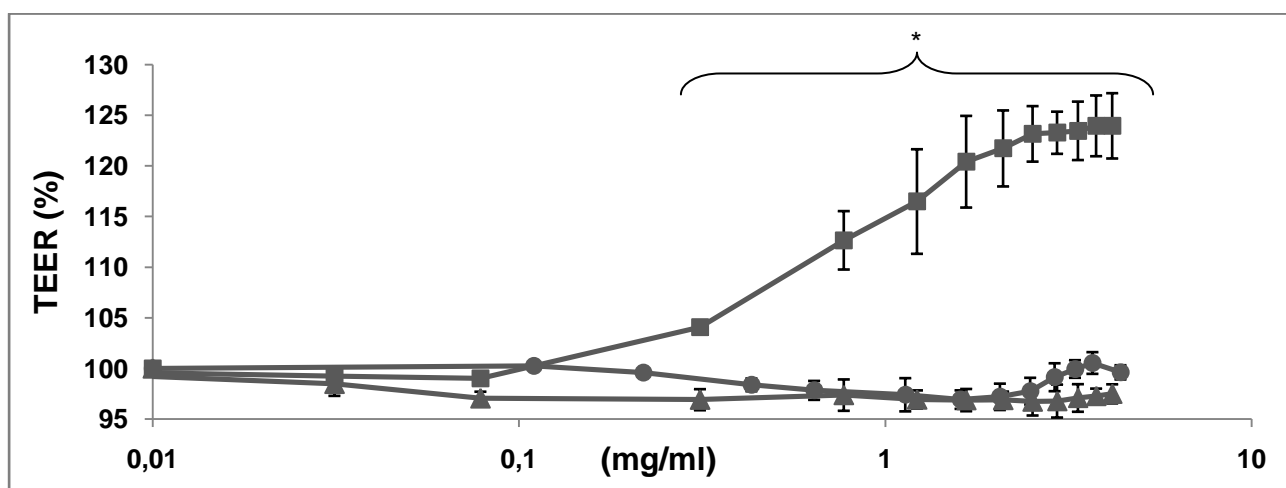


Abb. 4.28: Effekte von ■ Bevacizumab (* $p < 0,003$), ● Rituximab und ▲ humanem IgG1 auf den TEER-Wert von Caco-2-Monolayern. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 4.19: Effekte von Bevacizumab auf den TEER-Wert von Caco-2-Monolayern

Bevacizumab (mg/ml)	0,08	0,31	0,77	1,22	1,66	2,10	2,53
TEER (%)	99,02	104,08	112,66	116,49	120,43	121,74	123,18
p-Wert	<0,03	<0,003			<0,001		<0,0001

4.3.5.3 Tyrosinkinase-Inhibitor (SU5416)

Um die Bedeutung des VEGF-Rezeptors 2 für die VEGF-vermittelte Permeabilität zu untersuchen, wurde der Effekt des Tyrosinkinase-Inhibitors SU5416 auf den Caco-2-Monolayer quantifiziert. Abbildung 4.29 demonstriert den Einfluss von SU5416 auf den TEER-Wert von drei individuellen Caco-2-Monolayern. Da die Temperatur bis zur ersten Messung noch nicht konstant war, wurden für die Auswertung die unter 3.3.5.3 erläuterten *tc*TEER-Werte errechnet. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozent vom Ausgangswert zum Zeitpunkt t = 0 min. Eine 100 mikromolare Lösung von SU5416 resultierte in einem signifikanten Anstieg des TEER-Wertes auf 115 %. Demgegenüber konnte für die Kontrolle, die identische Konzentrationen DMSO aber kein SU5416 enthielt, keine Änderung der Permeabilität gemessen werden. Sowohl die Kontrolle, als auch die mit SU5416 behandelten Monolayer zeigten in den nächsten fünf Stunden keine wesentlichen Permeabilitätsveränderungen. Da VEGF-R1 auf Caco-2 nicht exprimiert wird (Abschnitt 4.3.4), weist das Experiment auf eine Beteiligung des VEGF-R2 an der Permeabilitätsregulation des Caco-2-Monolayers hin.

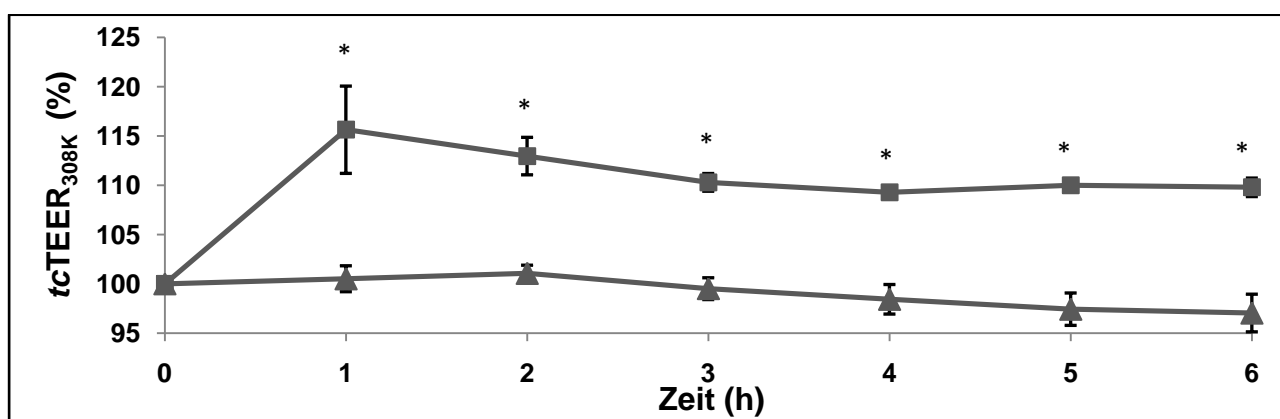


Abb. 4.29: Effekte von ■ 0,5 % DMSO (Kontrolle) und ▲ 100 µM des Tyrosinkinase-Inhibitors SU5416 auf den TEER-Wert von Caco-2-Monolayern (*p < 0,001)

4.3.5.4 siRNA gegen den VEGF-Rezeptor 2

Mit dem Ziel, die zuvor in Abschnitt 4.3.5.3 demonstrierte Bedeutung von VEGF-R2 für VEGF-induzierte Permeabilität zu untermauern, wurde, wie unter 4.3.4.2 dargestellt, die Expression des VEGF-R2 mittels spezifischer siRNA herunterreguliert. Die Integrität des Caco-2-Monolayers

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

wurde durch das Transfektionsreagenz und die siRNA nicht beeinträchtigt. Vor der Transfektion wurde ein TEER-Wert von $490 \pm 51 \Omega$ gemessen und nach der Transfektion von $466 \pm 49 \Omega$. In Abbildung 4.30 sind die Effekte von 6 ng/ml exogenem VEGF auf die Permeabilität von mit VEGF-R2-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten Caco-2-Monolayer zusammengefasst. Dargestellt ist die relative Änderung des TEER-Wertes in Abhängigkeit von VEGF auf den Ausgangswert ($t=0$), der auf 100 % gesetzt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Effekte von exogenem VEGF auf die Permeabilität bei den mit VEGF-R2 spezifischer siRNA behandelten Caco-2-Monolayern signifikant weniger stark waren als bei der Kontrolle. Das Experiment unterstreicht die Relevanz von VEGF und dessen Rezeptor 2 bei der Regulation der Permeabilität.

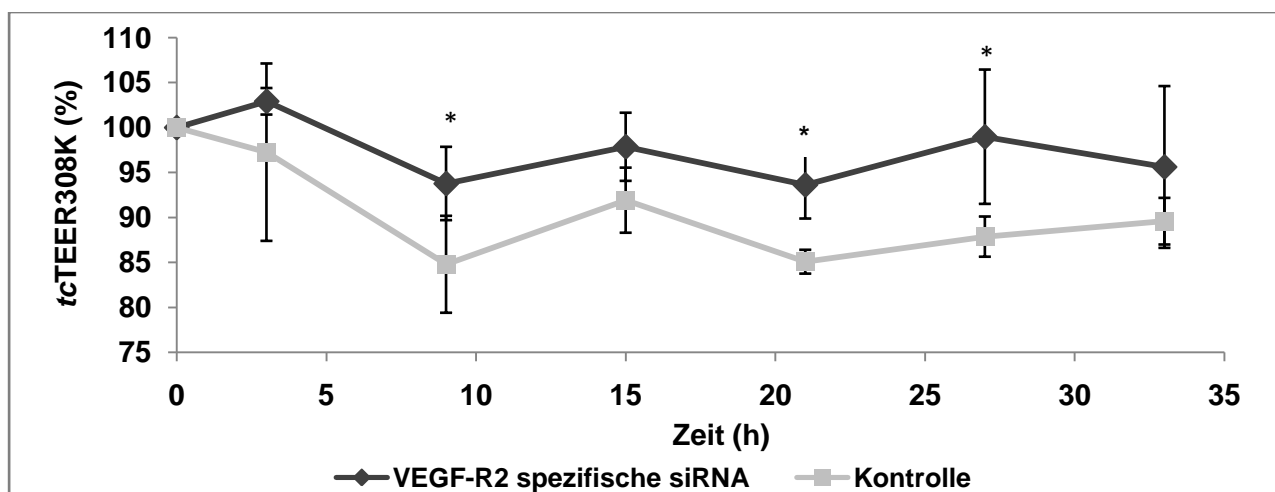


Abb. 4.30: Effekte von exogenem VEGF auf die Permeabilität von jeweils drei mit VEGF-R2-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten Caco-2-Monolayern. (* $p < 0,05$)

4.3.6 Effekte von Bevacizumab oder humanem IgG1 auf die Permeabilität von FITC-Dextran 4 kDa durch den Caco-2-Monolayer

4.3.6.1 Kalibrierung einer Lösung von FITC-Dextran 4 kDa in PBS

Die bei der 7-Punkt-Kalibrierung von FITC-Dextran 4 kDa in PBS durch lineare Regression erhaltene Ausgleichsgerade ist in Abbildung 4.31 gezeigt. Der Korrelationskoeffizient für die lineare Regression beträgt 0,98.

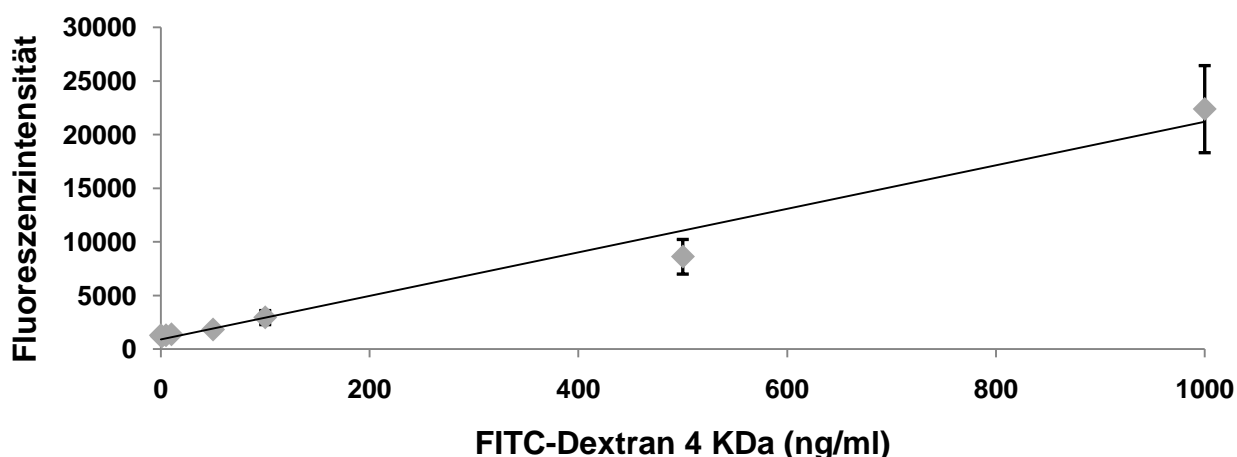


Abb. 4.31: Kalibrierung einer Lösung von FITC-Dextran 4kDa in PBS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3.6.2 Eigenfluoreszenz von Bevacizumab und humanem IgG1

Tabelle 4.20 zeigt unter A, dass die Eigenfluoreszenz einer Lösung von 2 mg humanem IgG1 pro ml PBS sehr niedrig ist. Dreimal so hoch, aber dennoch gering ist die Eigenfluoreszenz einer Bevacizumab-Lösung gleicher Konzentration. Die Tabelle 4.20B veranschaulicht weiterhin die Änderungen der FITC-Dextran-Konzentration am Anfang des Versuchs [$C_0(\text{Anfang})$] und nach Verdünnung mit PBS, Avastin oder humanem IgG1 [$C_0(\text{Ende})$].

Tabelle 4.20: (A) Eigenfluoreszenz von 2 mg Bevacizumab oder humanem IgG1 pro Milliliter PBS. (B) FITC-Dextran-Konzentration im Insert am Anfang des Versuchs und nach Applikation von PBS, Bevacizumab oder humanem IgG1.

A		B			
Eigenfluoreszenz (von 2 mg/ml)		$C_{0(\text{Anfang})}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$C_{0(\text{Ende})}$ ($\mu\text{g/ml}$) (nach Verdünnung mit)		
Bevacizumab	humanes IgG1		PBS	Bevacizumab	humanes IgG1
152	33	467	337	347	331
± 38	± 12	± 37	± 23	± 11	± 30

4.3.6.3 Permeabilitätskoeffizienten (P_{APP}) von FITC-Dextran in Abhängigkeit von Bevacizumab oder humanem IgG1

Die Effekte von 2 mg/ml Bevacizumab oder 2 mg/ml humanen IgG1 auf die Permeabilität von FITC-markierten Dextran 4 kDa über den Caco-2-Monolayer sind in Abbildung 4.32 zusammengefasst. Dazu wurde der Permeabilitätskoeffizient P_{APP} wie unter 4.2.6.2.2 beschrieben sowohl vor als auch nach der Antikörper-Applikation errechnet. Dabei wurden die in Tabelle 4.20 zusammengefassten Ergebnisse berücksichtigt. In Abbildung 4.32 ist das Verhältnis des P_{APP} nach der Applikation zu dem P_{APP} vor der Applikation, der gleich 1 gesetzt wurde, dargestellt. Eine

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Konzentration von 2 mg/ml Bevacizumab in Well und Insert resultierte in einer im Vergleich zu Kontrolle signifikanten Verminderung der Permeabilität von FITC-Dextran 4 kDa ($p = 0,018$). Demgegenüber wurde für 2 mg/ml humanes IgG1 keine Änderung der Permeabilität des FITC-Dextran 4 kDa im Vergleich zur Kontrolle gemessen ($p = 0,256$). Als Kontrolle dienten äquivalente Volumina einer isotonischen NaCl-Lösung, um Effekte aufgrund hydrostatischer Unterschiede, die sich aus der Applikation von 200 μ l Antikörper-Lösung in das Insert ergaben, zu berücksichtigen (siehe Abb. 4.11 auf Seite 65).

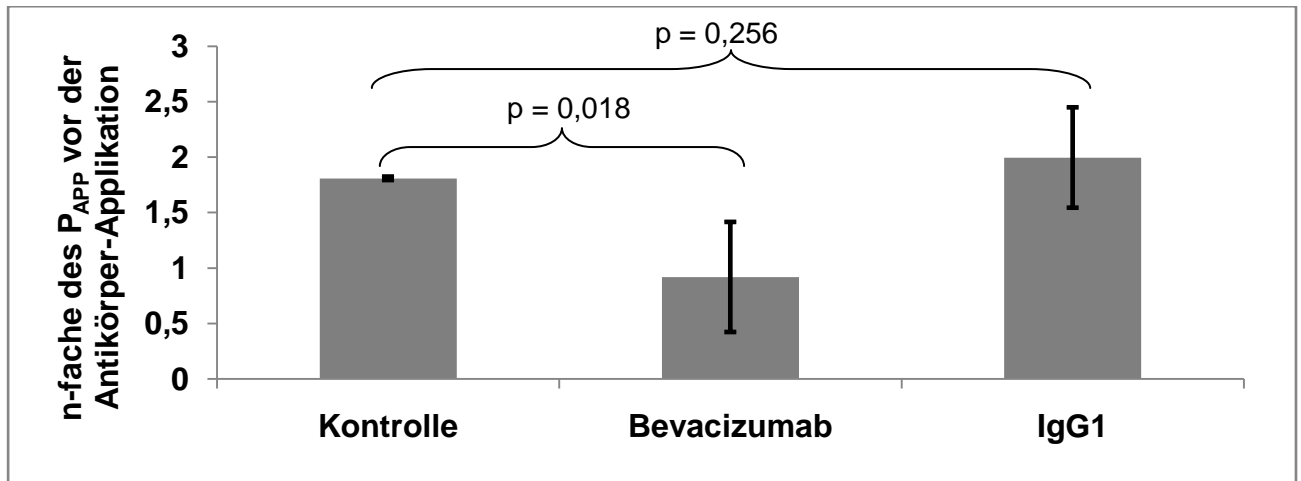


Abb. 4.32: Effekte von Bevacizumab oder humanem IgG1 auf die Permeabilität von FITC-Dextran 4 kDa durch den Caco-2-Monolayer

4.3.7 Leitfähigkeitsuntersuchungen

4.3.7.1 Zellkonstanten der Messzellen

Die Zellkonstante beschreibt das geometrische Verhältnis von Elektrodenabstand l und Elektrodenfläche A und ist als feste Größe konstant. In Tabelle 4.21 sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen für jede Elektrode angegeben. Die Zellkonstanten wurden mit Gleichung 4.3 berechnet. Die gemittelte Zellkonstante aller drei Messzellen beträgt $1,52 \text{ cm}^{-1} \pm 0,22 \text{ cm}^{-1}$. Der Variationskoeffizient von 0,15 ist vor allem durch Unterschiede im Abstand der Elektroden bedingt. Der Variationskoeffizient der einzelnen Messzelle liegt bei nur 0,024.

Tabelle 4.21: Zellkonstanten (cm^{-1}) der unter 3.3.3.2 beschriebenen Elektroden in einer 12-Wellplatte

	Zellkonstanten (cm^{-1})		
	Elektrode 1	Elektrode 2	Elektrode 3
Mittelwert	1,37	1,43	1,78
Standardabweichung	0,03	0,06	0,02

4.3.7.2 Leitfähigkeiten von Kulturmedien und Ergüssen

Die in den Abbildungen 4.33 angegebenen Leitfähigkeiten wurden mit der Gleichung 4.4 unter Berücksichtigung der in Abschnitt 4.3.7.1 ermittelten Zellkonstante berechnet. Das Diagramm 4.33.A zeigt, dass verschiedene Lösungen von DMEM sich bezüglich ihrer Leitfähigkeit nicht signifikant von der Leitfähigkeit von DMEM unterscheiden. In Abbildung 4.33.B sind die Leitfähigkeiten verschiedener Kulturmedien zusammengefasst. Die Leitfähigkeiten von vier verschiedenen Ergüssen vergleicht Abbildung 4.33.C mit der Leitfähigkeit von DMEM. Es zeigt sich, dass alle vier Ergüsse (Mittelwert: $0,0127 \Omega^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) eine deutlich geringere Leitfähigkeit als DMEM ($0,0149 \Omega \times \text{cm}^{-1}$) aufweisen. Die Ergüsse untereinander variieren demgegenüber aber nur mit einem Variationskoeffizienten von 0,029.

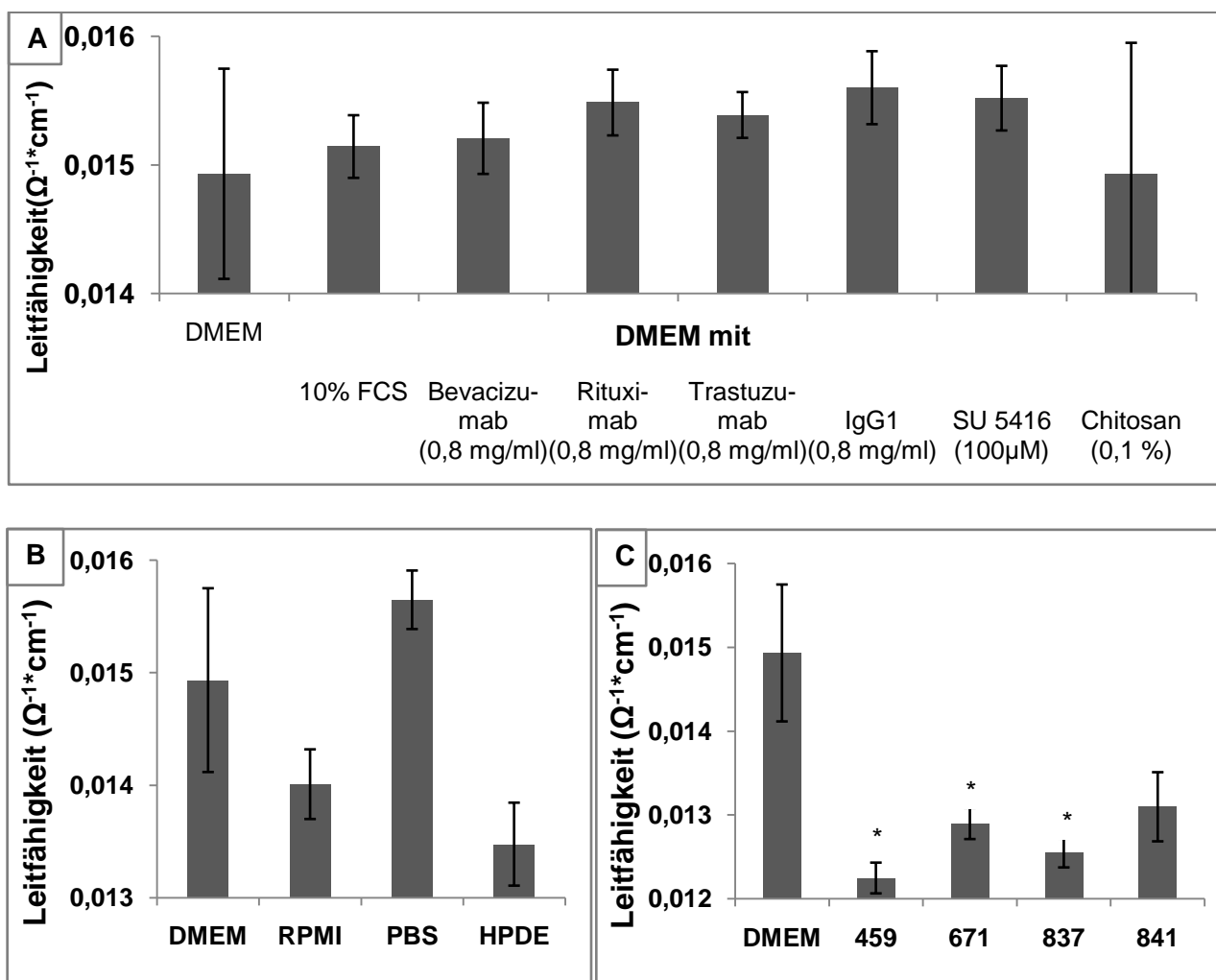


Abb. 4.33: Leitfähigkeiten von (A) verschiedenen Lösungen von DMEM, (B) verschiedenen Kulturmedien und (C) vier verschiedenen Ergüssen (* $p < 0,05$). Die den Ergüssen zugrundeliegenden Primärerkrankungen waren: 459 = NSCLC, 671 = Ösophagus-Karzinom, 837 = Leberzirrhose, 841 = Mamma-Karzinom.

4.3.8 Permeabilitätsveränderungen des Caco-2-Monolayers mittels TEER in Abhängigkeit von Ergüssen

4.3.8.1 VEGF-Gehalt in den Ergüssen vor und nach Filtration (0,2 µm)

Um die Keimfreiheit der Ergüsse zu gewährleisten und um das in Ergüssen nachweisbare Fibrin (Abb. 4.14, Seite 72) zu entfernen, wurden sie sterilfiltriert. In Tabelle 4.22 ist der VEGF-Gehalt von vier verschiedenen Ergüssen vor und nach Filtration durch einen Sterilfilter zusammengefasst. Es wird deutlich, dass die VEGF-Konzentration in den Ergüssen durch die Filtration nicht beeinträchtigt wird.

Tabelle 4.22: Einfluss der Sterilfiltration auf die VEGF-Konzentration von Ergüssen

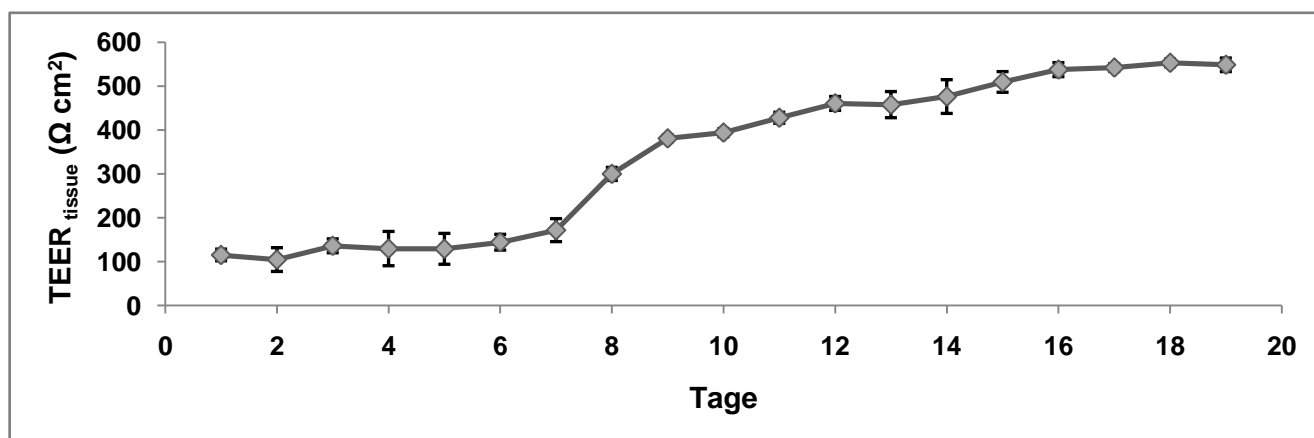
	[VEGF] (pg/ml) im Erguss			
	837	841	459	671
unfiltriert	2371 ± 192	34 ± 2	229 ± 44	2114 ± 0
filtriert	2678 ± 82	0 ± 0	242 ± 6	1946 ± 165

4.3.8.2 Permeabilitätsveränderungen

Obwohl der Versuchsaufbau wiederholt modifiziert worden war, konnten mit sterilfiltrierten Ergüssen keine reproduzierbaren Effekte auf die Permeabilität der Caco-2-Monolayer dokumentiert werden.

4.3.9 Entwicklung eines Caco-2-Monolayers

Abbildung 4.34 demonstriert das Wachstum von vier Caco-2-Monolayern anhand der TEER-Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Kultivierung. Der TEER-Wert stieg langsam, meist gleichmäßig an und erreichte nach 16 Tagen ein Plateau. Zwischen dem siebten und dem neunten Tag stieg der TEER-Wert allerdings sprunghaft um 190 Ω x cm². Nachdem die Caco-2-Zellen für 19 Tage kultiviert worden waren, betrug der TEER-Wert annähernd konstante 548 Ω x cm² ± 15 Ω x cm².



VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Abb. 4.34: TEER-Werte von Caco-2-Monolayern zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Kultivierung auf 12-Well-Inserts. Jeder Messwert repräsentiert den Mittelwert \pm SD von vier individuellen Caco-2-Monolayern.

Dass der TEER-Wert ab dem 7.Tag sprunghaft ansteigt, verdeutlicht auch die in Abbildung 4.35 gezeigte Fotostrecke. Bis einschließlich zum 7.Tag weist der Caco-2-Monolayer deutlich erkennbare Löcher auf. Ab dem 9.Tag hat sich der Monolayer geschlossen. In den folgenden Tagen bilden sich die Zell-Zell-Kontakte weiter aus, gefolgt von einem leichten Anstieg des TEER bis zum Plateau.

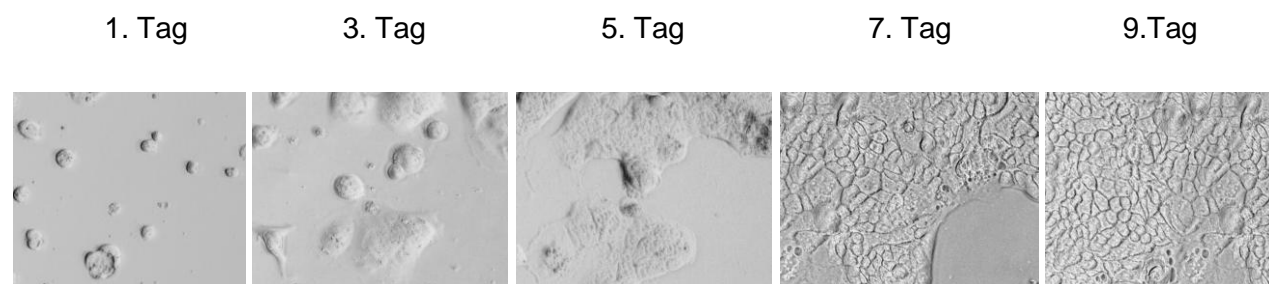


Abb. 4.35: Fotostrecke des wachsenden Caco-2-Monolayers (100-fache Vergrößerung).

4.3.10 Permeabilität von Bevacizumab und Paracetamol über den Caco-2-Monolayer

4.3.10.1 Analytik von Bevacizumab und humanem IgG1 mit dem „Easy Titer IgG1 Assay“

Die in Abbildung 4.36 dargestellte Kalibrierung zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Messwerte für humanes IgG1 und Bevacizumab, so dass vermutet werden konnte, dass Bevacizumab mit dem Assay quantitativ detektiert werden konnte. Da die halblogarithmischen Messwerte nur mit $R^2 = 0,76$ für humanes IgG1 und $R^2 = 0,8$ für Bevacizumab korrelierten, wurde für die quantitative Bestimmung von Bevacizumab zwischen zwei Messwerten interpoliert. Zum Beispiel musste bei einer Bevacizumab-haltigen Probe mit einer Absorption von 1,8526, weil diese zwischen der Absorption der beiden Standards 62,5 und 125 ng/ml lag (Tabelle 4.23), mit der folgenden Gleichung gerechnet werden:

$$62,5 + 62,5 \cdot \frac{(1,9382 - 1,8526)}{(1,9382 - 1,8134)} = 105,4 \text{ ng/ml}$$

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Tabelle 4.23: Meeswerte der Kalibrierung von Bevacizumab und humanem IgG1 mit des Easy-Titer Antibody Assay Kit. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Standard (ng/ml)	Ln Standard (ng/ml)	Absorption	
		Bevacizumab	humanes IgG1
500	6,21	1,5558	1,5487
250	5,52	1,6239	1,6896
125	4,83	1,8134	1,7538
62,5	4,14	1,9383	1,9381
31,2	3,44	2,0749	2,0607
15,6	2,75	2,1771	2,2054

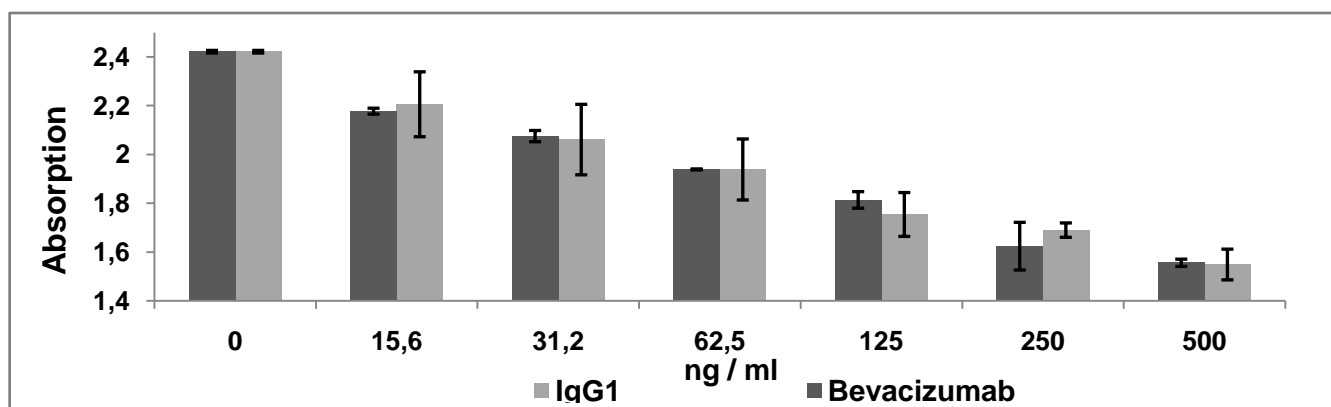


Abb. 4.36: Kalibrierung von Bevacizumab und humanem IgG1 mit des Easy-Titer Antibody Assay Kit. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3.10.2 Analytik von Paracetamol

Abbildung 4.37A zeigt das Absorptionsspektrum einer Lösung von 80 μ M Paracetamol in PBS. Das Absorptionsmaximum lag bei 245 nm. In Abbildung 4.37B ist ein repräsentatives Chromatogramm von Paracetamol dargestellt. Das Paracetamol wurde nach 270 Sekunden von der Säule eluiert. Zur quantitativen Bestimmung des Paracetamols wurde mit den unter 4.2.10.3.1 hergestellten Arbeitslösungen eine Kalibrierung durchgeführt. Abbildung 4.32C zeigt die durch lineare Regression erhaltene Ausgleichsgerade. Der Korrelationskoeffizient für diese Kalibrierung beträgt 0,999.

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

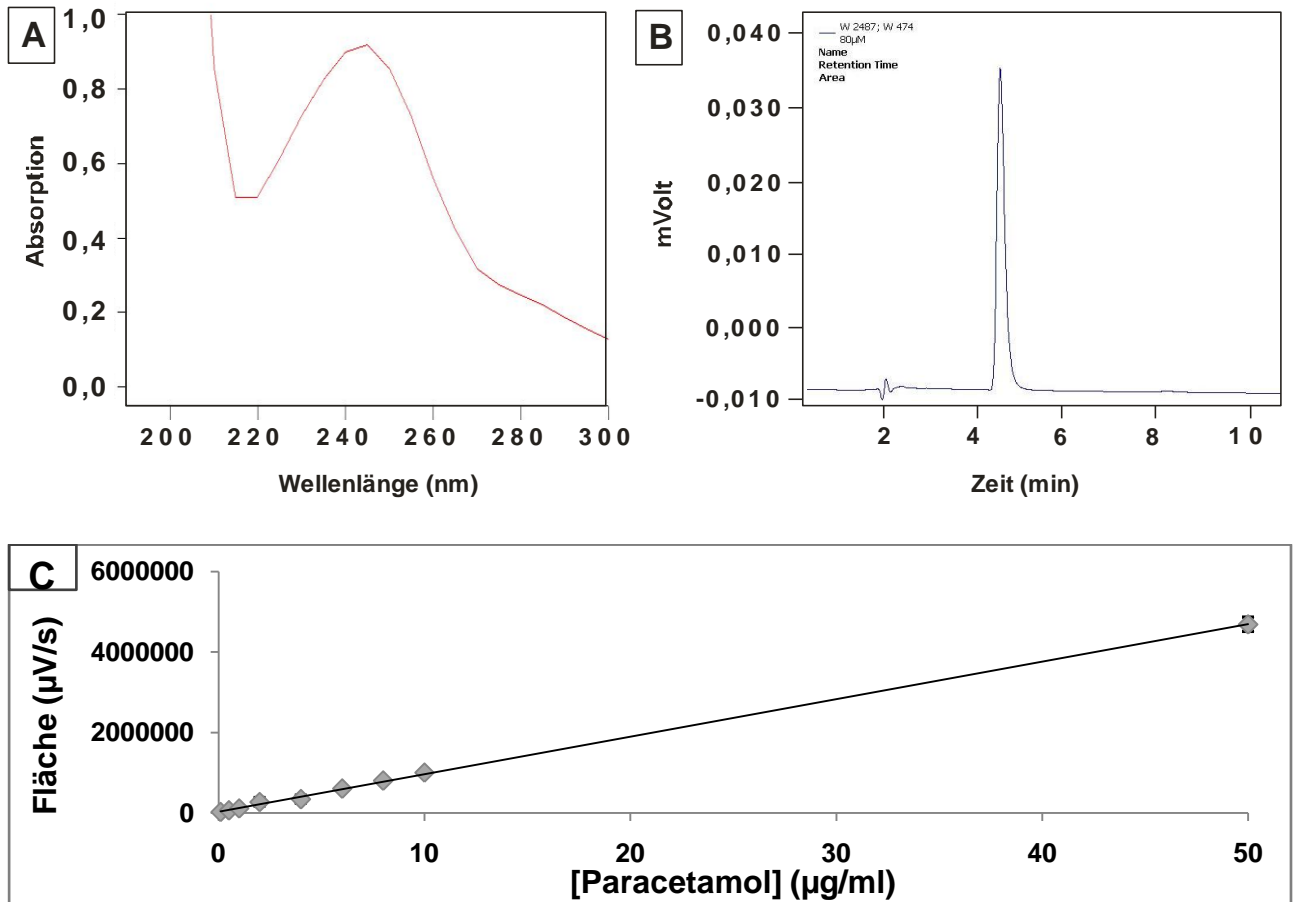


Abb. 4.37: (A) Absorptionsspektrum und (B) HPLC-Chromatogramm von Paracetamol
(C) Kalibrierung von Paracetamol mit der HPLC. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Jede Probe wurde doppelt vermessen.

Die Wiederfindungsrate ist der Anteil an Paracetamol, der mithilfe der Analytik nach Aufarbeitung der Probe detektiert werden kann, im Vergleich zu der Paracetamol-Menge, die vor der Aufbereitung der Probe hinzugefügt wurde. Durch die Untersuchung wurde der Paracetamol-Anteil bestimmt, der durch Aufnahme in die Caco-2-Zellen oder durch Absorption an der Kulturplatte der Analytik entzogen wurde. Die berechneten Wiederfindungsrate zeigen, dass gerade bei den im Versuch vorliegenden hohen Paracetamol-Konzentrationen die Wiederfindung hoch ist (Tabelle 4.24). Daher wurde für die Bestimmung der Permeabilität auch mit der erhaltenen Kalibrierung die Paracetamol-Konzentration berechnet.

Tabelle 4.24: Mittlere Wiederfindungsrate (%). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils doppelt gemessen.

Paracetamol-Konzentration in PBS µg/ml	0,1	0,5	1	2	4	6	8	10	50
Wiederfindungsrate (%)	0 ± 0	41,37 ± 2,87	69,72 ± 0,24	84,35 ± 0,79	91,16 ± 0,32	93,65 ± 0,14	94,55 ± 0,28	96,16 ± 0,22	96,74 ± 0,05

4.3.10.3 Permeabilitätskoeffizient (P_{APP}) von Bevacizumab und Paracetamol

Die mit Gleichung 4.2 berechneten P_{APP} -Werte von Bevacizumab und Paracetamol sind in Abbildung 4.38 dargestellt. Das Permeabilitätsverhältnis wurde mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$P_{ratio} = \frac{(P_{APP, ba})}{(P_{APP, ab})} \tag{4.7}$$

Dabei stellt ($P_{APP, ba}$) die Permeabilität von der basolateralen zur apikalen Seite (vom Well zum Insert beziehungsweise vom Blut zum Interstitium) und ($P_{APP, ab}$) von apikal nach basolateral (vom Insert zum Well beziehungsweise vom Interstitium zum Blut) dar. Für Paracetamol konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Transportrichtung beobachtet werden ($P_{ratio} = 0,99$). Demgegenüber ergibt die Berechnung des Permeabilitätsverhältnisses für Bevacizumab einen Wert von 4,02.

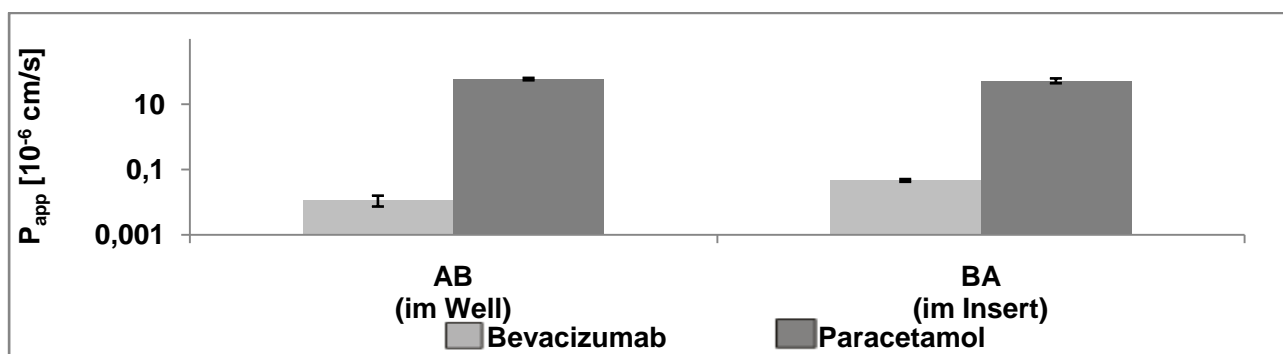


Abb. 4.38: Permeabilitätskoeffizienten von Bevacizumab und Paracetamol gemessen am Caco-2-Monolayer (AB = apikal → basolateral; BA = basolateral → apikal)

4.4 Diskussion

4.4.1 VEGF-Konzentrationen in Ergüssen und Sera sowie in den Überständen von Patientenzellen und Zelllinien

Die Bedeutung von VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse wurde in der vorliegenden Arbeit quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass vier verschiedene Tumorzelllinien (Abb. 4.19) 100-mal mehr VEGF sezernieren als die Zellen der Pleura parietalis (Abb. 4.23). Die Ergebnisse decken sich mit denen von Senger et al., die nachwiesen, dass fünf der sieben von ihnen untersuchten Tumorzelllinien unter Kulturbedingungen VEGF sezernierten (Senger et al., 1986). Dass das Pleuramesothel VEGF freisetzen kann, wurde für *New Zealand White Rabbits* nachgewiesen [Lee 2002] aber nicht wie in der vorliegenden Arbeit auf die Zellzahl normalisiert. Eine VEGF-Freisetzung wurde in der Literatur für viele verschiedene Zelltypen wie Mesothelzellen [Stadlmann et al., 2005], Endothelzellen [Namiki et al., 1995], Makrophagen [McLaren et al., 1996], neutrophile Granulozyten [Taichman et al., 1997], Fibroblasten [Pertovaara et al., 1994] und T-Zellen [Freeman et al., 1995] belegt.

Die VEGF-Konzentration im Serum eines gesunden Menschen beträgt 115,7 (66,8-183,3) pg/ml [Kim et al., 2004]. Im Vergleich dazu war der durchschnittliche VEGF-Gehalt im Serum, bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv unabhängig von der Dignität der Erkrankung, mit 793 ± 635 pg/ml fast siebenmal so hoch. Jeder dieser Patienten entwickelte einen pleuralen oder peritonealen Erguss. Bei Patienten mit Ergüssen basierend auf einer benignen Grunderkrankung (Herzinsuffizienz, Leberzirrhose) wurden VEGF-Serumspiegel von 303 ± 157 pg/ml gemessen (Abb. 4.16A). Demgegenüber ist bei Patienten mit Tumoren der VEGF-Gehalt sowohl im Serum als auch im Erguss deutlich erhöht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Ergüsse im Mittel mit 1051 ± 924 pg/ml sogar noch mehr VEGF enthielten als das Serum mit 938 ± 669 pg/ml (Abb. 4.16A). Auch Shu et al. fanden in Serum- und Ergussproben von Tumorpatienten dreifach höhere VEGF-Spiegel als in der Gruppe mit benignen Primärerkrankungen, wobei die VEGF-Konzentration in den Ergüssen sogar doppelt so hoch war als im Serum [Shu et al., 2007]. Diese Befunde decken sich mit den in Abb. 4.15 dargestellten Ergebnissen. In dem Diagramm werden die VEGF-Konzentrationen im Serum mit denen im Erguss korreliert. Insgesamt 5 der 35 Patienten wiesen in ihrem Erguss signifikant höhere VEGF-Konzentrationen im Vergleich zum Serum auf. Jedem dieser fünf Ergüsse lag eine Tumorerkrankung (drei Ovarial-Karzinome, ein Pankreaskarzinom und ein peritoneales Karzinom) zugrunde. Dass insbesondere Ovarial-Karzinome große VEGF-Mengen sezernieren, ist aus der Literatur bekannt [Kraft et al., 1999]. Die Überexpression kann darauf zurückgeführt werden, dass humanes Choriogonadotropin die VEGF-Freisetzung steigern kann [Vardhana et al., 2009].

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Die Korrelation von Serum- und Erguss-VEGF warf die Frage auf, ob VEGF in den Ergüssen durch metastasierte Tumorzellen gebildet wird. Um dies zu beantworten, wurden Zellen aus malignen Ergüssen isoliert und anschließend kultiviert. Dabei stellte sich heraus, dass 6 von 10 Primärzellen VEGF sezernieren (Abb. 4.18 und Tabelle 4.17). Obwohl im Überstand von vier Patientenzellen kein VEGF gefunden wurde, kann nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass auch von diesen Zellen VEGF freigesetzt werden kann. Es ist denkbar, dass durch die Verdünnung des Mediums während des Versuchs die Nachweisgrenze des ELISAs auch nach fünf Tagen noch nicht erreicht wurde. Dafür spricht, dass in dem Experiment, in dem das Medium erst nach 72 Stunden entnommen wurde, VEGF bei drei von drei Patientenzellen nachgewiesen werden konnte (Tabelle 4.17). Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Zellen im Erguss diversen Stimuli unterliegen, wie zum Beispiel der Hypoxie, die unter den durchgeführten Zellkulturbedingungen nicht gegeben sind.

Die Bedeutung von VEGF bei der Ergussentstehung konnte an einem weiteren klinischen Parameter noch verdeutlicht werden. So zeigt Abbildung 4.17, dass sehr große Erguss-Volumina (> 20 Liter) nur bei ebenfalls sehr hohen VEGF-Spiegeln in diesen Ergüssen auftraten ($p=0,015$). Dazu wurde das Produkt aus dem Ergussvolumen und der Punktionshäufigkeit berechnet und mit der VEGF-Konzentration im Erguss korreliert. Eine Abhängigkeit der Ergussbildung von der VEGF-Konzentration konnte auch durch Zebrowski et al. im Miles Assay dokumentiert werden. Für die Studie wurde Mäusen Evans Blau i.v. appliziert und 10 min später Ergüsse mit unterschiedlichen VEGF-Konzentrationen intradermal injiziert. Nach 30 min wurde die Subdermis präpariert und photographiert, sodass der in das dermale Gewebe ausgetretene Farbstoff quantifiziert werden konnte. Die kleinste Farbstoffmenge zeigte sich durch den Erguss mit der niedrigsten VEGF-Konzentration [Zebrowski et al., 1999]. Eine andere Arbeitsgruppe validierte die Bedeutung von VEGF für die Ergussentstehung, indem sie das Bauchfell von Mäusen mit VEGF-mRNA transfizierten. Insgesamt bildeten alle so behandelten Mäuse einen Aszites. Auch Lee et al. konnten zeigen, dass die VEGF-Konzentration mit $p<0,001$ mit dem Ergussvolumen korreliert. Dazu stimulierten sie das Pleuramesothel von *New Zealand White rabbits* mit TGF- β 1. Das Volumen des daraufhin gebildeten Pleuraergusses wurde bestimmt und die VEGF-Konzentration gemessen [Gary Lee et al., 2002].

Abbildung 4.16B vergleicht den VEGF-Gehalt im peritonealen und im pleuralen Erguss. Es wird deutlich, dass die VEGF-Konzentration in peritonealen Ergüssen signifikant höher ist als in Pleuraergüssen ($p=0,001$). Vergleichbare Resultate wurden auch von Atanackovic et al gefunden. Sie zeigten, dass VEGF zwar in Pleuraergüssen signifikant überexprimiert wird, aber dennoch nur 1/5 der VEGF-Konzentration erreicht, die in malignen peritonealen Ergüssen nachzuweisen ist [Atanackovic et al., 2008].

4.4.2 Entwicklung eines Modells zur Untersuchung VEGF-vermittelter Permeabilität

Um die Bedeutung von VEGF für die Ergussentstehung weiter zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei Modelle verwendet. Das eine Modell basiert auf der Pleura parietalis von Schweinen, die zu diesem Zweck in eine „Ussing-Kammer“-ähnliche Apparatur eingespannt wurde (Abb. 4.5 und Abb. 4.21). Für reproduzierbare Ergebnisse mussten allerdings einige Hindernisse überwunden werden. Unter anderem war die Präparation unversehrter Stücke der Pleura parietalis mit erheblichem Aufwand verbunden. Es muss bezweifelt werden, ob durch Abtrennung des einschichtigen Pleuramesothels von dem Bindegewebe Präparate gleicher Schichtdicke erhalten wurden. Desweiteren war die Verfügbarkeit von Pleuragewebe begrenzt und es standen auch nur fünf Apparaturen zur Verfügung, mit denen die Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Da der experimentelle Aufbau für dieses Experiment erst konstruiert worden war, gab es keine Erfahrungswerte in der Handhabung. Hypoxische Bedingungen, die die VEGF-Expression erheblich steigerten, können als wahrscheinlich angenommen werden. Positiv zu bewerten war, dass die Vitalität der Pleurazellen, nachdem sie für den Versuch in die Apparatur eingespannt worden waren, mit einer Trypanblau-Färbung gezeigt werden konnte. Keimfreie Untersuchungen konnten in der Apparatur allerdings nicht durchgeführt werden, sodass insbesondere längerfristige Experimenten fehlerbehaftet sein könnten. Aus diesen Gründen wurde das Modell der Pleura parietalis in der „Ussing-Kammer“-ähnlichen Apparatur nach einigen Experimenten nicht weiter verfolgt.

Es wurde ebenfalls versucht, einen Monolayer aus Pleuramesothelzellen zu kultivieren. Das dafür verwendete humane epitheliale Mesotheliom (JL-1, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) differenzierte allerdings zu keinem Monolayer mit hinreichendem TEER-Wert aus.

Alternativ wurde der Caco-2-Monolayer, der zu diesem Zweck auf 12-Well-Inserts kultiviert wurde, als Modell zur Untersuchung der VEGF-vermittelten Permeabilität etabliert. Der Caco-2-Monolayer wurde als Modell für das einschichtige Pleuramesothel ausgewählt, weil er bereits sehr gut charakterisiert ist und sich gut kultivieren lässt. Auf Inserts gewachsene Caco-2-Monolayer bestehen aus polarisierten auf der apikalen Seite Mikrovilli präsentierende Zellen. Auch auf dem Pleuramesothel konnten Mikrovilli nachgewiesen werden. [Gaudio et al., 1988]. Ab dem einundzwanzigsten Tag bilden die Caco-2-Zellen einen vollständig ausdifferenzierten Monolayer mit Tight Junctions, die bereits ab dem vierten Tag nachweisbar sind [Sun et al., 2008]. Die Expression des VEGF-Rezeptor 2 ist sowohl für humane Pleuramesotheliome [Ohta et al., 1999] als auch für Caco-2-Zellen [Kim et al., 2005] gezeigt worden. Die Rezeptorexpression konnte in dieser Arbeit für Caco-2-Monolayer bestätigt werden.

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Um den Caco-2-Monolayer als Modell zur Untersuchung der VEGF vermittelten Permeabilität zu validieren, wurden zunächst die Effekte von Chitosan auf den TEER-Wert des Caco-2-Monolayers untersucht. Chitosan wird in der Literatur schon seit langem die Fähigkeit zugesprochen, die Permeabilität durch Neuordnung von F-Aktin und dem Tight Junction Protein Zonulae occludentes zu erhöhen [Thanou et al., 2001]. Da Chitosan-Glutamat in PBS und DMEM nur eine geringe Löslichkeit zeigte, wurden die Experimente mit Chitosan-HCl durchgeführt. Schon nach 10 min zeigte sich eine gesteigerte Permeabilität in einem verminderten TEER-Wert. Dass der Effekt unmittelbar nach der Applikation eintritt, ist in der Literatur beschrieben [Opanasopit et al., 2007]. Für die Messung war es daher zwingend notwendig die unter Abschnitt 3.3.5.2 beschriebenen *tc*TEER-Werte zu berechnen, da die Temperatur und damit auch der TEER zum Messzeitpunkt noch nicht konstant waren. Hierin könnte auch eine Erklärung zu sehen sein, weshalb die in der Literatur beschriebenen Effekte mit Permeabilitätssteigerungen um bis zu 80% wesentlich deutlicher ausfallen [Kotze et al., 1998]. Es konnte aber dennoch bestätigt werden, dass sich der Caco-2-Monolayer als Modell zur Messung von Permeabilitätsveränderungen eignet.

4.4.3 Hemmung der VEGF-vermittelten Permeabilität mit:

4.4.3.1 einem Tyrosinkinase-Inhibitor oder VEGF-R2-spezifischer siRNA

Wenn VEGF eine Rolle bei der Entstehung maligner Ergüsse spielt, dann müsste mit einer Anti-VEGF Therapie die Ergussbildung vermindert werden können. Byrne et al. konnten die VEGF vermittelte Aszitesbildung mit VEGF-Trap inhibieren. Dazu wurden Mäusen OVCAR-3 Zellen intraperitoneal injiziert und vierzehn Tage später erfolgte die subkutane Gabe von 25 mg/ml VEGF-Trap [Byrne et al., 2003]. Andere Studien konnten die Entstehung maligner Ergüsse durch Applikation von Tyrosinkinase-Inhibitoren inhibieren [Zebrowski et al., 1999, Yano et al., 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor SU5416 die Permeabilität des Caco-2-Monolayers signifikant vermindern kann (Abb. 4.29). Für die Auswertung mussten *tc*TEER-Werte berechnet werden, da die Temperatur zum ersten Messzeitpunkt noch nicht konstant war. Mit 100 μ M war die Konzentration des Inhibitors höher als in anderen Studien, in denen jedoch die Effekte von SU5416 auf Migration und Proliferation untersucht wurden [Verheul et al., 2000]. Beides sind wichtige Schritte im Rahmen der Angiogenese. Neben dem VEGF-Rezeptor 2 wurde auch die Beteiligung des VEGF-Rezeptor 1 bei angiogenetischen Effekten nachgewiesen [Hiratsuka et al., 2001]. Der VEGF-Rezeptor 1 wird aber schon bei einer sehr viel niedrigeren SU5416-Konzentration blockiert ($IC_{50} = 0,09 \mu$ M) als das für VEGF-Rezeptor 2 der Fall ist ($IC_{50} = 1,3 \mu$ M) [Tille et al., 2003]. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Caco-2-Zellen keinen VEGF-Rezeptor 1 präsentieren und in der Literatur die VEGF-induzierte Hyperpermeabilität als ausschließlich VEGF-R2-vermittelt beschrieben wird [Gille et al., 2001, Bates et al., 2002], ist der Gebrauch der in der vorliegenden Arbeit verwendeten höheren

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Konzentration des Inhibitors erklärbar. Desweiteren wurde bereits in früheren Studien die VEGF-vermittelte Permeabilität mit vergleichbar hohen SU5416-Mengen gehemmt. Gómez et al. stimulierten mit humanem Choriogonadotropin die VEGF-Expression von weiblichen Ratten. Anschließend hemmten sie die VEGF-abhängige Hyperpermeabilität des vaskulären Endothels durch intraperitoneale Gabe von $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SU5416 [Gomez et al., 2002]. Wird für die Mäuse ein Körpergewicht von 30 g und ein Verteilungsvolumen von 10 ml zugrundegelegt, dann ergibt sich für SU5416 (MW: 238 g/mol) eine Konzentration von 314 μM . Dies entspricht in etwa den in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitor-Mengen. SU5416 zeigte in Phase 2 und 3 Studien eine erhöhte Toxizität, die mit Diarrhö, Erbrechen und kardiovaskulären Ereignissen bis hin zur Thromboembolie einhergingen. Wegen dieses negativen Nutzen-Risiko-Verhältnisses und wegen der im Vergleich zu anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren intravenösen Applikation wurden die klinischen Studien für SU5416 beendet [Morabito et al., 2006]. Demgegenüber ist Sunitinib ein bereits zur Therapie von gastrointestinalen Tumoren und metastasierten Nierenzellkarzinomen zugelassener oral verfügbarer Tyrosinkinase-Inhibitor. Melger-Lemes et al. konnten in jüngsten Studien die vaskuläre Permeabilität bei Ratten mit 20 mg Sunitinib/kg Körpergewicht signifikant vermindern [Melgar-Lesmes et al., 2009]. Die eingesetzte Konzentration bei den Ratten entspricht 50 μM , wenn ein Körpergewicht von 250 g und ein Verteilungsvolumen von 80 ml zugrundegelegt werden. Bei der bisher therapeutisch eingesetzten Dosis von 50 mg/Tag ergibt sich am Tag 14 eine kumulative Plasmakonzentration von maximal 101 ng/ml oder 0,25 μM . Es kann daher vermutet werden, dass die in der Zulassung von Sunitinib empfohlenen Tagesdosen nicht ausreichen, um VEGF-vermittelte Hyperpermeabilität zu hemmen.

Um den Caco-2-Monolayer weiter zu charakterisieren, wurde die Bedeutung des VEGF-Rezeptors 2 und seines Liganden mit Hilfe eines VEGF-R2-Knockdown-Modells des Caco-2-Monolayers untersucht. Wie die Abbildungen 4.24 und 4.25 demonstrieren, konnte sowohl die Expression der VEGF-R2 mRNA als auch des Proteins deutlich vermindert werden. Mit VEGF-R2 spezifischer siRNA transfizierte Caco-2-Monolayer reagierten im Vergleich zur Kontrolle auf exogene VEGF-Applikation mit einer signifikant schwächeren Permeabilitätserhöhung (Abb. 4.30). Indem die VEGF-vermittelte Hyperpermeabilisierung mit SU5416 gehemmt und diese Effekte in einem VEGF-R2-Knockdown-Modell bestätigt werden konnten, wurde die Bedeutung des VEGF-R2 für die Regulation der endothelialen Permeabilität am Caco-2-Monolayer gezeigt. Ferner wurde die Eignung des Modells zur Untersuchung von VEGF-vermittelter Permeabilität belegt.

4.4.3.2 Bevacizumab

Neben VEGF-Trap und Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden auch neutralisierende Antikörper gegen VEGF bereits in präklinischen Studien mit dem Ziel eingesetzt, die VEGF-vermittelte Ergussentstehung zu hemmen. Mesiano et al. injizierten 1×10^7 OVCAR-3 Zellen in das Peritoneum von Mäusen. Insgesamt 7-10 Tage später wurden 100 μg eines neutralisierenden Antikörpers

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

gegen VEGF intraperitoneal appliziert. Die Entstehung eines peritonealen Ergusses konnte im Vergleich zur Kontrolle vollständig gehemmt werden [Mesiano et al., 1998]. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurden verhältnismäßig hohe Konzentrationen eines neutralisierenden Antikörpers verwendet, um die Ergussbildung zu hemmen. Zum Beispiel dosierten Luo et al. die intraperitoneale Gabe eines neutralisierenden Antikörpers 20-fach höher als bei der vorliegenden VEGF-Konzentration im Aszites der Mäuse rechnerisch erforderlich gewesen wäre [Luo et al., 1998].

Obwohl in präklinischen Untersuchungen die große Bedeutung von VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse offensichtlich geworden war und VEGF daher als therapeutisches Ziel infrage kam, gibt es momentan nur sehr wenige klinische Studien, die sich mit diesem Aspekt befassen. In jüngster Zeit wurde in einigen Heilversuchen eine deutliche Verlängerung der punktionsfreien Zeit nach intrakavitärer Injektion von Bevacizumab gezeigt. Als erstes wurde ein Nutzen des neutralisierenden Antikörpers Bevacizumab (Avastin®) bei der Behandlung des malignen Aszites durch Pichelmayer et al. gezeigt [Pichelmayer et al., 2006]. Tabelle 4.25 liefert einen Überblick über Studien zur Therapie von Ergüssen mit Bevacizumab. Es wird ersichtlich, dass in allen Heilversuchen die eingesetzte Bevacizumab-Konzentration von 5-15 mg/kg Körpergewicht den Angaben der Zulassung für die bisherige Indikation entspricht. Da die Zulassung von Bevacizumab die Therapie maligner Ergüsse nicht umfasst (Offlabel use), sind bisher auch keine Empfehlungen für eine Dosierung bei dieser Indikation gegeben worden.

Tabelle 4.25: Überblick der Studien zur Behandlung maligner Ergüsse mit Bevacizumab

Studie	Pateinten- zahl	Applika- tionsart	Dosierung	ergussfreies Intervall	Toxizität
(Numnum et al., 2006)	4	i.v.	15 mg/kg, alle 3 Wochen	3-6 Monate	Proteinurie und Blut- hochdruck bei einem Patient
(Pichelmayer et al., 2006)	2	i.v.	5-15 mg/kg, alle 3 Wochen	bis 6 Monate	keine
(El-Shami et al.,2007)	9	i.p.	5 mg/kg, jeden Monat	2 Monate	Übelkeit und abdominale Schmerzen bei einem Patient
(Kesterson et al., 2008)	1	i.v.	15 mg/kg, alle 3 Wochen	6 Monate	keine
(Hamilton et al., 2008)	1	i.p.	5 mg/kg, jeden Monat	bis zum Tod	keine

4.4.3.2.1 durch Bestimmung des TEER-Wertes

In dieser Arbeit wurde am Modell des Caco-2-Monolayers eine Dosis-Wirkungskurve für Bevacizumab entwickelt (Abb. 4.28). Dabei ist zu berücksichtigen, dass Caco-2-Zellen selbst große Mengen VEGF sezernieren (Abb. 4.19 und Abb. 4.20). Obwohl vor dem Versuch das Medium in Well und Insert gewechselt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass erhebliche Mengen VEGF weiterhin an den Rezeptoren gebunden sind. Desweiteren bleiben beim Dekantieren des Mediums aus dem Insert ein unkontrolliertes Volumen von 35-45 μ l VEGF-haltigen Mediums auf dem Monolayer zurück [Hubatsch et al., 2007]. Folglich muss kein VEGF exogen appliziert werden, um die Tight Junctions des Caco-2-Monolayers zu öffnen. Durch Aufkonzentrierung konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab die Permeabilität des Caco-2-Monolayers dosisabhängig verringern kann. Eine ED_{50} von 0,7 mg/ml wurde berechnet. Demgegenüber hemmt Bevacizumab bereits mit einer ED_{50} von 50 ± 5 ng/ml die durch 3 ng/ml VEGF-vermittelte Proliferation von bovinen Endothelzellen [Presta et al., 1997]. Die ersten Änderungen des TEER, als Marker für die Integrität des Monolayers, wurden bei einer Konzentration von 0,31 mg/ml gemessen. Der maximale Effekt auf die Permeabilität wurde bei 2,53 mg/ml dokumentiert (Tabelle 4.19). Damit konnte die Permeabilität mit Bevacizumab um 30 % stärker vermindert werden als mit einer 100 mikromolaren Lösung des Tyrosinkinase-Inhibitors. Wenn die bisher zugelassene Höchstdosis von Bevacizumab von 15 mg/kg KG zugrundelegt wird und von einem 75 kg schweren Menschen mit einem mittleren Verteilungsvolumen im *steady state* von 5025 ml ausgegangen wird, würde die maximale Konzentration 0,22 mg/ml betragen. Durch Interpolation zwischen den Messwerten aus Tabelle 4.19 ergibt sich, dass eine Verminderung der Permeabilität um lediglich 12 % des maximalen Effektes möglich wäre. Ein größerer Effekt wäre bei intrakavitärer Applikation mit entsprechend geringerem Verteilungsvolumen gegeben. Betrachtet man das mittlere Ergussvolumen des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs von 2600 ± 3444 ml, ergibt sich bei einer intrakavitären Applikation von 15 mg/kg KG unter der Annahme, dass die Bauch- bzw. Pleurahöhle ein abgeschlossenes Kompartiment darstellt, eine Bevacizumab-Konzentration von 0,4 mg/ml. Eine solche Bevacizumab-Konzentration vermindert die Permeabilität des Monolayers um 25 % des maximalen Effektes. Der am Caco-2-Monolayer demonstrierte maximale Effekt scheint jedoch möglich, wenn das Verteilungsvolumen im Pleuraspalt durch Punktion deutlich reduziert wird. Die intrapleurale Applikation wäre dann während der anschließenden Pleurodese oder alternativ über einen Dauerkatheter denkbar.

Aufgrund der hohen Antikörperkonzentrationen, die für die Hemmung der VEGF-vermittelten Permeabilität erforderlich zu sein scheint, ließ sich ein unspezifischer Effekt zunächst nicht ausschließen. Da aber gezeigt werden konnte, dass sowohl humanes IgG1 als auch Rituximab bei gleicher Konzentration keine Änderung des TEER-Wertes bewirkten, kann von einem spezifischen Effekt des Bevacizumab ausgegangen werden (Abb.4.28). Weiterhin wären Änderungen des TEER-Wertes aufgrund von Leitfähigkeitsänderungen der verschiedenen DMEM-Lösungen

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

denkbar gewesen. Die in Abbildung 4.33B dargestellten Leitfähigkeiten verschiedener Kulturmedien entsprechen denen der Literatur [Ryman et al., 2007]. Daraus folgt, dass mit der Versuchsanordnung zuverlässige Leitfähigkeitsmessungen möglich sind. Abbildung 4.33A fasst die Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessung verschiedener DMEM-Lösungen zusammen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Lösungen gemessen werden. Ein unspezifischer Effekt auf den TEER-Wert aufgrund von Leitfähigkeitsänderungen kann daher ausgeschlossen werden.

4.4.3.2.2 durch Bestimmung der Permeabilität von FITC-markierten Dextran 4kDa

Um die mit Hilfe der TEER-Messung gefundenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden Änderungen der Permeabilität von FITC-Dextran 4 kDa über den Caco-2-Monolayer untersucht. Der Durchmesser dieses Dextrans beträgt 14 Å. Obwohl die Tight Junctions des Caco-2-Monolayers nur einen durchschnittlichen Porendurchmesser von 4 Å aufweisen [Watson et al., 2001], können sie auch von größeren Molekülen passiert werden. Anderson et al. erklären dies durch zwei unterschiedliche Wege, von denen der eine für Moleküle $< 4 \text{ \AA}$ in Abhängigkeit von der Ladung selektiv ist, der andere nicht zwischen Ladung und Größe unterscheidet. [Anderson et al., 2009]. Eine derartige Zweiteilung der Permeabilität in Abhängigkeit vom Durchmesser konnte anhand von Permeabilitätsuntersuchungen an der Pleura parietalis vom Schwein bestätigt werden. FITC-Dextran mit einem Stokes Durchmesser von 14 Å konnte die Pleura parietalis noch in relativ großer Menge passieren. Im Vergleich dazu war die Permeabilität von Dextranen $>23 \text{ \AA}$ um fast 90 % vermindert. Dextrane mit einem Durchmesser von 23 – 60 Å zeigten hingegen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Permeabilität. Auch andere Arbeitsgruppen haben nichtlineare Zusammenhänge der Permeabilität in Abhängigkeit von dem Molekulargewicht bereits nachgewiesen [Artursson et al., 1993, Knipp et al., 1997].

Um die Effekte von Bevacizumab auf die Permeabilität löslichen Dextrans 4 kDa zu untersuchen, wurden Lösungen von FITC-Dextran mit 2 mg/ml Bevacizumab oder humanen IgG1 sowie gleiche Volumina physiologischer Kochsalzlösung auf verschiedene Caco-2-Monolayer pipettiert. In beiden Kontrollen stieg die Permeabilität im Vergleich zum basalen Fluss von FITC-Dextran um 80 % an. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass während des Experimentes die VEGF-Konzentration durch endogen gebildetes VEGF ansteigt, zum anderen dadurch, dass der hydrostatische Druck auf den Monolayer während des Experimentes vergrößert wurde (Abb. 4.11). Im Vergleich zu der Kontrolle war die Permeabilität in Gegenwart von 2 mg/ml Bevacizumab signifikant reduziert (Abb. 4.32). Die Spezifität des Effektes von Bevacizumab ist gegeben, da äquivalente Konzentrationen humanes IgG1 keine Änderungen im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Auch frühere Studien haben gezeigt, dass die VEGF-vermittelte Permeabilität von FITC-Dextran in Gegenwart von Bevacizumab vollständig aufgehoben werden kann [Peters et al., 2007]. Dazu wurden choroidale endotheliale Zellen vom Schwein auf Inserts kultiviert und die Beeinflussung der

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Permeabilität von FITC-Dextran 70 kDa durch 20-100 ng/ml VEGF und 0,1-1 mg/ml Bevacizumab gemessen. Die Wirkung von Bevacizumab auf die Permeabilität ist in ihrer Intensität gut mit dem in dieser Arbeit gezeigten Effekten vergleichbar. Auch die gesteigerte Permeabilität der Kontrolle während des Experimentes wurde von Peters et al. nachgewiesen. Die in der vorliegenden Arbeit demonstrierten Effekte von Bevacizumab auf die Permeabilität von FITC-markierten Dextranen kann daher als Bestätigung der Ergebnisse, die mittels TEER-Messung erhalten wurden, angesehen werden.

4.4.4 Effekte von Ergüssen auf die Permeabilität des Caco-2-Monolayers

Obwohl der Versuchsaufbau wiederholt überarbeitet worden war, konnten mit sterilfiltrierten Ergüssen keine reproduzierbaren Effekte auf die Permeabilität der Caco-2-Monolayer dokumentiert werden. Dass durch Sterilfiltration die VEGF-Konzentration in den Ergüssen vermindert worden wäre, konnte ausgeschlossen werden (Tabelle 4.22). Eine Ursache könnte aber die in Abbildung 4.33C gezeigten Unterschiede in der Leitfähigkeit von Ergüssen und DMEM sein. Die daraus resultierenden TEER-Änderungen aufgrund physikalischer Eigenschaften der Ergüsse könnten biologische Effekte überlagert haben. Einige Ergüsse neigten auch nach der Filtration zur Bildung von Fibrin, welches eine reproduzierbare TEER-Messung weiter erschwerte.

4.4.5 Toxizitätsuntersuchungen von Bevacizumab

Aufgrund der für eine Änderung der Permeabilität des Caco-2-Monolayers erforderlichen hohen Bevacizumab-Konzentrationen, kann eine Toxizität nicht unmittelbar ausgeschlossen werden. Toxizitätsstudien für Bevacizumab wurden in erster Linie an Cynomolgus-Makaken durchgeführt, da deren VEGF eine 99 prozentige Homologie zum humanen VEGF aufweist (Shima et al., 1996). In den Untersuchungen wurden 2, 10 oder 50 mg Bevacizumab /kg Körpergewicht 4, 13 oder 26 Wochen intravenös appliziert [Ryan et al., 1999]. Die dokumentierten Nebenwirkungen beruhen auf der Hemmung der VEGF-abhängigen Angiogenese. Bei Jungtieren mit offenen Wachstumsfugen wurde epiphysäre Dysplasien beobachtet. Die Verminderung der weiblichen Fertilität ist die Folge einer gehemmten Reifung der Ovarfollikel, von reduzierten oder ganz fehlenden Gelbkörperchen mit einhergehender Abnahme des Uterusgewichts und selteneren Menstruationszyklen. Beim Kaninchen hemmte Bevacizumab die Wundheilung. Die bisher genannten Nebenwirkungen waren nach Absetzen der Bevacizumab-Gabe teilweise oder vollständig reversibel. Da Bevacizumab wie alle IgGs die Plazentaschranke passieren kann und somit die Angiogenese beim Fötus hemmt, steht es im Verdacht schwerwiegende Geburtsfehler zu verursachen. Während der Toxizitätsstudien wurde nur sehr vereinzelt eine Antikörperbildung gegen Bevacizumab festgestellt. Wenn die in den Toxizitätsstudien eingesetzte Höchstdosis, die generell gut verträglich war, in den Erguss appliziert werden würde, wäre eine Permeabilitätsverminderung von 84 % des in Abbildung 4.28 gezeigten maximalen Effekts möglich. Bei vorhergegangener Punktion würden demnach bereits Bevacizumab-Konzentrationen,

die deutlich unterhalb der getesteten Höchstdosis liegen, für den maximalen Effekt auf die Permeabilität ausreichen.

4.4.6 Permeabilitätsuntersuchungen von Bevacizumab

In den in Tabelle 4.25 zusammengefassten Heilversuchen wurde Bevacizumab sowohl intrakavitär als auch intravenös injiziert. Um zu entscheiden, welche Applikationsart vorzuziehen ist, sollte in einem weiteren Experiment die Permeabilität von Bevacizumab über die Pleura beziehungsweise über das Peritoneum quantifiziert werden. Bei Patienten, die intravenös mit Bevacizumab behandelt worden waren, war es während der Punktion zu Blutungen gekommen. Infolgedessen wurde bei diesen Patienten keine Punktion mehr durchgeführt, sodass auch keine Erguss-Proben von Patienten zur Verfügung standen, in denen der aus dem Blut in den Erguss permeierte Bevacizumab-Anteil bestimmt werden konnte. Daher wurde hilfsweise die Permeabilität des Bevacizumab über den Caco-2-Monolayer untersucht. Der Caco-2-Monolayer ist insbesondere für die Vorhersage des Transports von Arzneistoffen ein gut charakterisiertes Modell [Volpe, 2008]. In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zum Wachstum und zur Integrität des Caco-2-Monolayers zeigten, dass die TEER-Werte von über 19 Tage kultivierten Caco-2-Monolayern bei $> 500 \Omega\text{cm}^2$ ein Plateau erreichten. Ein konstanter TEER-Wert wird als Indiz für einen vollständig ausdifferenzierten Monolayer mit ausgebildeten Tight Junctions angesehen. Von Bravo et al. wurden 20 Tage nach der Aussaat nur $343 \Omega\text{cm}^2$ gemessen [Bravo et al., 2004]. Dieser Unterschied kann dadurch begründet werden, dass von Bravo et al. 1/5 der in dieser Arbeit eingesetzten Zellzahl ausgesät wurde. Nach Galkin et al. resultieren höhere Ausgangszellzahlen in einem Plateau mit einem höheren TEER-Wert [Galkin et al., 2008]. In dieser Arbeit wurden die Monolayer entsprechend dem von Hubatsch et al. entwickelten Protokoll zur Untersuchung von Arzneistoffpermeabilitäten durch Caco-2-Monolayer kultiviert [Hubatsch et al., 2007]. Um das Modell zu validieren wurde der Permeabilitätskoeffizient (P_{APP}) von Paracetamol bestimmt. Der erhaltene P_{APP} lag mit $52,8 \pm 14,1$ (A→B) und $52,7 \pm 8,9$ (B→A) (10^{-6} cm/s) über den in anderen Studien beschriebenen Messwerten von $29,8 \times 10^{-6}$ cm/s [Laitinen et al., 2004]. Der Vergleich von P_{APP} -Werten aus verschiedenen Laboratorien ist allerdings schwierig, da sich die Monolayer hinsichtlich der Ausbildung von Tight Junctions sowie ihrer Enzym- oder Transporterausstattung stark unterscheiden können [Briske-Anderson et al., 1997]. Eine weitere Erklärung für die in dieser Arbeit gefundenen höheren Permeabilitätskoeffizienten kann in der von Siissalo et al. beschriebenen Zunahme des P_{APP} in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Donor-Lösung zu sehen sein [Siissalo et al., 2009]. Da die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Donor-Lösung 100-fach höher als in den Vergleichsstudien konzentriert war, werden höheren P_{APP} -Werte für Paracetamol erklärbar. Das Modell kann daher als geeignet für die Bestimmung des P_{APP} angesehen werden. Für Bevacizumab wurde ein P_{APP} von $0,01 \pm 0,004$ (A→B) und $0,05 \pm 0,004$ (B→A) (10^{-6} cm/s) nachgewiesen. Aus diesen Ergebnissen ließ sich ein Permeabilitätsverhältnis von 4,02 berechnen. $P_{\text{ratios}} > 2$ gelten in der Literatur als Anzeichen für einen aktiven

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Transportmechanismus. Der aktive Transport von Bevacizumab in die Zelle wurde bereits gezeigt [Heiduschka et al., 2007, Klettner et al., 2009]. Ein gerichteter transzellulärer Transport konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden. P-Glykoprotein ist zwar in Caco-2 exprimiert [Wang et al., 2009], Bevacizumab wurde bisher jedoch nicht als Substrat für Transporter beschrieben. Das Permeabilitätsverhältnis von Bevacizumab scheint daher ein Artefakt zu sein, das auf Unterschiede in der Integrität der Monolayer und Ungenauigkeiten in der Analytik zurückzuführen sein könnte. In jedem Fall liegt jedoch der Permeabilitätskoeffizient von Bevacizumab deutlich unter 1. Ist der P_{APP} kleiner als 1 ist eine schlechte Permeabilität (0-20 %) zu erwarten, bei Werten zwischen 1 und 10 wird von einer mittleren Permeabilität (20-70 %) gesprochen und für Werte größer als 10 wird eine gute Permeabilität (70-100%) erwartet.

Die geringe Permeabilität von Bevacizumab deutet darauf hin, dass die intrakavitäre Applikation vorzuziehen ist. Diese Applikationsform scheint vor allem vor dem Hintergrund sinnvoll, dass vor allem das VEGF in dem Erguss neutralisiert werden soll. Weiterhin kann angeführt werden, dass die hohe Bevacizumab-Konzentration, die scheinbar für die Normalisierung der VEGF-vermittelten Hyperpermeabilität erforderlich ist, nur durch Injektion in das von der Ergussbildung betroffene Kompartiment erreicht wird. In den meisten präklinischen Tiermodellen konnte durch intraperitoneale Applikation die Ergussentstehung erfolgreich gehemmt werden. Letztendlich wurde in keiner der bisher durchgeführten Heilversuche schwerwiegende Nebenwirkungen nach intrakavitärer Gabe von Bevacizumab dokumentiert (Tabelle 4.25).

4.4.7 Zusammenfassung

Aufgrund der für die Therapie maligner Ergüsse erforderlichen hohen Dosen von Bevacizumab und den damit verbundenen Kosten, stellt sich die Frage nach einer alternativen Therapie, die zum Ziel hätte, zunächst die hohen VEGF-Spiegel in den Ergüssen zu senken. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen in den Ergüssen befähigt sind, VEGF zu sezernieren. Daher würde eine Verminderung der Zellzahl geringere VEGF-Spiegel nach sich ziehen, die letztendlich zu einem verlängerten ergussfreien Intervall führen. Dieser Ansatz wird bei der Therapie maligner Ergüsse mit Catumaxomab verfolgt. Catumaxomab ist ein trifunktionaler monoklonaler Ratte-Maus-Hybridantikörper, der mit seinem Maus-Fab-Fragment spezifisch das tumorassoziierte Antigen EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) bindet. Das Fab-Fragment der Ratte bindet an CD3, einem Bestandteil des T-Zell Rezeptorkomplexes. Eine dritte Bindungsstelle in der FC-Region von Catumaxomab ermöglicht die Interaktion mit akzessorischen Immunzellen über die FC γ -Rezeptoren. Infolge der Bindungseigenschaften von Catumaxomab werden Tumorzellen, T-Lymphozyten und akzessorische Immunzellen in unmittelbare Nähe zueinander gebracht. Durch koordinative Immunreaktion wird die Tumorzelle zerstört [Sebastian et al., 2009]. In einer Studie wurden 23 Frauen mit rezidivierenden Ergüssen intraperitoneal mit Catumaxomab behandelt. Die

VEGF bei der Entstehung maligner Ergüsse

Ergussbildung konnte gehemmt und die Tumorzellzahl signifikant reduziert werden. Catumaxomab ist seit Ende 2009 als Removab® zur Behandlung des malignen Aszites bei Patienten mit EpCAM-positiven Karzinomen zugelassen. Vor dem Hintergrund des in der Fachinformation angegebenen Dosierungsschemas, resultieren Therapiekosten in Höhe von 14.500 Euro pro Patient. Somit ist Catumaxomab zumindest aus finanzieller Sicht keine Alternative für Bevacizumab.

Ein weiterer Ansatzpunkt könnte sein, die VEGF-Produktion der Tumorzellen zu reduzieren. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Albendazol (Eskazole®) die VEGF-Freisetzung von Tumoren vermindert und somit signifikant die Ergussbildung hemmt [Pourgholami et al., 2006]. Albendazol ist seit vielen Jahren als Anthelminthikum zugelassen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten daher Faktoren aus den Ergüssen untersucht werden, die die VEGF-Expression von Tumorzellen stimulieren, um diese Faktoren gegebenenfalls zu hemmen und somit die Ergussbildung zu unterbinden.

5. Regulation der VEGF-Produktion

5.1 Einleitung

5.1.1 Regulation der VEGF-Produktion

VEGF besitzt eine große Bedeutung im Rahmen der Angiogenese und Regulation der epithelialen Permeabilität. Zytokine (IL-1 und IL-6), Wachstumsfaktoren (PDGF und TGF- β 1) sind Stimulanzen der VEGF-Produktion [Neufeld et al., 1999]. Darüberhinaus spielt der unter hypoxischen Bedingungen gebildete Hypoxie-induzierte Faktor (HIF)-1 α eine Schlüsselrolle bei der Regulation der VEGF-Expression [Shweiki et al., 1992]. Neben zahlreichen anderen Faktoren wird auch die Inaktivierung von Tumorsuppressoren als ursächlich für erhöhte VEGF-Produktion genannt. Mutationen im von Hippel-Lindau-Gen [Siemeister et al., 1996] assoziierten wie auch Mutationen im P53-Gen [Kieser et al., 1994] mit erhöhten VEGF-Spiegeln. Welche Faktoren für die hohe VEGF-Konzentration in Ergüssen verantwortlich sind, soll in diesem Kapitel untersucht werden. Im Fokus der Studien stehen TGF- β 1, IL-8 und die Gerinnungsfaktoren FXa und FIIa.

5.1.2 Der Wachstumsfaktor TGF- β

Der Transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) ist ein 25 kDa schweres Homodimer, das aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten mit je 112 Aminosäuren besteht [Massague, 1987]. Die Familie der TGF- β s setzt sich aus fünf Isoformen zusammen, von denen aber nur TGF- β 1-3 in Säugetieren exprimiert werden [Saito et al., 1999]. Es wird ubiquitär gebildet. Die TGF- β 1-Konzentration ist bei verschiedensten Karzinomen erhöht [Derynck et al., 2001]. Jede Isoform wird von einem Gen auf verschiedenen Chromosomen codiert. TGF- β wird zunächst als ein aus 380 Aminosäuren bestehendes Vorläuferprotein synthetisiert, das an die Extrazellulärmatrix gebunden ist. Durch Plasmin und Metalloproteasen wird das aktive Homodimer in vivo abgespalten [Khalil, 1999]. Die anfängliche Unwirksamkeit ist aufgrund der pleiotropen Wirkung von TGF- β notwendig. Wie eine Zelle auf einen TGF- β 1-Stimulus reagiert, ist stark vom Zelltyp abhängig [Siegel et al., 2003, Kang, 2006]. TGF- β 1 bewirkt eine Inhibierung der Proliferation durch Zellzyklusarrest in der G1-Phase, indem Zellzyklusaktivatoren gehemmt und Zellzyklusinhibitoren induziert werden [Laiho et al., 1990]. Daneben stimuliert TGF- β 1 auch apoptotische Prozesse und induziert epitheliale-mesenchymale Transition. Siegel et al. zeigten am Beispiel für primäre Brusttumoren im Mausmodell, dass TGF- β 1 im Frühstadium der Tumorgenese die Tumorentstehung zunächst hemmt. Im Gegensatz dazu besitzt TGF- β 1 im fortgeschrittenen Stadium einer Tumorerkrankung proonkogenetische Eigenschaften, die mit einer erhöhten Invasivität, Mortalität und Metastasierung einhergehen [Siegel et al., 2003].

Regulation der VEGF-Expression

TGF- β reguliert die Zellprozesse durch Bindung an spezifische Rezeptor-Serin/Threoninkinasen, bekannt als TGF- β -Rezeptor I,II und III. Rezeptor III, auch als β -Glycan bezeichnet, wird auf mesenchymalen, epithelialen neuronalen und vielen anderen Zellen, nicht aber auf Endothelzellen exprimiert. Das β -Glycan ähnliche Endoglin ist demgegenüber auf Endothelzellen nachweisbar und übernimmt dort die Funktion des Typ-III-Rezeptors. TGF- β 1 wird von beiden Typ-III-Rezeptoren mit hoher Affinität gebunden ohne direkt eine Signaltransduktion zu vermitteln (a). Vielmehr präsentieren die beiden Co-Rezeptoren das TGF- β 1 den Typ II- Rezeptoren, indem sie einen Komplex aus Rezeptor III, TGF- β 1 und Rezeptor II bilden. Die Bindung des TGF- β 1 an das Typ II-Rezeptorhomodimer resultiert in dessen Aktivierung (b). In der Folge rekrutiert der Rezeptor II ein Typ I-Rezeptorhomodimer, wodurch dieses unter Ausbildung eines tetrameren Rezeptorkomplexes phosphoryliert und aktiviert wird. Von dem Typ I-Rezeptor existieren drei verschiedene Subtypen [ALK (*activin receptor-like kinase*) 1,2 und 5] (c). Der aktivierte Typ I-Rezeptor bindet Smad 2 oder 3 und phosphoryliert es. (Der Name Smad stammt aus den beiden ersten, indentifizierten Mitgliedern der Familie: Sma in *c. elegans* und Mad in *Drosophila*.) (d). Wenn eines dieser Smads phosphoryliert worden ist, dissoziiert es vom Rezeptor und bindet an Smad 4, das einen Komplex mit Smad 1,2,3,5 oder 8 bilden kann (e). Der Smad-Komplex wandert dann in den Kern (f) und assoziiert dort mit anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren. Indem der Komplex an spezifische Stellen der DNA bindet, wird ein besonderer Satz von Zielgenen aktiviert (g).

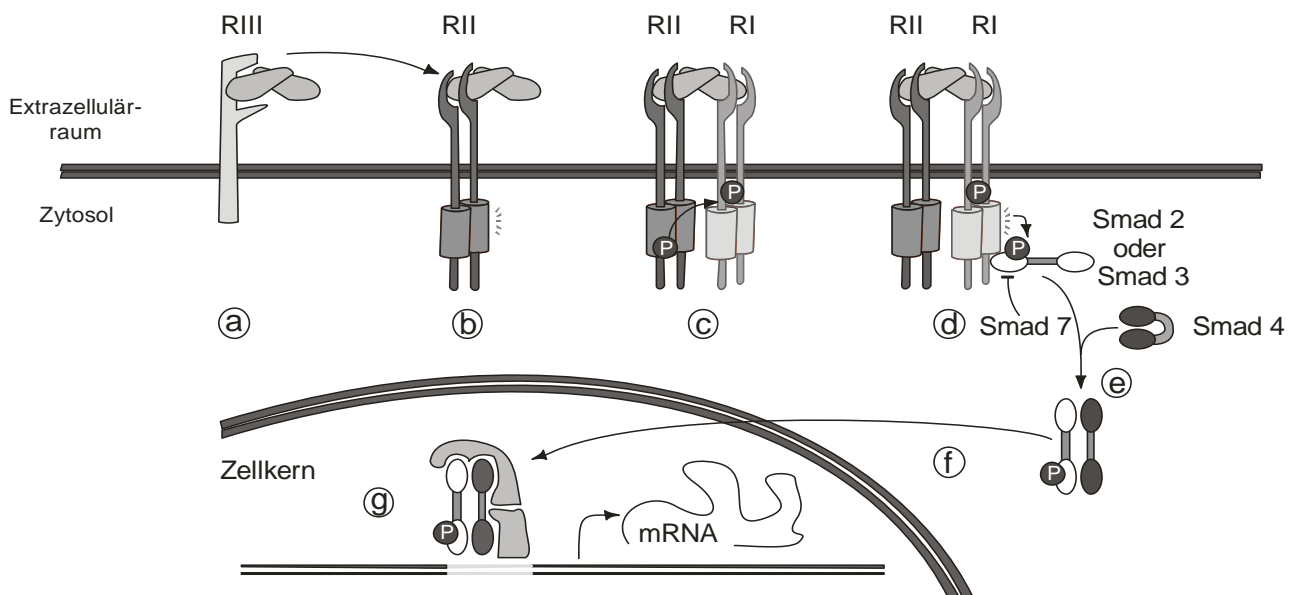


Abb. 5.1: Modell für den Smad-abhängigen, durch TGF- β 1 aktivierten Signalweg

5.1.3 Das Chemokin IL-8

IL-8 wird als Vorläuferprotein bestehend aus 99 Aminosäuren synthetisiert, das nach Abspaltung einer Signalsequenz freigesetzt wird. Durch anschließende extrazelluläre Modifikation wird die spezifische Aktivität erhöht [Clark-Lewis et al., 1991]. Es konnte gezeigt werden, dass IL-8 in Lösung als Homodimer vorliegt [Clare et al., 1992]. Die biologisch aktive Form scheint aber das

Regulation der VEGF-Expression

Monomer zu sein [Rajaratnam et al., 1994]. Wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weisen die Chemokinrezeptoren sieben Transmembransegmente auf. Bis heute sind 18 Chemokin-Rezeptoren identifiziert worden [Allen et al., 2007]. Aber nur CXCR1 [Murphy et al., 2009] und CXCR2 [Holmes et al., 2009] binden IL-8. Die Eigenschaften dieser Rezeptoren sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Eigenschaften von IL-8 Rezeptor [Brat et al., 2005].

Eigenschaften	CXCR1	CXCR2
Lokalisation	Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Basophile, T-Lymphozyten, Endothelzellen	Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Basophile, T-Lymphozyten, Endothelzellen, Neuronen des ZNS
Biologische Funktion	Anlockung von Neutrophilen, Angiogenese	Anlockung von Neutrophilen, Angiogenese, Anreicherung von Makrophagen

5.1.4 Die Gerinnungsfaktoren Thrombin und FXa

Die Serinprotease Faktor Xa wird im Verlauf der extrinsischen oder intrinsischen Blutgerinnungskaskade entweder durch einen Komplex aus Tissue Faktor (TF) und Faktor VII oder durch Faktor VIIIa proteolytisch zu Faktor Xa aktiviert [Thews et al., 1999]. Durch Faktor Xa wird überwiegend an der Oberfläche zirkulierender Blutplättchen Prothrombin zu Thrombin gespalten, das seinerseits eine Serinprotease darstellt. Serinproteasen bilden eine Klasse aus proteolytischen Enzymen, deren bezeichnendes Merkmal eine katalytische Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure darstellt. Diese Aminosäuren haben die Fähigkeit, Peptidbindungen zu hydrolysieren [Steinhoff et al., 2005]. Die durch Hydrolyse bewirkte Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren verläuft bei allen Serinproteinasen nach einem identischen Mechanismus [Ossovskaya et al., 2004]. Dabei spalten die Proteinase an einer spezifischen Stelle innerhalb des extrazellulär gelegenen Aminoterminus des Rezeptors. Dadurch wird ein neuer Aminoterminus freigelegt, der als gebundener (*tethered*) Ligand durch Interaktion mit der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors diesen aktiviert (Abbildung 5.2) [Macfarlane et al., 2001]. Durch Desensitivierung oder *Downregulation* des Rezeptors wird die Signaltransduktion aufgehoben [Ossovskaya et al., 2004]. Die durch Serinproteinasen aktivierbaren G-Protein gekoppelten Rezeptoren werden aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus in die Urokinase-Rezeptoren und die Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) unterteilt. [Steinhoff et al., 2005].

Regulation der VEGF-Expression

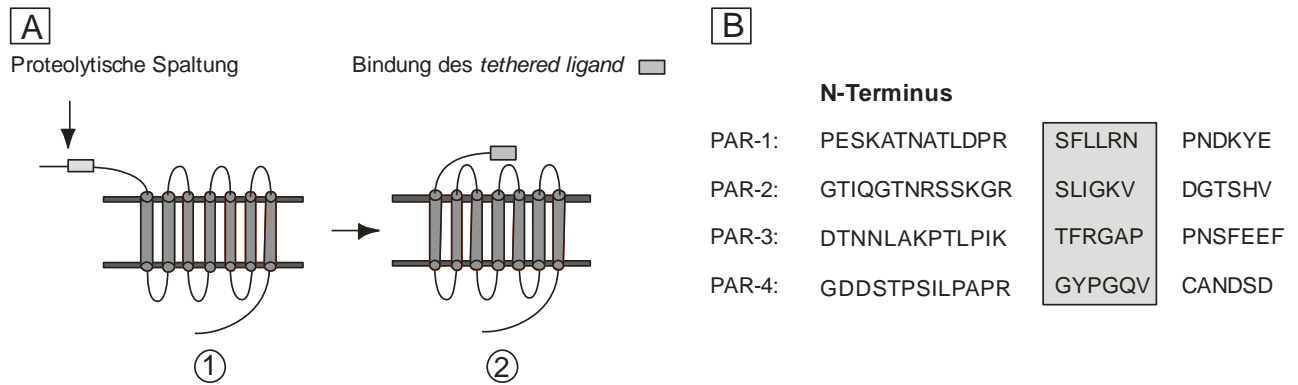


Abb. 5.2: (A) Aktivierung von Proteinase-aktivierten Rezeptoren durch Serinproteasen. (B) „*Tethered Ligand*“ und PAR aktivierende Peptide

Insgesamt werden vier PARs unterschieden (Tabelle 5.2). Für PAR-1, PAR-2 und PAR-4 wurden PAR-aktivierende Peptide (PAR-AP) designt, deren Sequenzen mit denen der sogenannten *tethered ligands* übereinstimmen. Obwohl es sich um selektive Rezeptor-Agonisten handelt, ist für das PAR-1-AP gezeigt worden, dass es ebenfalls PAR-2 aktiviert. Demgegenüber ist das PAR-2-AP selektiv.

Tabelle 5.2: Eigenschaften der Proteinase-aktivierten Rezeptoren

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Aktivierende Proteasen	Thrombin, Fxa, APC, Trypsin	Trypsin, FVIIa, Fxa, Tryptase, MT-SP1	Thrombin	Thrombin, Trypsin
Aktivierende Peptide	SFLLRN, TFLLRN	SLIGKV		GYPGQV
Lokalisierung	Blutplättchen, Endothel, Monozyten, Fibroblasten, Epithel	Endothel, Monozyten, Epithel, Fibroblasten	Blutplättchen, Endothel, Monozyten	Blutplättchen, Endothel, Monozyten

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Einfluss der Gerinnungsfaktoren auf die VEGF-Expression

5.2.1.1 Bestimmung von Gerinnungsfaktoren in Ergüssen

Natrium-Citrat enthaltende S-Monovetten wurden mit 1,5 ml Erguss gefüllt und nach kurzem Schütteln bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert (Varifuge 20 RS, Heraeus). Der Überstand wurde in Gerinnungsröhrchen (Dade Behring) pipettiert.

Die Analytik wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt. Die Methode der Messung der Faktoren II, V, XII und X beruht darauf, dass der Mangel an einem der Faktoren zu einer verlängerten Thromboplastinzeit (PT) führt. Zur

Regulation der VEGF-Expression

Einzelfaktor-Bestimmung wurde die PT einer Mischung des entsprechenden Mangelplasmas mit dem Erguss gemessen. Ein Erguss, dem der betreffende Faktor fehlt, ist nicht in der Lage, die Abwesenheit des Faktors im Mangelplasma auszugleichen, woraus eine Verlängerung der PT resultiert. Die Aktivität des Gerinnungsfaktors in % der Norm wurde über eine Bezugskurve ermittelt, die durch Verdünnung von Kontroll-Plasma mit dem entsprechenden Mangelplasma erstellt wurde. Die Konzentration von Protein C und AT3 wurden mit chromogenen Assays bestimmt. Der Gehalt von Prothrombinfragment F₁₊₂ und D-Dimeren in den Ergüssen wurde mittels Sandwich-ELISA quantifiziert.

5.2.1.2 Durchflusszytometrie

5.2.1.2.1 Aufbereitung der Proben

Die Zellen wurden mit Accutase (PAA) aus den Kulturflaschen abgelöst und die entstandene Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500-750 µl Dulbecco's PBS (Cell Concepts) resuspendiert. Je nach Zellzahl wurden 50 µl der Zellsuspension in eine 96-Wellplatte (Nunclon, Nunc) pipettiert und bei 4 °C, 1000 U/min für 4 Minuten zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus). Das entstandene Zellpellet wurde zweimal mit 100 µl kaltem Waschpuffer (PBS mit 1 % (W/V) BSA und 0,1 % (W/V) NaN₃) gewaschen. Dazu wurde das Zellpellet resuspendiert und bei 4 °C und 1000 U/min für 4 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit 10 µl PAR-2 Antikörperlösung (50 µg/ml) oder IgG2a-Isotypkontrolle resuspendiert und 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension wie oben beschrieben zentrifugiert und zweimal gewaschen. Das entstandene Zellpellet wurde mit 10 µl FITC-anti-Maus-IgG2a resuspendiert und erneut bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert. Nachdem die Zellen zentrifugiert und anschließend zweimal gewaschen worden waren, wurden sie in 150 µl einer 1 prozentigen PFA-Lösung resuspendiert und in FACS-Röhrchen (Sterilin, 40x6 mm round base) überführt.

5.2.1.2.2 Detektion von PAR-1 und PAR-2 auf Patientenzellen und Tumorzelllinien mittels FACS (*fluorescence activated cell sorter*)

Für die Auswertung wurden in jedem der drei Experimente pro Zelllinie 10.000 Zellen, die sich in dem zuvor im Dot Plot (Abb. 5.3A) festgelegten Bereich befanden, vermessen.

Regulation der VEGF-Expression

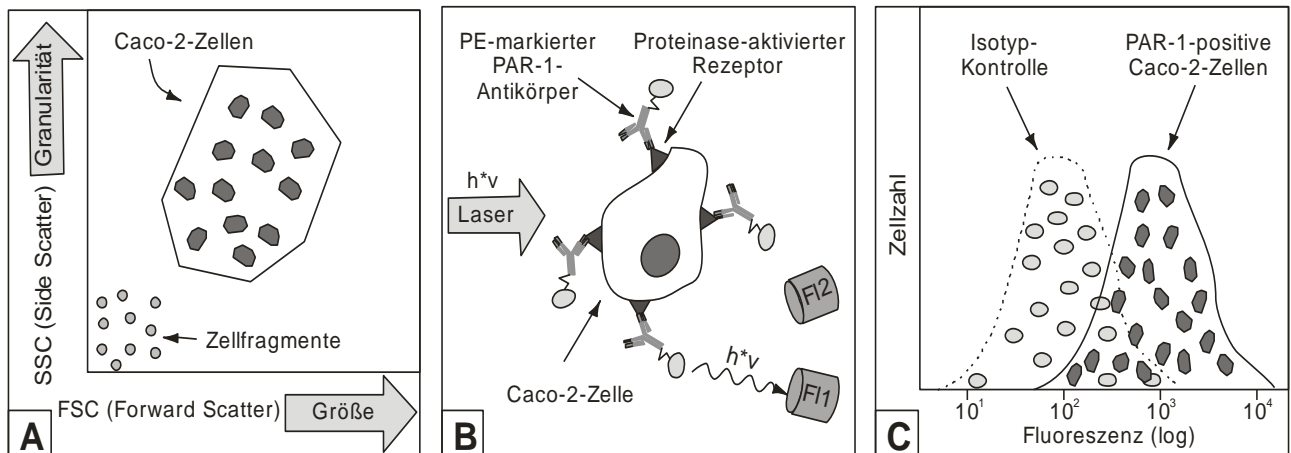


Abb. 5.3: Prinzip der FACS-Analytik: (A) Charakterisierung von ungefärbten Zellen anhand der Lichtstreuung (Dot Plot). Große Zellen befinden sich rechts in der Abbildung. Granuläre Zellen befinden sich oben. (B) Schematische Darstellung von gefärbten Zellen bei der FACS-Messung. Das Antikörper-gekoppelte Fluorochrom wird durch den Laser angeregt und emittiert Fluoreszenzlicht, dessen Intensität je nach Wellenlänge von dem Photomultiplier-Detektor FL1 oder FL2 gemessen wird. (C) FACS-Histogramm: Die Abzisse gibt die logarithmierte Fluoreszenzintensität wieder, die Ordinate die Zellzahl.

Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm. Emittiertes Licht der Wellenlänge 525 nm (FITC) wurde vom Photomultiplier-Detektor FL1 vermessen und der Photomultiplier-Detektor FL2 quantifizierte Licht der Wellenlänge 575 nm (PE).

5.2.1.3 Einfluss von FXa und FIIa auf die VEGF-Produktion von Panc-1 und Patientenzellen

5.2.1.3.1 VEGF-mRNA Realtime PCR

5.2.1.3.1.1 Stimulation der Zellen

Zellen, die wie unter 4.2.1 beschrieben aus den Ergüssen mit den Nummern 459 und 800 isoliert worden sind, werden in der Folge Patientenzelle 459 (P459) und Patientenzelle 800 (P800) genannt. Die Primärzellen P459 und P800 wurden ausgewählt, weil sie sich gut kultivieren ließen. Je 5×10^4 P459- und P800-Zellen wurden in je 12 Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml Medium (Tabelle 7.1, Seite 147) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium aus den Wells 1-4 entfernt und diese anschließend gemäß Tabelle 5.3 für die 48 stündige Stimulation beziehungsweise Kontrolle mit 1 ml Medium gefüllt. Die Patientenzellen wurden zusätzlich über 24, 12, 6 und 3 Stunden in gleicher Weise stimuliert, wobei in diesen Fällen keine weitere Kontrolle pipettiert wurde. Am Ende des Versuchs wurde aus allen 12 Wells gleichzeitig die RNA wie unter 4.2.4.2.1 beschrieben isoliert.

Regulation der VEGF-Expression

Tabelle 5.3: Pipettierschema für Stimulationskinetik mit FIIa und SLIGKV

Well-Nr.	1	5	7	9	11	2	4	6	8	10	3 und 4
Inkubationsdauer (h)	48	24	12	6	3	48	24	12	6	3	48
	1 U/ml FIIa in RPMI mit 10 % FCS					100 µM SLIGKV in RPMI mit 10 % FCS					RPMI mit 10 % FCS (Kontrolle)

In einem weiteren Experiment wurden 5×10^4 Panc-1-, P459- und P800-Zellen in je neun Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml des entsprechenden Mediums (Tabellen 7.1 und 7.2, Seite 147) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde in allen Wells das Medium gewechselt und je Zelle die Wells entsprechend Tabelle 5.4 mit 1 ml Medium gefüllt. Nach weiteren 3 Stunden wurde die RNA wie unter 4.2.4.2.1 beschrieben isoliert.

Tabelle 5.4: Pipettierschema für 3-stündige Inkubation mit FIIa und SLIGKV

Well-Nr. 1 -3	Well-Nr. 4-6	Well-Nr. 6-9
1 U/ml FIIa in RPMI mit 10 % FCS	100 µM SLIGKV in RPMI mit 10 % FCS	RPMI mit 10 % FCS (Kontrolle)

5.2.1.3.1.2 Quantifizierung der VEGF-mRNA

Die RNA wurde wie in Abschnitt 4.2.4.2.3 geschildert durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die Polymerasekettenreaktion in Echtzeit wurde die cDNA 1:4 mit Wasser für die Chromatographie verdünnt. Insgesamt 10 µl dieser Verdünnung wurden in Doppelbestimmung in die Vertiefung einer 96-Well PCR-Platte (Themowell®, Costar) pipettiert. Darauf folgend wurde pro Vertiefung 20 µl Mastermix (Tabelle 5.5) hinzupipettiert.

Tabelle 5.5: Mastermix für die realtime-PCR

SYBR® Green-Supernix	F-Primer (0,1 nmol/µl)	R-Primer (0,1 nmol/µl)	Wasser
15 µl	0,15 µl	0,15 µl	4,7 µl

Die PCR-Platte wurde mit einer selbstklebenden Folie (Optical Sealing Tape, Bio-Rad) abgedeckt und in den iCycler (Bio-Rad) eingesetzt. Am Ende der PCR wurde mit einer Schmelzkurve die Reinheit des Produktes überprüft.

Tabelle 5.6: Bedingungen der realtime-PCRs

Amplifikat	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
TBP (housekeeping gene)	95 °C; 30 s	60 °C; 30 s	72 °C; 30 s	40
VEGF (Zielgen)	95 °C; 30 s	63 °C; 30 s	72 °C; 30 s	40

5.2.1.3.1.3 Auswertung

Zur Auswertung der Realtime-PCR-Ergebnisse wurde die relative Quantifizierung nach Pfaffel verwendet, die auf dem Verhältnis der Genexpression des Zielgens gegenüber einem weiterem nicht reguliertem Gen (housekeeping gene) basiert. Als Maß werden die sogenannten CP (Crossing Point)-Werte herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am CP findet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Das Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle des Zielgens im Zähler und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle des Referenzgens im Nenner zusammen. Idealerweise ist das Referenzgen nicht reguliert und sowohl unter der Behandlung als auch in der Kontrolle sind die CPs identisch [Pfaffl, 2001].

$$Ratio = \frac{2^{[CP, Zielgen (Kontrolle)] - [CP, Zielgen (Behandlung)]}}{2^{[CP, Referenzgen (Kontrolle)] - [CP, Referenzgen (Behandlung)]}} \quad (5.1)$$

5.2.1.3.2 VEGF-ELISA

Je 1×10^5 Panc-1-, P459- und P800-Zellen wurden in je neun Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml Mediums (RPMI mit 10 % (V/V) FCS und 1 % (V/V) Glutamin (200 mM)) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde in allen Wells das Medium gewechselt und je Zelle die Wells entsprechend Tabelle 5.7 mit 1 ml Medium gefüllt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium entnommen und zur späteren VEGF-Gehaltsbestimmung bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Anschließend wurden die Zellen zur Normalisierung des VEGF-Gehalts mit einer Neubauer-Kammer gezählt. Die VEGF-Konzentration wurde wie unter 4.2.2 erläutert bestimmt.

Tabelle 5.7: Pipettierschema für 24-stündige Stimulation mit FIIa und SLIGKV (VEGF-ELISA)

Well-Nr. 1-3	Well-Nr. 4-6	Well-Nr. 6-9
1 U/ml FIIa in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM)	100 μM SLIGKV in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM)	RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM) (Kontrolle)

5.2.2 Einfluss von TGF- β 1 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

5.2.2.1 Bestimmung der TGF- β 1-Konzentration in den Ergüssen

In vier Ergüssen (459, 671, 837 und 841), die wie unter 4.2.1 beschrieben gesammelt und aufgearbeitet worden waren, wurde vor und nach Filtration durch einen $0,2\text{ }\mu\text{m}$ Filter (Sartorius) entsprechend Abschnitt 4.2.2 die TGF- β 1-Konzentration bestimmt.

5.2.2.2 Bestimmung der TGF-β1-Konzentration in den Überständen von Zelllinien und Patientenzellen

Die Patientenzellen P459, P837 und P841, die wie unter 4.2.1 beschrieben isoliert worden waren, sowie Caco-2- und HPDE-Zellen wurden in dreifachem Ansatz in einer Zelldichte von 1×10^5 in eine 6-Wellplatte ausgesät. Nachdem die Zellen über 72 Stunden in 3 ml des entsprechenden Mediums kultiviert worden waren, wurde das Medium entnommen und zur späteren TGF-β1-Gehaltsbestimmung eingefroren. Abschließend wurde mit einer Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt, um die TGF-β1-Freisetzung zu normalisieren.

5.2.2.3 Einfluss von TGF-β1 auf die VEGF-Produktion von Zelllinien und Patientenzellen

5.2.2.3.1 VEGF-mRNA Realtime PCR

5.2.2.3.1.1 Stimulation der Patientenzellen

Je 5×10^4 P459-Zellen und P800-Zellen wurden in je 4 Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml Medium (Tabelle 7.1, Seite 147) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium aus den Wells 1 und 2 entfernt und diese anschließend gemäß Tabelle 5.8 für die 12 stündige Stimulation beziehungsweise Kontrolle mit 1 ml Medium gefüllt. Um das TGF-β1 vor Versuchsbeginn zu aktivieren, wurden 10 µg TGF-β1 entsprechend den Angaben des Herstellers in 0,58 µl eine 25 prozentigen HCl-Lösung gelöst. Anschließend wurde 1 ml einer 0,1 prozentigen BSA-H₂O-Lösung hinzugegeben. Die Patientenzellen wurden zusätzlich über 6 und 3 Stunden in gleicher Weise stimuliert, wobei in diesen Fällen keine weitere Kontrolle pipettiert wurde. Am Ende des Versuchs wurde aus allen sechs Wells gleichzeitig die RNA wie unter 4.2.4.2.1 beschrieben isoliert.

Tabelle 5.8: Pipettierschema für Stimulationskinetik mit TGF-β1

Well-Nr.	1	3	4	2
Inkubationsdauer (h)	12	6	3	12
	10 ng/ml TGF-β1 in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM)			RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM) (Kontrolle)

In einem weiteren Experiment wurden 5×10^4 Zellen der Zelllinie Panc-1, Caco-2 und HPDE, sowie der Patientenzellen P459, P800 und P841 in je sechs Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml des entsprechenden Mediums (Tabellen 7.1 und 7.2, Seite 147) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde in allen Wells das Medium gewechselt und je Zelle die Wells entsprechend Tabelle 5.9 mit 1 ml Medium gefüllt. Nach weiteren 3 Stunden wurde die RNA wie unter 4.2.4.2.1 beschrieben isoliert.

Regulation der VEGF-Expression

Tabelle 5.9: Pipettierschema für 3-stündige Stimulation mit TGF- β 1

Well-Nr. 1-3	Well-Nr. 4-6
10 ng/ml TGF- β 1 in Medium (Tabelle 7.1 und 7.2, Seite 147)	Medium (Tabelle 7.1 und 7.2, Seite 147) (Kontrolle)

5.2.2.3.1.2 Quantifizierung der VEGF-mRNA

Wie unter Abschnitt 5.2.1.3.1.2 geschildert wurde die VEGF-mRNA quantifiziert und das Ergebnis mit dem unter 5.2.1.3.1.3 dargestellten Verfahren ausgewertet.

5.2.2.3.2 VEGF-ELISA

5.2.2.3.2.1 Stimulation der Zellen mit TGF- β 1

Je 5×10^4 Zellen der Zelllinien Panc-1, Caco-2 und HPDE, sowie der aus Ergüssen isolierten Zellen P459 und P800 wurden in je sechs Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml des entsprechenden Mediums (Tabellen 7.1 und 7.2, Seite 147) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde in allen Wells das Medium gewechselt und je Zelle die Wells entsprechend Tabelle 5.10 mit 1 ml Medium gefüllt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium entnommen und zur späteren VEGF-Gehaltsbestimmung bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Anschließend wurden die Zellen, zwecks Normalisierung des bestimmten VEGF-Gehalts, mit einer Neubauer-Kammer gezählt. Die VEGF-Konzentration wurde wie unter 4.2.2 erläutert bestimmt.

Tabelle 5.10: Pipettierschema für 24-stündige Stimulation mit TGF- β 1 (VEGF-ELISA)

Well-Nr. 1-3	Well-Nr 4-6
10 ng/ml TGF- β 1 in Medium (Tabelle 7.1 und 7.2, Seite 147)	Medium (Tabelle 7.1 und 7.2, Seite 147) (Kontrolle)

5.2.2.3.2.2 Inhibierung des endogenen TGF- β 1

P459- und P800-Zellen wurden in einer Zelldichte von 1×10^5 jeweils in neun Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml des in Tabelle 5.11 angegebenen Mediums kultiviert. Nach 24 Stunden wurde in allen Wells das Medium gewechselt und die Wells wiederum entsprechend Tabelle 5.11 mit 1 ml Medium gefüllt. Nach weiteren 48 Stunden wurde das Medium entnommen und zur späteren VEGF-Gehaltsbestimmung bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Um die VEGF-Konzentration auf die Zellzahl zu normalisieren, wurden die Zellen mit einer Neubauer-Kammer gezählt. Die VEGF-Konzentration wurde wie unter 4.2.2 erläutert bestimmt.

Regulation der VEGF-Expression

Tabelle 5.11: Pipettierschema für Neutralisation des endogenen TGF- β 1 (ELISA). (MAB1835 ist ein die Wirkung von TGF- β blockierender Antikörper).

Well-Nr. 1 -3	Well-Nr. 4-6	Well-Nr. 6-9
2 μ g/ml MAB1835 in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM)	2 μ g/ml Maus IgG1-Isotyp in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM) (Isotyp-Kontrolle)	RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM) (Kontrolle)

5.2.3 Einfluss von IL-8 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

5.2.3.1 Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Ergüssen

In vier Ergüssen (459, 671, 837 und 841), die wie unter 4.2.1 beschrieben gesammelt und aufgearbeitet worden waren, wurde entsprechend Abschnitt 4.2.2 die IL-8-Konzentration bestimmt.

5.2.3.2 Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Überständen von Zelllinien und Patientenzellen

Die IL-8-Konzentration wurde in den unter 5.2.2.2 gesammelten Kulturüberständen bestimmt.

5.2.3.3 Einfluss von IL-8 auf die VEGF-Produktion von Zelllinien und Patientenzellen

5.2.3.3.1 VEGF-mRNA Realtime PCR

5.2.3.3.1.1 Stimulation der Zellen

Caco-2- und HPDE-Zellen wurden in je 6 Wells einer 12-Wellplatte in einer Zelldichte von 1×10^5 ausgesät und in 1 ml Medium (Tabelle 7.1, Seite 147) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium aus den Wells 1 und 2 entfernt und diese anschließend gemäß Tabelle 5.12 für die 24-stündige Stimulation beziehungsweise Kontrolle mit 1 ml Medium gefüllt. Die Zelllinien wurden zusätzlich über 12, 6 und 3 Stunden in gleicher Weise stimuliert, wobei nur für den 12 Stundenwert eine weitere Kontrolle pipettiert wurde. Am Ende des Versuchs wurde aus allen sechs Wells gleichzeitig die RNA wie unter 4.2.4.2.1 beschrieben isoliert.

Tabelle 5.12: Pipettierschema für Stimulationskinetik mit IL-8

Well-Nr.	1	3	5	6	2	4
Inkubationsdauer (h)	24	12	6	3	24	12
	10 ng/ml IL-8 in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM)				RPMI mit 10 % FCS und 1 % Glutamin (200 mM) (Kontrolle)	

Regulation der VEGF-Expression

In einem weiteren Experiment wurden 1×10^5 Zellen der Zelllinien Caco-2 und HPDE, sowie der aus Ergüssen isolierten Zellen P459 und P800 in je sechs Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml des entsprechenden Mediums (Tabellen 7.1 und 7.2, Seite 147) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde in allen Wells das Medium gewechselt und je Zelle die Wells entsprechend Tabelle 5.13 mit 1 ml Medium gefüllt. Nach weiteren 12 Stunden wurde die RNA wie unter 4.2.4.2.1 beschrieben isoliert.

Tabelle 5.13: Pipettierschema für 12-stündige Stimulation mit IL-8

Well-Nr. 1-3	Well-Nr. 4-6
10 ng/ml IL-8 in Medium (Tabelle 7.1 und 7.2, Seite 147)	Medium (Tabelle 7.1 und 7.2, Seite 147) (Kontrolle)

5.2.3.3.1.2 Quantifizierung der VEGF-mRNA

Die mRNA wurde wie unter Abschnitt 5.2.1.3.1.2 geschildert quantifiziert und das Ergebnis mit dem unter 5.2.1.3.1.3 dargestellten Verfahren ausgewertet.

5.2.3.3.2 VEGF-ELISA

Je 1×10^5 Zellen der Tumorzelllinie Panc-1, sowie der Patientenzellen P459 und P800 wurden in je sechs Wells einer 12-Wellplatte ausgesät und in 1 ml des entsprechenden Mediums (Tabellen 7.1 und 7.2, Seite 147) kultiviert. Nach weiteren 24 Stunden wurde in allen Wells das Medium gewechselt und je Zelle die Wells entsprechend Tabelle 5.14 mit 1 ml Medium gefüllt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium entnommen und zur späteren VEGF-Gehaltsbestimmung bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Anschließend wurden die Zellen, zwecks Normalisierung des bestimmten VEGF-Gehalts, mit einer Neubauer-Kammer gezählt. Die VEGF-Konzentration wurde wie unter 4.2.2 erläutert bestimmt.

Tabelle 5.14: Pipettierschema für 24-stündige Stimulation mit IL-8 (ELISA)

Well-Nr. 1-3	Well-Nr. 4-6
10 ng/ml IL-8 in Medium (Tabelle 7.1 und 7.2, Seite 147)	Medium (Tabelle 7.1 und 7.2, Seite 147) (Kontrolle)

5.2.4 Bestimmung von Permeabilitätsveränderungen des Caco-2 Monolayers mittels TEER-Messung in Abhängigkeit von:

Die Caco-2 Monoayler wurden wie unter 3.2.1 geschildert über 15-18 Tage kultiviert. Die unter 3.3.3.2 beschriebenen Elektroden wurden zusammen mit den Thermoelementen in der Halterung fixiert und in mit Ethanol gefüllte Wells einer 12-Wellplatte für 45 min eingetaucht. Das Medium wurde in Well und Insert erneuert, sodass sich 1,5 ml Medium im Well und 0,5 ml Medium im Insert befanden. Nachdem der Versuchsaufbau für 4 Stunden im Brutschrank temperiert worden war,

Regulation der VEGF-Expression

wurden der TEER-Wert und die Temperatur, wie unter 3.2.4 erklärt, alle 20 min gemessen. Nachdem der TEER-Wert über drei Messungen konstant war, sodass dieser als Ausgangswert verwendet werden konnte, wurde mit der Stimulation der Caco-2-Monolayer wie unter 5.2.4.1 – 5.2.4.3 beschrieben fortgefahren. Anschließend wurde der TEER-Wert alle 6 Stunden über einen Zeitraum von 48 Stunden gemessen.

5.2.4.1 FIIa und FXa

Aus dem Insert wurden 100 µl Medium und aus dem Well 300 µl Medium entnommen und durch gleiche Volumina verschiedener DMEM-Lösungen mit entweder FXa oder FIIa oder keinem der beiden Faktoren ersetzt, sodass die in den Tabellen 5.15A und 5.15B angegebenen Konzentrationen resultierten.

Tabelle 5.15A: Pipettierschema zur Bestimmung der Wirkung von FIIa auf die Permeabilität des Caco-2-Monolayers

Messreihe	Elektrode 1	Elektrode 2	Elektrode 3
1	1 U/ml FIIa in DMEM mit 10 % FCS	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)	1 U/ml FIIa in DMEM mit 10 % FCS
2	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)	1 U/ml FIIa in DMEM mit 10 % FCS	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)

Tabelle 5.15B: Pipettierschema zur Bestimmung der Wirkung von FXa auf die Permeabilität des Caco-2-Monolayers

Messreihe	Elektrode 1	Elektrode 2	Elektrode 3
1	1 U/ml FXa in DMEM mit 10 % FCS	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)	1 U/ml FXa in DMEM mit 10 % FCS
2	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)	1 U/ml FXa in DMEM mit 10 % FCS	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)

5.2.4.2 IL-8

Aus dem Insert wurden 200 µl Medium und aus dem Well 600 µl Medium entnommen und durch gleiche Volumina von DMEM-Lösungen mit oder ohne IL-8 ersetzt, sodass sich die in den Tabellen 5.16 angegebenen Konzentrationen ergaben.

Regulation der VEGF-Expression

Tabelle 5.16: Pipettierschema zur Bestimmung der Wirkung von IL-8 auf die Permeabilität des Caco-2-Monolayers

Messreihe	Elektrode 1	Elektrode 2	Elektrode 3
1	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)	10 ng/ml IL-8 in DMEM mit 10 % FCS	10 ng/ml IL-8 in DMEM mit 10 % FCS
2	10 ng/ml IL-8 in DMEM mit 10 % FCS	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)	DMEM mit 10 % FCS (Kontrolle)

5.2.4.3 TGF- β 1 oder eines TGF- β 1 neutralisierenden Antikörpers

Das Medium in Insert und Well wurde gegen die in Tabelle 5.17 beschriebenen DMEM-Lösungen ausgetauscht.

Tabelle 5.17: Pipettierschema zur Bestimmung der Wirkung von TGF- β 1 oder der Kombination aus TGF- β 1 mit dessen neutralisierenden Antikörper auf die Permeabilität des Caco-2 Monolayers

Messreihe	Elektrode 1	Elektrode 2	Elektrode 3
1,2 und 3	10 ng/ml TGF- β 1 in DMEM mit 10 % FCS	10 ng/ml TGF- β 1 + 2 μ g/ml MAB1835 in DMEM mit 10 % FCS	10 ng/ml TGF- β 1 + 2 μ g/ml humanes IgG1 in DMEM mit 10 % FCS

5.2.4.4 TGF- β 1 oder der Kombination aus TGF- β 1 und Bevacizumab

Das Medium wurde nicht wie unter 5.2.4 beschrieben durch frisches Medium ersetzt, sondern durch die in Tabelle 5.18A aufgeführten Lösungen von DMEM.

Tabelle 5.18A: Pipettierschema zur Vorinkubation mit Bevacizumab

Messreihe	Elektrode 1	Elektrode 2	Elektrode 3
1,2 und 3	DMEM mit 10 % FCS	DMEM mit 10 % FCS	DMEM mit 10 % FCS + 2 mg/ml Bevacizumab

Die Monlayer wurden bis zu einem konstanten TEER-Wert im Brutschrank temperiert und anschließend das Medium erneut gegen die in Tabelle 5.18B beschriebenen Lösungen ausgetauscht.

Tabelle 5.18B: Pipettierschema zur Bestimmung der Wirkung von TGF- β 1 oder der Kombination von TGF- β 1 und Bevacizumab auf die Permeabilität des Caco-2 Monolayers.

Messreihe	Elektrode 1	Elektrode 2	Elektrode 3
1,2 und 3	DMEM mit 10 % FCS	DMEM mit 10 % FCS + 2mg/ml humanes IgG1	DMEM mit 10 % FCS + 2 mg/ml Bevacizumab

5.3 Ergebnisse

Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der t-Test nach Student in Excel durchgeführt.

5.3.1 Einfluss der Gerinnungsfaktoren auf die VEGF-Expression

5.3.1.1 Bestimmung von Gerinnungsfaktoren in Ergüssen

Tabelle 5.19 zeigt, dass die Faktoren der extrinsischen Gerinnungskaskade in den Ergüssen nachweisbar sind, wobei der Gehalt der einzelnen Faktoren deutlich unter den Normwerten für Plasma liegt. Demgegenüber sind Prothrombinfragment F₁₊₂ und D-Dimere in ihrer Konzentration erhöht.

Tabelle 5.19: Gerinnungsfaktoren in den Ergüssen. *Normwerte aus [Dörner et al., 2001] [(¹) nur in einer Probe oberhalb der Nachweisgrenze, (²) nur in zwei Proben oberhalb der Nachweisgrenze]

	Faktor II (%)	Faktor V ⁽¹⁾ (%)	Faktor VII (%)	Faktor X ⁽²⁾ (%)	Protein C (%)	F 1+2 (pmol/l)	AT3 (%)	D-Dimer (mg/dl)
	27,9 ± 11,2 ↓	<5 (7) ± 0 ↓	15,8 ± 11,1 ↓	10 ± 5,6 ↓	19,8 ± 9,5 ↓	1483,4 ± 443,8 ↑	30,6 ± 12,4 ↓	31,6 ± 9,3 ↑
Normwerte*	70- 130	70-140	50-130	70-140	70-140	300-1200	80-120	0,002-0,04

5.3.1.2 PAR-1- und PAR-2-Expression auf Patientenzellen und Tumorzelllinien im FACS (*fluorescence activated cell sorter*)

Für die Auswertung wurden jeweils 10.000 Zellen, die sich in dem zuvor im Dot Plot (Abb. 5.3A) festgelegten Bereich befanden, vermessen. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Zellen den Proteinase-aktivierten Rezeptor 1 exprimieren. Demgegenüber waren nur Panc-1- und P800-Zellen PAR-2 positiv. Bei Caco-2- und P459-Zellen war PAR-2 nicht nachweisbar (Tabelle 5.20). Insgesamt waren 14 von 18 untersuchten Patientenzellen PAR-1 positiv. Allerdings präsentierten nur 2 von 12 Patientenzellen PAR-2 (Tabelle 5.21).

Tabelle 5.20: PAR-1 und PAR-2 Expression auf Tumorzelllinien und Patientenzellen.

	Panc-1	Caco-2	P459	P800
PAR-1	++	+	+	+
PAR-2	++	-	-	+

Tabelle 5.21: PAR-Präsentation auf Patientenzellen (FACS)

	PAR-1	PAR-2
Nachweisbarkeit auf verschiedenen Patientenzellen (Anzahl)	14 von 18	2 von 12

5.3.1.3 Einfluss von FXa und FIIa auf die VEGF-Produktion von Panc-1 und Patientenzellen

5.3.1.3.1 VEGF-mRNA Realtime PCR

In der Abbildung 5.4 sind die Ergebnisse der Stimulationskinetik der beiden Patientenzellen P459 und P800 mit FIIa und dem PAR-2-Agonisten SLIGKV zusammengefasst. Da die Effekte beider Gerinnungsfaktoren auf die Expression der VEGF-mRNA nur schwach ausgeprägt sind, lässt sich eine vorzugswürdige Stimulationsdauer nur schwer festlegen. Die zum Teil scheinbar hemmende Wirkung von FIIa und SLIGKV auf die VEGF-mRNA ist diesen nur minimalen Effekten der Faktoren und der Tatsache, dass jede Probe in diesem Vorversuch nur im einfachen Ansatz vermessen wurde, geschuldet. Durch FIIa scheint die VEGF-mRNA bei beiden Patientenzellen bereits nach drei Stunden maximal induziert zu sein. SLIGKV zeigt in der dargestellten Stimulationskinetik nahezu keine Effekte auf den Gehalt an VEGF-mRNA. Die Kontrolle (Tabelle 5.3, Seite 111) wurde auf eins festgelegt.

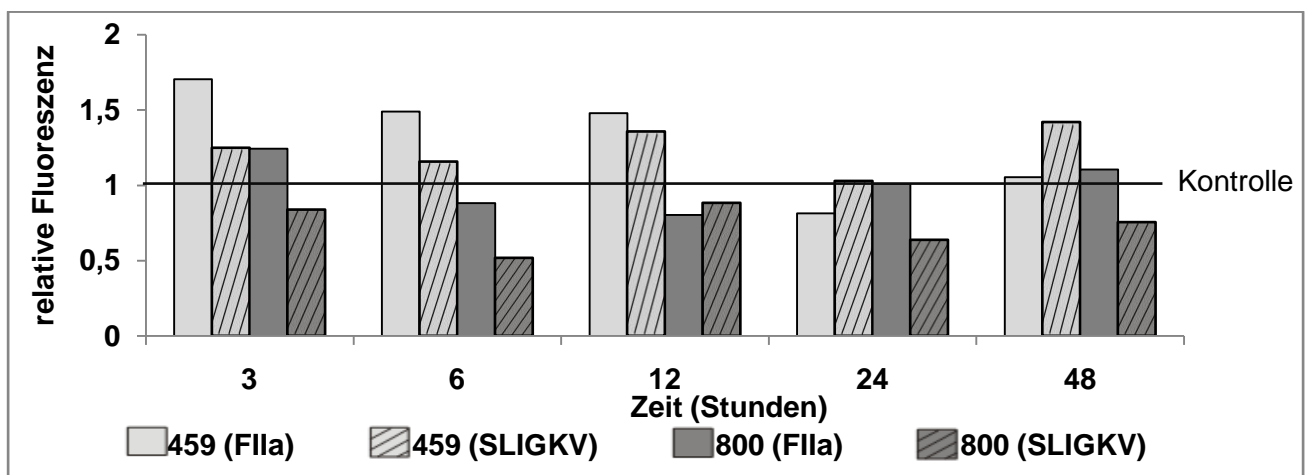


Abb. 5.4: Relative Expression der VEGF-mRNA bei P459- und P800-Zellen infolge der Stimulationskinetik mit FIIa und SLIGKV.

Die Änderung des Gehalts der VEGF-mRNA in der Tumorzelllinie Panc-1 und den Patientenzellen P459 und P800 nach dreistündiger Inkubation mit FIIa und SLIGKV, sind in Abbildung 5.5 demonstriert. Im Mittel konnte für Panc-1-, P459- und P800-Zellen ein Anstieg der VEGF-mRNA nach FIIa-Stimulation um $1,28 \pm 0,13$ gezeigt werden. In Gegenwart von SLIGKV wird der Gehalt an VEGF-mRNA zwar um $1,41 \pm 0,26$ gesteigert, dennoch bleibt auch die Wirkung des PAR-2-

Regulation der VEGF-Expression

Agonisten schwach. Lediglich bei P800-Zellen ist ein signifikanter Effekt von SLIGKV auf die Expression der VEGF-mRNA nachweisbar.

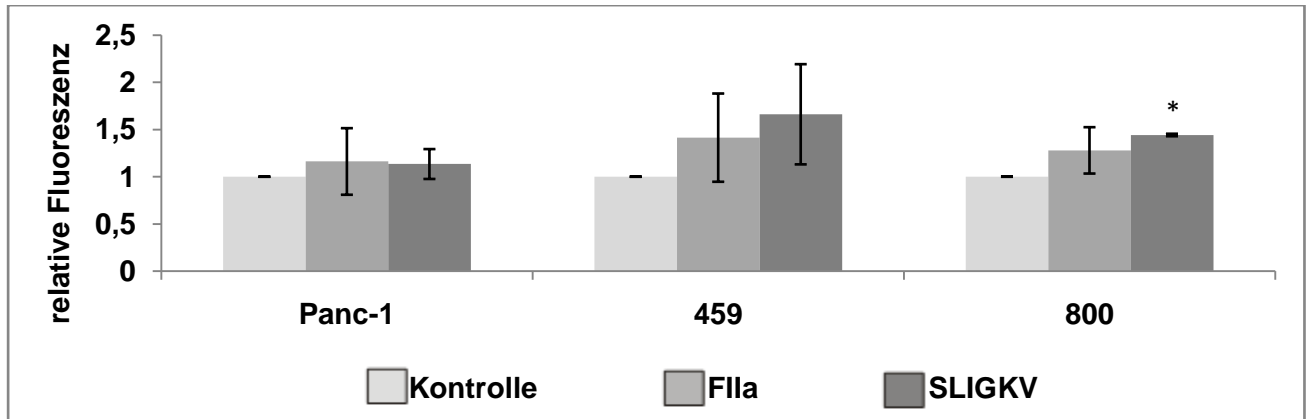


Abb. 5.5: Relative Expression der VEGF-mRNA in Panc-1-, P459- und P800-Zellen nach dreistündiger Stimulation mit FIIa oder SLIGKV (*p < 0,05).

5.3.1.3.2 VEGF-ELISA

In Abbildung 5.6 ist die VEGF-Konzentration angegeben, die errechnet wurde, indem der VEGF-Gehalt im Kulturüberstand auf die Zellzahl normalisiert wurde. Die Änderungen der VEGF-Freisetzung von Panc-1-Zellen sowie den Patientenzellen P459 und P800 als Folge der 24-stündigen Stimulation mit FIIa oder SLIGKV sind dargestellt. Im Mittel konnte für Panc-1-, P459- und P800-Zellen ein Anstieg der VEGF-Freisetzung nach FIIa-Stimulation um $2,11 \pm 0,72$ gezeigt werden. Alle drei untersuchten Zellen weisen damit einen signifikanten Anstieg der VEGF-Freisetzung nach FIIa-Stimulation auf. Demgegenüber wird in Gegenwart von SLIGKV im Vergleich zur Kontrolle nur 1,22-mal mehr VEGF freigesetzt. Wie bereits in Abbildung 5.5 für VEGF-mRNA gezeigt wird, ist durch SLIGKV nur bei Patientenzelle P800 ein geringer jedoch signifikanter Effekt nachweisbar.

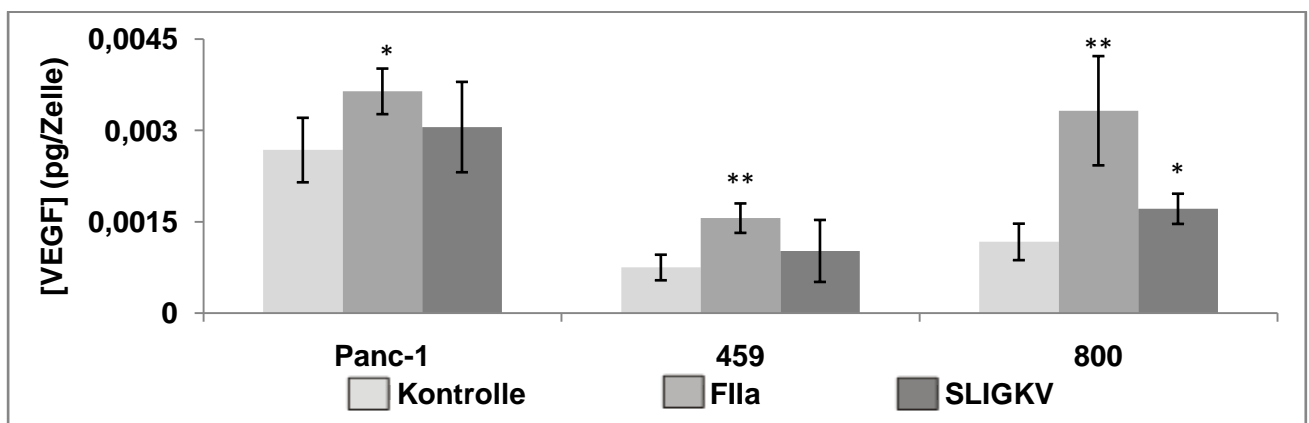


Abb. 5.6: VEGF-Freisetzung von Panc-1-, P459 und P800-Zellen in Abhängigkeit von FIIa und SLIGKV. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei Experimenten (*p < 0,05; **p < 0,01).

5.3.2 Einfluss von TGF-β1 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

5.3.2.1 Bestimmung der TGF-β1-Konzentration in Ergüssen

Um die Keimfreiheit der Ergüsse zu gewährleisten und um das in Ergüssen nachweisbare Fibrin (Abb.4.14, Seite 72) zu entfernen, sodass die Effekte der Ergüsse auf den Caco-2 Monolayer untersucht werden können, wurden sie sterilfiltriert. In Tabelle 5.22 ist der TGF-β1-Gehalt in den Ergüssen vor und nach Filtration durch einen Sterilfilter dargestellt. Es zeigt sich, dass alle untersuchten Ergüsse beachtliche Mengen TGF-β1 enthalten, welches durch Filtration durch einen 0,2 µm Filter nicht entfernt wird. Da der TGF-β1-Gehalt in den Ergüssen zwischen 13 und 24 ng/ml beträgt, wurden in der Folge die Stimulationsexperimente mit 10 ng/ml TGF-β1 durchgeführt, um submaximale Konzentrationen zu gewährleisten.

Tabelle 5.22: TGF-β1-Konzentration in den Ergüssen vor und nach Filtration (0,2 µm)

	[TGF-β1] (ng/ml) im Erguss			
	837	841	459	671
unfiltriert	14,3 ± 0,4	13,6 ± 0,8	20,3 ± 1,5	22,6 ± 1,8
filtriert	13,8 ± 0,1	13,3 ± 0,2	20,6 ± 0,9	23,5 ± 1,0

5.3.2.2 Bestimmung der TGF-β1-Konzentration in den Überständen von Zelllinien und Patientenzellen

Abbildung 5.7 veranschaulicht die TGF-β1-Sekretion von HPDE- und Caco-2-Zellen sowie den Patientenzellen P459, P837 und P841. Es zeigt sich, dass die TGF-β1-Freisetzung von der Dignität der Zellen abhängt. Die immortalisierte pankreatische Gangzelllinie HPDE und auch die Patientenzellen, die aus einem Erguss isoliert wurden, dem eine Leberzirrhose zugrunde lag, setzen mit gemittelten 1,4 fg/Zelle signifikant weniger TGF-β1 frei als die malignen Tumore Caco-2, P841 und P459 mit gemittelten 2,4 fg/Zelle ($p < 0,01$). Die geringen Standardabweichungen ergeben sich daraus, dass die Proben zur Quantifizierung im ELISA gepoolt wurden und daher lediglich eine analytische Standardabweichung angegeben werden kann.

Regulation der VEGF-Expression

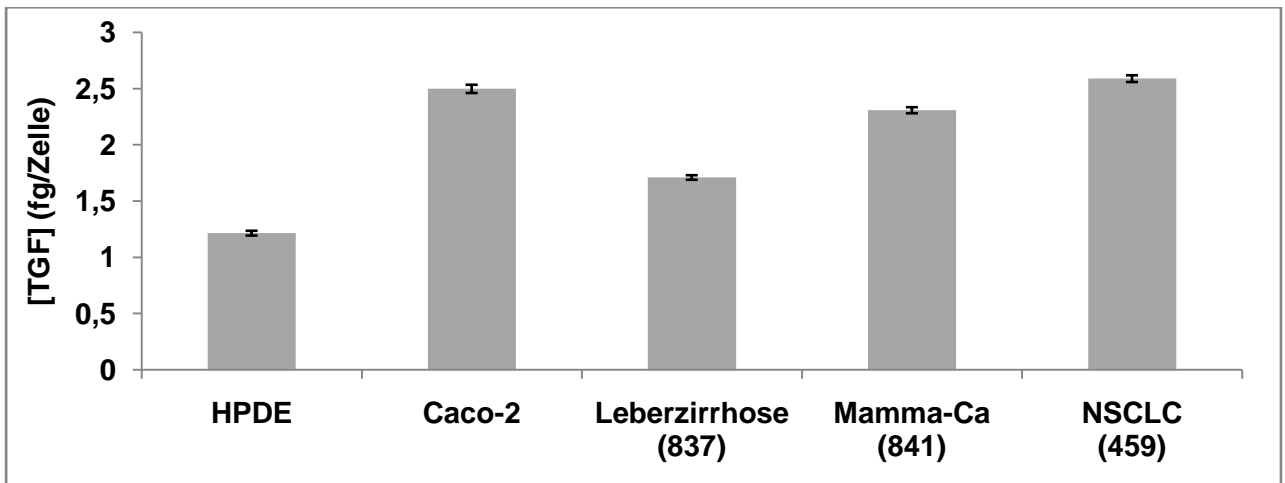


Abb. 5.7: TGF-β1-Konzentration in den Überständen von Patientenzellen und Zelllinien

5.3.2.3 Einfluss von TGF-β1 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

5.3.2.3.1 VEGF-mRNA Realtime PCR

In der Abbildung 5.8 sind die Ergebnisse der Stimulationskinetik von P459- und P800-Zellen mit TGF-β1 dargestellt. Die gemessenen Effekte sind sowohl bei P459- als auch P800-Zellen nach drei Stunden am deutlichsten. Eine Steigerung der Expression der VEGF-mRNA um bis zu Faktor 9,3 bei P800-Zellen ist dargestellt. Nur halb so stark aber dennoch ausgeprägt ist die Induktion mit Faktor 4,6 bei P459-Zellen. Bei beiden Patientenzellen nimmt der Effekt von TGF-β1 auf die Expression der VEGF-mRNA mit der Stimulationsdauer ab und beträgt im Mittel nach 12-stündiger Stimulation nur noch Faktor 1,47. Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass für einen ausgeprägten Effekt die Zellen nur für drei Stunden stimuliert werden sollten. Die Kontrolle (Tabelle 5.8, Seite 113) wurde auf eins festgelegt.

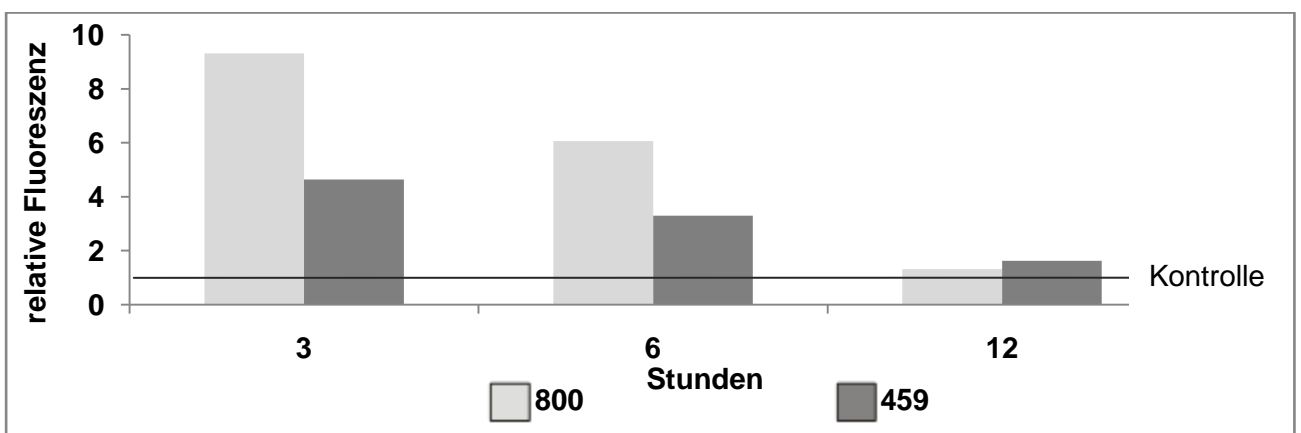


Abb. 5.8: Relative Expression der VEGF-mRNA bei P459- und P800-Zellen infolge der Stimulationskinetik mit TGF-β1

Abbildung 5.9 beschreibt die Effekte einer dreistündigen Stimulation mit TGF-β1 auf die Expression der VEGF-mRNA in den Tumorzelllinien Caco-2 und Panc-1, der immortalisierten

Regulation der VEGF-Expression

pankreatischen Gangzelllinie HPDE, sowie den Patientenzellen P459, P841 und P800. Für die sechs verschiedenen Zellen konnte eine mittlere Induktion der VEGF-mRNA von $3,56 \pm 2,65$ nachgewiesen werden. Es fällt auf, dass die Patientenzellen, von allen untersuchten Zellen, diejenigen mit dem größten Effekt infolge einer TGF- β 1-Stimulation sind. Der Gehalt der VEGF-mRNA wurde in diesem Fall um den Faktor 5,49 ($\pm 2,51$) gesteigert. Auch in diesem Experiment sind die Reaktion bei Patientenzelle P800 mehr als doppelt so stark als bei Patientenzelle P459. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Menge an VEGF-mRNA in Caco-2-Zellen nach dreistündiger TGF- β 1-Stimulation nicht erhöht war.

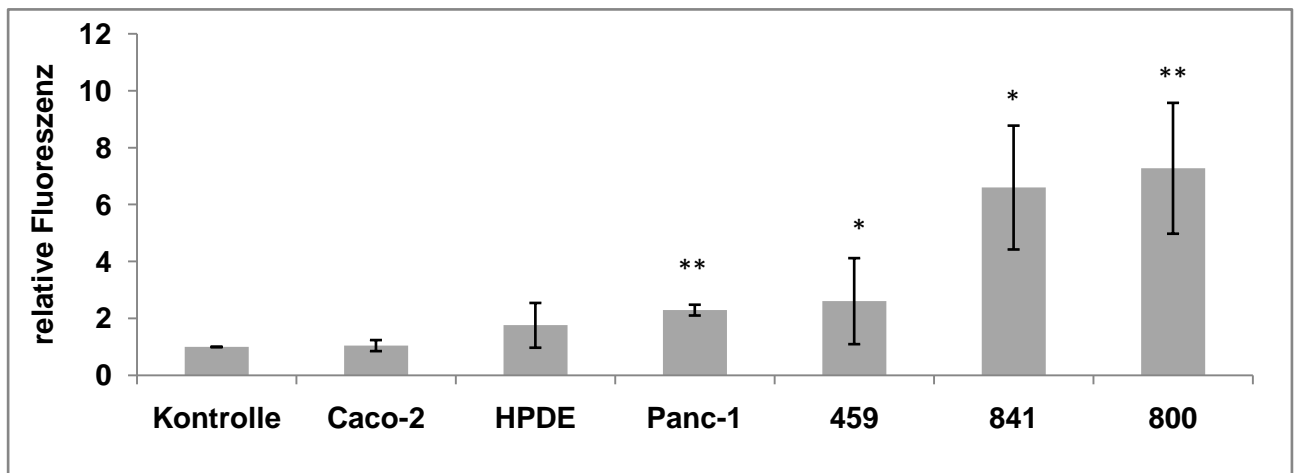


Abb. 5.9: Stimulation von Tumorzelllinien, einer immortalisierten Pankreaszelle und Patientenzellen mit TGF- β 1 über 3 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

5.3.2.3.2 VEGF-ELISA

Die auf die Zellzahl normalisierte VEGF-Konzentration im Überstand von zwei Tumorzelllinien, der immortalisierten Pankreaszelllinie HPDE und der aus den Ergüssen 459 und 800 isolierten Patientenzellen ist in Abbildung 5.10 gezeigt. Dargestellt sind die Effekte einer 24-stündigen Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β 1. Die unter 5.3.2.3.1 mittels realtime PCR erhaltenen Ergebnisse konnten bestätigt werden. Mit Ausnahme der P459-Zellen ist die Induktion der VEGF-Freisetzung mit der Induktion der VEGF-mRNA auch in ihrem Umfang vergleichbar. Trotz der Ergebnisse für P459-Zellen, die darauf zurückzuführen sein könnten, dass sich die VEGF-Konzentration im Überstand am Rande der Nachweisgrenze befand, steigt die VEGF-Freisetzung im Mittel um Faktor 2,19 an. In der basal schon sehr hohen VEGF-Freisetzung bei Caco-2-Zellen könnte der Grund zu sehen sein, dass auch bei dieser Zelllinie keine Steigerung der VEGF-Freisetzung nach TGF- β 1-Stimulation gemessen wurde.

Regulation der VEGF-Expression

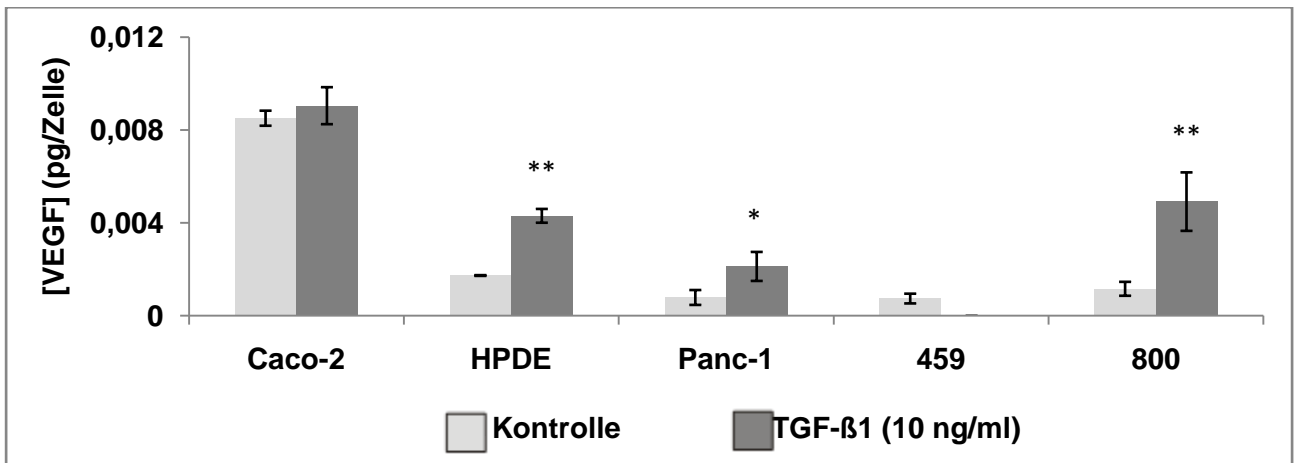


Abb. 5.10: VEGF-Konzentrationen im Überstand nach Stimulation von Tumorzelllinien und Patientenzellen mit TGF-β1. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen (*p<0,05; **p<0,005).

Abbildung 5.11 zeigt die Wirkung des gegen TGF-β1 neutralisierend wirkenden Antikörpers Mab1835 auf die VEGF-Freisetzung von P459- und P800-Zellen. Der Antikörper zeigte bei P459-Zellen keine Beeinflussung der VEGF-Freisetzung, obwohl sich wie Abbildung 5.7 auf Seite 123 belegt für diese von allen untersuchten Zellen die größte TGF-β1-Sekretion nachweisen ließ. Auch für Patientenzelle P800 ließ sich keine signifikante Reduktion der VEGF-Freisetzung gegenüber der Isotyp-Kontrolle nachweisen, da die Isotyp-Kontrolle selbst bereits die Freisetzung hemmte. Dem-gegenüber war infolge der 48-stündigen Inkubation mit MAB1835 die VEGF-Sekretion gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant vermindert (p=0,037).

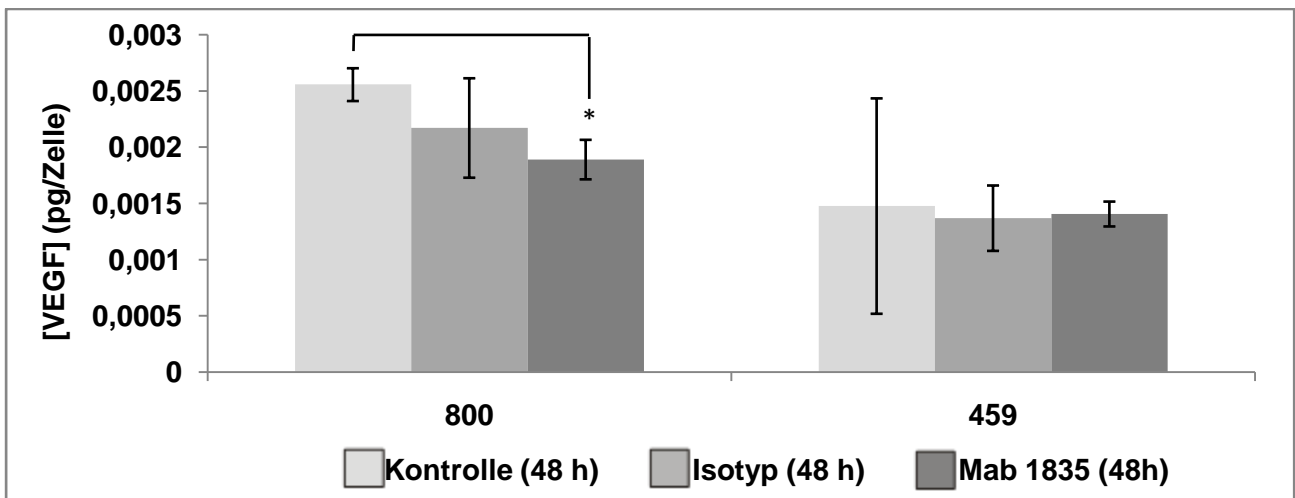


Abb. 5.11: Einfluss eines TGF-β1 neutralisierenden Antikörpers (MAB1835) auf die VEGF-Freisetzung von Patientenzellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen.

5.3.3 Einfluss von IL-8 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

5.3.3.1 Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Ergüssen

Tabelle 5.23 zeigt, dass alle untersuchten Ergüsse IL-8 enthalten. Der Mittelwert liegt bei 192 ± 196 pg/ml (n=4).

Tabelle 5.23: IL-8-Konzentration in den Ergüssen.

[IL-8] (pg/ml) im Erguss			
Leberzirrhose (837)	Mamma-Ca (841)	NSCLC (459)	Ösophagus-Ca (671)
49,1 $\pm 14,4$	192,0 $\pm 1,4$	60,0 $\pm 2,4$	470,3 $\pm 15,0$

5.3.3.2 Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Überständen von Zelllinien und Patientenzellen

Im Überstand von HPDE-Zellen wurden 1,7 fg IL-8 pro Zelle nachgewiesen. In den weiteren untersuchten Überständen von Caco-2-, P459-, P837- und P841-Zellen war kein IL-8 detektierbar. Die Nachweisgrenze des ELISAs lag bei 31,2 pg/ml beziehungsweise 0,312 fg/Zelle unter der Annahme, dass sich 1×10^5 Zellen im Well befinden.

5.3.3.3 Einfluss von IL-8 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

5.3.3.3.1 VEGF-mRNA Realtime PCR

Abbildung 5.12A zeigt die Ergebnisse der Stimulationskinetik an Caco-2- und HPDE-Zellen mit IL-8. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse der 12- und der 24-stündigen Kontrolle gemittelt und auf eins festgelegt. Die Effekte von IL-8 auf die Expression der VEGF-mRNA sind nur schwach ausgeprägt. Desweiteren weisen beide untersuchten Zelllinien hinsichtlich der Stimulationsdauer gegensätzliche Resultate auf. Die zum Teil scheinbar hemmende Wirkung von IL-8 auf die VEGF-mRNA könnte dadurch bedingt sein, dass jede Probe in diesem Vorversuch nur einer einmaligen Analyse unterzogen wurde. Obwohl die Ergebnisse keine vorzugswürdige Stimulationsdauer erkennen ließen, wurde in den folgenden Experimenten über 12 Stunden mit IL-8 inkubiert, weil beide Zelllinien bei dieser Stimulationsdauer die vergleichbarsten Effekte auf die VEGF-mRNA aufwiesen. Die Ergebnisse, die nach einer 12-stündigen Inkubation der Patientenzellen P459 und P800 sowie den Zelllinien Caco-2 und HPDE erhalten wurden, sind in Abbildung 5.12B zusammengefasst. Der Gehalt an VEGF-mRNA lag im Mittel bei $0,95 \pm 0,04$ im Vergleich zur Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde. Die Wirkung von IL-8 auf die VEGF-mRNA war bei den untersuchten Zellen nahezu identisch.

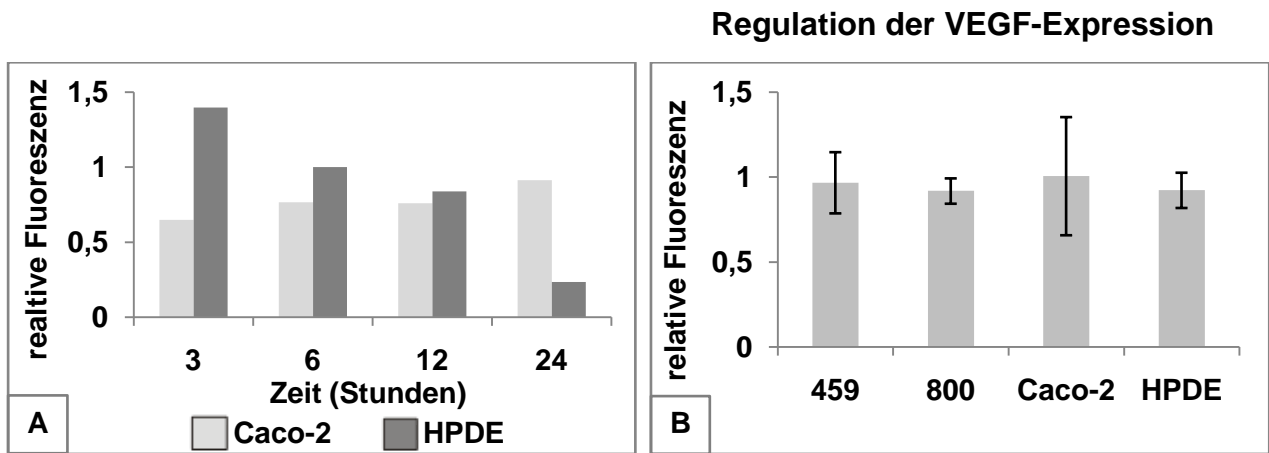


Abb. 5.12: (A) Relative Expression der VEGF-mRNA bei Caco-2- und HPDE-Zellen nach der Stimulationskinetik mit IL-8. (B) Relative Expression der VEGF-mRNA in den Zelllinien Caco-2 und HPDE sowie den Patientenzellen P459 und P800 nach 12-stündiger Stimulation mit IL-8. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen.

5.3.3.3.2 VEGF-ELISA

In Abbildung 5.13 ist die auf die Zellzahl normalisierte VEGF-Konzentration in den Kulturüberständen nach 24-stündiger Stimulation mit IL-8 angegeben. Die VEGF-Konzentration im Überstand der Kontrolle ist im Mittel nahezu identisch mit der VEGF-Konzentration nach Stimulation mit IL-8 (Faktor $1,0005 \pm 0,0004$). Für Panc-1-Zellen sowie die beiden Patientenzellen P459 und P800 konnte daher kein signifikanter Effekt von IL-8 auf die VEGF-Sekretion gezeigt werden.

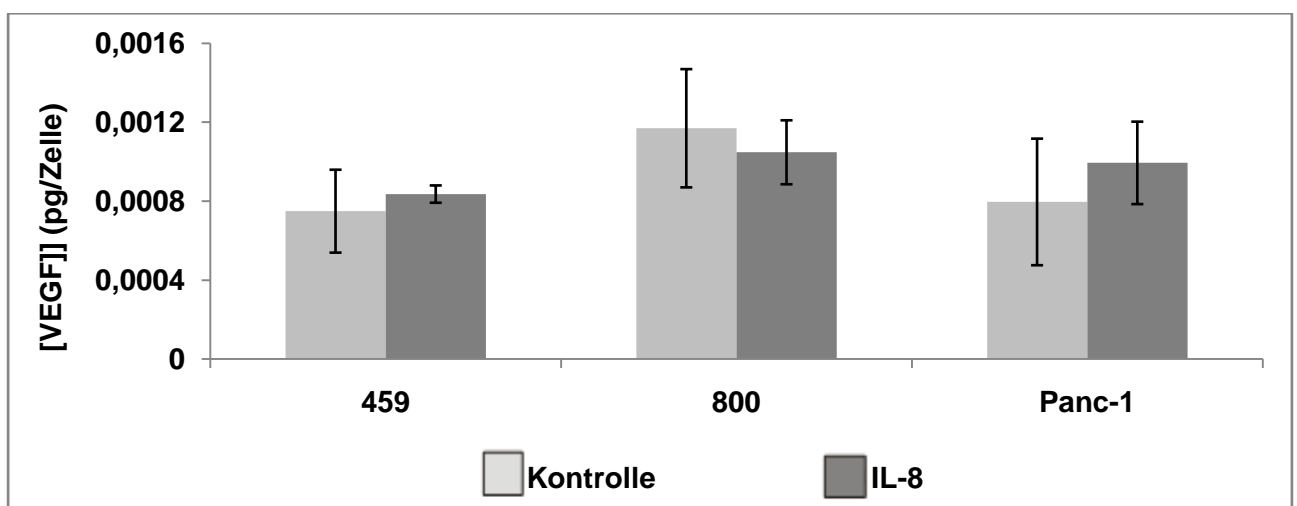


Abb. 5.13: VEGF-Konzentration im Überstand nach 24-stündiger Stimulation von Panc-1-, P459- und P800-Zellen mit IL-8. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen.

Regulation der VEGF-Expression

5.3.4 Bestimmung von Permeabilitätsveränderungen des Caco-2 Monolayers mittels TEER-Messung in Abhängigkeit von:

5.3.4.1 Flla, FXa, TGF- β 1 und IL-8

In Abbildung 5.14 ist die 48-stündige Entwicklung der Permeabilität der Caco-2-Monolayer nach Stimulation mit TGF- β 1, IL-8, Flla oder FXa demonstriert. Signifikante Änderungen im Bezug auf die Kontrolle waren lediglich nach Applikation von 10 ng/ml TGF- β 1 nachweisbar.

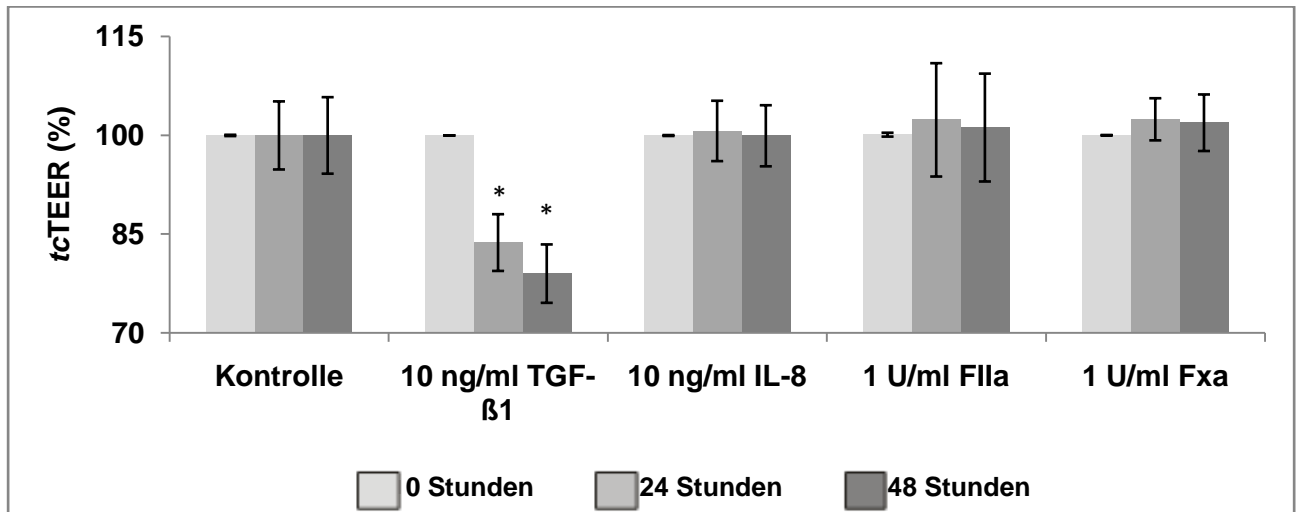


Abb. 5.14: Entwicklung des t TEER-Wertes der Caco-2-Monolayer nach Applikation von TGF- β 1, IL-8, Flla oder FXa. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

5.3.4.2 TGF- β 1 oder eines TGF- β 1 neutralisierenden Antikörpers

In Abbildung 5.15 sind die Permeabilitätsänderungen infolge der Stimulation mit TGF- β 1 zusammengefasst. Bereits nach einer 12-stündigen Inkubation mit 10 ng/ml TGF- β 1 nimmt die Permeabilität um signifikante 8 % zu. Nach 48 Stunden ist sogar ein mittlerer Anstieg der Permeabilität von 20 % bezogen auf den Ausgangswert nachweisbar. Die Spezifität des Effekts konnte durch den neutralisierend wirkenden Antikörper MAB1835 belegt werden, der die TGF- β 1-vermittelte Hyperpermeabilisierung zwar nicht vollständig aufheben konnte, doch zumindest signifikant reduziert hat. Da auch die Isotyp-Kontrolle die TGF- β 1-induzierten Effekte unspezifisch abschwächte, war gegenüber dieser Kontrolle der Effekt von MAB 1835 nicht signifikant. Das Experiment unterstreicht die große Bedeutung von TGF- β 1 bei der Regulation der Permeabilität von epithelialen Monolayern.

Regulation der VEGF-Expression

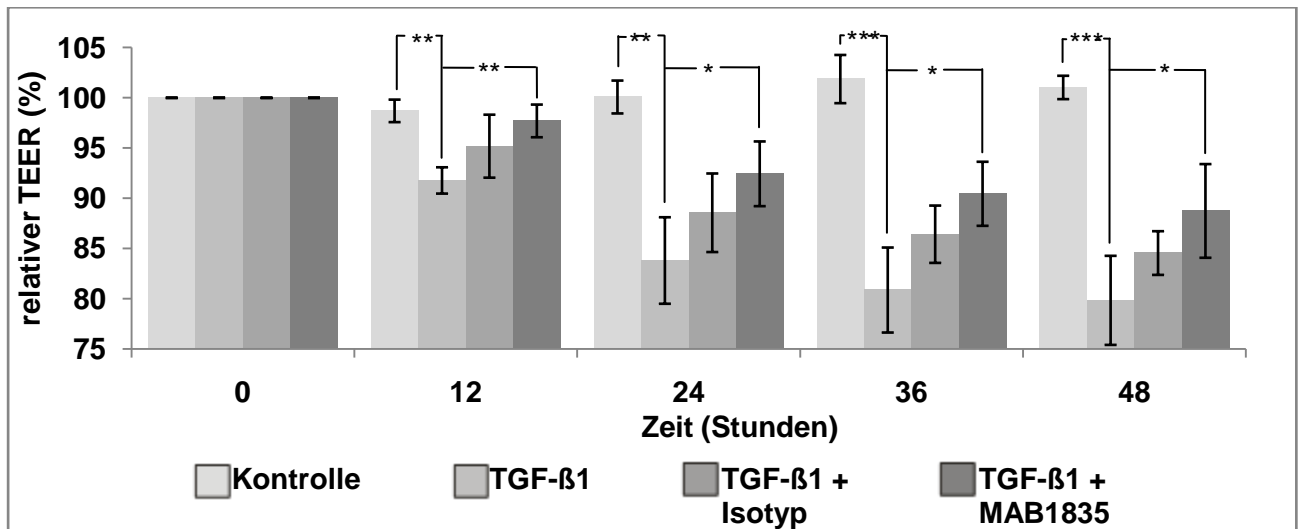


Abb. 5.15: Entwicklung des TEER-Wertes nach Applikation von 10 ng/ml TGF-β1 mit und ohne neutralisierenden Antikörper oder Isotyp-Kontrolle (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,001). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

5.3.4.3 TGF-β1 oder der Kombination aus TGF-β1 und Bevacizumab

Um zu überprüfen, ob die in Abbildung 5.15 dargestellten Effekte durch VEGF vermittelt sind, wurden die mit TGF-β1-stimulierten Monolayer mit und ohne den blockierenden Antikörper Bevacizumab inkubiert. Die eingesetzten Bevacizumab-Konzentrationen ergaben sich aus Abbildung 4.28 auf Seite 82. Für die Auswertung wurde der konstante TEER-Wert auf 100 % gesetzt, der nach der 4-5-stündigen Vorinkubation mit Bevacizumab und vor der Stimulation mit TGF-β1 beziehungsweise TGF-β1/Bevacizumab gemessen wurde. Abbildung 5.16 zeigt deutlich, dass TGF-β1 die Permeabilität erhöht, obwohl die Wirkung des VEGF durch Bevacizumab neutralisiert wurde. Die Hyperpermeabilisierung scheint daher initial auf einem VEGF-unabhängigen Effekt zu beruhen. Dabei weist Abbildung 5.16 sogar auf eine Sensibilisierung der Caco-2-Monolayer gegenüber TGF-β1 durch Bevacizumab hin, indem ein über den durchschnittlichen TGF-β1-Effekt hinaus gesteigerte Wirkung auf die Permeabilität durch die Kombination mit Bevacizumab nachgewiesen wurde. Allerdings fiel die allein TGF-β1-vermittelte Zunahme der Permeabilität mit gemittelten 7,5 % nach 30-stündiger Inkubation in diesem Experiment auch schwächer aus als dies in Abbildung 5.15 gezeigt wurde. Die TEER-Entwicklung der mit TGF-β1 und Bevacizumab behandelten Monolayer demonstriert nach 18 Stunden ein Abklingen der direkt durch TGF-β1 hervorgerufenen Hyperpermeabilisierung bis auf das Niveau der Kontrolle. Die Permeabilität nimmt innerhalb von 12 Stunden um 15 % ab. Demgegenüber steigt die Permeabilität in dem nur TGF-β1 enthaltenden Ansatz um weitere 4 % an. Abbildung 5.16 erlaubt somit den Rückschluss, dass die Erhöhung der Permeabilität durch TGF-β1 initial VEGF-unabhängig ist, nach 18-stündiger Inkubation allerdings eine deutliche VEGF-Abhängigkeit aufweist.

Regulation der VEGF-Expression

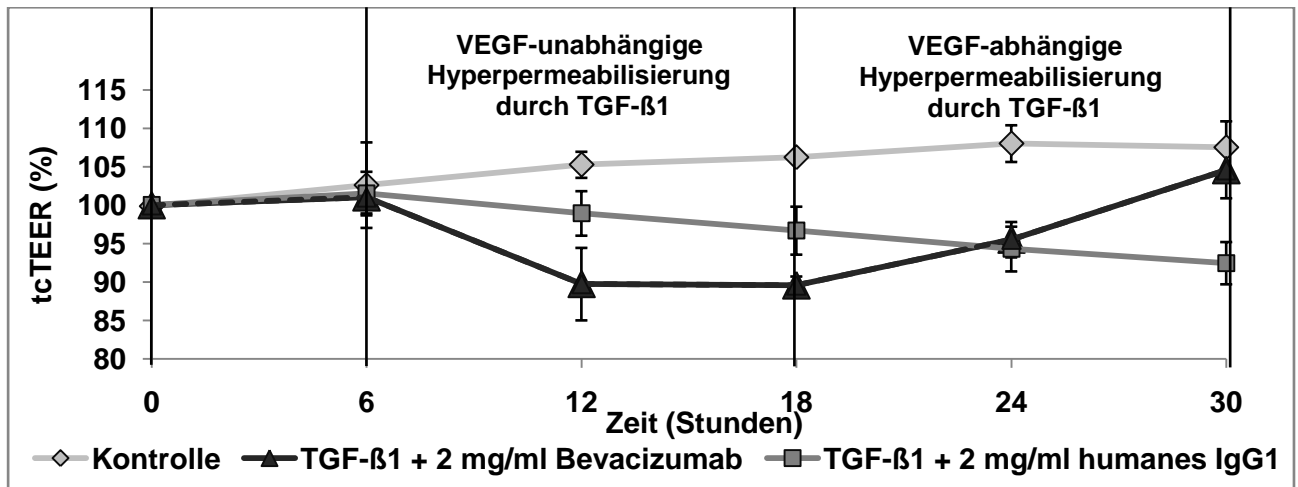


Abb. 5.16: Entwicklung des TEER-Wertes nach Applikation von TGF-β1 mit 2 mg/ml humanem IgG1 als Isotyp-Kontrolle sowie TGF-β1 mit 2 mg/ml Bevacizumab im Vergleich zur Kontrolle, die nur DMEM mit 10 % FCS enthält. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

5.4 Diskussion

Um die hohen VEGF-Spiegel im Erguss zu erklären, wurden Effekte der dort nachweisbaren Proteine auf die VEGF-Produktion der aus den Ergüssen isolierten Zellen untersucht.

5.4.1 Effekte von FIIa und SLIGKV auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

Enge Zusammenhänge zwischen Neoplasien und dem Hämostasesystem wurden von Armand Trousseau bereits 1865 beschreiben. Es wird geschätzt, dass beinahe 15 % aller Krebspatienten im Zuge ihrer Neoplasie auch an thromboembolischen Komplikationen erkranken [Hoffman et al., 2001]. In dieser Arbeit wurden die Ergüsse von 35 Patienten auf die Faktoren der Gerinnungskaskade untersucht. Hohe Konzentrationen des Prothrombinfragments F_{1+2} weisen darauf hin, dass Prothrombin in den Ergüssen zu Thrombin (FIIa) aktiviert worden ist. Darüber hinaus ist mit Antithrombin der natürliche Gegenspieler des FIIa in seiner Konzentration vermindert (Tabelle 5.19). Ein weiteres Anzeichen für ein aktiviertes Gerinnungssystem ist das in vielen Ergüssen nachweisbare Fibrin (Abb. 4.14 Seite 72). Die übermäßig gesteigerte Konzentration an D-Dimeren als Abbauprodukt des Fibrins unterstreicht diese Beobachtung. Ferner konnten sämtliche Faktoren der extrinsischen Gerinnungskaskade in den Ergüssen nachgewiesen werden, wobei die Konzentration von Faktor V nur in einer Probe und Faktor X in zwei Proben oberhalb der Nachweisgrenze lagen. FIIa und FXa vermitteln ihre Wirkung über Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs) (Abschnitt 5.1.4). Die PAR-1-Expression auf den aus Ergüssen isolierten Zellen konnte bei 79 % der untersuchten Patientenzellen gezeigt werden. Demgegenüber konnte in der vorliegenden Arbeit nur bei 15 % der untersuchten Patientenzellen die Expression von PAR-2 belegt werden (Tabelle 5.21). Tabelle 5.20 zeigt, dass auf der Tumorzelllinie Panc-1 beide PARs exprimiert

Regulation der VEGF-Expression

werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein [Wei et al., 2006], sodass Panc-1-Zellen als Referenzzelllinie für die Stimulationsexperimente mit FIIa und FXa verwendet wurden. Da in den Vorversuchen keine Unterschiede hinsichtlich der Effekte von FXa und dem PAR-2-Agonisten SLIGKV nachweisbar waren, wurde in der Folge wegen der höheren Selektivität der Agonist verwendet. Stimulationskinetiken mit den Gerinnungsfaktoren haben ergeben, dass die stärkste Induktion der VEGF-mRNA nach 3 Stunden eintritt (Abb. 5.4). Allerdings war die Steigerung des Gehalts an VEGF-mRNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Faktor 1,28 bei FIIa und Faktor 1,41 bei SLIGKV nur schwach ausgeprägt (Abb. 5.5). Mit SLIGKV konnten geringe jedoch signifikante Effekte auf die VEGF-Expression sowohl der mRNA als auch des Proteins lediglich für P800-Zellen nachgewiesen werden. Erklärbar wird dieses Ergebnis vor dem Hintergrund, dass P800-Zellen im Gegensatz zu P459-Zellen PAR-2 positiv sind. Die schwachen Effekte von SLIGKV, die sich auch bei den PAR-2 exprimierenden Panc-1-Zellen zeigten, müssen auch vor dem Hintergrund gesehen werden, dass ohnehin nur 15 % der Patientenzellen PAR-2 positiv sind. Nach Stimulation mit FIIa konnte demgegenüber für alle drei untersuchten Zellen im Mittel eine Verdopplung der VEGF-Freisetzung demonstriert werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die beiden untersuchten Gerinnungsfaktoren die VEGF-mRNA nur geringfügig induzieren. Allerdings konnte zumindest für FIIa eine deutlich erhöhte VEGF-Freisetzung gezeigt werden. Die in ihrem Gehalt unveränderte VEGF-mRNA legt nahe, dass für diesen Effekt in der Zelle gespeichertes VEGF freigesetzt wird. Die dargestellten Ergebnisse entsprechen denen früherer Studien. Liu et al. belegten an DU 145 Pankreaskarzinomzellen eine optimale Stimulationsdauer von 0,5-4 Stunden. Desweiteren wurde ebenfalls eine nur 20 prozentige Induktion der VEGF-mRNA und auch eine Verdopplung der VEGF-Sekretion nach Stimulation mit 1 U/ml FIIa nachgewiesen [Liu et al., 2006]. Ikeda et al. konnten wiederum im Überstand von pankreatischen Karzinomzelllinien nach 24-stündiger Inkubation mit 100 µM SLIGKV keine signifikanten Veränderungen auf die VEGF-Freisetzung zeigen [Ikeda et al., 2006]. Letztendlich können die dargestellten Effekte von FIIa und SLIGKV auf die VEGF-Produktion die hohen VEGF-Konzentrationen in den Ergüssen nicht vollständig erklären.

5.4.2 Effekte von TGF-β1 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

In Tabelle 5.22 wird gezeigt, dass die Ergüsse im Mittel $17,7 \pm 4,4$ ng/ml TGF-β1 enthalten. Mit einem Median von 1,079 ng/ml wurden von Duysinx et al. in den Pleuraergüssen von 103 Patienten niedrigere TGF-β1-Konzentrationen gemessen, wobei von Duynix et al. ebenso wie in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen benignen und malignen Grunderkrankungen nachgewiesen wurden [Duysinx et al., 2008]. Bisher war jedoch ungeklärt, welche Zellen für die hohen TGF-β1-Konzentrationen in den Ergüssen verantwortlich sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die aus Ergüssen isolierten Zellen TGF-β1 sezernieren, wobei das Ausmaß von der Dignität der Primärerkrankung abhängig war. Zellen, die aus einem

Regulation der VEGF-Expression

Erguss mit zugrundeliegender Leberzirrhose isoliert worden waren, sezernierten signifikant weniger TGF- β 1 als Zellen, die aus Ergüssen mit maligner Grunderkrankung stammen (Abb. 5.7). Dass die TGF- β 1-Freisetzung bei malignen Erkrankungen erhöht ist, wurde unter anderem auch von Gann et al. gezeigt, die höhere TGF- β 1-Spiegel bei Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu Patienten mit benigner Prostata Hyperplasie nachwiesen [Gann et al., 1999]. Die stimulierenden Eigenschaften von TGF- β 1 auf die VEGF-Expression sind bereits seit 1991 bekannt [Dolecki et al., 1991]. Es konnte gezeigt werden, dass die VEGF-Promotorregion durch Smad 3/4 nicht aber durch Smad 2 aktiviert wird [Sugano et al., 2003]. Bisher wurden die Effekte allerdings noch nicht bei den in Ergüssen befindlichen Zellen direkt nachgewiesen. In der Literatur fanden sich aber bereits Hinweise, dass auch die in den Ergüssen befindlichen Zellen in ihrer VEGF-Freisetzung durch TGF- β 1 regulierbar sind. So wiesen Cheng et al. eine signifikante Korrelation zwischen der VEGF-Konzentration in sieben verschiedenen pleuralen Ergüssen und dem TGF- β 1-Gehalt nach [Cheng et al., 2000].

Um herauszufinden, nach welcher Stimulationsdauer sich die stärksten Effekte auf die VEGF-mRNA zeigen, wurden P459- und P800-Zellen unterschiedlich lange mit TGF- β 1 inkubiert. Bei einem Stimulationsoptimum von 3 Stunden ließ sich der Gehalt an VEGF-mRNA im Mittel um den Faktor 3,56 erhöhen. Dabei zeigten die Patientenzellen von allen untersuchten Zellen mit $5,49 \pm 2,51$ den größten Effekt. Der Grund für dieses Ergebnis könnte darin bestehen, dass das Stimulationsoptimum auf Basis der an Patientenzellen gewonnenen Ergebnisse ermittelt wurde. Da in der Literatur in der Regel längere Stimulationszeiten zu maximalen Effekten führen (Benckert et al., 2003, Szeto et al. 2005), kann gemutmaßt werden, dass sich für die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zelllinien bei längerer Stimulation ebenfalls noch deutlichere Effekte nachweisen ließen. Allerdings wären keine gravierenden Unterschiede zu erwarten, da die Ergebnisse, die für VEGF-mRNA erhalten wurden, für die im ELISA nachgewiesene Freisetzung des Proteins nahezu identisch sind (Abb. 5.10). Auch im ELISA ließ sich für Caco-2-Zellen keine signifikante Freisetzung von VEGF nach 24-stündiger Stimulation mit TGF- β 1 belegen. Eine mögliche Ursache könnte in der basal schon hohen VEGF-Sekretion zu sehen sein. Eine generell fehlende Responsivität von Caco-2-Zellen auf TGF- β 1 kann anhand der Literatur verneint werden [Daniel et al., 2007, Chen et al., 2002]. Die bei Panc-1 gemessene Induktion der VEGF-Freisetzung bestätigt in ihrer Intensität die Angaben der Literatur [Takano et al., 2007]. Auffallend war, dass für P459-Zellen, trotz Induktion der VEGF-mRNA um den Faktor $2,6 \pm 1,5$ (Abb. 5.9), kein Effekt auf die VEGF-Freisetzung nachweisbar war. Der Grund hierfür könnte in der geringen VEGF-Freisetzung von P459-Zellen liegen, die die Nachweisgrenze des ELISAs kaum erreichte. Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, dass die VEGF-Sekretion nur bei P800-Zellen nicht aber bei P459-Zellen in Gegenwart eines TGF- β -neutralisierenden Antikörpers vermindert war (Abb. 5.11). Obwohl die Effekte bei P800-Zellen nur gegenüber der unbehandelten Kontrolle

signifikant waren, unterstreicht das Ergebnis doch die große Bedeutung von TGF- β 1 bei der Regulation der VEGF-Konzentration in den Ergüssen.

5.4.3 Effekte von IL-8 auf die VEGF-Expression von Zelllinien und Patientenzellen

IL-8 konnte in den Ergüssen nachgewiesen werden, wobei die mittlere Konzentration bei Ergüssen basierend auf einer malignen Grunderkrankung mit 241 pg/ml höher war als bei dem Erguss, dem eine Leberzirrhose zugrundelag (49 pg/ml) (Tabelle 5.23). Vergleichbare IL-8-Konzentrationen belegten bereits Atanackovic et al., indem sie dreifach höhere IL-8-Spiegel in malignen Ergüssen im Vergleich zu benignen Ergüssen zeigten [Atanackovic et al., 2008]. Die Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit zur IL-8-Freisetzung der beiden Zelllinien HPDE und Caco-2 und der aus den Ergüssen 459, 837 und 841 isolierten Zellen durchgeführt wurden, konnten lediglich bei HPDE-Zellen eine IL-8-Sekretion belegen. Da von Eckmann et al. die IL-8-Freisetzung aus Caco-2-Zellen allerdings bereits gezeigt worden war [Eckmann et al., 1993], kann sowohl für Caco-2 als auch für die Patientenzellen eine Freisetzung von IL-8 unter anderen Versuchsbedingungen nicht definitiv ausgeschlossen werden. Die stimulierende (IL-1 und IL-6) [Li et al., 1995, Cohen et al., 1996] aber teilweise auch hemmende Wirkung (IL-10 und IL-13) [Matsumoto et al., 1997] der Interleukine auf die VEGF-Expression ist aus der Literatur bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von IL-8 auf die VEGF-Expression untersucht. Dazu wurden mit HPDE und Caco-2 sowohl Zelllinien als auch mit P459 und P800 aus den Ergüssen isolierte Zellen für 12 Stunden mit IL-8 stimuliert. Die Stimulationsdauer ergab sich einerseits aus der in Abbildung 5.12A dargestellten Stimulationskinetik, in der nach 12-stündiger Inkubation für Caco-2 und HPDE-Zellen die vergleichbarsten Ergebnisse gezeigt sind, andererseits aus der Literatur. So demonstrierten Martin et al. den maximalen Effekt auf die VEGF-mRNA nach einer 12-stündigen Inkubation, in der von ihnen mit IL-8 durchgeführten Stimulationskinetik [Martin et al., 2009]. Dass sie im Vergleich mit den in den Abbildung 5.12B und 5.13 präsentierten Ergebnissen eine deutliche Stimulation nachgewiesen haben, könnte durch die 10-fach höhere IL-8-Konzentration bedingt sein. Die Bedeutung der von Martin et al. dargelegten Effekte, muss allerdings vor dem Hintergrund relativiert werden, dass sowohl in der vorliegenden als auch in anderen Arbeiten die IL-8-Konzentration in den Ergüssen mit gemittelten 193 pg/ml wesentlich niedriger ist. Ob im Mikromilieu der Zelle höhere IL-8-Konzentrationen erreicht werden, die autokrin den CXCR2 aktivieren, muss an dieser Stelle offen bleiben. Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass bei den in den Ergüssen vorliegenden IL-8-Konzentrationen keine Effekte auf den VEGF-Gehalt in den Ergüssen zu erwarten sind.

5.4.4 Permeabilitätsveränderungen des Caco-2 Monolayers in Abhängigkeit von FXa, FIIa, IL-8 und TGF- β 1

Um zu überprüfen, ob FXa, FIIa, IL-8 oder TGF- β 1 die Permeabilität des Caco-2 Monolayers beeinflussen können, wurde der TEER-Wert vor und nach ihrer Applikation bestimmt. Desweiteren sollte, wenn Permeabilitätsveränderungen durch das Protein nachweisbar waren, überprüft werden, ob diese VEGF-vermittelt sind. Für die eingesetzten Konzentrationen von FXa, FIIa und IL-8 wurde keine Änderung des TEER-Wertes gemessen.

Dieses Ergebnis deckt sich für IL-8 mit der Literatur. In einer Studie wurde zwar eine Änderung der Permeabilität von Albumin durch den HUVEC-Monolayer dokumentiert [Biffi et al., 1995]. Die dazu notwendige Konzentration von 1000 ng/ml IL-8 übersteigt die mittlere Konzentration in den Ergüssen allerdings massiv. In einer weiteren Untersuchung wurde selbst bei derartig hohen IL-8-Konzentrationen keine TEER-Änderungen des HUVEC-Monolayers gemessen [Dewi et al., 2004]. Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, dass die Permeabilität des Caco-2 Monolayers durch 10 ng/ml IL-8 nicht verändert wurde (Abb. 5.14).

Für FXa-vermittelte Permeabilitätsänderungen gibt es bisher nur wenige Daten. In einer Studie wurde nach basolateraler nicht aber nach apikaler Applikation eines PAR-2 Agonisten die Permeabilität des Monolayers einer humanen Darm-Epithelzelllinie erhöht [Chin et al., 2008]. Für das in Abbildung 5.14 gezeigte Experiment wurde FXa mit einer Aktivität von 1 U/ml sowohl apikal als auch basolateral appliziert. Der Grund dafür, dass der Gerinnungsfaktor beim Caco-2 Monolayer keine Permeabilitätsänderungen bewirkt, kann zunächst darin gesehen werden, dass PAR-2 auf Caco-2 Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Tabelle 5.20). Dass FXa keine Effekte über den PAR-1 zeigt, obwohl frühere Studien nachgewiesen haben, dass der Rezeptor durch FXa in gleicher Weise aktiviert wird wie durch FIIa [Riewald et al., 2001], kann damit begründet werden, dass FIIa mit einer Aktivität von 1 U/ml selbst auch keine Permeabilitätsänderungen bewirkte (Abb 5.14). Dass nach Applikation von FIIa keine Änderung des TEER-Wertes gezeigt werden konnte, überrascht zunächst, da in der Literatur die hyperpermeabilisierende Wirkung von FIIa in zahlreichen Studien bereits belegt wurde. Ursächlich für diese abweichenden Ergebnisse könnten die in diesen Studien eingesetzten höheren FIIa-Konzentrationen von 7 U/ml [Moy et al., 2006] sein. Andere Publikationen benennen keine FIIa-Aktivität, sondern lediglich Konzentrationen von 20 nM [Ye et al., 2005] oder 100 nM [Antonov et al., 2008]. Dass derartige FIIa-Konzentrationen ebenfalls zu Aktivitäten > 1 U/ml führen, kann als wahrscheinlich angenommen werden, da in einer weiteren Arbeit der TEER-Wert bei einer Aktivität < 1 U/ml unverändert blieb [Troyanovski et al., 2008]. Es kann vermutet werden, dass vergleichbar hohe Aktivitäten nicht in den Ergüssen auftreten, zumal Tabelle 5.19 für FII einen durchschnittlichen Gehalt von lediglich $27,9 \pm 11,2$ % der Norm zeigt. FX konnte überhaupt nur in 2 der 35 Ergussproben nachgewiesen werden. Letztendlich kann nicht endgültig geklärt werden, ob

Regulation der VEGF-Expression

in den Ergüssen oder im Blutplasma hinreichend hohe FIIa- oder FXa -Aktivitäten vorliegen, um direkt durch Hyperpermeabilisierung der Pleura oder des Peritoneums kausal für die Ergussentstehung zu sein.

Demgegenüber konnte ein Anstieg der Permeabilität nach Applikation von 10 ng/ml TGF- β 1 in Abb. 5.14 und 5.15 belegt werden. Der TEER-Wert nahm während der 48-stündigen Inkubation auf 80 % des Ausgangswertes ab. Die Spezifität dieses Effektes konnte durch Neutralisation von TGF- β 1 belegt werden. Die in den Abbildungen 5.14 und 5.15 dargelegte Wirkung von TGF- β 1 auf den Caco-2-Monolayer wurde in früheren Studien bereits für andere einen epithelialen Monolayer ausbildende Zellen belegt. Lu et al konnten eine TGF- β 1-vermittelte Hyperpermeabilisierung an Endothelzellen der Rinderlunge und an HUVEC unter Beteiligung von Smad-2 und p38 nachweisen [Lu et al., 2006]. Die Permeabilitätsänderung basiert letztendlich auf einer Neuordnung der Adherens Junctions [Hurst et al., 1999]. In allen beispielhaft vorgestellten Studien zeigte sich eine Permeabilitätsänderung bereits nach 1-4 Stunden. Mit TEER-Änderungen von bis zu 70 % vom Ausgangswert waren die Effekte nach Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β 1 meist ausgeprägter als sie in den Abbildungen 5.14 und 5.15 angegeben sind.

Um die Frage zu beantworten, ob die TGF- β 1-vermittelte Hyperpermeabilisierung auf einer Induktion von VEGF beruht, wie sie in Abbildung 5.9 demonstriert wird, wurden die Stimulationsexperimente in Gegenwart von Bevacizumab durchgeführt. Die initial VEGF-unabhängige TGF- β 1-induzierte Zunahme der Permeabilität konnte in Abbildung 5.16 bewiesen werden. Ferner konnte allerdings auch eine VEGF-abhängige Regulation der Permeabilität belegt werden, da nach 18-stündiger Inkubation mit TGF- β 1 und Bevacizumab die Permeabilität wieder auf den Ausgangswert vermindert wurde. Demgegenüber nahm die Permeabilität bei den nur mit TGF- β 1 stimulierten Monolayern weiter zu. Da, wie die Abbildungen 5.9 und 5.10 zeigen, die VEGF-Expression bei Caco-2 nicht durch TGF- β 1 induziert wird, scheint dieser VEGF-abhängige Effekt des TGF- β 1 eine andere Ursache zu haben. Ob VEGF in dem Ansatz ohne Bevacizumab über eine durch TGF- β 1 gesteigerte VEGF-R2-Expression die Hyperpermeabilität bewirkt ist fraglich, da an Zellen des mikrovaskulären Endothels von Rindern sogar bereits eine Hemmung der VEGF-R2-Expression durch TGF- β 1 gezeigt wurde [Mandriota et al., 1996].

5.4.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass TGF- β 1 mit einer gemittelten Induktion der VEGF-mRNA um den Faktor 3,56 von den untersuchten Stimulanzien den größten Effekt im Vergleich zu den Gerinnungsfaktoren FIIa und FXa mit einer gemittelten Induktion von 1,35 besitzt. Wenn die Freisetzung von VEGF betrachtet wird, fällt das Ergebnis etwas weniger deutlich aus. Nicht zuletzt, weil P459-Zellen keine erhöhte VEGF-Freisetzung nach TGF- β 1 Stimulation zeigten, wie dies aufgrund der Ergebnisse für die VEGF-mRNA zu erwarten gewesen wäre, ist die VEGF-

Regulation der VEGF-Expression

Freisetzung nach TGF- β 1-Stimulation nur um den Faktor 2,19 gesteigert. Eine vergleichbare Induktion zeigt FIIa, das bereits gebildetes VEGF freizusetzen scheint. Für IL-8 konnte weder ein Effekt auf die VEGF-mRNA noch auf die VEGF-Freisetzung nachgewiesen werden.

Da die Induktion von VEGF bei TGF- β 1 am stärksten war, und insbesondere, weil nur TGF- β 1 die Permeabilität des Caco-2-Monolayer erhöhen konnte, sollte der Fokus bei der Therapie maligner Ergüsse neben VEGF auch auf TGF- β 1 gelegt werden. Die Gründe für einen VEGF-unabhängigen und einen VEGF-abhängigen Anteil der TGF- β 1-vermittelten Hyperpermeabilisierung werden Gegenstand weiterer Untersuchungen sein müssen.

6. Zusammenfassung

Etwa 15-20 % aller Tumorpatienten entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung einen pleuralen oder peritonealen Erguss. In Anbetracht der kurzen Überlebenszeit von im Mittel 20 Wochen ist bei der Therapie maligner Ergüsse die Beseitigung der durch den Erguss hervorgerufenen Symptome und Beschwerden das zentrale Ziel. Bisher gibt es keine befriedigende Behandlung maligner Ergüsse, da nur eine begrenzte Patientenzahl körperlich in der Lage ist, sich einem invasivem Eingriff mit abschließender Pleurodese zu unterziehen. Andererseits treten nach Punktion häufig Rezidive auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zu der Bedeutung von VEGF, in dessen Funktion als Permeabilitätsfaktor, bei der Entstehung maligner Ergüsse durchgeführt. Ziel der Studien war es, die Option einer Anti-VEGF-Therapie mit dem gegen VEGF neutralisierend wirkenden Antikörper Bevacizumab zur Behandlung maligner Ergüsse präklinisch zu untersuchen.

Mit der Bestimmung der Permeabilität markierter löslicher Verbindungen und der Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) wurden zwei literaturbekannte Verfahren herangezogen, um epitheliale Permeabilitätsveränderungen zu quantifizieren. Da der experimentelle Aufbau TEER-Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen erforderte, musste die aus der Literatur bekannte Temperaturabhängigkeit der TEER-Messung berücksichtigt werden. Dazu wurde erstmalig eine mathematische Lösung erarbeitet, mit der temperaturunabhängige TEER-Werte unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erhalten werden können.

Um möglichst in vivo Bedingungen zu simulieren, wären die VEGF-vermittelten Permeabilitätsveränderungen idealerweise an der Pleura parietalis untersucht worden. Daher wurde die Pleura parietalis vom Schwein in eine im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Apparatur eingespannt. Da die Studien an der Pleura jedoch zu wenig reproduzierbaren Ergebnissen führten, wurde mit dem Caco-2 Monolayer ein Zellkultur basiertes Modell etabliert.

Aus der Literatur sind drei VEGF-Rezeptoren bekannt. Die Bedeutung des VEGF-R2 für VEGF-vermittelte Permeabilitätsänderungen konnte mittels VEGF-R2-spezifischer siRNA oder Rezeptor-Antagonisten auch für Caco-2 Monolayer gezeigt werden.

In früheren Studien wurde bereits im Tiermodell die Option einer intrakavitären Bevacizumab-Therapie mit dem Ziel, die VEGF-vermittelte Hyperpermeabilisierung und damit die Ergussentstehung zu hemmen, untersucht. Da die Zulassung von Bevacizumab die Therapie maligner Ergüsse bisher nicht umfasst, sind auch keine Empfehlungen für eine Dosierung bei dieser Indikation gegeben worden. In der vorliegenden Arbeit konnte am Modell des Caco-2

Zusammenfassung

Monolayers für Bevacizumab eine Dosis-Wirkungskurve gezeigt werden. Die maximale Verminderung der Permeabilität wurde für eine Bevacizumab-Konzentration von 2,53 mg/ml nachgewiesen. Eine ED₅₀ von 0,7 mg/ml wurde berechnet.

Da die aus der ED₅₀ resultierenden hohen Antikörper-Konzentrationen die nach bisher empfohlenen Dosierung resultierenden Plasmaspiegel deutlich überschreiten, stellte sich die Frage nach der Applikationsart. Die erstmalig an Caco-2 Monolayern durchgeführten Permeabilitätsstudien zeigten eine schlechte Permeabilität von Bevacizumab. Die Ergebnisse legen eine intrakavitäre Applikation nahe, da sie auf eine nur minimale Permeabilität vom Plasma in den Erguss hinweisen. Die intrakavitäre Applikation scheint aber auch vor dem Hintergrund sinnvoll, dass epidemiologische Studien in dieser und in früheren Arbeiten gezeigt haben, dass die VEGF-Konzentration gerade im Erguss deutlich erhöht ist.

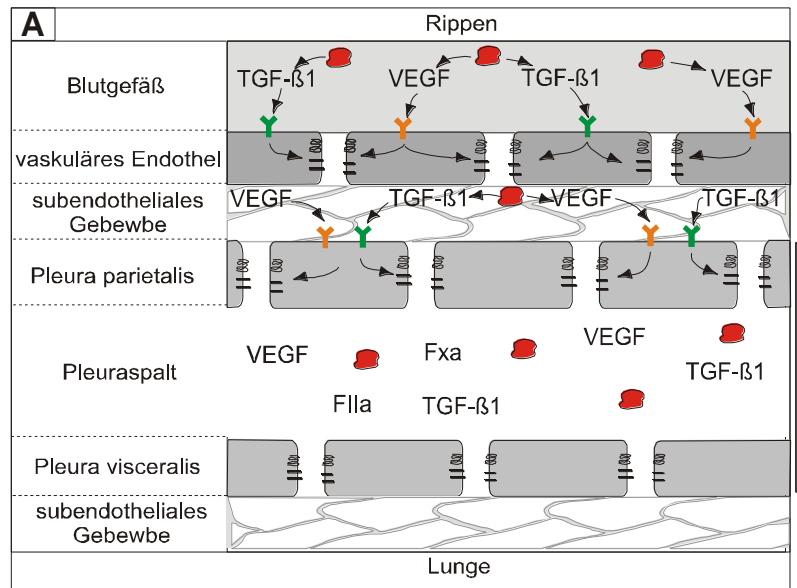
In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass aus Ergüssen isolierte Zellen VEGF freisetzen können und somit direkt kausal für hohe VEGF-Spiegel in malignen Ergüssen sein können. Zur Aufklärung der Expression und Freisetzung von VEGF durch isolierte Primärzellen, wurden in den Ergüssen befindliche mögliche Stimulanzen der VEGF-Expression quantifiziert. Anschließend wurden sowohl die aus dem Erguss isolierten Zellen als auch verschiedene Zelllinien mit den Gerinnungsfaktoren FIIa und FXa sowie dem Chemokin IL-8 und dem Wachstumsfaktor TGF-β1 behandelt. Es zeigte sich, dass TGF-β1 sowohl die VEGF-mRNA als auch die VEGF-Freisetzung am stärksten induziert. Daneben konnte lediglich für FIIa eine signifikante Steigerung der VEGF-Freisetzung nachgewiesen werden. Der PAR-2-Agonist, der anstelle von FXa eingesetzt wurde, zeigt nur eine schwache Induktion und IL-8 blieb ohne Wirkung auf die VEGF-Expression. Die Tendenz der Ergebnisse war bei allen untersuchten Zellen vergleichbar. Unterschiede konnten lediglich im Umfang der Effekte belegt werden.

Untersuchungen inwieweit FIIa, FXa, IL-8 und TGF-β1 in Konzentrationen, in denen sie auch in den Ergüssen nachweisbar waren, die Permeabilität des Caco-2 Monolayers beeinflussen können, ergaben lediglich für TGF-β1 signifikante Effekte. Ein Anstieg der Permeabilität um gemittelte 20 % war nachweisbar. Inwieweit diese Effekte VEGF-abhängig sind, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Erste Experimente deuten allerdings darauf hin, dass zunächst ein VEGF-unabhängiger Effekt für die Hyperpermeabilisierung verantwortlich ist, bevor dieser von einer VEGF-abhängigen Komponente abgelöst wird.

Letztendlich resultierte aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ein Modell zur Entstehung maligner Ergüsse (Abb. 6).

Zusammenfassung

(A) Metastatische Tumorzellen gelangen in die Blutgefäße und setzen dort VEGF und TGF- β 1 frei. Die beiden Wachstumsfaktoren erhöhen die Permeabilität des vaskulären Endothels und der beiden Pleurablätter. Flüssigkeit und Albumin können verstärkt in den Pleuraspalt eindringen. Der Abstand zwischen Pleura parietalis und der Pleura visceralis wächst an. Tumorzellen, VEGF, TGF- β 1 sowie Faktoren des Gerinnungssystems gelangen in den Pleuraspalt.



(B) Die in dem Erguss befindlichen Zellen setzen VEGF und TGF- β 1 frei. TGF- β 1 erhöht die epitheliale Permeabilität entweder direkt oder indirekt, indem es die VEGF-Expression induziert. Die Gerinnungsfaktoren beeinflussen die Permeabilität nicht unmittelbar. Beide Faktoren sind nur schwache Induktoren der VEGF-mRNA-Expression. F11a setzt bereits gebildetes VEGF frei. Die Ergussentstehung ist somit ein sich immer wieder selbst verstärkender Prozess.

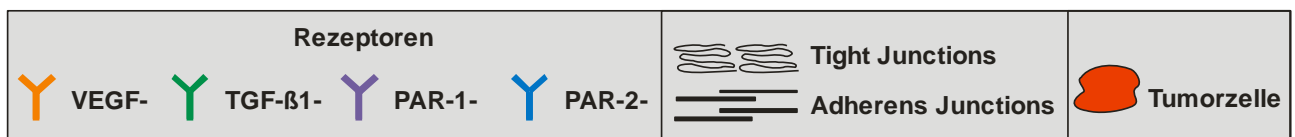
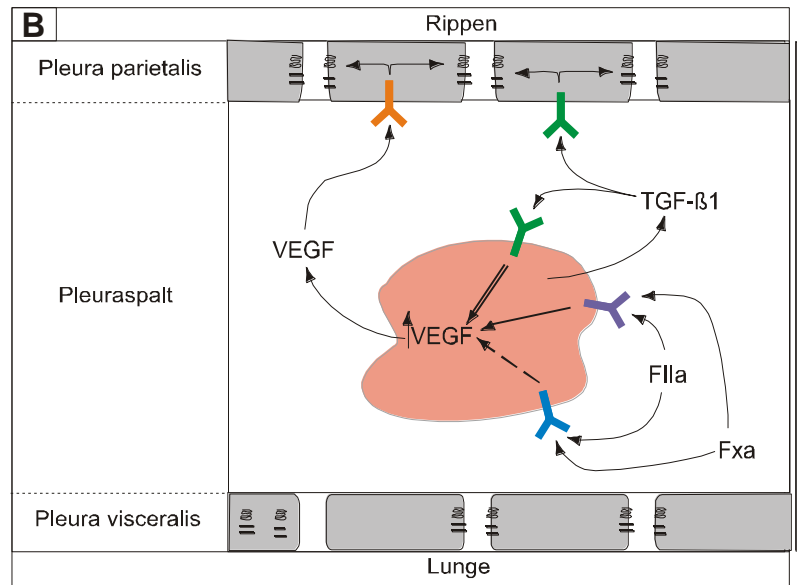


Abb. 6: Modell zur Entstehung maligner Ergüsse.

Aus dem in Abbildung 6 dargestellten Modell zur Entstehung maligner Ergüsse lassen sich Therapieoptionen ableiten. Im Mittelpunkt steht dabei eine kombinierte Blockade der TGF- β 1- und VEGF- vermittelten Signaltransduktion.

7. Material

7.1 Antikörper

FITC Anti-Maus IgG2a	Biolegend, Uithoorn, Niederlande
Bevacizumab (Avastin®)	Roche, Mannheim
HRP-gekoppelter anti-Maus Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
HRP-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
HSP90	Santa Cruz, Heidelberg
Humanes IgG1	Sigma-Aldrich, München
MAB1835 (Anti-TGF-β 1,2,3)	RD-Systems, Wiesbaden
Monoklonaler Maus IgG1 Isotypkontrolle	RD-Systems, Wiesbaden Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PAR-1 Antikörper	Immunotech, Prag, Tschechien
PAR-2 Antikörper	Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA
Rituximab (MabThera®)	Roche, Mannheim
Trastuzumab (Herceptin®)	Roche, Mannheim
VEGF-R1	Santa Cruz, Heidelberg
VEGF-R2	Santa Cruz, Heidelberg Acris, Herford
Monoklonaler Maus IgG2a Isotypkontrolle	Acris, Herford

7.2 Chemikalien

4-Hydroxyacetanilid	Merck, Darmstadt
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Aceton	Merck, Darmstadt
AMPS (Amoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Auftragspuffer (5X) PCR	Qiagen, Hilden
Biotin-Molekulargewichtsmarker	Cell Signaling, Danvers, USA
BSA (Albumin bovine (BSA) Fraction V	Biomol, Hamburg
Chitosan-HCl	Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle (Saale)
Complete Mini EDTA free Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe

Materialien

DTT (Dithiotrietol)	Biomol, Hamburg
EGF	Invitrogen, Karlsruhe
EnVisionPox anti Maus	Dako, Carpinteria, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Faktor II-, V-, VII- und X- Mangelplasmen	Dade Behring, Marburg
FCS	Lonza, Basel, Schweiz
FITC-Dextran 4, 10, 40, 70 kDa	Sigma-Aldrich, München
H ₂ O ₂ (30%)	Merck, Darmstadt
Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
HiPerFect®	Qiagen, Hilden
Kaisers Gylceringelatine	Merck, Darmstadt
KCl 0,01 M (Certipur®)	Merck, Darmstadt
Keratinocyten Medium SFM	Gibco, Eggenstein
Kontroll-Plasma N	Dade Behring, Marburg
Längenstandard (100 bp-Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA, Pasching, Östereich
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MMLV-Reverse Transkriptase	Promega, Heidelberg
NaCl 0,9 %	Merck, Darmstadt
Oligo-dt-Primer	Promega, Heidelberg
PAA-Lösung	Biomol, Hamburg
Phosphorsäure 85 %	Merck, Darmstadt
Re-Blot Plus Strong	Chemicon, Schwalbach
RITC-Dextran 70 kDa	Sigma-Aldrich, München
RNAsin, RNase-Inhibitor	Gibco, Eggenstein
RPMI-Medium	Gibco, Eggenstein
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
SYBR-Green	Bio-Rad, München
Taq-DNA-Polymerase	Gibco, Eggenstein
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, München
Tris-Glycerin-SDS-Probenpuffer (2x)	Invitrogen, Karlsruhe

Materialien

Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Tyrosinkinaseinhibitor (SU5416)	Merck, Darmstadt
Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt

7.3 Peptide

FIIa (Thrombin)	American Diagnostica, Pfungstadt
FXa	American Diagnostica, Pfungstadt
IL-8	RD-Systems, Wiesbaden
SLIGKV	Tocris, Bristol, UK
TGF- β 1	RD-Systems, Wiesbaden
VEGF	RD-System, Wiesbaden

7.4 gebrauchsfertige Kits

AT ₃ -chromogener Assay	Dade Behring, Marburg
D-Dimer-ELISA	Dade Behring, Marburg
Easy Titer IgG Assay	Thermo-Scientific, Schwerte
IL-8-ELISA	RD-Systems, Wiesbaden
Peroxidase Substrat Kit DAB	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Protein C-chromogener Assay	Dade Behring, Marburg
Prothrombinfragment F ₁₊₂ -ELISA	Dade Behring, Marburg
RNeasy Minikit	Qiagen, Hilden
SuperSignal®-Kit	Thermo-Scientific
TGF- β 1-ELISA	RD-Systems
VEGF-ELISA	RD-Systems

7.5 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Axioplan 2	Zeiss, Jena
Axiovert 25	Zeiss, Jena

Materialien

Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Blot-Kammer	Bio-Rad, München
Brutschrank	Heraeus, Hanau
ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München
Cycler	Biometra, , Göttingen
Durchflusszytometer FACS CALIBUR	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Elektrophoresemakammer (für PCR)	Bio-Rad, München
Endohm-12	World Precision Instruments, Berlin
EVOM Voltohmmeter	World Precision Instruments, Berlin
Fluorimeter infinite F200	Tecan, Crailsheim
Fotokamera E330	Olympus, Hamburg
ICycler	Bio-Rad, München
Kapillarviskosimeter	Schott, Mainz
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Laminar Flow	Heraeus, Hanau
Laminar-Flow	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikrowelle	Miele, Gütersloh
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
NanoDrop 1000	peQLab, Erlangen
Netzgerät	Desaga, Wiesloch
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Opsys-Plattenphotometer	Dynex, Berlin
Orbital-Schüttler	IKA, Staufen
Phenomenex C-18	Phenomenex, Aschaffenburg
Pipettboy	Integra Bioscience, Fernwald
Rollenmixer	VWR, Darmstadt
STX-2	World Precision Instruments, Berlin
STX3	World Precision Instruments, Berlin
Supelcosil™ LC-18	Sigma-Aldrich, München

Materialien

Themoelement Typ K	Voltcraf, Hirschau
Themometer K102	Voltcraft, Hirschau
Themomixer	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühler (-30 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühler (-80 °C)	Heraeus, Hanau
Tube-Rotator	NeoLab, Heidelberg
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
UV-Lichtdetektor	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	KNF, Freiburg
Varifuge 20 RS	Heraeus, Hanau
Vortexer	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Waters™ 600 Absorptions-Detektor	Waters, Eschborn
Waters™ 600 Autosampler	Waters, Eschborn
Waters™ 600 Controller	Waters, Eschborn
Waters™ 600 Pumpe	Waters, Eschborn

7.6 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen	Assistent, Sondheim
FACS-Röhrchen	Sterilin, London, UK
Gerinnungsröhrchen	Dade Behring, Marburg
Inserts (12-Well)	Greiner, Frickenhausen Millicell, Schalbach
Inserts (6-Well) 0,4; 1; 3 und 8 µm	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Kulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well)	Greiner, Frickenhausen
Objektträger	Assistent, Sondheim
Parafilm	American National Can, Schalke
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Roti Polyvinylidifluorid-Membran	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten (2; 5; 10; 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Materialien

Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
S-Monovette (Citrat)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritze (10ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Whatmann 3 mm, Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Whatmann Membranfilter 0,45 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

7.7 Primer

β-Actin	Vorwärtsprimer 3': ATCTGGCACACACCTTCTACAATGAGCTGCG Rückwärtsprimer 5': CTGCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC
TATA Box Binding Protein	Vorwärtsprimer 3': GCTGGCCCATAGTGATCTTT Rückwärtsprimer 5': CTTCACACGCCAAGAAACAG
VEGF	Vorwärtsprimer 3': CATGAACTTTCTGCTGTCTTGG Rückwärtsprimer 5': CCTGGTGAGAGATCTGGTTCC
VEGF-R1	RD-Systems
VEGF-R2	Vorwärtsprimer 3': AAGGTGTCAGGAAAAGACGAACT Rückwärtsprimer 5': TCCCCTCCATTGGCCCGCTTAAC

7.8 siRNA

Kontrolle	Qiagen, Hilden
VEGF-R2	Qiagen, Hilden

7.9 Lösungen und Puffer

Blotto	5 g Milchpulver, 100 ml TBST (1X)
Gelpuffer 1	1,5 M Tris-Base, 0,4 % SDS, ad 200 Aqua bidest., pH 6,8

Materialien

Gelpuffer 2	1,5 M Tris-Base, 0,4 % SDS, ad 200 Aqua bidest., pH 8,8
RIPA-Puffer	1 % Triton x-100, 50 mM HEPES 0,1 % SDS, 0,25 % Deoxycholat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Protease-Inhibitor
SDS-Puffer (10X)	25 mM Tris-Base, 0,1 % SDS, 190 mM Glycin
TBE(10X)	89 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 89 mM Borsäure, pH 7,6
TBS (1X)	20 mM Tris-Base, 140 mM NaCl, ad 1000 ml Aqua dest.
TBS (1X)	20 mM Tris-Base, 140 mM NaCl, pH 7,6
TBST	1000 ml TBS (1X), 1000 µl Tween 20

7.10 Zellmaterial

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85 % im Brutschrank kultiviert.

7.10.1 Primärkulturen

Die Patientenzellen wurden für die Experimente ohne Erguss kultiviert. Als Kulturmedium wurde RPMI, 10 % FCS und 1 % L-Glutamin verwendet.

Tabelle 7.1: Grunderkrankungen kultivierter Patientenzellen

Patientenzelle	Grunderkrankung
459	NSCLC
671	Ösophagus-Ca
715	Sigma-Ca
742	Ovarial-Ca
747	Mamma-Ca
800	Mamma- und Ovarial-Ca
811	Ovarial-Ca
815	Ovarial-Ca
826	Pankreas-Ca
837	Leberzirrhose
841	Mamma-Ca

7.10.2 Zelllinien

Tabelle 7.2: Zelllinien mit verwendetem Kulturmedium

Zelllinie	Zelltyp	Medium
BxPC3	humanes Pankreas-Adenokarzinom	RPMI, 10 % FCS, 1 % Glutamin (200 mM)
Caco-2	humanes Colonkarzinom	DMEM mit 4,5 g Glukose pro Liter, 10 % FCS
HPDE	immortalisierte pankreatische Gang Epithelzellen	RPMI mit 10 % FCS sowie KSFM mit Rinderhypophysenextrakt 50 µg/ml) und EGF (5 ng/ml) (aa)
HUVEC	humanes Endothel der Nabelschnurvenen	Medium 199, 10 % FCS, 1 % L-Glutamin (200 mM)
JL-1	humanes epitheliales Mesotheliom	DMEM mit 4,5 g Glukose pro Liter, 10 % FCS
Panc-1	humanes Pankreaskarzinom	RPMI, 10 % FCS, 1 % Glutamin (200 mM)
Panc-89	humanes Pankreaskarzinom	RPMI, 10 % FCS, 1 % Glutamin (200 mM)

8. Literaturverzeichnis

AGOSTONI E & ZOCCHI, L (2007)

Pleural liquid and its exchanges. *Respir Physiol Neurobiol* 159, 311-323.

ALLEN S J, CROWN, S E & HANDEL, T M (2007)

Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.

ANDERSON J M & VAN ITALLIE, C M (2009)

Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 1.

ANTONETTI D A, BARBER, A J, HOLLINGER, L A, WOLPERT, E B & GARDNER, T W (1999)

Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 274, 23463-23467.

ANTONOV A, SNEAD, C, GORSHKOV, B, ANTONOVA, G N, VERIN, A D & CATRAVAS, J D (2008)

Heat shock protein 90 inhibitors protect and restore pulmonary endothelial barrier function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 551-559.

ANTONY V B, LODDENKEMPER, R, ASTOUL, P, BOUTIN, C, GOLDSTRAW, P, HOTT, J, RODRIGUEZ PANADERO, F & SAHN, S A (2001)

Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 18, 402-419.

ARAMOTO H, BRESLIN, J W, PAPPAS, P J, HOBSON, R W, 2ND & DURAN, W N (2004)

Vascular endothelial growth factor stimulates differential signaling pathways in in vivo microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H1590-1598.

ARTURSSON P, UGELL, A L & LOFROTH, J E (1993)

Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm Res* 10, 1123-1129.

ATANACKOVIC D, CAO, Y, KIM, J W, BRANDL, S, THOM, I, FALTZ, C, HILDEBRANDT, Y, BARTELS, K, DE WEERTH, A, HEGEWISCH-BECKER, S, HOSSFELD, D K & BOKEMEYER, C (2008)

The local cytokine and chemokine milieu within malignant effusions. *Tumour Biol* 29, 93-104.

ATKINS P W & DE PAULA, J (2010)

Atkins' physical chemistry. 9. ed Oxford University Press, Oxford.

Literaturverzeichnis

- BAGGIOLINI M, LOETSCHER, P & MOSER, B (1995)
Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* 17, 103-108.
- BATES D O & HARPER, S J (2002)
Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol* 39, 225-237.
- BECKER P M, WALTENBERGER, J, YACHECHKO, R, MIRZAPOIAZOVA, T, SHAM, J S, LEE, C G, ELIAS, J A & VERIN, A D (2005)
Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ Res* 96, 1257-1265.
- BENCKERT C, JONAS, S, CRAMER, T, VON MARSCHALL, Z, SCHAFFER, G, PETERS, M, WAGNER, K, RADKE, C, WIEDENMANN, B, NEUHAUS, P, HOCKER, M & ROSEWICZ, S (2003)
Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 63, 1083-1092.
- BERGER A M & BERGER, C R (2004)
Data mining as a tool for research and knowledge development in nursing. *Comput Inform Nurs* 22, 123-131.
- BERRY R S, RICE, S A & ROSS, J (1980).
Physical chemistry. Wiley, New York.
- BIFFL W L, MOORE, E E, MOORE, F A, CARL, V S, FRANCIOSE, R J & BANERJEE, A (1995)
Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils. *J Trauma* 39, 98-102.
- BIRUKOVA A A, BIRUKOV, K G, ADYSHEV, D, USATYUK, P, NATARAJAN, V, GARCIA, J G & VERIN, A D (2005)
Involvement of microtubules and Rho pathway in TGF-beta1-induced lung vascular barrier dysfunction. *J Cell Physiol* 204, 934-947.
- BÖHNING D (1998).
Allgemeine Epidemiologie und ihre methodischen Grundlagen. Oldenbourg, München [u.a.].
- BONFERONI M C, SANDRI, G, ROSSI, S, FERRARI, F, GIBIN, S & CARAMELLA, C (2008)
Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery. Evaluation of penetration enhancement and peptidase inhibition properties. *Eur J Pharm Sci* 33, 166-176.

Literaturverzeichnis

BRAT D J, BELLAIL, A C & VAN MEIR, E G (2005)

The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 7, 122-133.

BRAVO S A, NIELSEN, C U, AMSTRUP, J, FROKJAER, S & BRODIN, B (2004)

In-depth evaluation of Gly-Sar transport parameters as a function of culture time in the Caco-2 cell model. *Eur J Pharm Sci* 21, 77-86.

BRISKE-ANDERSON M J, FINLEY, J W & NEWMAN, S M (1997)

The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 248-257.

BUSELMAIER W (2009).

Biologie für Mediziner. [mit Glossar]. 11., völlig Neubearb.. Aufl. Springer Medizin, Heidelberg.

BYRNE A T, ROSS, L, HOLASH, J, NAKANISHI, M, HU, L, HOFMANN, J I, YANCOPOULOS, G D & JAFFE, R B (2003)

Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* 9, 5721-5728.

CARMELIET P, FERREIRA, V, BREIER, G, POLLEFEYT, S, KIECKENS, L, GERTSENSTEIN, M, FAHRIG, M, VANDENHOECK, A, HARPAL, K, EBERHARDT, C, DECLERCQ, C, PAWLING, J, MOONS, L, COLLEN, D, RISAU, W & NAGY, A (1996)

Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.

CATALIOTO R M, FESTA, C, TRIOLO, A, ALTAMURA, M, MAGGI, C A & GIULIANI, S (2009)

Differential effect of ethanol and hydrogen peroxide on barrier function and prostaglandin E2 release in differentiated Caco-2 cells: selective prevention by growth factors. *J Pharm Sci* 98, 713-727.

CHEN A, DAVIS, B H, SITRIN, M D, BRASITUS, T A & BISSONNETTE, M (2002)

Transforming growth factor-beta 1 signaling contributes to Caco-2 cell growth inhibition induced by 1,25(OH)₂D₃. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G864-874.

Literaturverzeichnis

- CHEN Y, WIESMANN, C, FUH, G, LI, B, CHRISTINGER, H W, MCKAY, P, DE VOS, A M & LOWMAN, H B (1999)
Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol* 293, 865-881.
- CHENG D, LEE, Y C, ROGERS, J T, PERKETT, E A, MOYERS, J P, RODRIGUEZ, R M & LIGHT, R W (2000)
Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor-beta isoform levels in pleural effusions. *Chest* 118, 1747-1753.
- CHIN A C, LEE, W Y, NUSRAT, A, VERGNOLLE, N & PARKOS, C A (2008)
Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J Immunol* 181, 5702-5710.
- CLARK-LEWIS I, SCHUMACHER, C, BAGGIOLINI, M & MOSER, B (1991)
Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J Biol Chem* 266, 23128-23134.
- CLAUSS M (2000)
Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 26, 561-569.
- CLORE G M & GRONENBORN, A M (1992)
NMR and X-ray analysis of the three-dimensional structure of interleukin-8. *Cytokines* 4, 18-40.
- COHEN T, NAHARI, D, CEREM, L W, NEUFELD, G & LEVI, B Z (1996)
Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271, 736-741.
- CONNOLLY D T (1991)
Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 47, 219-223.
- CONNOLLY D T, OLANDER, J V, HEUVELMAN, D, NELSON, R, MONSELL, R, SIEGEL, N, HAYMORE, B L, LEIMGRUBER, R & FEDER, J (1989)
Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 264, 20017-20024.
- CROSS M J, DIXELIUS, J, MATSUMOTO, T & CLAESSION-WELSH, L (2003)
VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28, 488-494.

Literaturverzeichnis

- DANIEL C, SCHRODER, O, ZAHN, N, GASCHOTT, T, STEINHILBER, D & STEIN, J M (2007)
The TGFbeta/Smad 3-signaling pathway is involved in butyrate-mediated vitamin D receptor (VDR)-expression. *J Cell Biochem* 102, 1420-1431.
- DAUSSE E, DA ROCHA GOMES, S & TOULME, J J (2009)
Aptamers: a new class of oligonucleotides in the drug discovery pipeline? *Curr Opin Pharmacol* 9, 602-607.
- DEJANA E, ORSENIGO, F & LAMPUGNANI, M G (2008)
The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 121, 2115-2122.
- DERYNCK R, AKHURST, R J & BALMAIN, A (2001)
TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-129.
- DEWI B E, TAKASAKI, T & KURANE, I (2004)
In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods* 121, 171-180.
- DIAMOND J M (1977)
Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 20, 10-18.
- DÖRNER K & BATTISTA, H-J (2001).
Klinische Chemie und Hämatologie. 59 Tabellen. 4. Aufl Thieme, Stuttgart [u.a.].
- DOLECKI G J & CONNOLLY, D T (1991)
Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 180, 572-578.
- DURAKER N & CAYNAK, Z C (2005)
Prognostic value of the 2002 TNM classification for breast carcinoma with regard to the number of metastatic axillary lymph nodes. *Cancer* 104, 700-707.
- DUYSINX B C, CORHAY, J L, HUBIN, L, NGUYEN, D, HENKET, M & LOUIS, R (2008)
Diagnostic value of interleukine-6, transforming growth factor-beta 1 and vascular endothelial growth factor in malignant pleural effusions. *Respir Med* 102, 1708-1714.

Literaturverzeichnis

ECKMANN L, JUNG, H C, SCHURER-MALY, C, PANJA, A, MORZYCKA-WROBLEWSKA, E & KAGNOFF, M F (1993)

Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105, 1689-1697.

ELLINGTON A D & SZOSTAK, J W (1990)

In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.

ESSER S, LAMPUGNANI, M G, CORADA, M, DEJANA, E & RISAU, W (1998)

Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 13), 1853-1865.

FANNING A S, JAMESON, B J, JESAITIS, L A & ANDERSON, J M (1998)

The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 29745-29753.

FEIGHERY L M, COCHRANE, S W, QUINN, T, BAIRD, A W, O'TOOLE, D, OWENS, S E, O'DONOGHUE, D, MRSNY, R J & BRAYDEN, D J (2008)

Myosin light chain kinase inhibition: correction of increased intestinal epithelial permeability in vitro. *Pharm Res* 25, 1377-1386.

FERRARA N (2004)

Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25, 581-611.

FERRARA N & DAVIS-SMYTH, T (1997)

The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25.

FERRARA N, GERBER, H P & LECOUTER, J (2003)

The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.

FERRARA N & HENZEL, W J (1989)

Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851-858.

FERRARA N, HOUCK, K, JAKEMAN, L & LEUNG, D W (1992)

Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13, 18-32.

Literaturverzeichnis

FLETCHER R H, FLETCHER, S W & HAERTING, J (2007)

Klinische Epidemiologie. Grundlagen und Anwendung. 2., vollst. überarb. dt.-sprachige Ausg. Huber, Bern.

FORSYTHE J A, JIANG, B H, IYER, N V, AGANI, F, LEUNG, S W, KOOS, R D & SEMENZA, G L (1996)

Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol 16, 4604-4613.

FRANK W (2004)

[Current diagnostic approach to pleural effusion]. Pneumologie 58, 777-790.

FRASER H M (2006)

Regulation of the ovarian follicular vasculature. Reprod Biol Endocrinol 4, 18.

FREEMAN M R, SCHNECK, F X, GAGNON, M L, CORLESS, C, SOKER, S, NIKNEJAD, K, PEOPLES, G E & KLAGSBRUN, M (1995)

Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. Cancer Res 55, 4140-4145.

GALKIN A, PAKKANEN, J & VUORELA, P (2008)

Development of an automated 7-day 96-well Caco-2 cell culture model. Pharmazie 63, 464-469.

GANN P H, KLEIN, K G, CHATTERTON, R T, ELLMAN, A E, GRAYHACK, J T, NADLER, R B & LEE, C (1999)

Growth factors in expressed prostatic fluid from men with prostate cancer, BPH, and clinically normal prostates. Prostate 40, 248-255.

GARRISON R N, KAELIN, L D, GALLOWAY, R H & HEUSER, L S (1986)

Malignant ascites. Clinical and experimental observations. Ann Surg 203, 644-651.

GARY LEE Y C, MELKERNEKER, D, THOMPSON, P J, LIGHT, R W & LANE, K B (2002)

Transforming growth factor beta induces vascular endothelial growth factor elaboration from pleural mesothelial cells in vivo and in vitro. Am J Respir Crit Care Med 165, 88-94.

GAUDIO E, RENDINA, E A, PANNARALE, L, RICCI, C & MARINOZZI, G (1988)

Surface morphology of the human pleura. A scanning electron microscopic study. Chest 93, 149-153.

Literaturverzeichnis

GILLE H, KOWALSKI, J, LI, B, LECOUTER, J, MOFFAT, B, ZIONCHECK, T F, PELLETIER, N & FERRARA, N (2001)

Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 276, 3222-3230.

GOLDSTRAW P (2009)

The 7th Edition of TNM in Lung Cancer: what now? *J Thorac Oncol* 4, 671-673.

GOMEZ R, SIMON, C, REMOHI, J & PELLICER, A (2002)

Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology* 143, 4339-4348.

GREEN K J, GETSIOS, S, TROYANOVSKY, S & GODSEL, L M

Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Protoc* 2.

GREENE F L & SOBIN, L H (2008)

The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin* 58, 180-190.

GUO D, JIA, Q, SONG, H Y, WARREN, R S & DONNER, D B (1995)

Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 270, 6729-6733.

HAAS U (2002).

Physik für Pharmazeuten und Mediziner ; ein Lehrbuch für alle Studierenden mit Physik als Nebenfach ; mit 84 Tabellen. 6., neu bearb. und erw. Aufl. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart.

HAMANN C H, HAMNETT, A & VIELSTICH, W (2007).

Electrochemistry. 2., completely rev. and updated ed. WILEY-VCH, Weinheim.

HAMILTON C A, MAXWELL, G L, CHERNOFSKY, M R, BERNSTEIN, S A, FARLEY, J H & ROSE, G S (2008)

Intraperitoneal bevacizumab for the palliation of malignant ascites in refractory ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 111, 530-532.

Literaturverzeichnis

HARHAJ N S & ANTONETTI, D A (2004)

Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1206-1237.

HASHIMOTO K, OSHIMA, T, TOMITA, T, KIM, Y, MATSUMOTO, T, JOH, T & MIWA, H (2008)

Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 154-157.

HEIDUSCHKA P, FIETZ, H, HOFMEISTER, S, SCHULTHEISS, S, MACK, A F, PETERS, S, ZIEMSEN, F, NIGGEMANN, B, JULIEN, S, BARTZ-SCHMIDT, K U & SCHRAERMAYER, U (2007)

Penetration of bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 2814-2823.

HEINEMANN L (1994).

Epidemiologische Arbeitsmethoden. Mit 110 Tabellen. G. Fischer, Jena [u.a.].

HIRATSUKA S, MARU, Y, OKADA, A, SEIKI, M, NODA, T & SHIBUYA, M (2001)

Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* 61, 1207-1213.

HO Q T & KUO, C J (2007)

Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1349-1357.

HOFFMAN R, HAIM, N & BRENNER, B (2001)

Cancer and thrombosis revisited. *Blood Rev* 15, 61-67.

HOLMES W E, LEE, J, KUANG, W J, RICE, G C & WOOD, W I (2009)

Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991. 253: 1278-1280. *J Immunol* 183, 2895-2897.

HOMBACH J, HOYER, H & BERNKOP-SCHNURCH, A (2008)

Thiolated chitosans: development and in vitro evaluation of an oral tobramycin sulphate delivery system. *Eur J Pharm Sci* 33, 1-8.

HORN L C, SCHIERLE, K, SCHMIDT, D, ULRICH, U, LIEBMANN, A & WITTEKIND, C

Current TNM/FIGO classification for cervical and endometrial cancer as well as malignant mixed Mullerian tumors : Facts and background. *Pathologe*.

Literaturverzeichnis

- HOUCK K A, FERRARA, N, WINER, J, CACHIANES, G, LI, B & LEUNG, D W (1991)
The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5, 1806-1814.
- HOUCK K A, LEUNG, D W, ROWLAND, A M, WINER, J & FERRARA, N (1992)
Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267, 26031-26037.
- HSU J Y & WAKELEE, H A (2009)
Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy. *BioDrugs* 23, 289-304.
- HUANG K, ANDERSSON, C, ROOMANS, G M, ITO, N & CLAESSON-WELSH, L (2001)
Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 315-324.
- HUBATSCH I, RAGNARSSON, E G & ARTURSSON, P (2007)
Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* 2, 2111-2119.
- HURST V I, GOLDBERG, P L, MINNEAR, F L, HEIMARK, R L & VINCENT, P A (1999)
Rearrangement of adherens junctions by transforming growth factor-beta1: role of contraction. *Am J Physiol* 276, L582-595.
- IKEDA O, EGAMI, H, ISHIKO, T, ISHIKAWA, S, KAMOHARA, H, HIDAKA, H, TAKAHASHI, M & OGAWA, M (2006)
Signal of proteinase-activated receptor-2 contributes to highly malignant potential of human pancreatic cancer by up-regulation of interleukin-8 release. *Int J Oncol* 28, 939-946.
- IYER S, LEONIDAS, D D, SWAMINATHAN, G J, MAGLIONE, D, BATTISTI, M, TUCCI, M, PERSICO, M G & ACHARYA, K R (2001)
The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 276, 12153-12161.
- JOHANSSON K M, IZGORODINA, E I, FORSYTH, M, MACFARLANE, D R & SEDDON, K R (2008)
Protic ionic liquids based on the dimeric and oligomeric anions: $[(\text{AcO})_x\text{H}(x-1)]$. *Phys Chem Chem Phys* 10, 2972-2978.

Literaturverzeichnis

JONKER-VENTER C, SNYMAN, D, JANSE VAN RENSBURG, C, JORDAAN, E, SCHULTZ, C, STEENEKAMP, J H, HAMMAN, J H & KOTZE, A F (2006)

Low molecular weight quaternised chitosan (11): in vitro assessment of absorption enhancing properties. *Pharmazie* 61, 301-305.

JOUKOV V, PAJUSOLA, K, KAIPAINEN, A, CHILOV, D, LAHTINEN, I, KUKK, E, SAKSELA, O, KALKKINEN, N & ALITALO, K (1996)

A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 15, 1751.

KAITU'U-LINO T J, SLUKA, P, FOO, C F & STANTON, P G (2007)

Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells in vitro. *Reproduction* 133, 1169-1179.

KANG Y (2006)

Pro-metastasis function of TGFbeta mediated by the Smad pathway. *J Cell Biochem* 98, 1380-1390.

KECK P J, HAUSER, S D, KRIVI, G, SANZO, K, WARREN, T, FEDER, J & CONNOLLY, D T (1989)

Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312.

KENDALL R L & THOMAS, K A (1993)

Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10705-10709.

KESTERSON J P, MHAWECH-FAUCEGLIA, P & LELE, S (2008)

The use of bevacizumab in refractory ovarian granulosa-cell carcinoma with symptomatic relief of ascites: a case report. *Gynecol Oncol* 111, 527-529.

KEYT B A, BERLEAU, L T, NGUYEN, H V, CHEN, H, HEINSOHN, H, VANDLEN, R & FERRARA, N (1996)

The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271, 7788-7795.

KHALIL N (1999)

TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1, 1255-1263.

Literaturverzeichnis

KIESER A, WEICH, H A, BRANDNER, G, MARME, D & KOLCH, W (1994)

Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9, 963-969.

KIM S J, CHOI, I K, PARK, K H, YOON, S Y, OH, S C, SEO, J H, CHOI, C W, KIM, B S, SHIN, S W, KIM, Y H & KIM, J S (2004)

Serum vascular endothelial growth factor per platelet count in hepatocellular carcinoma: correlations with clinical parameters and survival. *Jpn J Clin Oncol* 34, 184-190.

KIM S J, SEO, J H, LEE, Y J, YOON, J H, CHOI, C W, KIM, B S, SHIN, S W, KIM, Y H & KIM, J S (2005)
Autocrine vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor-2 growth pathway represents a cyclooxygenase-2-independent target for the cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in colon cancer cells. *Oncology* 68, 204-211.

KLETTNER A K, KRUSE, M L, MEYER, T, WESCH, D, KABELITZ, D & ROIDER, J (2009)

Different properties of VEGF-antagonists: Bevacizumab but not Ranibizumab accumulates in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247, 1601-1608.

KNIPP G T, HO, N F, BARSUHN, C L & BORCHARDT, R T (1997)

Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J Pharm Sci* 86, 1105-1110.

KOBOLD S, HEGEWISCH-BECKER, S, OECHSLE, K, JORDAN, K, BOKEMEYER, C & ATANACKOVIC, D (2009)

Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? *Oncologist* 14, 1242-1251.

KOLSCHMANN S, BALLIN, A, JUERGENS, U R, ROHDE, G, GESSNER, C, HAMMERSCHMIDT, S, WIRTZ, H & GILLISSEN, A (2006)

Talc pleurodesis in malignant pleural effusions. *Pneumologie* 60, 89-95.

KOTZE A F, LUESSEN, H L, DE LEEUW, B J, DE BOER, A G, VERHOEF, J C & JUNGINGER, H E (1998)

Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *J Control Release* 51, 35-46.

Literaturverzeichnis

- KRAFT A, WEINDEL, K, OCHS, A, MARTH, C, ZMIJA, J, SCHUMACHER, P, UNGER, C, MARME, D & GASTL, G (1999)
Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 85, 178-187.
- KRUPITSKAYA Y & WAKELEE, H A (2009)
Ramucirumab, a fully human mAb to the transmembrane signaling tyrosine kinase VEGFR-2 for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 10, 597-605.
- LAIHO M, DECAPRIO, J A, LUDLOW, J W, LIVINGSTON, D M & MASSAGUE, J (1990)
Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 62, 175-185.
- LAITINEN L A, TAMMELA, P S, GALKIN, A, VUORELA, H J, MARVOLA, M L & VUORELA, P M (2004)
Effects of extracts of commonly consumed food supplements and food fractions on the permeability of drugs across Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* 21, 1904-1916.
- LALLOO A K, LUO, F R, GUO, A, PARANJPE, P V, LEE, S H, VYAS, V, RUBIN, E & SINKO, P J (2004)
Membrane transport of camptothecin: facilitation by human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *BMC Med* 2, 16.
- LEE C W, BOCIEK, G & FAUGHT, W (1998)
A survey of practice in management of malignant ascites. *J Pain Symptom Manage* 16, 96-101.
- LEERS M P, KLEINVELD, H A & SCHARNHORST, V (2007)
Differentiating transudative from exudative pleural effusion: should we measure effusion cholesterol dehydrogenase? *Clin Chem Lab Med* 45, 1332-1338.
- LI J, PERRELLA, M A, TSAI, J C, YET, S F, HSIEH, C M, YOSHIZUMI, M, PATTERSON, C, ENDEGE, W O, ZHOU, F & LEE, M E (1995)
Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270, 308-312.
- LIGHT R W (1997)
Diagnostic principles in pleural disease. *Eur Respir J* 10, 476-481.

Literaturverzeichnis

- LIN Y S, NGUYEN, C, MENDOZA, J L, ESCANDON, E, FEI, D, MENG, Y G & MODI, N B (1999)
Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 371-378.
- LIU J, SCHUFF-WERNER, P & STEINER, M (2006)
Thrombin/thrombin receptor (PAR-1)-mediated induction of IL-8 and VEGF expression in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 183-189.
- LIU Y, MCCARTHY, J & LADISCH, S (2006)
Membrane ganglioside enrichment lowers the threshold for vascular endothelial cell angiogenic signaling. *Cancer Res* 66, 10408-10414.
- LOHELA M, SAARISTO, A, VEIKKOLA, T & ALITALO, K (2003)
Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost* 90, 167-184.
- LOWRY O H, ROSEBROUGH, N J, FARR, A L & RANDALL, R J (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- LU Q, HARRINGTON, E O, JACKSON, H, MORIN, N, SHANNON, C & ROUNDS, S (2006)
Transforming growth factor-beta1-induced endothelial barrier dysfunction involves Smad2-dependent p38 activation and subsequent RhoA activation. *J Appl Physiol* 101, 375-384.
- LU S, GOUGH, A W, BOBROWSKI, W F & STEWART, B H (1996)
Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *J Pharm Sci* 85, 270-273.
- LUO J C, TOYODA, M & SHIBUYA, M (1998)
Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody. *Cancer Res* 58, 2594-2600.
- LUO J C, YAMAGUCHI, S, SHINKAI, A, SHITARA, K & SHIBUYA, M (1998)
Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. *Cancer Res* 58, 2652-2660.
- MACFARLANE S R, SEATTER, M J, KANKE, T, HUNTER, G D & PLEVIN, R (2001)
Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53, 245-282.

Literaturverzeichnis

MACKEY J, GELMON, K, MARTIN, M, MCCARTHY, N, PINTER, T, RUPIN, M & YOUSSEFIAN, H (2009)
TRIO-012: a multicenter, multinational, randomized, double-blind phase III study of IMC-1121B plus docetaxel versus placebo plus docetaxel in previously untreated patients with HER2-negative, unresectable, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 9, 258-261.

MAHMOOD G, DEBNATH, C R & MANDAL, A K (2009)
Evaluation of 100 cases of ascites. *Mymensingh Med J* 18, 62-66.

MANDRIOTA S J, MENOUD, P A & PEPPER, M S (1996)
Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 11500-11505.

MAREL M, ZRUSTOVA, M, STASNY, B & LIGHT, R W (1993)
The incidence of pleural effusion in a well-defined region. Epidemiologic study in central Bohemia. *Chest* 104, 1486-1489.

MARTIN D, GALISTEO, R & GUTKIND, J S (2009)
CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *J Biol Chem* 284, 6038-6042.

MASSAGUE J (1987)
The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49, 437-438.

MASUNGI C, MENSCH, J, WILLEMS, B, VAN DIJCK, A, BORREMANS, C, NOPPE, M, BREWSTER, M E & AUGUSTIJNS, P (2009)
Usefulness of a novel Caco-2 cell perfusion system II. Characterization of monolayer properties and peptidase activity. *Pharmazie* 64, 36-42.

MATSUMOTO K, OHI, H & KANMATSUSE, K (1997)
Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron* 77, 212-218.

MATTER K & BALDA, M S (2003)
Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30, 228-234.

MATTHYS H & SEEGER, W (2008).
Klinische Pneumologie. Mit 175 Tabellen. 4., überarb. und aktualisierte Aufl. Springer Medizin, Heidelberg.

Literaturverzeichnis

- MCGILLIGAN V E, WALLACE, J M, HEAVEY, P M, RIDLEY, D L & ROWLAND, I R (2007)
The effect of nicotine in vitro on the integrity of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. *Food Chem Toxicol* 45, 1593-1598.
- MCLAREN J, PRENTICE, A, CHARNOCK-JONES, D S, MILLICAN, S A, MULLER, K H, SHARKEY, A M & SMITH, S K (1996)
Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 98, 482-489.
- MCLAUGHLIN J N, SHEN, L, HOLINSTAT, M, BROOKS, J D, DIBENEDETTO, E & HAMM, H E (2005)
Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* 280, 25048-25059.
- MEIER A (2003).
Der rechtliche Schutz patientenbezogener Gesundheitsdaten. *Münsteraner Reihe ; 84*. Karlsruhe, Verl. Versicherungswirtschaft: LXXIII, 394 S.
- MELGAR-LESMES P, TUGUES, S, ROS, J, FERNANDEZ-VARO, G, MORALES-RUIZ, M, RODES, J & JIMENEZ, W (2009)
Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhotic rats. *Gut* 58, 285-292.
- MESIANO S, FERRARA, N & JAFFE, R B (1998)
Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am J Pathol* 153, 1249-1256.
- MEYER M, CLAUSS, M, LEPPLE-WIENHUES, A, WALTENBERGER, J, AUGUSTIN, H G, ZICHE, M, LANZ, C, BUTTNER, M, RZIHA, H J & DEHIO, C (1999)
A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 18, 363-374.
- MORABITO A, DE MAIO, E, DI MAIO, M, NORMANNO, N & PERRONE, F (2006)
Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist* 11, 753-764.
- MOSES H L, YANG, E Y & PIETENPOL, J A (1990)
TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 63, 245-247.

MOUNTAIN C F (1997)

Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 111, 1710-1717.

MOY A B, BLACKWELL, K, WU, M H & GRANGER, H J (2006)

Growth factor- and heparin-dependent regulation of constitutive and agonist-mediated human endothelial barrier function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, 2126-2135.

MULLER Y A, CHEN, Y, CHRISTINGER, H W, LI, B, CUNNINGHAM, B C, LOWMAN, H B & DE VOS, A M (1998)

VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure* 6, 1153-1167.

MULLER Y A, LI, B, CHRISTINGER, H W, WELLS, J A, CUNNINGHAM, B C & DE VOS, A M (1997)

Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7192-7197.

MURPHY P M & TIFFANY, H L (2009)

Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991. 253: 1280-1283. *J Immunol* 183, 2898-2901.

MUSANI A I (2009)

Treatment options for malignant pleural effusion. *Curr Opin Pulm Med* 15, 380-387.

MUSANI A I, HAAS, A R, SEIJO, L, WILBY, M & STERMAN, D H (2004)

Outpatient management of malignant pleural effusions with small-bore, tunneled pleural catheters. *Respiration* 71, 559-566.

MUTSAERS S E (2004)

The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 9-16.

NAGUMO Y, HAN, J, BELLILA, A, ISODA, H & TANAKA, T (2008)

Cofilin mediates tight-junction opening by redistributing actin and tight-junction proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 921-925.

NAMIKI A, BROGI, E, KEARNEY, M, KIM, E A, WU, T, COUFFINHAL, T, VARTICOVSKI, L & ISNER, J M (1995)

Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 270, 31189-31195.

NERAGI-MIANDOAB S (2008)

Surgical and other invasive approaches to recurrent pleural effusion with malignant etiology. Support Care Cancer 16, 1323-1331.

NEUFELD G, COHEN, T, GENGRINOVITCH, S & POLTORAK, Z (1999)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. Faseb J 13, 9-22.

NEUHAUS W, PLATTNER, V E, WIRTH, M, GERMANN, B, LACHMANN, B, GABOR, F & NOE, C R (2008)

Validation of in vitro cell culture models of the blood-brain barrier: tightness characterization of two promising cell lines. J Pharm Sci 97, 5158-5175.

NOPPEN M (2004)

Normal volume and cellular contents of pleural fluid. Paediatr Respir Rev 5 Suppl A, S201-203.

NOPPEN M, DE WAELE, M, LI, R, GUCHT, K V, D'HAESE, J, GERLO, E & VINCKEN, W (2000)

Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. Am J Respir Crit Care Med 162, 1023-1026.

NUMNUM T M, ROCCONI, R P, WHITWORTH, J & BARNES, M N (2006)

The use of bevacizumab to palliate symptomatic ascites in patients with refractory ovarian carcinoma. Gynecol Oncol 102, 425-428.

OGAWA S, OKU, A, SAWANO, A, YAMAGUCHI, S, YAZAKI, Y & SHIBUYA, M (1998)

A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Fik-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. J Biol Chem 273, 31273-31282.

OHSUGI M, LARUE, L, SCHWARZ, H & KEMLER, R (1997)

Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin. Dev Biol 185, 261-271.

OHTA Y, SHRIDHAR, V, BRIGHT, R K, KALEMKERIAN, G P, DU, W, CARBONE, M, WATANABE, Y & PASS, H I (1999)

VEGF and VEGF type C play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumours. Br J Cancer 81, 54-61.

OLOFSSON B, JELTSCH, M, ERIKSSON, U & ALITALO, K (1999)

Current biology of VEGF-B and VEGF-C. Curr Opin Biotechnol 10, 528-535.

OLOPADE O I & ULTMANN, J E (1991)

Malignant effusions. *CA Cancer J Clin* 41, 166-179.

OPANASOPIT P, AUMKLAD, P, KOWAPRADIT, J, NGAWHIRANPAT, T, APIRAKARAMWONG, A, ROJANARATA, T & PUTTIPIPATKHACHORN, S (2007)

Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on in vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Dev Technol* 12, 447-455.

OSSOVSKAYA V S & BUNNETT, N W (2004)

Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84, 579-621.

OTROCK Z K, MAKAREM, J A & SHAMSEDDINE, A I (2007)

Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 38, 258-268.

PARDALI K & MOUSTAKAS, A (2007)

Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1775, 21-62.

PARK J E, CHEN, H H, WINER, J, HOUCK, K A & FERRARA, N (1994)

Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 269, 25646-25654.

PARK J E, KELLER, G A & FERRARA, N (1993)

The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4, 1317-1326.

PATZ A (1980)

Studies on retinal neovascularization. Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19, 1133-1138.

PEDRAM A, RAZANDI, M & LEVIN, E R (2002)

Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability. Inhibition by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem* 277, 44385-44398.

PERSICO M G, VINCENTI, V & DIPALMA, T (1999)

Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 237, 31-40.

Literaturverzeichnis

PERTOVAARA L, KAIPAINEN, A, MUSTONEN, T, ORPANA, A, FERRARA, N, SAKSELA, O & ALITALO, K (1994)

Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269, 6271-6274.

PETERS S, JULIEN, S, HEIDUSCHKA, P, GRISANTI, S, ZIEMSEN, F, ADLER, M, SCHRAERMAYER, U & BARTZ-SCHMIDT, K U (2007)

Antipermeability and antiproliferative effects of standard and frozen bevacizumab on choroidal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 91, 827-831.

PFAFFL M W (2001)

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

PICHELMAYER O, GRUENBERGER, B, ZIELINSKI, C & RADERER, M (2006)

Bevacizumab is active in malignant effusion. *Ann Oncol* 17, 1853.

PICHELMAYER O, ZIELINSKI, C & RADERER, M (2005)

Response of a nonmalignant pleural effusion to bevacizumab. *N Engl J Med* 353, 740-741.

PIGEOT I, AHRENS, W & KUBLER, J (2006)

[Data sources in epidemiology]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 49, 628-636.

PITTET J F, GRIFFITHS, M J, GEISER, T, KAMINSKI, N, DALTON, S L, HUANG, X, BROWN, L A, GOTWALS, P J, KOTELIANSKY, V E, MATTHAY, M A & SHEPPARD, D (2001)

TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 107, 1537-1544.

PLOUET J, MORO, F, BERTAGNOLLI, S, COLDEBOEUF, N, MAZARGUIL, H, CLAMENS, S & BAYARD, F (1997)

Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 272, 13390-13396.

PLOUET J & MOUKADIRI, H (1990)

Specific binding of vasculotropin to bovine brain capillary endothelial cells. *Biochimie* 72, 51-55.

PLOUET J, SCHILLING, J & GOSPODAROWICZ, D (1989)

Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *Embo J* 8, 3801-3806.

Literaturverzeichnis

POURGHOLAMI M H, YAN CAI, Z, LU, Y, WANG, L & MORRIS, D L (2006)

Albendazole: a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice. *Clin Cancer Res* 12, 1928-1935.

PRESTA L G, CHEN, H, O'CONNOR, S J, CHISHOLM, V, MENG, Y G, KRUMMEN, L, WINKLER, M & FERRARA, N (1997)

Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57, 4593-4599.

PRUD'HOMME G J, DRAGHIA-AKLI, R & WANG, Q (2007)

Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. *Gene Ther* 14, 553-564.

RADULOVICH N, QIAN, J Y & TSAO, M S (2008)

Human pancreatic duct epithelial cell model for KRAS transformation. *Methods Enzymol* 439, 1-13.

RAJARATHNAM K, SYKES, B D, KAY, C M, DEWALD, B, GEISER, T, BAGGIOLINI, M & CLARK-LEWIS, I (1994)

Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 264, 90-92.

RIEWALD M, KRAVCHENKO, V V, PETROVAN, R J, O'BRIEN, P J, BRASS, L F, ULEVITCH, R J & RUF, W (2001)

Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood* 97, 3109-3116.

RINDI G, KLOPPEL, G, ALHMAN, H, CAPLIN, M, COUVELARD, A, DE HERDER, W W, ERIKSSON, B, FALCHETTI, A, FALCONI, M, KOMMINOTH, P, KORNER, M, LOPES, J M, MCNICOL, A M, NILSSON, O, PERREN, A, SCARPA, A, SCOAZEC, J Y & WIEDENMANN, B (2006)

TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 449, 395-401.

RODRIGUEZ-PANADERO F, BORDERAS NARANJO, F & LOPEZ MEJIAS, J (1989)

Pleural metastatic tumours and effusions. Frequency and pathogenic mechanisms in a post-mortem series. *Eur Respir J* 2, 366-369.

RODRIGUEZ-PANADERO F, JANSSEN, J P & ASTOUL, P (2006)

Thoracoscopy: general overview and place in the diagnosis and management of pleural effusion. *Eur Respir J* 28, 409-422.

ROSENBERG S M (2006)

Palliation of malignant ascites. *Gastroenterol Clin North Am* 35, 189-199.

RUCKMAN J, GREEN, L S, BEESON, J, WAUGH, S, GILLETTE, W L, HENNINGER, D D, CLAESSON-WELSH, L & JANJIC, N (1998)

2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 273, 20556-20567.

RUNYON B A (1994)

Care of patients with ascites. *N Engl J Med* 330, 337-342.

RYAN A M, EPPLER, D B, HAGLER, K E, BRUNER, R H, THOMFORD, P J, HALL, R L, SHOPP, G M & O'NEILL, C A (1999)

Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol Pathol* 27, 78-86.

RYMAN K D, GARDNER, C L, BURKE, C W, MEIER, K C, THOMPSON, J M & KLIMSTRA, W B (2007)

Heparan sulfate binding can contribute to the neurovirulence of neuroadapted and nonneuroadapted Sindbis viruses. *J Virol* 81, 3563-3573.

SADAHIRO S, SUZUKI, T, ISHIKAWA, K, YASUDA, S, TAJIMA, T, MAKUUCHI, H, MURAYAMA, C & OHIZUMI, Y (2001)

Intraoperative radiation therapy for curatively resected rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 44, 1689-1695.

SAGRISTA-SAULEDA J, MERCE, J, PERMANYER-MIRALDA, G & SOLER-SOLER, J (2000)

Clinical clues to the causes of large pericardial effusions. *Am J Med* 109, 95-101.

SAHN S A (2001)

Malignant pleural effusions. *Semin Respir Crit Care Med* 22, 607-616.

SAHN S A (2001)

Management of malignant pleural effusions. *Monaldi Arch Chest Dis* 56, 394-399.

Literaturverzeichnis

- SAITO H, TSUJITANI, S, OKA, S, KONDO, A, IKEGUCHI, M, MAETA, M & KAIBARA, N (1999)
The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 86, 1455-1462.
- SAMOWITZ W S, CURTIN, K, MA, K N, SCHAFFER, D, COLEMAN, L W, LEPPERT, M & SLATTERY, M L (2001)
Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 917-923.
- SAWAI T, LAMPMAN, R, HUA, Y, SEGURA, B, DRONGOWSKI, R A, CORAN, A G & HARMON, C M (2002)
Lysophosphatidylcholine alters enterocyte monolayer permeability via a protein kinase C/Ca²⁺ mechanism. *Pediatr Surg Int* 18, 591-594.
- SAWANO A, IWAI, S, SAKURAI, Y, ITO, M, SHITARA, K, NAKAHATA, T & SHIBUYA, M (2001)
Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97, 785-791.
- SEBASTIAN M, KUEMMEL, A, SCHMIDT, M & SCHMITTEL, A (2009)
Catumaxomab: A bispecific trifunctional antibody. *Drugs Today (Barc)* 45, 589-597.
- SEEBER S (2003).
Therapiekonzepte Onkologie. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Springer, Berlin [u.a.].
- SENGER D R, CONNOLLY, D T, VAN DE WATER, L, FEDER, J & DVORAK, H F (1990)
Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 50, 1774-1778.
- SENGER D R, GALLI, S J, DVORAK, A M, PERRUZZI, C A, HARVEY, V S & DVORAK, H F (1983)
Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.
- SENGER D R, PERRUZZI, C A, FEDER, J & DVORAK, H F (1986)
A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 46, 5629-5632.

Literaturverzeichnis

- SHIMA D T, GOUGOS, A, MILLER, J W, TOLENTINO, M, ROBINSON, G, ADAMIS, A P & D'AMORE, P A (1996)
Cloning and mRNA expression of vascular endothelial growth factor in ischemic retinas of *Macaca fascicularis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 1334-1340.
- SHU J, SUN, G, LIU, H & LIU, J (2007)
Clinical utility of vascular endothelial growth factor in diagnosing malignant pleural effusions. *Acta Oncol* 46, 1004-1011.
- SHWEIKI D, ITIN, A, SOFFER, D & KESHET, E (1992)
Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.
- SIEGEL P M & MASSAGUE, J (2003)
Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 807-821.
- SIEMEISTER G, WEINDEL, K, MOHRS, K, BARLEON, B, MARTINY-BARON, G & MARME, D (1996)
Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 56, 2299-2301.
- SISSALO S, LAINE, L, TOLONEN, A, KAUKONEN, A M, FINEL, M & HIRVONEN, J (2009)
Caco-2 cell monolayers as a tool to study simultaneous phase II metabolism and metabolite efflux of indomethacin, paracetamol and 1-naphthol. *Int J Pharm* 383, 24-29.
- SILINS G, GRIMMOND, S, EGERTON, M & HAYWARD, N (1997)
Analysis of the promoter region of the human VEGF-related factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 413-418.
- SOKER S, MIAO, H Q, NOMI, M, TAKASHIMA, S & KLAGSBRUN, M (2002)
VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* 85, 357-368.
- SPORN M B & ROBERTS, A B (1992)
Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 119, 1017-1021.

Literaturverzeichnis

STADLMANN S, AMBERGER, A, POLLHEIMER, J, GASTL, G, OFFNER, F A, MARGREITER, R & ZEIMET, A G (2005)

Ovarian carcinoma cells and IL-1beta-activated human peritoneal mesothelial cells are possible sources of vascular endothelial growth factor in inflammatory and malignant peritoneal effusions. *Gynecol Oncol* 97, 784-789.

STEINBROOK R (2006)

The price of sight--ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med* 355, 1409-1412.

STEINHOFF M, BUDDENKOTTE, J, SHPACOVITCH, V, RATTENHOLL, A, MOORMANN, C, VERGNOLLE, N, LUGER, T A & HOLLENBERG, M D (2005)

Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26, 1-43.

STUTTFELD E & BALLMER-HOFER, K (2009)

Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 61, 915-922.

SUGANO Y, MATSUZAKI, K, TAHASHI, Y, FURUKAWA, F, MORI, S, YAMAGATA, H, YOSHIDA, K, MATSUSHITA, M, NISHIZAWA, M, FUJISAWA, J & INOUE, K (2003)

Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 22, 2309-2321.

SUN H, CHOW, E C, LIU, S, DU, Y & PANG, K S (2008)

The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 395-411.

SZETO C C, LAI, K B, CHOW, K M, SZETO, C Y, WONG, T Y & LI, P K (2005)

Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of connective tissue growth factor and vascular endothelial growth factor by peritoneal mesothelial cell. *Nephron Exp Nephrol* 99, 95-104.

TAICHMAN N S, YOUNG, S, CRUCHLEY, A T, TAYLOR, P & PALEOLOG, E (1997)

Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 62, 397-400.

Literaturverzeichnis

TAKAHASHI H & SHIBUYA, M (2005)

The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 109, 227-241.

TAKAHASHI T & SHIBUYA, M (1997)

The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 14, 2079-2089.

TAKANO S, KANAI, F, JAZAG, A, IJICHI, H, YAO, J, OGAWA, H, ENOMOTO, N, OMATA, M & NAKAO, A (2007)

Smad4 is essential for down-regulation of E-cadherin induced by TGF-beta in pancreatic cancer cell line PANC-1. *J Biochem* 141, 345-351.

TAMMELA T, ENHOLM, B, ALITALO, K & PAAVONEN, K (2005)

The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65, 550-563.

TAN C, SEDRAKYAN, A, BROWNE, J, SWIFT, S & TREASURE, T (2006)

The evidence on the effectiveness of management for malignant pleural effusion: a systematic review. *Eur J Cardiothorac Surg* 29, 829-838.

TERMAN B I, DOUGHER-VERMAZEN, M, CARRION, M E, DIMITROV, D, ARMELLINO, D C, GOSPODAROWICZ, D & BOHLEN, P (1992)

Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 1579-1586.

THANOU M, NIHOT, M T, JANSEN, M, VERHOEF, J C & JUNGINGER, H E (2001)

Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. *J Pharm Sci* 90, 38-46.

THANOU M, VERHOEF, J C & JUNGINGER, H E (2001)

Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 50 Suppl 1, S91-101.

THEWS G, MUTSCHLER, E & VAUPEL, P (1999).

Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5., völlig neu bearb. und erw. Aufl. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart.

Literaturverzeichnis

THURBER D L, EDWARDS, J E & ACHOR, R W (1962)

Secondary malignant tumors of the pericardium. *Circulation* 26, 228-241.

TILLE J C, WANG, X, LIPSON, K E, MCMAHON, G, FERRARA, N, ZHU, Z, HICKLIN, D J, SLEEMAN, J P, ERIKSSON, U, ALITALO, K & PEPPER, M S (2003)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 signaling mediates VEGF-C(deltaNdeltaC)- and VEGF-A-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res* 285, 286-298.

TIPPIN T K & THAKKER, D R (2008)

Biorelevant refinement of the Caco-2 cell culture model to assess efficacy of paracellular permeability enhancers. *J Pharm Sci* 97, 1977-1992.

TIRUMALASETTY P P & ELEY, J G (2005)

Evaluation of dodecylmaltoside as a permeability enhancer for insulin using human carcinoma cells. *J Pharm Sci* 94, 246-255.

TISCHER E, MITCHELL, R, HARTMAN, T, SILVA, M, GOSPODAROWICZ, D, FIDDES, J C & ABRAHAM, J A (1991)

The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266, 11947-11954.

TORRES R, PIZARRO, L, CSENDES, A, GARCIA, C & LAGOS, N (2007)

GTX 2/3 epimers permeate the intestine through a paracellular pathway. *J Toxicol Sci* 32, 241-248.

TROYANOVSKY B, ALVAREZ, D F, KING, J A & SCHAPHORST, K L (2008)

Thrombin enhances the barrier function of rat microvascular endothelium in a PAR-1-dependent manner. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L266-275.

TSUZUKI W (2007)

Absorption properties of micellar lipid metabolites into Caco2 cells. *Lipids* 42, 613-619.

TUERK C & GOLD, L (1990)

Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.

VALDES L, ALVAREZ, D, VALLE, J M, POSE, A & SAN JOSE, E (1996)

The etiology of pleural effusions in an area with high incidence of tuberculosis. *Chest* 109, 158-162.

Literaturverzeichnis

- VARDHANA P A, JULIUS, M A, POLLAK, S V, LUSTBADER, E G, TROUSDALE, R K & LUSTBADER, J W (2009)
A unique human chorionic gonadotropin antagonist suppresses ovarian hyperstimulation syndrome in rats. *Endocrinology* 150, 3807-3814.
- VERHEUL H M, HOEKMAN, K, JORNA, A S, SMIT, E F & PINEDO, H M (2000)
Targeting vascular endothelial growth factor blockade: ascites and pleural effusion formation. *Oncologist* 5 Suppl 1, 45-50.
- VOLPE D A (2008)
Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J Pharm Sci* 97, 712-725.
- WANG N S (1975)
The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 111, 12-20.
- WANG X D, MENG, M X, GAO, L B, LIU, T, XU, Q & ZENG, S (2009)
Permeation of astilbin and taxifolin in Caco-2 cell and their effects on the P-gp. *Int J Pharm* 378, 1-8.
- WANG Z F, WANG, L S & FAN, T B (2007)
Densities and viscosities of ternary mixtures of heptane, octane, nonane, and hexyl benzene from 293.15 K to 313.15 K. *Journal of Chemical and Engineering Data* 52, 1866-1871.
- WATSON C J, ROWLAND, M & WARHURST, G (2001)
Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C388-397.
- WEI C, GERAS-RAAKA, E, MARCUS-SAMUELS, B, ORON, Y & GERSHENGORN, M C (2006)
Trypsin and thrombin accelerate aggregation of human endocrine pancreas precursor cells. *J Cell Physiol* 206, 322-328.
- WINDLE P E (2004)
Data mining: an excellent research tool. *J Perianesth Nurs* 19, 355-356.
- WITTEKIND C & OBERSCHMID, B
[Gastrointestinal tumors : New N classification of the UICC]. *Chirurg* 81, 95-98; 100-102.

Literaturverzeichnis

YANG P C, HE, S H & ZHENG, P Y (2007)

Investigation into the signal transduction pathway via which heat stress impairs intestinal epithelial barrier function. *J Gastroenterol Hepatol* 22, 1823-1831.

YANO S, HERBST, R S, SHINOHARA, H, KNIGHTON, B, BUCANA, C D, KILLION, J J, WOOD, J & FIDLER, I J (2000)

Treatment for malignant pleural effusion of human lung adenocarcinoma by inhibition of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase phosphorylation. *Clin Cancer Res* 6, 957-965.

YE S Q, ZHANG, L Q, ADYSHEV, D, USATYUK, P V, GARCIA, A N, LAVOIE, T L, VERIN, A D, NATARAJAN, V & GARCIA, J G (2005)

Pre-B-cell-colony-enhancing factor is critically involved in thrombin-induced lung endothelial cell barrier dysregulation. *Microvasc Res* 70, 142-151.

YEAGER M & HARRIS, A L (2007)

Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr Opin Cell Biol* 19, 521-528.

YEO K T, WANG, H H, NAGY, J A, SIOUSSAT, T M, LEDBETTER, S R, HOOGEWERF, A J, ZHOU, Y, MASSE, E M, SENGER, D R, DVORAK, H F & ET AL. (1993)

Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions. *Cancer Res* 53, 2912-2918.

YOSHIDA D, TODO, H, HASEGAWA, T & SUGIBAYASHI, K (2008)

Effect of molecular weight on the dermatopharmacokinetics and systemic disposition of drugs after intracutaneous injection. *Eur J Pharm Sci* 35, 5-11.

ZEBROWSKI B K, YANO, S, LIU, W, SHAHEEN, R M, HICKLIN, D J, PUTNAM, J B, JR. & ELLIS, L M (1999)

Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 5, 3364-3368.

ZOCCHI L (2002)

Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 20, 1545-1558.

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Kunze bedanke ich mich für die Betreuung meiner Arbeit. Vor allem war mir Dein unerschütterlicher Glaube an meine Publikation zur Berechnung des temperaturunabhängigen TEER Wertes eine große Hilfe. Auch wenn wir schon zweimal gescheitert sind, gehe ich davon aus dass wir es noch schaffen werden, gemeinsam den ersten Platz beim Alumni Cup zu ersegeln.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Clement ganz herzlich bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt Prof. Dr. Heiner Schäfer und Prof. Dr. Susanne Sebens. Ich durfte mich von einem Gast in Eurem Labor zu einem vollwertigen Mitglied entwickeln, ihr habt mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Auch der Spaß kam nie zu kurz, sodass ich jeden Tag aufs Neue mit Freude in Eurem Team geforscht habe. Eure Unterstützung war alles andere als selbstverständlich und dafür bin ich Euch unendlich dankbar.

Dies wurde von allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie mitgetragen: Ich danke hier Dagmar Leisner, Maike Witt, Frauke Grohmann, Maike Großmann, Eike Jürgen, Dr. Marie-Luise Kruse und insbesondere Iris Bauer für die permanente Unterstützung während des Laboralltages.

Bei Momme Denker möchte ich mich für die Freundschaft im und außerhalb des Labors bedanken. Neben vielen gemeinsamen Wochenenden im Labor werden mir einige ernsthafte Gespräche sowie zahlreiche Freizeitaktivitäten in positiver Erinnerung bleiben und ich hoffe, dass noch viele folgen werden.

Vielen Dank auch an Claudia Geismann für ihre große fachliche Hilfe und die freundschaftlichen Unterhaltungen darüber hinaus.

Bei Anna Beimar bedanke ich mich, für Ihr beeindruckendes Engagement, mit dem sie meine Arbeit fortgesetzt hat.

Für die Bereitstellung des klinischen Materials bedanke ich mich bei Prof. Dr. Frank Gieseler und Prof. Dr. Hendrik Ungefroren.

Bei Dr. Tobias Schulte bedanke ich mich für die Hilfe bei der Präparation der Pleura parietalis.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Sven Wichmann für seine Hilfe bei der HPLC, bei Herrn Boehme für Konstruktion der benötigten Apparaturen sowie bei Arne Herzog und Detlef Rödiger für ihre kompetente Hilfe bei jeglichen Computerproblemen.

Bei Thomas Behrendt möchte ich mich für die Unterstützung bei diversen organisatorischen Angelegenheiten und die tolle Atmosphäre in unserem Büro bedanken.

Danksagung

Mein innigster Dank geht an meine Familie: Mama, Papa, Rike, Holger, Momo, Oppa, Öhme, Brigitte und Paul für ihre Liebe und ihren starken Rückhalt.

Mein liebevoller Dank gilt Melina, die mit Ihrer großen Liebe und unerschütterlichen Geduld diese Arbeit erst ermöglicht hat. Du hast mir die Kraft gegeben, Rückschläge zu verkraften und weiter an das Ziel zu glauben.

Ich bin dankbar, Mike Clark kennengelernt zu haben, der leider viel zu früh verstorben ist. Mike, Du warst ein toller Mensch und ich bedaure, dass wir nicht mehr Zeit zusammen verbringen konnten. Ich habe etliche Male im Labor darüber nachgedacht wie meine Promotion verlaufen wäre, wenn Du noch da wärest. Ich werde Dich immer als einen ganz besonderen Menschen in Erinnerung behalten.

Persönliche Daten

Vor- und Familienname: Lars-Fabian Blume
Geburtsdatum: 31. Mai 1980
Geburtsort: Hamm
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1986 - 1990 Südschule, Kamen
1990 - 1999 Städtisches Gymnasium, Kamen
Juni 1999 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

Juli 1999 - Juni 2000 Städtisches Hellmig-Krankenhaus

Pharmazie-Studium

Oktober 2000 - Februar 2005 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
März 2003 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 2005 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juni 2005 – Mai 2006 Praktisches Jahr in der Hellweg-Apotheke, Kamen
August 2006 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
September 2006 Erteilung der Approbation

Promotion

Seit September 2006 Anfertigung der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Kunze

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – nach Inhalt und Form selbstständig von mir erarbeitet. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft entstanden.

Teile der Arbeit sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

BLUME L F, DENKER, M, GIESELER, F & KUNZE, T

Temperature corrected transepithelial electrical resistance (TEER) measurement to quantify rapid changes in paracellular permeability. Pharmazie 65, 19-24.

Kiel, den 29.04.2010

Lars-Fabian Blume

Abstract

Approximately 15-20 % of tumor patients develop pleural or peritoneal effusions during the progression of their disease. Considering the short mean survival time of 20 weeks, the foremost goal in the therapy of malignant effusions is the palliation of the symptomatic patient.

Until now, there is no satisfactory treatment of malignant effusions, as only a limited number of patients is able to undergo invasive surgery with chemical pleurodesis. Further, thoracentesis or paracentesis often result in relapse.

Here we set out to research the significance of VEGF in its function as a permeability factor in the formation of malignant effusions. Examining the therapeutic efficacy of an anti-VEGF therapy with Bevacizumab in the setting of malignant effusions preclinical studies were performed.

Two different methods were applied to determine the epithelial permeability changes. Firstly the direct measurement of the permeability of marked solute and secondly the determination of the transepithelial electrical resistance (TEER) was used. As the experimental set-up required TEER measurements at different temperatures, the influence of temperature on TEER values as known from the literature had to be considered.

For this purpose, a new mathematical solution was worked out, with which the temperature-independent TEER values can be calculated under different experimental conditions. To mimic physiological conditions permeability changes caused by VEGF would have been ideally investigated at the pleura parietalis. Therefore, porcine pleura parietalis was fixed in an apparatus which was designed for this work. However, difficulties during the studies occurred, as for example the limited availability and complex preparation of the pleura parietalis, leading to not reproducible results. Therefore a cell culture model based on Caco-2 monolayer was established.

In recent studies the option of an intracavitary therapy with Bevacizumab was investigated, using an animal model in order to inhibit the VEGF-induced permeability and therefore the formation of the effusion. As the current drug approval of Bevacizumab does not content the therapy of malignant effusions, there are no dosage recommendations given. In this work a dose-response relationship for Bevacizumab is shown for Caco-2 monolayer. The maximum reduction of the permeability was shown at a Bevacizumab concentration of 2,53 mg/ml. An ED_{50} of 0,7 mg/ml was calculated.

As the determined high antibody concentrations exceeded clearly the plasma levels due to the present dosage recommendation, the most beneficial kind of application had to be established. Permeability studies initially made on Caco-2 monolayer have shown a poor permeability of Bevacizumab. Therefore a intracavitary application of Bevacizumab would be most suitable for a optimal inactivation of VEGF. Also considering the fact, that epidemiological studies had shown

Abstract

that the VEGF concentration is increased especially in effusions, intracavitary application seems to be appropriate.

It was shown that cells isolated from effusions are able to secrete VEGF and therefore they are directly responsible for high VEGF levels in malignant effusions. To explain the high VEGF concentrations, factors from the effusion that were able to induce the VEGF expression were quantified. Afterwards cells isolated from the effusions as well as different cell lines were incubated with the coagulation factors FIIa and FXa same as chemokine IL-8 and further the growth factor TGF- β 1. It became obvious that the impact of TGF- β 1 on both, the VEGF-mRNA as also the VEGF secretion is the highest of all factors mentioned before.

Besides the effect of TGF- β 1 only a significant increase of the VEGF secretion could be proved for FIIa. The PAR-2-Agonist that was used instead of FXa shows only a poor induction and IL-8 remained without effect on the VEGF expression. The tendency of the results was comparable for all investigated cells. Differences could be detected only in the extent of the effects.

Studies of the impact of FIIa, FXa, IL-8 and TGF- β 1 on the permeability of the Caco-2 monolayer in concentrations, in which they also were detectable in effusions, yield merely for TGF- β 1 in significant results. A mean increase of the permeability of 20 % was shown. To what extent these effects depend on VEGF has to be investigated in further studies. Initial experiments indicate that at first a VEGF-independent effect is responsible for the increased permeability, afterwards a VEGF-dependent component takes place instead of it.

Summing up the results of this work a model regarding the formation of malignant effusions is presented from which possible therapeutic options can be deviated.