

# Technische Universität München

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie  
Klinikum rechts der Isar München

## **Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems und den Vascular Endothelial Growth Factor in Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereiches**

Jörg Volker Hötzel

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Molls
2. Priv.-Doz. Dr. B. Röper

Die Dissertation wurde am 30.01.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.10.2013 angenommen.



**Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von Komponenten  
des Plasminogen-Aktivierungs-Systems  
und den Vascular Endothelial Growth Factor in  
Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereiches**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Technischen Universität München

Vorgelegt von  
Jörg Volker Hötzel  
aus Gräfelfing

2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines DFG-Forschungsprojektes in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie am Klinikum rechts der Isar in München angefertigt. Die Leitung der Abteilung hat Univ.-Prof. Dr. med. Michael Molls inne.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

### **Veröffentlichung:**

Bayer C, Schilling D, Hoetzel J, Egermann HP, Zips D, Yaromina A, Geurts-Moespot A, Sprague LD, Sweep F, Baumann M, Molls M, Adam M (2008).

**“PAI-1 levels predict response to fractionated irradiation in 10 human squamous cell carcinoma lines of the head and neck.”**

Radiother Oncol 86(3):361

### **Kongress-Beiträge:**

Bayer C, Hoetzel J, Egermann HP, Sprague L, Molls M, Adam M.

**“Influence of hypoxia on the expression of VEGF and components of the Plasminogen Activation System in human squamous cell carcinoma cell lines and tumors.”**

25th Meeting of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO)

Leipzig, Deutschland, 8.-12. Oktober 2006

Bayer C, Hoetzel J, Egermann HP, Adam M, Sprague L, Molls M.

**“Influence of hypoxia on the expression of VEGF and components of the Plasminogen Activation System (PAS) in Squamous Cell Carcinoma (SCC) cell lines.”**

Third International Congress on Translational Research and Pre-Clinical Strategies in Radiation Oncology (ICTR)

Lugano, Schweiz, 12.-15. März 2006

Bayer C, Hoetzel J, Egermann HP, Molls M.

**“PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type-1) correlates to hypoxia and radiation resistance in squamous cell carcinomas of the head and neck (SCCHN).”**

13th International Congress of Radiation Research (ICRR)

San Francisco, CA, USA, 8.-12. Juli 2007

Bayer C, Hoetzel J, Egermann HP, Adam M, Molls M.

**“PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type-1) correlates to hypoxia and radiation resistance in squamous cell carcinomas of the head and neck (SCCHN).”**

10th International Wolfsberg Meeting

Ermattingen, Schweiz, 12.-14. Mai 2007

---

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	IV
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VI
<b>A Einleitung</b>	<b>1</b>
1 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches	1
2 Invasion, Metastasierung und Neoangiogenese	2
3 Das Plasminogen-Aktivierungs-System	3
3.1 Plasminogen und Plasmin	3
3.2 uPA und tPA	3
3.3 uPAR	4
3.4 PAI-1 und PAI-2	4
3.5 Funktionen des PAS	4
4 Die Neoangiogenese	6
4.1 VEGF	6
4.2 Einfluss des PAS auf die Neoangiogenese	7
4.3 Interaktionen zwischen VEGF und dem PAS	8
5 Das Mikromilieu des Tumors	8
5.1 Akute Hypoxie	8
5.2 Chronische Hypoxie	9
6 Flucht oder Adaption	10
7 Fragestellung	12
<b>B Material und Methoden</b>	<b>13</b>
1 Methoden der Zellkultur	13
1.1 Verwendete Zellen	13
1.2 Kultivierung der Zelllinien	13
1.3 Subkultivierung	14
1.4 Kryokonservierung	14
2 Hypoxieversuche	14
2.1 Herstellung hypoxischer Bedingungen	14
2.2 Durchführung der Hypoxieversuche	15

2.3 Vergleichskulturen	15
2.4 Gewinnung von Überständen und Zelllysaten für ELISA- und uPA-Aktivitäts-Assays	16
3 Koloniebildungs-Assay	16
4 Bestimmung der Proteinmengen	17
4.1 Gesamtproteinmenge in den Zelllysaten	17
4.2 Menge des sezernierten VEGF, PAI-1 und uPA-Antigens	17
4.3 Menge des zellgebundenen uPA-Antigens	18
5 uPA-Aktivitäts-Assay	18
6 Statistische Auswertung	18
<b>C Ergebnisse</b>	<b>19</b>
1 Einfluss von Hypoxie auf Zellüberleben und Koloniebildungsfähigkeit	19
2 Änderung der Proteinsekretion in den Zelllinien	19
2.1 Änderung der Proteinsekretion von VEGF, PAI-1 und uPA	19
2.2 Zelluläre Expression von uPA	22
2.3 uPA-Aktivität	24
3 Auswirkungen der Hypoxie auf die Regulation von VEGF, PAI-1 und uPA	24
4 Korrelationen zwischen VEGF, PAI-1 und uPA	25
5 Korrelationen zwischen zellgebundenem uPA und den sezernierten Proteinen	27
6 Zusammenfassung der Korrelationen	30
<b>D Diskussion</b>	<b>31</b>
1 Änderung der Proteinsekretion in Tumorzellen im Vergleich mit Fibroblasten	31
1.1 Änderung der Proteinmengen von VEGF	31
1.2 Änderung der Proteinmengen von PAI-1 und uPA	32
1.3 Folgen der veränderten Proteinsekretion	33
2 Änderung der Proteinsekretion unter Einfluss von Hypoxie	33
2.1 Einfluss von Hypoxie auf VEGF	34
2.2 Einfluss von Hypoxie auf PAI-1	35
2.3 Einfluss von Hypoxie auf uPA	37
2.4 Einfluss von Hypoxie auf die uPA-Aktivität	37

---

3 Korrelationen zwischen den Komponenten des PAS und VEGF	38
4 Therapeutische Ansätze	40
4.1 Eingriffe in das PAS und Beeinflussung von VEGF	40
4.2 Bestrahlung	41
<b>E    Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>F    Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>G    Danksagung</b>	<b>59</b>
<b>H    Lebenslauf</b>	<b>60</b>



**Verwendete Abkürzungen**

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
c	centi
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay = Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	fetal calf serum = Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	hypoxia inducible factor = Hypoxie-induzierter Faktor
HRE	hypoxia responsive element = Hypoxie-responsives Element
Jig	Luftdicht verschließbarer Aluminiumbehälter
l	Liter
m	milli
M	Molar
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure
μ	mikro
n	nano
n.n.	nicht nachweisbar
p	Signifikanzwert
PAS	plasminogen activation system = Plasminogen-Aktivierungs-System
PAI-1	plasminogen activator inhibitor type-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PAI-2	plasminogen activator inhibitor type-2 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 2
PBS	phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck

---

R	Korrelationskoeffizient (nach Pearson)
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
SCCHN	squamous cell carcinoma of the head and neck = Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches
scuPA	single chain urokinase-type plasminogen activator = Einsträngiger Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator
SEM	standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
SERPIN	serine protease inhibitors = Serinprotease-Inhibitor
sez.	sezerniert
Tab.	Tabelle
tPA	tissue-type plasminogen activator = Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Unit
uPA	urokinase-type plasminogen activator = Urokinase-Typ- Plasminogen-Aktivator
uPAR	uPA-Rezeptor
VEGF	vascular endothelial growth factor = Gefäßendothel- Wachstumsfaktor
VEGFR-2	VEGF-Rezeptor 2
zell.	zellulär

**Abbildungen**

- Abb. 1: Das Plasminogen-Aktivierungs-System.
- Abb. 2: Die Wirkung von VEGF auf das PAS in endothelialen Zellen.
- Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der strukturellen Unterschiede im Gefäßsystem zwischen normalem Gewebe und dem malignen Tumoren.
- Abb. 4: Lokalisation der hypoxischen Gebiete in Bezug auf ein Blutgefäß.
- Abb. 5: ELISA-Analyse der VEGF-Proteinmenge in den zellfreien Überständen der vier Zellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.
- Abb. 6: ELISA-Analyse der PAI-1-Proteinmenge in den zellfreien Überständen der vier Zellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.
- Abb. 7: ELISA-Analyse der uPA-Proteinmenge in den zellfreien Überständen der vier Zellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.
- Abb. 8: ELISA-Analyse der uPA-Proteinmenge in den Zelllysaten der vier Zellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.
- Abb. 9: Analyse der uPA-Aktivität in den zellfreien Überständen der drei Tumorzellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.
- Abb. 10: Analyse der Proteinmengen und der uPA-Aktivität in den drei Tumorzellreihen.
- Abb. 11: Korrelation zwischen sez. uPA- und PAI-1-Antigenmenge.
- Abb. 12: Korrelation zwischen sez. uPA- und VEGF-Antigenmenge.
- Abb. 13: Korrelation zwischen sez. PAI-1- und VEGF-Antigenmenge.
- Abb. 14: Korrelation zwischen zell. uPA- und sez. PAI-1-Antigenmenge.
- Abb. 15: Korrelation zwischen zell. uPA- und sez. VEGF-Antigenmenge.
- Abb. 16: Korrelation zwischen zell. uPA- und sez. uPA-Antigenmenge.

**Tabellen**

- Tab. 1: Beschreibung der verwendeten Zelllinien.
- Tab. 2: Antigenmengen in den zellfreien Überständen.
- Tab. 3: Antigenmengen in den Zelllysaten.
- Tab. 4: Zusammenfassung der Korrelationen zwischen den sezernierten Proteinmengen von uPA, PAI-1 und VEGF sowie der zellulären uPA-Menge.

## A Einleitung

### 1 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches

Karzinome der Kopf-Hals-Region (das sind Karzinome der Mundhöhle, des Nasopharynx und Larynx) machen weltweit einen Anteil von etwa 6 % der malignen Tumorerkrankungen aus und gehören damit zu den zehn häufigsten Tumorentitäten insgesamt (Curado et al. 2007). Allein in Deutschland gibt es pro Jahr geschätzte 10.400 Neuerkrankungen, Männer sind etwa dreimal häufiger betroffen als Frauen. Zeigte sich vor allem bei Männern bis zum Beginn der 1990er Jahre eine erhebliche Zunahme der Inzidenz, ist sie seitdem zwar rückläufig, dennoch stellen diese Karzinome mit einem Anteil an allen Krebssterbefällen von 3,3 % bei Männern und 1,0 % bei Frauen weiterhin ein großes Problem dar (Batzler et al. 2008). Hauptrisikofaktoren für die Erkrankung sind Alkohol- und Nikotinabusus, es wird jedoch auch ein zu geringer Konsum von Obst und Gemüse sowie eine Beteiligung bestimmter Viren bei der Entstehung diskutiert (Vokes et al. 1993).

Den größten Anteil der Tumoren machen Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches (SCCHN = squamous cell carcinoma of the head and neck) aus. Die Prognose dieser Karzinome hängt von verschiedenen Faktoren ab, hauptsächlich jedoch vom Tumorstadium. Werden sie in einem frühen Stadium entdeckt, besteht eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 75 %. Bei bis zu 40 % der Patienten jedoch wird die Krankheit erst im metastasierten Stadium diagnostiziert und die Überlebensrate sinkt drastisch auf unter 35 %. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet hat sich diese Prognose in den letzten Jahren nicht entscheidend verbessert.

Die Therapie der SCCHN besteht derzeit je nach Stadium aus radikaler Chirurgie, solitärer, adjuvanter oder neoadjuvanter Strahlentherapie und eventuell aus einer begleitenden Chemotherapie. Die Auswahl der Therapieform richtet sich nach verschiedenen prognostischen Faktoren, darunter klinische Faktoren wie zum Beispiel Alter und Geschlecht. Aber auch pathologische Faktoren, beschrieben durch die TNM-Klassifikation (T: Ausdehnung des Primärtumors, N: Lymphknotenbefall, M: vorhandene Fernmetastasen) und das histologische Grading, spielen eine Rolle (Bettendorf et al. 2004, Lefebvre 2005, Vokes et al. 1993, Wendt et al. 2002). Trotz dieser Einteilungsmöglichkeiten bleibt es jedoch schwer, prädiktive Aussagen über die Aggressivität des Tumors, sein Rezidivpotential und vor allem den Erfolg einer bestimmten Therapieform zu machen. Es wäre deshalb von entscheidender Bedeutung, prognostische oder prädiktive Marker für diese Tumoren zu

finden, die Aufschlüsse über bestimmte Merkmale des Tumors, wie Aggressivität, Metastasierungspotential, Rezidivrisiko und Sensitivität gegenüber Radio- beziehungsweise Chemotherapie, geben und so eine individuell zugeschnittene Therapie ermöglichen. So könnte sowohl eine adjuvante als auch eine neoadjuvante Radio- oder Chemotherapie sehr viel gezielter bei Patienten eingesetzt werden, für deren Tumoren ein Ansprechen wahrscheinlich ist. Weiterhin könnte zum Beispiel bei den Tumoren, die ein aggressives Wachstum zeigen oder hohes Metastasierungs- oder Rezidivpotential besitzen, gezielt eine radikalere Operationstechnik oder eine prophylaktische Neck-Dissection (operative Ausräumung der Halslymphknoten) durchgeführt werden. Durch die prognostische oder prädiktive Aussagekraft solcher Marker könnten also sowohl die Erfolgchancen einer Therapie erhöht werden als auch für einige Patienten eventuell schmerzhaft Operationen und deren Folgen vermieden und so ihre Lebensqualität deutlich verbessert werden.

Ein Grund für die Unterschiede bezüglich der Prognose und dem Erfolg der verschiedenen Therapiemöglichkeiten liegt in der inter- und intratumoralen Heterogenität solider Tumoren, sowohl Änderungen im Genom betreffend als auch Änderungen in der Expression und Sekretion verschiedener Proteine und Wachstumsfaktoren sowie im veränderten Tumormikromilieu.

## 2 Invasion, Metastasierung und Neoangiogenese

Die besondere Eigenschaft, die maligne Tumoren auszeichnet, ist die Fähigkeit invasiv in umliegendes Gewebe einzuwachsen und Metastasen zu bilden. Dafür sind die folgenden Schritte notwendig: zunächst die Ablösung der Tumorzellen von ihrer ursprünglichen Position, danach die Anhaftung an die umliegende extrazelluläre Matrix und deren schrittweise Degradation, um eine Wanderung (Migration) der Zellen zu ermöglichen. Um Fernmetastasen setzen zu können, benötigen Tumorzellen Anschluss an ein Blutgefäß oder eine Lymphbahn. Schließlich sind Adhäsion an und Invasion durch das Endothel notwendig um sich an einer neuen Stelle im Organismus festzusetzen (Andreasen et al. 1997). Bei vielen dieser Vorgänge spielt das Plasminogen-Aktivierungs-System (PAS) eine zentrale Rolle.

Eine weitere Spezialität von Malignomen ist, dass ein wachsender Tumor ab einer Größe von etwa 1 mm Durchmesser ein eigenes Gefäßsystem und eine eigene Blutversorgung benötigt, um sich selbst mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Hierfür ist unter anderem der vascular endothelial growth factor (VEGF) entscheidend (Roskoski 2007).

### 3 Das Plasminogen-Aktivierungs-System (PAS)

Das Plasminogen-Aktivierungs-System ist eine enzymatische Kaskade, die schlussendlich zur Freisetzung der Serinprotease Plasmin und so zum proteolytischen Abbau von Fibrin und anderen Proteinen der extrazellulären Matrix führt. Die Bestandteile des PAS sind Plasmin und sein Vorläufer Plasminogen, die beiden Aktivatoren des Systems urokinase-type plasminogen activator (uPA) und tissue-type plasminogen activator (tPA), der uPA-Rezeptor (uPAR) und die beiden Inhibitoren plasminogen activator inhibitor type-1 und type-2 (PAI-1, PAI-2) (Andreasen et al. 1997, Stoppelli 2001).

#### 3.1 Plasminogen und Plasmin

Plasmin ist eine zweikettige Serinprotease und hat die Fähigkeit, unterschiedliche Matrixproteine wie Fibronectin, Vitronectin, Fibrin, Laminin und Proteoglykane zu spalten. Dies ist ein essenzieller Schritt zur Degradierung der extrazellulären Matrix. Plasmin ist zudem ein physiologischer Aktivator von latenten Metalloproteasen, welche eine zusätzliche proteolytische Aktivität entwickeln. Weiterhin reguliert Plasmin durch Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren das Zellwachstum und die Differenzierung von Zellen. Vorläufer von Plasmin ist das hauptsächlich in der Leber gebildete Plasminogen, ein ubiquitär im Gewebe vorkommendes Zymogen, welches durch proteolytische Spaltung in aktives Plasmin überführt werden kann (Andreasen et al. 1997, Andreasen et al. 2000, Stoppelli 2001).

#### 3.2 uPA und tPA

Die zwei Aktivatoren des PAS, uPA und tPA, überführen beide durch Spaltung einer Peptidbindung die inaktive Vorstufe des Plasmin in seine aktive Form, haben aber strukturelle und funktionelle Unterschiede.

Die Serinprotease uPA besteht aus zwei Polypeptidketten und wird wie Plasmin aus einer einkettigen, inaktiven Vorstufe, dem sogenannten single-chain uPA (scuPA), durch proteolytische Spaltung gebildet. Als Katalysator für diesen Vorgang dient hauptsächlich Plasmin. Durch die Bindung von scuPA an den uPA-Rezeptor wird die Geschwindigkeit gesteigert, mit der scuPA in aktives uPA umgewandelt werden kann.

Die Serinprotease tPA findet sich hauptsächlich im Blutserum. Hier fördert es die Bildung von Plasmin, welches die Proteolyse von Fibrin bewirkt und so entscheidend zur Thrombolyse beiträgt (Andreasen et al. 1997, Rakic et al. 2003, Stoppelli 2001).

### 3.3 uPAR

Der uPA-Rezeptor (uPAR) ist ein stark glykosyliertes Protein, welches überwiegend durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker an die Zellmembran gebunden ist; es existieren jedoch auch lösliche Formen im Plasma. uPAR ist in der Lage, uPA und scuPA zu binden, und erhöht stark die Geschwindigkeit, mit der scuPA in uPA umgewandelt wird. Durch die daraufhin hohe Konzentration von aktivem uPA an der Zelloberfläche wird sekundär, durch proteolytische Spaltung von Plasminogen, die Konzentration von aktivem Plasmin gesteigert (Andreasen et al. 1997).

### 3.4 PAI-1 und PAI-2

Die beiden Inhibitoren des PAS gehören zur Familie der serine protease inhibitors (SERPIN). Der hauptsächliche Inhibitor des PAS im Plasma und in der perizellulären Matrix ist PAI-1. Es wird bereits in seiner aktiven Form sezerniert, ist jedoch instabil, solange es nicht an Vitronektin gebunden ist. Vitronektin findet sich in der extrazellulären Matrix, im Plasma und in Thrombozyten und kann als Kofaktor von PAI-1 betrachtet werden, der sowohl die Aktivität als auch die Lokalisation von PAI-1 steuert (Rakic et al. 2003).

Auch PAI-2 ist in der Lage, die beiden Aktivatoren des PAS zu inhibieren, jedoch ist seine Wirkung schwächer und langsamer. Da zudem nur ein geringer Anteil des produzierten PAI-2 sezerniert wird, werden PAI-2 vor allem intrazelluläre Wirkungen zugeschrieben. So hat es unter anderem eine modulierende Wirkung auf die Apoptose und beeinflusst die Zellproliferation und Differenzierung (Andreasen et al. 1997, Medcalf et al. 2005).

### 3.5 Funktionen des PAS

Eine der Hauptfunktionen des PAS ist seine Wirkung auf die Migration und Invasion von Zellen in umliegendes Gewebe sowie die Angiogenese. Die einzelnen Komponenten des PAS haben hierbei unterschiedliche Aufgaben und besitzen untereinander komplexe Wechselwirkungen (Abb. 1).

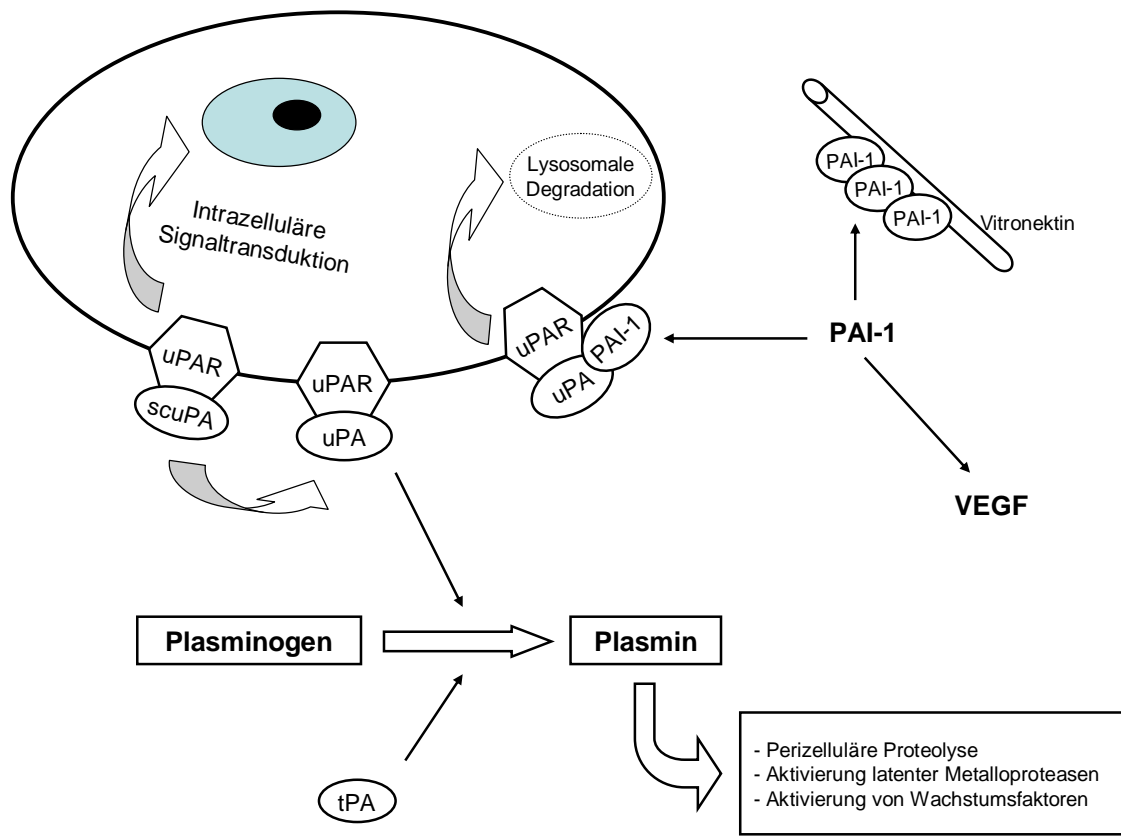


Abb. 1: Das Plasminogen-Aktivierungs-System (vgl. Rakic et al. 2003).

Die Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe läuft in mehreren Schritten ab. So muss zuerst der Zell-Zell-Kontakt gelöst und daran anschließend die umliegende extrazelluläre Matrix proteolytisch aufgelöst werden. Schließlich werden adhäsive Faktoren benötigt, um die Migration der Zelle zu gewährleisten und sie am Ziel neu zu verankern. Die Aktivität des PAS findet sich zumeist an der Zelloberfläche und in ihrer unmittelbaren Umgebung. Dort bindet der zellgebundene Rezeptor für uPA die Vorstufe scuPA. Die anschließende Umwandlung in aktives uPA führt zur Entwicklung seiner vollen katalytischen Aktivität. Durch konsekutive uPA-vermittelte Spaltung von Plasminogen zu Plasmin entsteht so an fokalen Adhäsionspunkten und an Zell-Zell-Kontakten gezielt eine proteolytische Aktivität. In unmittelbarer Nähe der Zelle ist diese besonders ausgeprägt, da an die Zelloberfläche gebundenes Plasmin besser vor abbauenden Proteasen wie zum Beispiel  $\alpha$ 1-Antiplasmin geschützt ist (Andreasen et al. 1997). Die verschiedenen Wege, die zur Adhäsion der Zellen an Teile der extrazellulären Matrix führen und so die Beweglichkeit und schließlich die Festsetzung der Zellen am Ziel ermöglichen, sind noch nicht vollständig



geklärt. Hierbei spielen wohl die Bindung von uPAR an Vitronektin und intrazelluläre Signalkaskaden durch Bindung von uPA an uPAR eine Rolle (Andreasen et al. 2000).

Plasmin, uPA und auch uPAR haben noch weitere Funktionen, die die Adhäsion, Migration und Invasion von Zellen zusätzlich positiv beeinflussen. So sind uPA und Plasmin auch an der Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) und macrophage stimulating protein (MSP) durch proteolytische Spaltung beteiligt und uPAR besitzt enge Wechselwirkungen mit zellnahen Integrinen.

PAI-1 und PAI-2 kontrollieren dieses proteolytische System, wobei PAI-1 aufgrund seiner höheren Konzentration im Gewebe und seiner größeren Reaktionsgeschwindigkeit den Großteil der Wirkung ausmacht. PAI-1 bildet dabei an der Zelloberfläche kovalente Bindungen mit uPA/uPAR-Komplexen und dieser PAI-1/uPA/uPAR-Komplex wird daraufhin schnell internalisiert und abgebaut. So führt PAI-1 auf der einen Seite zu einer Verminderung der Aktivität des PAS durch die Inaktivierung von uPA. Auf der anderen Seite jedoch fokussiert PAI-1 die Aktivität des Systems neu, da uPAR nach der Internalisation der Komplexe und der lysosomalen Degradation recycelt wird und an anderer Stelle an die Zelloberfläche zurückkehren kann (Andreasen et al. 1997, Stoppelli 2001).

#### 4 Die Neoangiogenese

Einer der wichtigsten Mechanismen, um bei raschem Tumorwachstum eine Sauerstoffversorgung der Zellen aufrecht zu erhalten, ist die Bildung neuer Blutgefäße, die Neoangiogenese. Einer der stärksten Induktoren im wachsenden Tumorgewebe ist hierbei der Wachstumsfaktor VEGF (Folkman 1990). Aber auch das PAS kann durch verschiedene Mechanismen und Interaktionen mit VEGF die Neoangiogenese beeinflussen.

##### 4.1 VEGF

VEGF beschreibt eine Reihe von Proteinen, die für die Gefäßneubildung essentiell sind. Man unterscheidet inzwischen verschiedene Formen von VEGF, wobei das bedeutsamste Protein für die Angiogenese VEGF-A ist. Es existieren verschiedene Isoformen von VEGF-A die durch alternatives Spleißen aus dem VEGF-A-Gen entstehen. Einige der so entstehenden Proteine sind hauptsächlich in gebundener Form an der Zelloberfläche zu finden, andere liegen in sezernierter Form vor. Vor allem die größtenteils sezernierten Isoformen VEGF<sub>165</sub>

und VEGF<sub>121</sub> stimulieren die Proliferation und Migration von Endothelzellen in neues Gewebe und fördern so direkt die Angiogenese. Zusätzlich wirkt VEGF auch durch eine Steigerung der Permeabilität der bereits vorhandenen Gefäße. Auf diese Weise können Plasmaproteine aus den Gefäßen austreten und es entsteht ein günstiges Milieu für die Angiogenese (Ferrara et al. 1997, Klagsbrun et al. 1996, Reinmuth et al. 2003). Es wurden verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche von Endothelzellen identifiziert, die VEGF binden können. Eine der wichtigsten Bindungsstellen für VEGF<sub>165</sub> ist hierbei der vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2). Dieser wirkt unter anderem über eine Hochregulation vom PAS durch Aktivierung von scuPA (Abb.2, vgl. Binder et al. 2007).

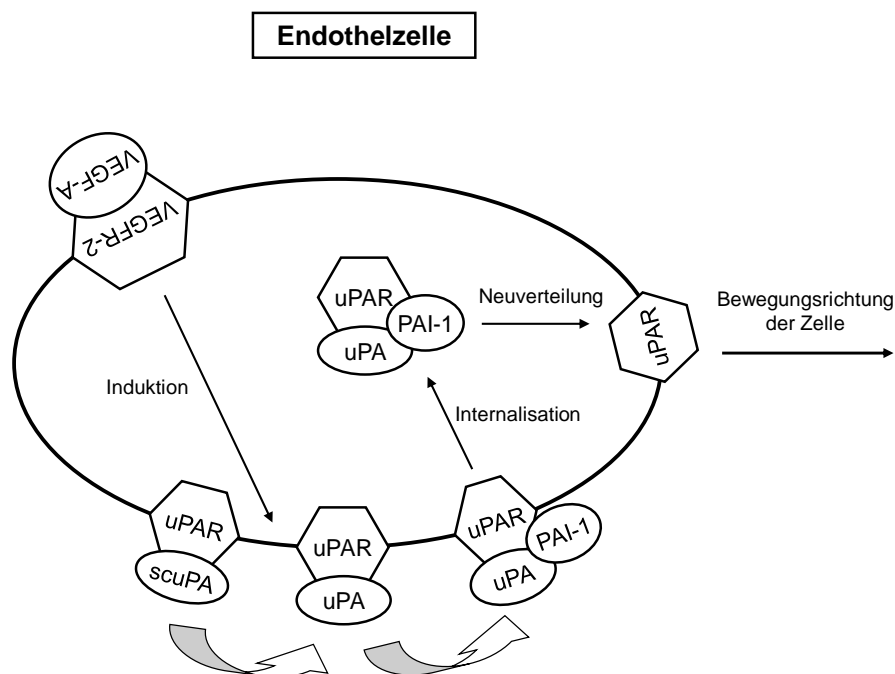


Abb. 2: Die Wirkung von VEGF auf das PAS in endothelialen Zellen (vgl. Binder et al. 2007).

#### 4.2 Einfluss des PAS auf die Neoangiogenese

Auch das PAS hat wichtige Funktionen bei der Angiogenese. So ist eine Degradation der extrazellulären Matrix eine Voraussetzung für die erfolgreiche Migration von Endothelzellen. Dazu ist die gezielte proteolytische Aktivität von Plasmin nötig, welche an der Zelloberfläche von uPA und uPAR fokussiert wird. Außerdem gibt es Hinweise, dass eine enge Kontrolle

dieses Systems durch PAI-1 notwendig ist. Dafür spricht die Erkenntnis, dass die PAI-1-Konzentration in wachsenden Tumoren dosisabhängig zu einer Hemmung beziehungsweise zu einer Förderung des Wachstums führen kann. Zu viel PAI-1 inhibiert die Auflösung der extrazellulären Matrix vollständig und verhindert so die Einwanderung von Endothelzellen. Zu wenig PAI-1 hingegen führt zu einer exzessiven Proteolyse und es bleibt kein Grundgerüst mehr für einwandernde Endothelzellen. Die Konzentration von PAI-1 muss also in engen Grenzen gehalten werden, wenn die für das Tumorwachstum notwendige Angiogenese stattfinden soll (Bajou et al. 2001, Bajou et al. 2004, Brooks et al. 2000, Brooks et al. 2004, Devy et al. 2002, Rakic et al. 2003).

#### 4.3 Interaktionen zwischen VEGF und dem PAS

VEGF und das PAS besitzen untereinander komplexe Wechselwirkungen. So konnte für einige Tumorzellarten gezeigt werden, dass VEGF die Expression von uPA und PAI-1 induzieren kann (Pepper et al. 1991, Rakic et al. 2003). Aber auch umgekehrt konnte belegt werden, dass PAI-1 direkt die Expression und Freisetzung von VEGF stimulieren kann (Hjortland et al. 2004). Außerdem kann VEGF in endothelialen Zellen die Aktivierung von scuPA an der Zelloberfläche beschleunigen (Prager et al. 2004).

### 5 Das Mikromilieu des Tumors

Die Physiologie des Tumorgewebes und seiner näheren Umgebung unterscheidet sich deutlich von der normaler Gewebe. Charakteristisch sind beispielsweise Regionen mit hohen extrazellulären Laktatspiegeln und einer daraus resultierenden metabolischen Azidose, geringe Glukosespiegel, ein hoher interstitieller Flüssigkeitsfluss und -druck sowie hypoxische Areale. Man unterscheidet hierbei generell zwei Arten von Hypoxie: akute und chronische Hypoxie.

#### 5.1 Akute Hypoxie

Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der akuten Hypoxie spielt das veränderte intratumoralen Gefäßsystem und eine daraus resultierende veränderte Mikrozirkulation. Die durch Neoangiogenese im Tumor gebildeten Gefäße weisen im Gegensatz zum normalen Gewebe oft Unregelmäßigkeiten wie Dilatationen, Undichtigkeiten, unvollständige und

unterbrochene Endothelien und Basalmembranen auf. Sie besitzen eine irreguläre Architektur mit arteriovenösen Shunts und blinden Enden (Abb. 3, Vaupel 2009).

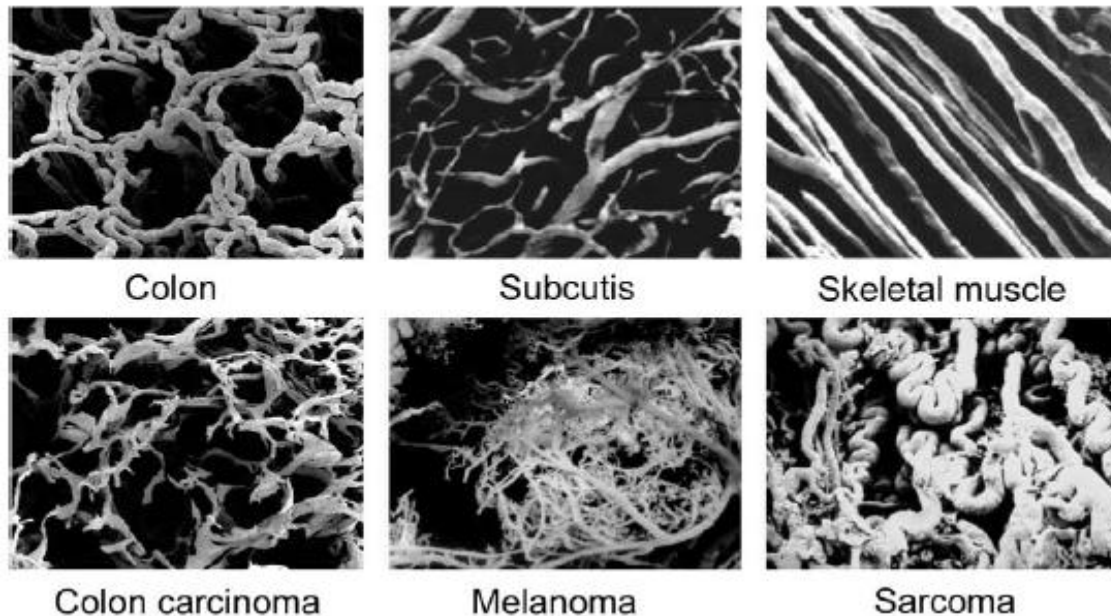


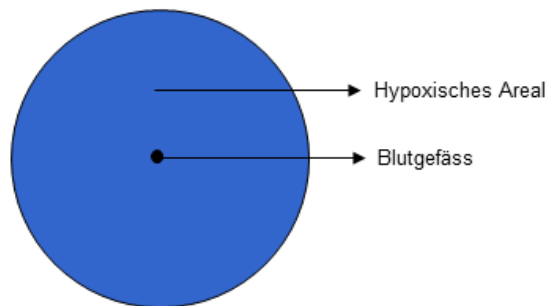
Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der strukturellen Unterschiede im Gefäßsystem zwischen normalem Gewebe (obere Reihe) und dem malignen Tumoren (untere Reihe) (Vaupel 2009).

Bedingt durch die schweren strukturellen und funktionellen Veränderungen der Blutgefäße entstehen deutliche Perfusionsstörungen. Da die Perfusion sich im Verlauf wieder verbessern kann, ist diese Form der Hypoxie oft temporär (Abb. 4, A, vgl. Janssen et al. 2005).

## 5.2 Chronische Hypoxie

Chronisch hypoxische Areale entstehen durch die sich rasch vergrößernde Distanz zwischen den Kapillaren. Ab einer Distanz von etwa 70  $\mu\text{m}$  wird die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen aufgrund der verlängerten Diffusionsstrecke unzureichend. Dadurch entsteht ein Gefälle von normoxischen zu hypoxischen Arealen (Abb. 4, B). Weiter verstärkt wird die chronische Hypoxie von einer eventuell vorhandenen Tumoranämie, da bei weniger Sauerstoff im Blut die Diffusionsstrecke, die überbrückt werden kann, weiter abnimmt (Höckel et al. 2001, Janssen et al. 2005, Vaupel et al. 2004, Vaupel 2004b).

## A) Akute Hypoxie



## B) Chronische Hypoxie

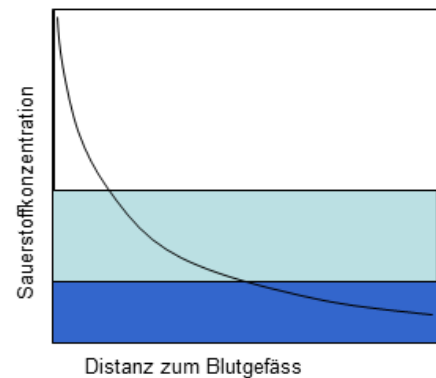
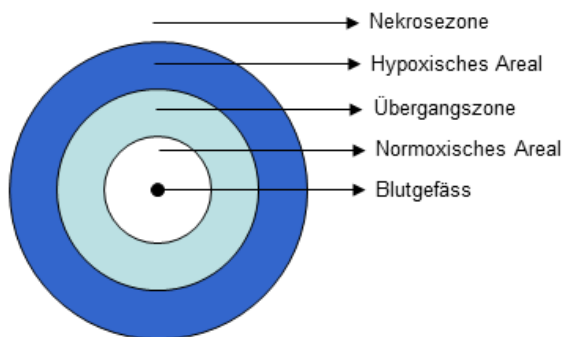


Abb. 4: Lokalisation der hypoxischen Gebiete in Bezug auf ein Blutgefäß; A) Akute Hypoxie, B) Chronische Hypoxie (nach Janssen et al. 2005).

## 6 Flucht oder Adaption

Diese hypoxischen Areale haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Tumorzellen und das Tumorwachstum. Auf der einen Seite können sie das Wachstum der Tumorzellen einschränken, die Proteinsynthese verlangsamen und sowohl zur Apoptose als auch zum nekrotischen Zelltod führen (Riva et al. 1998). Auf der anderen Seite gibt es Möglichkeiten, wie die Tumorzellen der nun „feindlichen“ Umgebung entkommen beziehungsweise sich dieser anpassen können (Vaupel et al. 2004).

Die „Flucht“ der Tumorzellen aus dem unterversorgten Gebiet erfolgt durch lokale Gewebeinvasion oder durch Fernmetastasierung, also dieselben Mechanismen, die auch beim „normalen“ Tumorwachstum eine Rolle spielen. Hypoxie stimuliert demzufolge weiter die

Expression von Komponenten des PAS, die den Tumorzellen die Ablösung aus dem Zellverband ermöglichen. Gezeigt wurde eine Steigerung der Produktion von uPAR (Graham et al. 1998, Graham et al. 1999) und PAI-1 (Fink et al. 2002, Kietzmann et al. 1999, Koong et al. 2000, Weinmann et al. 2002, Weinmann et al. 2004).

Die Adaptation der Zellen an die neue Umgebung geschieht einerseits dadurch, dass hypoxische Bedingungen zu genomischer Instabilität, Punktmutationen, Gen-Amplifikationen und zur klonalen Selektion von Tumorzellen führen, die diese Bedingungen besser tolerieren (Reynolds et al. 1996, Semenza 2000, Vaupel 2004a, Weinmann et al. 2004). Andererseits versuchen natürlich gerade Tumorzellen in unterversorgten Gebieten, ihre Sauerstoffzufuhr zu verbessern. So führen hypoxische Bedingungen zu einer erhöhten Expression von VEGF und einer dadurch gesteigerten Neoangiogenese (Forsythe et al. 1996, Koong et al. 2000, Levy et al. 1995, Liu et al. 1995, Mohamed et al. 2004).

Die Steigerung der Sekretion von uPAR, PAI-1 und VEGF ist vermutlich genetisch bedingt. Die kodierenden Genome der Proteine enthalten alle ein sogenanntes hypoxia responsive element (HRE) in der Promoterregion. Dieses bindet den hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) und steigert so die Expression bestimmter Proteine (Brahimi-Horn et al. 2006, Carmeliet et al. 1998, Fink et al. 2002, Forsythe et al. 1996, Kietzmann et al. 1999). Aktives HIF-1 ist ein Heterodimer bestehend aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ , welches nur unter hypoxischen Bedingungen entstehen kann, da bei Normoxie die Untereinheit HIF-1 $\alpha$  sofort proteolytisch abgebaut wird und sich nicht mit der  $\beta$ -Untereinheit zum aktiven HIF-1 verbinden kann (Semenza 2000, 2001, Vaupel 2004a).

## 7 Fragestellung

Die Fähigkeiten zur Invasion in umliegendes Gewebe, zur Metastasierung und nicht zuletzt zur Neubildung von Gefäßen unterscheiden Malignome von normalem Gewebe. Dafür verantwortlich sind komplexe intra- und extrazelluläre Veränderungen. In der vorliegenden Arbeit werden daher systematisch einige Komponenten, die eine Rolle bei diesen Vorgängen spielen, untersucht.

In der Vergangenheit konnte bereits mehrfach und für verschiedene Zelllinien *in vitro* gezeigt werden, dass Tumorhypoxie die Expression sowohl von VEGF als auch von verschiedenen Komponenten des PAS stimuliert und zu einer Prognoseverschlechterung führen kann. Weiterhin hat Hypoxie einen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit von Strahlen- und zytotoxischer Chemotherapie. Bislang existieren jedoch speziell für SCCHN keine systematischen Studien, die die Zusammenhänge zwischen den Komponenten Hypoxie, PAS und VEGF analysieren.

Das erste Ziel dieser Studie ist es daher, in den drei SCCHN-Zelllinien FaDu, UT-SCC-14 und UT-SCC-5 die Expression bestimmter Komponenten des PAS (uPA und PAI-1) und den Angiogenese-Stimulator VEGF im Vergleich zu normalen Mausfibroblasten zu untersuchen. Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, ob sich direkte Zusammenhänge der einzelnen Komponenten untereinander finden lassen.

Leider ist die Sauerstoffkonzentration im Tumor aufgrund der unregelmäßigen Verteilung hypoxischer Areale nur schwer zu messen. Eine zusätzliche Fragestellung ist deshalb, ob die sezernierten Proteine PAI-1, uPA und VEGF gegebenenfalls als unabhängige, endogene Marker für Hypoxie verwendet werden können, was in der Folge eine individuellere und angepasste Therapie ermöglichen würde.

Weiterhin bieten die einzelnen Komponenten des PAS und der Angiogenese-Faktor VEGF vielfältige Möglichkeiten für eine medikamentöse Intervention. Eine Voraussetzung für die Entwicklung von spezifischen Medikamenten ist jedoch die genaue Kenntnis der Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten. Auch hierfür könnte die Studie wertvolle Hinweise liefern.

## B Material und Methoden

### 1 Methoden der Zellkultur

#### 1.1 Verwendete Zellen

Verwendet wurden drei Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion sowie Mausfibroblasten als Kontrollzelllinie:

Tab. 1: Beschreibung der verwendeten Zelllinien.

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellart</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>TNM-Klassifikation</b>	<b>Grading</b>
<b>FaDu</b>	Primärtumor	Hypopharynx	-	G4
<b>UT-SCC-5</b>	Metastase	Zunge	T1, N1, M0	G3
<b>UT-SCC-14</b>	Rezidivtumor	Zunge	T3, N1, M0	G3
<b>NIH3T3</b>	Mausfibroblasten	-	-	-

Die Zelllinie FaDu ist von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) erhältlich, die Zelllinien UT-SCC-5 und UT-SCC-14 wurden freundlicherweise von Prof. Grénman, Universität Turku (Finnland), zur Verfügung gestellt. Die Linie NIH3T3 ist von den National Institutes of Health, USA zu beziehen.

#### 1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, mit 25 mM HEPES-Puffer, ohne Na-Pyruvat, Gibco, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in Kulturflaschen kultiviert. Dem Kulturmedium wurden 10 % fötales Kälberserum (FCS, Biochrom, Deutschland) und 1 % PSN (PSN Antibiotic Mixture, 5 mg/ml Penicillin, 5 mg/ml Streptomycin, 10 mg/ml Neomycin, Invitrogen, Deutschland) zugegeben. Alle Arbeitsschritte an den Zellkulturen wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen (Lamin Air LB48L, Heraeus, Deutschland) durchgeführt.



### 1.3 Subkultivierung

Alle zwei bis drei Tage wurden die konfluenten Zellen passagiert, um eine Hemmung des Wachstums durch den Kontakt der Zellen untereinander zu verhindern. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS (phosphate buffered saline, Sigma, Deutschland) gewaschen. Um die Zellen vom Boden abzulösen, wurden sie mit 1,5 ml Trypsin (Invitrogen, Deutschland) bedeckt und 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Prozess wurde durch Zugabe von mindestens 3 ml Kulturmedium gestoppt; nach Resuspendierung erfolgte je nach Zelllinie, Dichte und Wachstumsgeschwindigkeit die Aufteilung der Zellen auf neue Kulturflaschen.

### 1.4 Kryokonservierung

Für die Langzeitaufbewahrung wurden Kryotubes (Eppendorf, Deutschland) mit 500µl Einfriermedium (20 % DMSO (Sigma, Deutschland), 40 % FCS, 40 % Kulturmedium) vorbereitet und im Kühlschrank gekühlt. Die Zellen wurden dann mittels Trypsin vom Boden abgelöst, elektronisch gezählt (Z2 Coulter Counter, Beckman Coulter, USA), und je  $1 \times 10^6$  Zellen in die vorbereiteten Kryotubes transferiert. Diese wurden dann für eine Stunde bei -20 °C eingefroren und schließlich bei -80 °C aufbewahrt. Für längere Aufbewahrungszeiten erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff.

## 2 Hypoxieversuche

### 2.1 Herstellung hypoxischer Bedingungen

Die Herstellung hypoxischer Bedingungen erfolgte in luftdicht verschließbaren Aluminiumbehältern (Jigs), die speziell für unser Labor angefertigt wurden. Diese wurden über ein Schlauchsystem mit einer Vakuumpumpe und einer N<sub>2</sub>-Gasflasche verbunden. Um hypoxische Bedingungen zu erreichen wurde Luft bis zu einem Druck von -0,3 bar evakuiert und anschließend Stickstoff bis zu einem Druck von 1,3 bar zugegeben. Der jeweilige Druck im Behälter wurde mittels eines Barometers kontrolliert. Dieser Zyklus wurde dann alle 2 Minuten für insgesamt 22 Minuten wiederholt. Um den Gasaustausch zu fördern, wurden die Jigs während dieses Vorgangs in einem Wasserbad (37 °C, 45 rpm) leicht geschüttelt. Der so

erreichte O<sub>2</sub>-Gehalt von 0,66 % (ca. 5 mmHg) entspricht in etwa dem Partialdruck in hypoxischen Arealen von Kopf- und Halstumoren. Bei der Etablierung dieser Methode wurde die O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium mittels einer polarographischen pO<sub>2</sub>-Elektrode gemessen (Künzel et al. 2001).

## 2.2 Durchführung der Hypoxieversuche

Für die Hypoxieversuche wurden die kultivierten Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Trypsin vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und die Zellzahl wurde bestimmt. Dann wurden zwischen  $1,0 \times 10^6$  und  $1,5 \times 10^6$  Zellen je nach Verdopplungszeit der Zelllinie und Verwendungszweck in 10 ml Medium auf 10 cm Petrischalen ausgesät. Diese Schalen wurden 72h im Brutschrank inkubiert, um eine ausreichende Anzahl Zellen für die späteren Analysen zu erhalten. Nach dem Wachstum wurden die Zellen erneut zwei Mal mit PBS gewaschen und das Kulturmedium wurde ausgetauscht. Für die Schalen, die für uPA-Aktivitätsversuche vorgesehen waren, wurde ab diesem Zeitpunkt FCS-freies Medium verwendet. Die so vorbereiteten Schalen wurden in vorgewärmten Jigs (37 °C) platziert und diese wurden luftdicht verschlossen. In zehn Runden wurde dann, wie oben beschrieben, Luft evakuiert und durch Stickstoff ersetzt, um die gewünschten Bedingungen von ungefähr 0,66 % O<sub>2</sub> zu schaffen. Die Behälter wurden daraufhin für 24h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

## 2.3 Vergleichskulturen

Die Kontrollzellen (Mausfibroblasten) wurden exakt wie die Tumorzellen für die Hypoxiekulturen ausgesät. Sie wurden nach dem Mediumwechsel für die letzten 24h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

## 2.4 Gewinnung von Überständen und Zelllysaten für ELISA- und uPA-Aktivitäts-Assays

Verwendete Puffer-Lösung:

### Lyse-Puffer

10 mM TRIS (Sigma, Deutschland)

0,9 % NaCl (Merck, Deutschland)

0,1 % Triton® X-100 (Sigma, Deutschland)

0,5 % TWEEN® 20 (Sigma, Deutschland)

pH 7,4

Nach 24 h wurden die Schalen aus den Jigs entnommen und sofort weiterverarbeitet. Die Überstände wurden abpipetiert und in 15 ml Falcon-Tubes transferiert. Reste von abgestorbenen Zellen wurden abzentrifugiert (10.000 rpm, 4 °C, 10 min) und 10 ml des Überstandes in einem frischen, kalten Teströhrchen bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Um Zelllysate zu gewinnen und verbleibendes Medium zu entfernen, wurden die noch haftenden Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml eiskalter Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben. Um den Vorgang zu beschleunigen, wurden die Zellen nun mechanisch mit Einmal-Kratzern vom Boden der Schalen abgekratzt und anschließend die so gewonnene Zellsuspension in ein vorgekühltes Eppendorf-Tube gegeben. Diese wurden danach für 24 h bei 4 °C rotiert, um alle Zellen zu lysieren. Schließlich wurde der Zelldetritus abzentrifugiert (10.000 rpm, 4 °C, 10 min) und das Lysat in einem frischen, kalten Eppendorf-Gefäß bei -80 °C eingefroren.

### 3 Koloniebildungs-Assay

Für den Koloniebildungs-Assay wurden nach 24 h Inkubation unter Normoxie beziehungsweise Hypoxie die Überstände aus den Schalen verworfen, die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mittels Trypsin vom Boden abgelöst. Danach wurden sie mit dem Coulter Counter gezählt und es wurde eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 50, 100, 500, 1000, 5000 Zellen/ml hergestellt. Diese wurden dann in jeweils 3 wells einer 6-well-Platte ausgesät. Die Platten wurden erneut inkubiert, bis sich Kolonien von etwa 50 Zellen gebildet hatten. Dann wurden die wells erneut zweifach mit PBS gewaschen, die Zellen 5 min

mit -20 °C kaltem Methanol (Roth) fixiert und mit Kristallviolett (0.1 % in wässriger Lösung, Apotheke, Klinikum rechts der Isar) gefärbt. Nach ausspülen mit H<sub>2</sub>O wurden die Kolonien unter dem Mikroskop ausgezählt.

#### 4 Bestimmung der Proteinmengen

Die Bestimmung der Antigenmengen in Überständen und Zelllysaten erfolgte mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits. Zur Messung der Extinktion wurde ein kommerzieller ELISA-Reader (BioTek EL808, BioTek Instruments, Deutschland) verwendet. Zur Standardisierung der Ergebnisse und um Unterschiede im Wachstum zwischen den einzelnen Zelllinien auszugleichen, wurde die Gesamtproteinmenge in den Zelllysaten gemessen, die Ergebnisse dazu ins Verhältnis gesetzt und demzufolge als ng/mg Gesamtproteinmenge angegeben. Die Unterschiede im Volumen zwischen den zellfreien Überständen (10 ml) und den Zelllysaten (1 ml) wurden bei den Berechnungen berücksichtigt.

##### 4.1 Gesamtproteinmenge in den Zelllysaten

Die gesamte Proteinmenge in den Zelllysaten wurde mittels des BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, USA) bestimmt. Danach wurde der Assay den Vorgaben des Herstellers gemäß durchgeführt.

##### 4.2 Menge des sezernierten VEGF, PAI-1 und uPA-Antigens

Die Menge des sezernierten VEGF, PAI-1 und uPA-Antigens wurde aus den zellfreien Überständen ermittelt. Hierzu wurde die Menge des sezernierten VEGF mittels eines humanen VEGF Immunoassay Kit (Quantikine®, Cat.-Nr. DVE00, R&D Systems, USA) ermittelt. Die Proteinmenge von PAI-1 und uPA wurden durch die kommerziell erhältlichen IMUBIND® ELISA Kits (#894, beziehungsweise #821, American Diagnostica, USA) bestimmt.

### 4.3 Menge des zellgebundenen uPA-Antigens

Die Menge des zellgebundenen uPA wurde aus den Zellysaten ermittelt. Auch hierfür wurde das IMUBIND® ELISA Kit (#894, American Diagnostica, USA) gemäß den Vorgaben des Herstellers genutzt.

### 5 uPA-Aktivitäts-Assay

Die uPA-Aktivität wurde in den zellfreien Überständen bestimmt. Dazu wurde ein kolorimetrisches uPA Aktivitäts Assay Kit (Cat.-Nr. ECM600, Chemicon International, USA) verwendet.

Um die Aktivität des sezernierten uPA ermitteln zu können, wurden hierzu 5 ml der Überstände mittels einer Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Pierce Biotechnology Inc., USA) auf ein Volumen von weniger als 160 µl reduziert. Dieser Schritt war nötig, um uPA-Mengen zu erreichen, die innerhalb der Nachweisgrenze des Assays lagen. Danach wurde der Test mit den konzentrierten Überständen wie vom Hersteller vorgegeben durchgeführt. Die Ergebnisse wurden ins Verhältnis zur Gesamtproteinmenge in den Zellysaten gesetzt und werden demzufolge in u(Units)/mg Gesamtproteinmenge angegeben. Der Konzentrationsfaktor wurde bei den Berechnungen berücksichtigt.

### 6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels des „statistical package for social sciences“ (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse für die Antigenmengen von VEGF, PAI-1 und uPA werden als Mittelwerte +/- SEM (standard error of the mean) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Antigenmengen von VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle beziehungsweise im Vergleich zwischen Normoxie und Hypoxie wurde mit Hilfe des t-Tests auf ihre Signifikanz überprüft. Hierbei wurden drei Signifikanzniveaus festgelegt: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ . Um die Korrelationen zwischen VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivität zu bestimmen, wurde der Korrelationskoeffizient (nach Pearson) berechnet und wiederum mit dem t-Test auf Signifikanz überprüft. Es wurden hier dieselben Signifikanzniveaus wie oben verwendet.

## C Ergebnisse

### 1 Einfluss einer Hypoxie auf Zellüberleben und Koloniebildungsfähigkeit

Die hypoxischen Bedingungen hatten einen deutlichen Einfluss auf das Zellüberleben und die Koloniebildungsfähigkeit der untersuchten Zellreihen. So reduzierte sich die Fraktion der koloniebildungsfähigen Zellen nach 24h Hypoxie im Vergleich zu 24h Normoxie bei FaDu auf 31,8 % und bei UT-SCC-5 auf 33,5 %. Die Zellen der Linie UT-SCC-14 konnten so nicht untersucht werden, da sie bereits unter normoxischen Bedingungen kein deutliches Koloniebildungsverhalten zeigten. Dies ist ein bekanntes Phänomen und wurde schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Aber auch bei dieser Zelllinie wurde eine deutliche Abnahme der Zellpopulation festgestellt.

### 2 Änderung der Proteinsekretion in den Zelllinien

#### 2.1 Änderung der Proteinsekretion von VEGF, PAI-1 und uPA

Die Zellen der vier Zelllinien wurden für 24h entweder unter normoxischen (20 % O<sub>2</sub>) oder hypoxischen Bedingungen (~0,66 % O<sub>2</sub>) inkubiert. Anschließend erfolgte die Gewinnung der zellfreien Überstände.

Die Antigenmenge des Wachstumsfaktors VEGF und der Proteasen PAI-1 und uPA waren in den zellfreien Überständen der hier untersuchten Zelllinien sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen signifikant höher als in der Vergleichskultur (Tab. 2). Die VEGF- und uPA-Mengen lagen bei der Fibroblastenzelllinie 3T3 jeweils unterhalb der Nachweisgrenze. Für PAI-1 ergab sich im Vergleich zwischen den Tumorzelllinien und der Vergleichszelllinie unter normoxischen Bedingungen eine Steigerung um den Faktor 37 bis 138, unter hypoxischen Bedingungen um den Faktor 28 bis 116.

Tab. 2: Antigenmengen in den zellfreien Überständen.

Zelllinie	VEGF		PAI-1		uPA	
	N	H	N	H	N	H
NIH3T3	n.n.	n.n.	1,02 ± 0,23	2,06 ± 0,41	n.n.	n.n.
FaDu	1,93 ± 0,39	3,74 ± 0,86	61,3 ± 13,6	150,1 ± 16,7	28,9 ± 9,17	14,1 ± 1,31
UT-SCC-5	0,46 ± 0,05	0,92 ± 0,1	37,4 ± 3,0	58,2 ± 3,76	13,1 ± 0,53	5,68 ± 0,8
UT-SCC-14	1,89 ± 0,54	2,44 ± 0,62	140,1 ± 32,1	238,3 ± 41,7	93,9 ± 29,4	38,2 ± 2,31

Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM in ng/mg Gesamtprotein angegeben.

N: Normoxische Bedingungen, H: Hypoxische Bedingungen, n.n.: nicht nachweisbar

Die sezernierte VEGF-Antigenmenge nahm unter hypoxischen Bedingungen bei allen Tumorzelllinien im Vergleich zu normoxischen Bedingungen zu. Diese Zunahme war für die Zelllinie UT-SCC-5 signifikant ( $p=0,001$ ). Für die beiden anderen Zelllinien, UT-SCC 14 ( $p=0,234$ ) und FaDu ( $p=0,05$ ), erreichte die Zunahme keine Signifikanz.

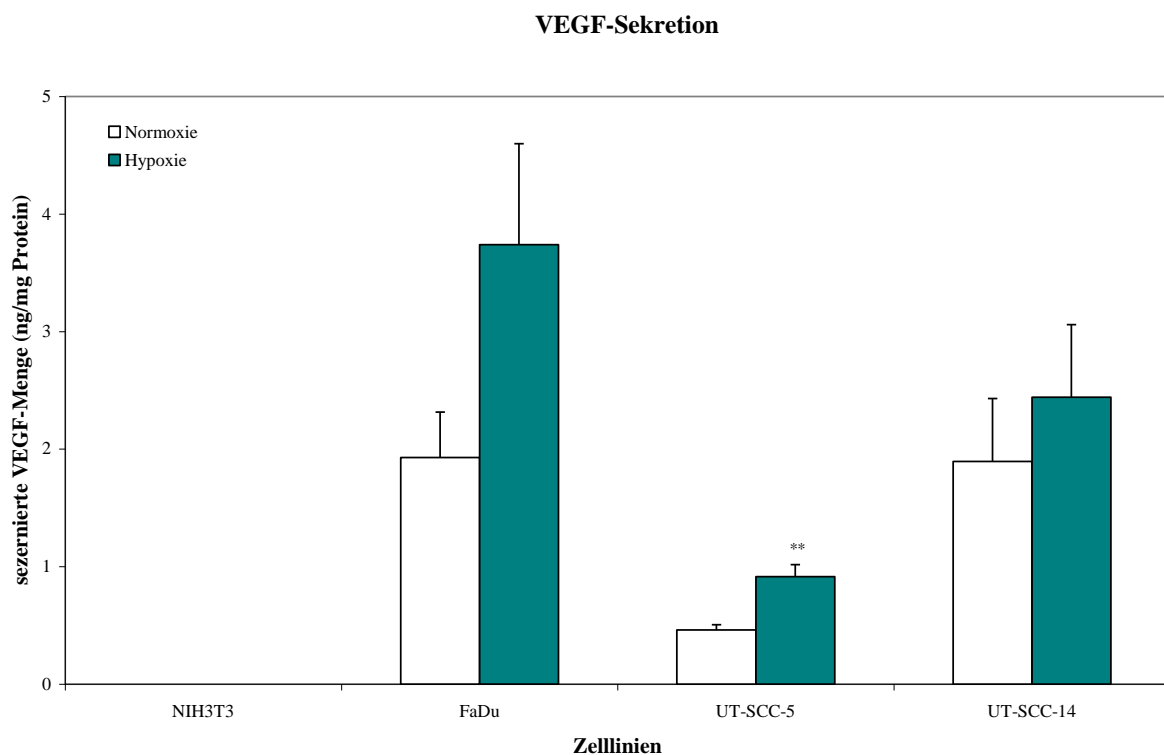


Abb. 5: ELISA-Analyse der VEGF-Proteinmenge in den zellfreien Überständen der vier Zellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.

Signifikanzniveau: \*\* =  $p < 0,01$

Auch die PAI-1 Proteinmenge in den zellfreien Überständen zeigte nach 24h Hypoxie einen Anstieg bei allen Tumorzelllinien. Diese Zunahme erreichte für die Zelllinien FaDu und UT-SCC-5 das höchste Signifikanzniveau ( $p < 0,001$ ), war aber auch für UT-SCC-14 noch deutlich signifikant ( $p = 0,009$ ).

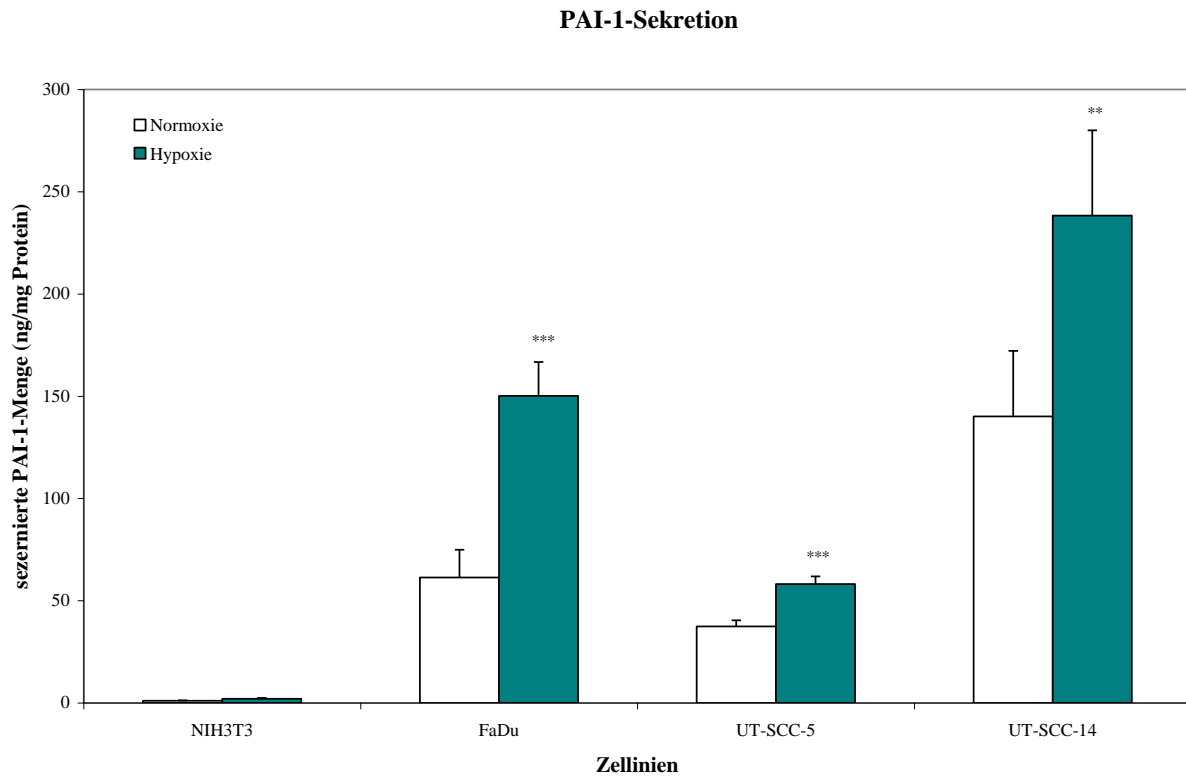


Abb. 6: ELISA-Analyse der PAI-1-Proteinmenge in den zellfreien Überständen der vier Zellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.

Signifikanzniveaus: \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Ergebnissen nahm die Sekretion von uPA bei allen Tumorzelllinien unter Hypoxie ab. Für die Zellen der Linie FaDu war diese Abnahme nicht signifikant ( $p = 0,065$ ). Signifikant jedoch war diese Abnahme für die Linien UT-SCC-5 ( $p < 0,001$ ) und UT-SCC-14 ( $p = 0,004$ ).



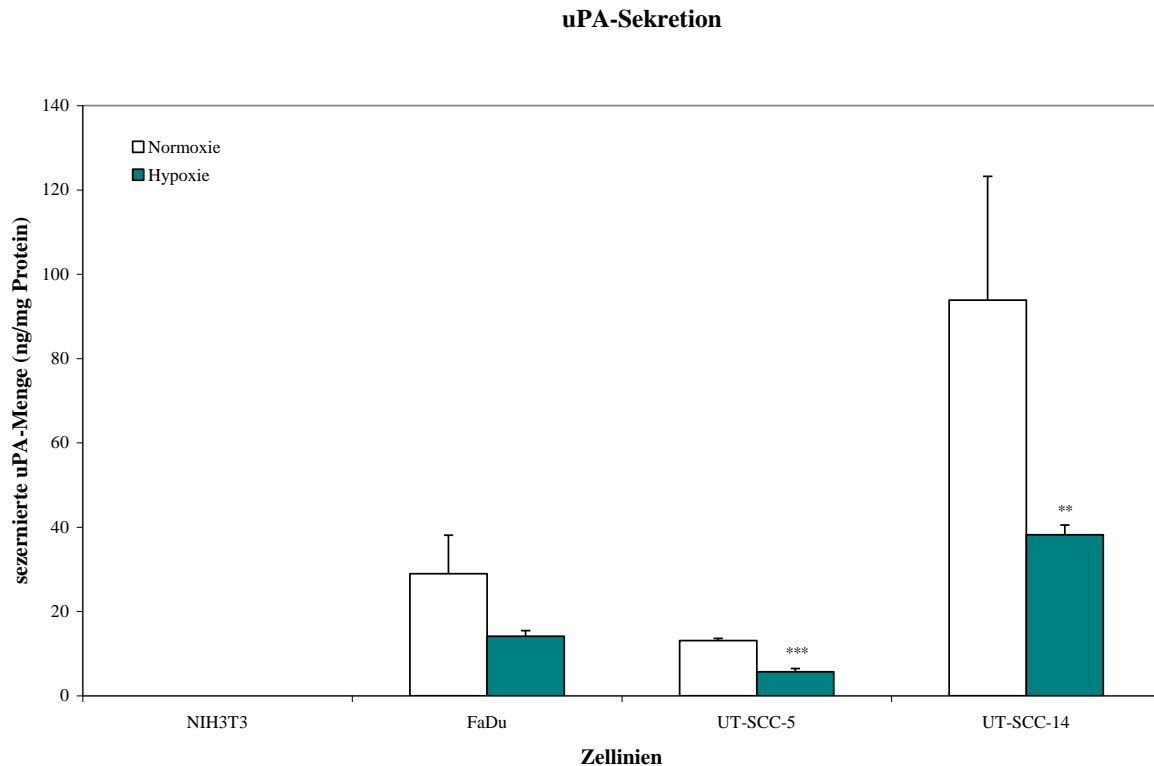


Abb. 7: ELISA-Analyse der uPA-Proteinmenge in den zellfreien Überständen der vier Zellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.

Signifikanzniveaus: \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

## 2.2 Zelluläre Expression von uPA

Um seine Funktion als Kofaktor bei der Degradation der extrazellulären Matrix zu erfüllen, muss uPA in seine aktive Form überführt werden. Dazu bindet es an den uPAR und wird dort von Plasmin und anderen Proteasen aktiviert. Deshalb untersuchten wir die Menge des zellgebundenen uPA unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand der gewonnenen Zellysate. Trotz einer signifikanten Zunahme gegenüber der Kontrollzelllinie waren die Ergebnisse im Vergleich zwischen Hypoxie und Normoxie unterschiedlich.

Tab. 3: Antigenmengen in den Zelllysaten.

Zelllinie	Zelluläres uPA	
	N	H
NIH3T3	n.n.	n.n.
FaDu	10,33 ± 3,47	10,72 ± 2,10
UT-SCC-5	4,87 ± 0,91	8,09 ± 1,51
UT-SCC-14	11,51 ± 1,21	36,80 ± 5,11

Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM in ng/mg Gesamtprotein angegeben.

N: Normoxische Bedingungen, H: Hypoxische Bedingungen, n.n.: nicht nachweisbar

Zeigte sich für FaDu keine nennenswerte Änderung der uPA-Antigenmenge in den Zelllysaten, konnten bei den beiden anderen Zelllinien Steigerungen der uPA-Menge nach 24h Hypoxie beobachtet werden. Signifikanz erreichte jedoch nur der Anstieg bei UT-SCC-14 ( $p < 0,001$ ).

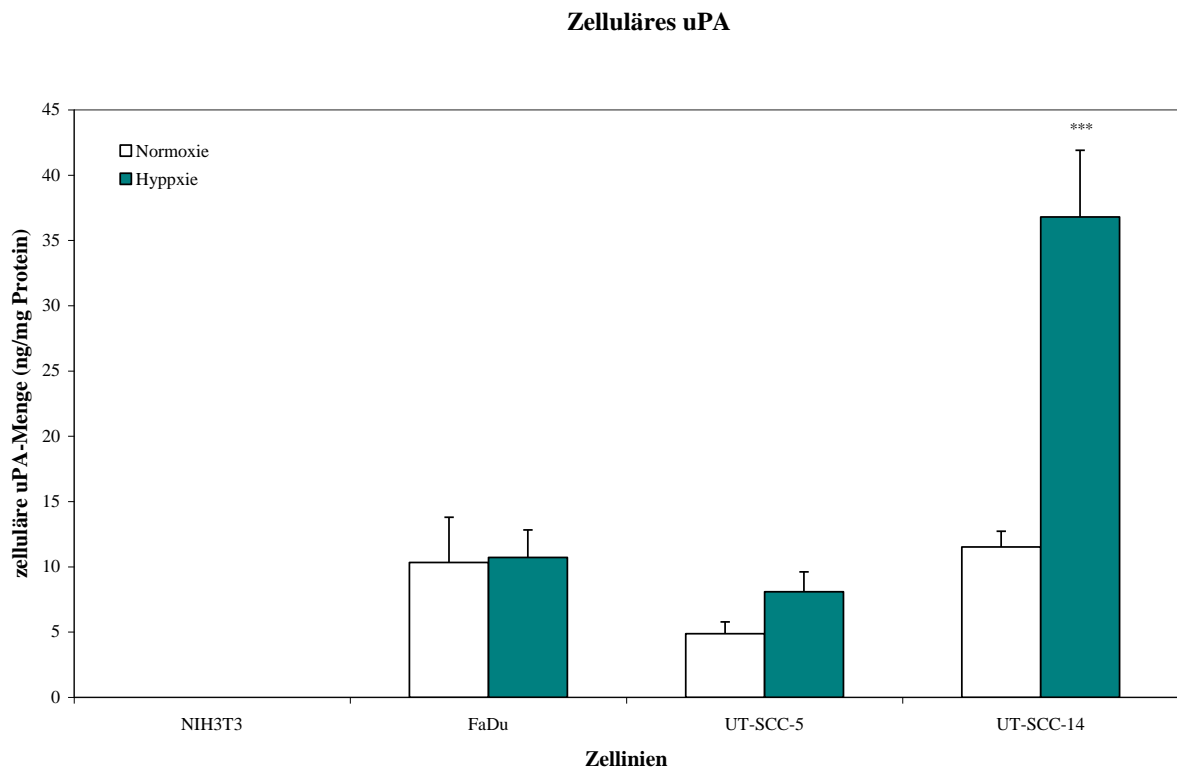


Abb. 8: ELISA-Analyse der uPA-Proteinmenge in den Zelllysaten der vier Zellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.

Signifikanzniveaus: \*\*\* =  $p < 0,001$

### 2.3 uPA-Aktivität

Da nur aktives uPA in der Lage ist, seine Funktion als Aktivator des PAS zu erfüllen, wurde weiterhin versucht, die Aktivität des in die Überständen sezernierten uPA mittels eines kolorimetrischen Tests zu ermitteln. Getestet wurden nur die drei Tumorzelllinien, da die Menge des sezernierten uPA in den Mausfibroblasten bereits unterhalb der Nachweisgrenze der ELISA-Tests lagen. Hierbei ergab sich für die Überstände eine leichte, nicht signifikante Steigerung der Aktivität nach 24h Hypoxie.

**uPA-Aktivität in den zellfreien Überständen**

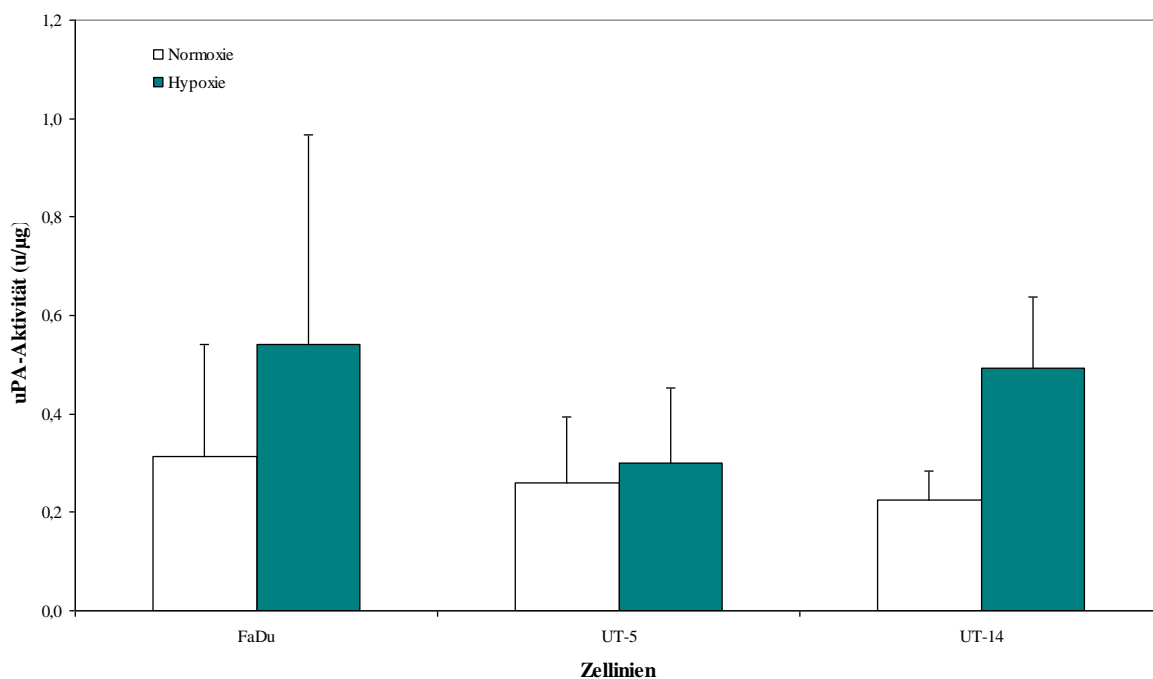


Abb. 9: Analyse der uPA-Aktivität in den zellfreien Überständen der drei Tumorzellreihen unter normoxischen Bedingungen und nach 24h Hypoxie.

### 3 Auswirkungen einer Hypoxie auf die Regulation von VEGF, PAI-1 und uPA

Die gewonnenen Daten aus den drei Tumorzelllinien wurden gepoolt, um allgemeine Veränderungen der Sekretion von VEGF, PAI-1 und uPA sowie des zellgebundenen uPA und der uPA-Aktivität in Bezug auf die Oxygenierung zu untersuchen. Hierbei zeigte sich in den Überständen eine Hochregulation sowohl der VEGF als auch der PAI-1-Sekretion, jedoch erreichte nur PAI-1 hier ein signifikantes Niveau ( $p < 0,001$ ). Die uPA-Menge in den Zellüberständen nahm signifikant ab ( $p = 0,018$ ), während beim zellulären uPA eine signifikante Zunahme beobachtet werden konnte ( $p = 0,033$ ). Die Aktivität des sezernierten

uPA nahm leicht zu. Diese Beobachtung erreichte allerdings keine Signifikanz. Die uPA-Aktivität in den Lysaten war zu gering, um mit der verwendeten Methode bestimmt zu werden.

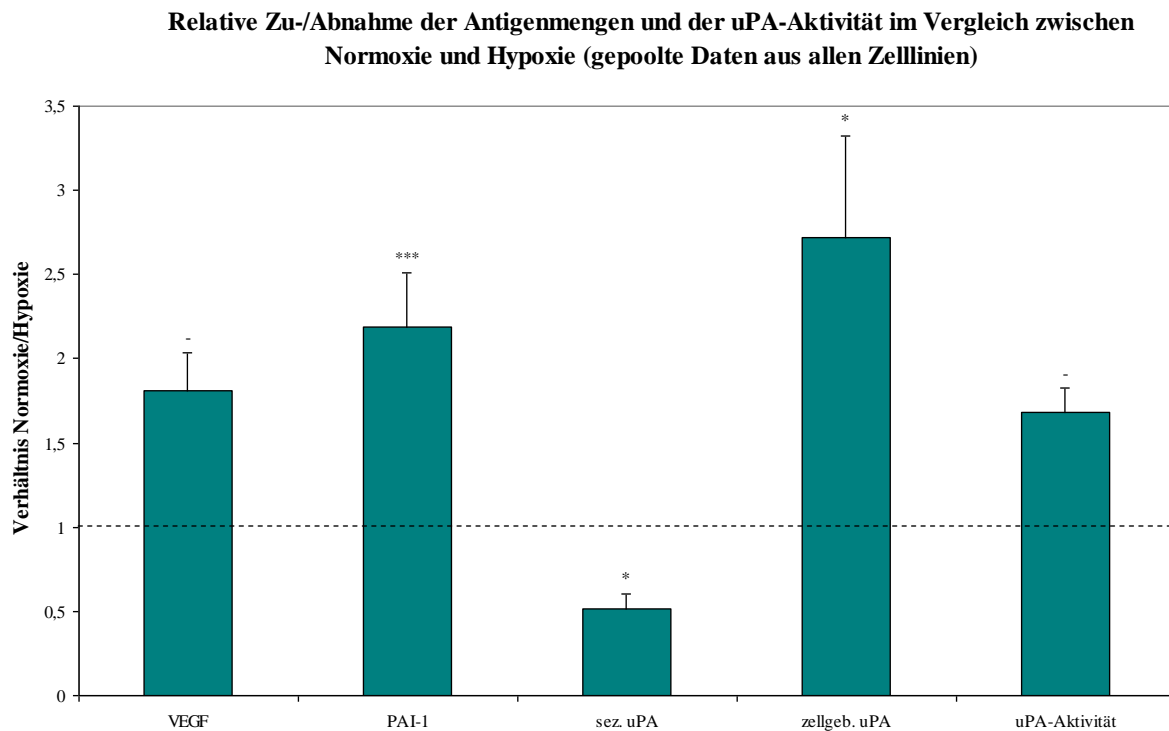


Abb. 10: Analyse der Proteinmengen und der uPA-Aktivität in den drei Tumorzellreihen.

Signifikanzniveaus: \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

#### 4 Korrelationen zwischen VEGF, PAI-1 und uPA

Um die Zusammenhänge zwischen den sezernierten und zellulären Antigenmengen von VEGF, PAI-1 und uPA zu untersuchen, wurden die Ergebnisse aus allen drei Tumorzelllinien auf mögliche Korrelationen geprüft. Die deutlichste Korrelation zeigte sich zwischen sezernierten uPA- und PAI-1-Antigenmengen unter normoxischen Bedingungen ( $R^2=0,96$ ;  $p<0,001$ ). Nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen blieb dieser Zusammenhang, wenn auch mit geringerer Signifikanz, erhalten ( $R^2=0,66$ ;  $p=0,004$ ).

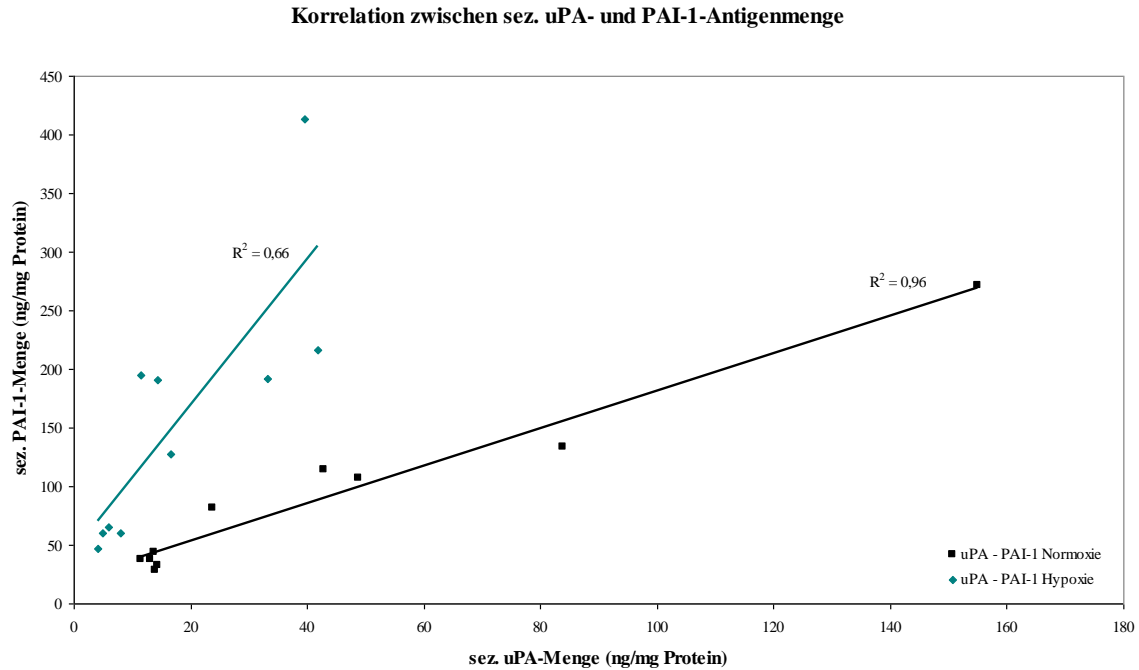


Abb. 11: Korrelation zwischen sez. uPA- und PAI-1-Antigenmengen; R: Korrelationskoeffizient (nach Pearson).

Auch zwischen uPA und VEGF zeigte sich bei Normoxie ein signifikanter Zusammenhang ( $R=0,64$ ;  $p=0,006$ ). Jedoch konnte dieser Zusammenhang unter hypoxischen Bedingungen nicht bestätigt werden ( $R^2=0,11$ ;  $p=0,344$ ).

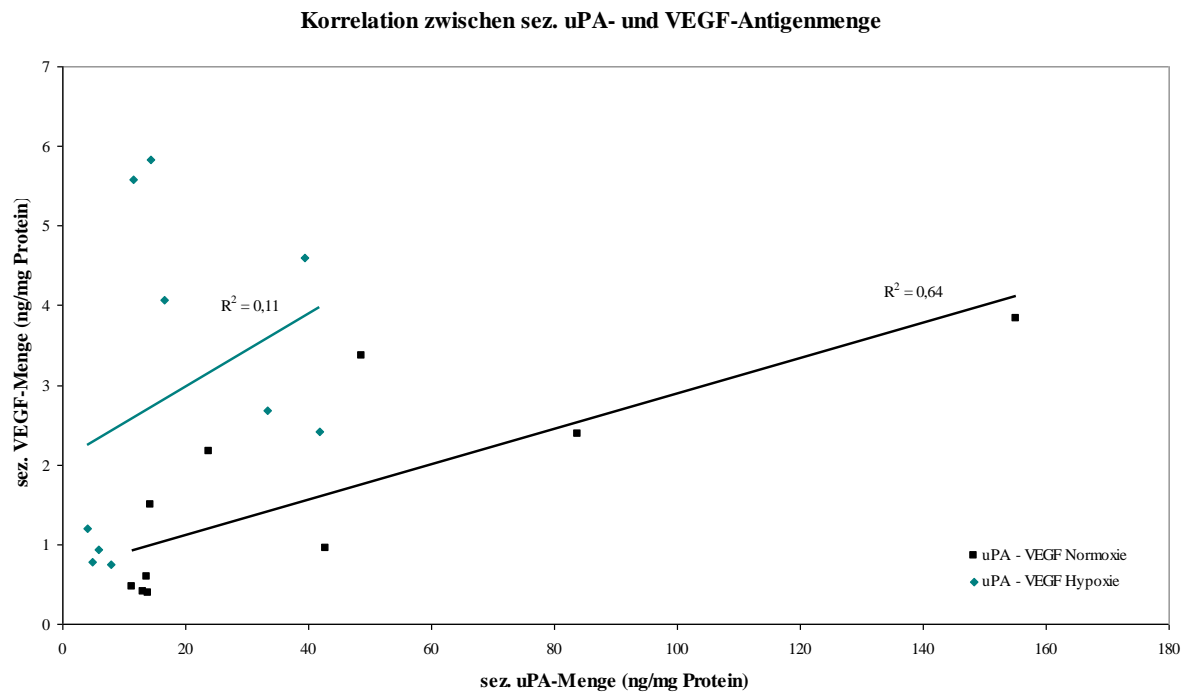


Abb. 12: Korrelation zwischen sez. uPA- und VEGF-Antigenmengen; R: Korrelationskoeffizient (nach Pearson).

Schließlich fand sich unter normoxischen Bedingungen auch zwischen VEGF und PAI-1 eine signifikante Korrelation ( $R^2=0,65$ ;  $p=0,001$ ), diese nahm allerdings wie zwischen uPA und PAI-1 unter Hypoxie an Signifikanz ab ( $R^2=0,40$ ;  $p=0,02$ ).

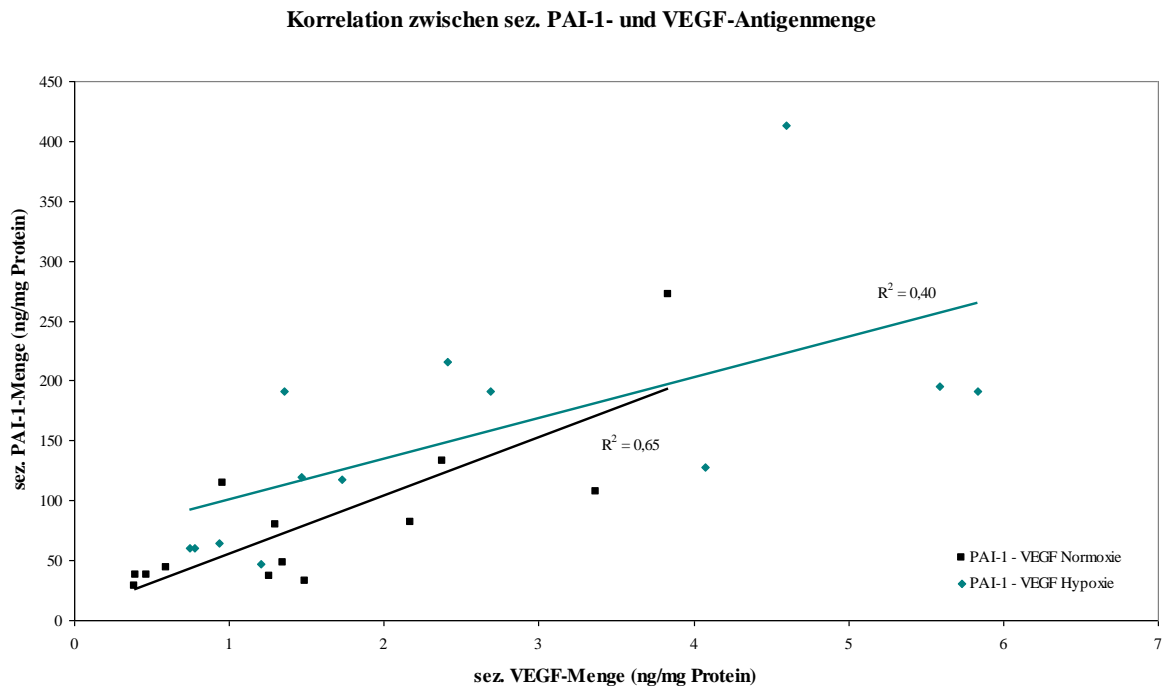


Abb. 13: Korrelation zwischen sez. PAI-1- und VEGF-Antigenmengen; R: Korrelationskoeffizient (nach Pearson).

### 5 Korrelationen zwischen zellgebundenem uPA und den sezernierten Proteinen

Betrachtet man die Zusammenhänge zwischen dem zellgebundenen uPA, welches in den Lysaten der Tumorzellen gemessen wurde, und den verschiedenen sezernierten Antigenen, ergibt sich ein ähnliches Bild. So zeigte sich zwischen dem zellgebundenen uPA und der PAI-1 Menge in den Überständen ein schwach signifikanter Zusammenhang ( $R^2=0,43$ ;  $p=0,021$ ). Diese Korrelation blieb unter hypoxischen Bedingungen erhalten ( $R^2=0,37$ ;  $p=0,037$ ).

## Korrelation zwischen zell. uPA- und sez. PAI-1-Antigenmenge

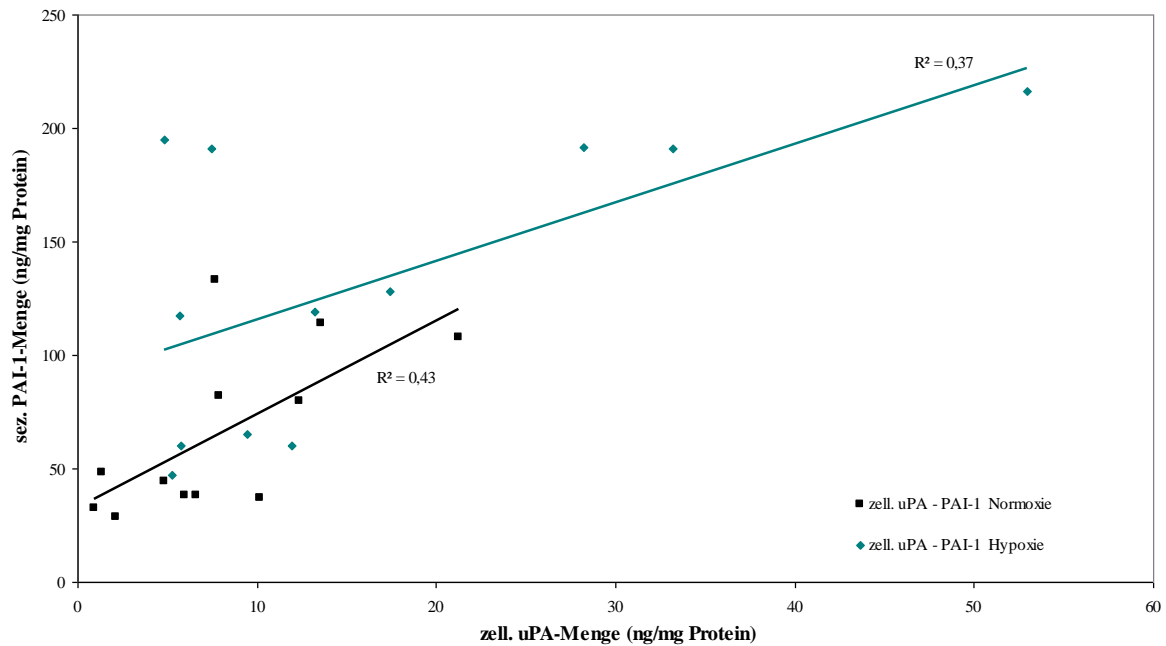


Abb. 14: Korrelation zwischen zell. uPA- und sez. PAI-1-Antigenmenge; R: Korrelationskoeffizient (nach Pearson).

Zwischen dem zellgebundenen uPA und dem in die Überstände sezernierten VEGF schließlich ergab sich keine signifikante Korrelation, sowohl unter normoxischen ( $R^2=0,29$ ;  $p=0,058$ ) als auch unter hypoxischen Bedingungen ( $R^2=0,02$ ;  $p=0,68$ ).

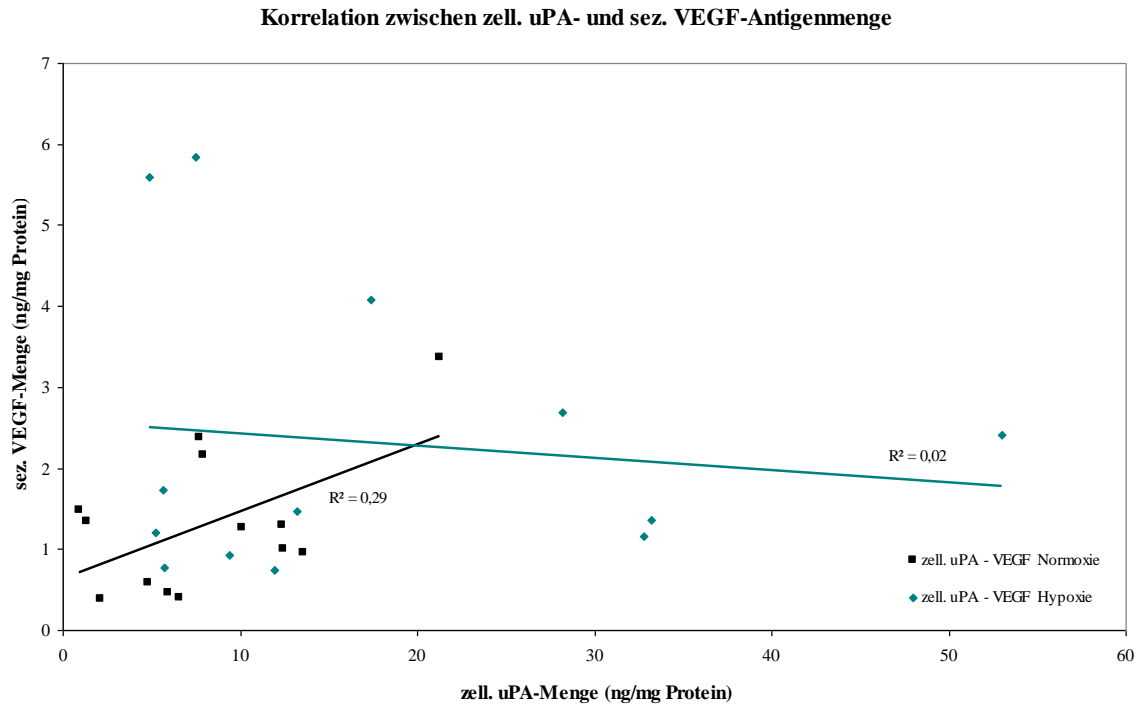


Abb. 15: Korrelation zwischen zell. uPA- und sez. VEGF-Antigenmenge; R: Korrelationskoeffizient (nach Pearson).

Während zwischen dem Anteil des zellgebundenen uPA und des sezernierten uPA unter normoxischen Bedingungen kein signifikanter Zusammenhang ersichtlich war ( $R^2=0,26$ ;  $p=0,161$ ), wurde unter hypoxischen Bedingungen eine deutliche Korrelation erkennbar ( $R^2=0,87$ ;  $p<0,001$ ).



## Korrelation zwischen zell. uPA- und sez. uPA-Menge

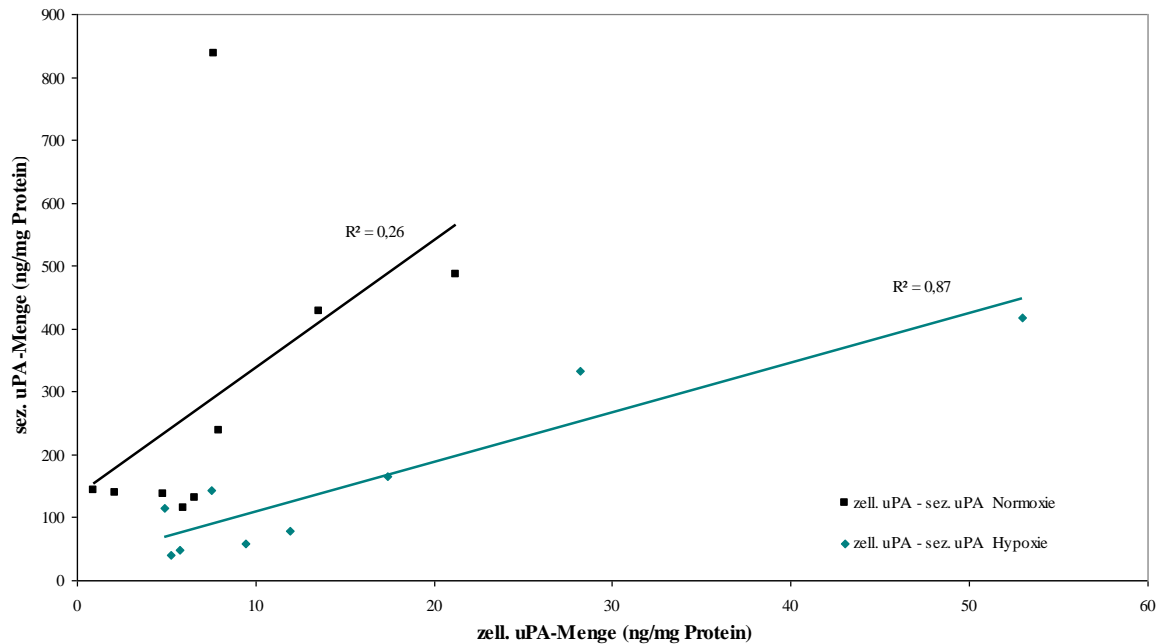


Abb. 16: Korrelation zwischen zell. uPA- und sez. uPA-Antigenmenge; R: Korrelationskoeffizient (nach Pearson).

## 6 Zusammenfassung der Korrelationen

Daraus ergibt sich folgende Zusammenfassung der Korrelationen:

Tab. 4: Zusammenfassung der Korrelationen zwischen den sezernierten Proteinmengen von uPA, PAI-1 und VEGF sowie der zellulären uPA-Menge.

Korrelation	Normoxie	Hypoxie
<b>uPA – PAI-1</b>	p < 0,001 ***	p = 0,004 **
<b>uPA – VEGF</b>	p = 0,006 *	p = 0,344 n.s.
<b>PAI-1 – VEGF</b>	p = 0,001 **	p = 0,020 *
<b>Zell. uPA – PAI-1</b>	p = 0,021 *	p = 0,037 *
<b>Zell. uPA – VEGF</b>	p = 0,058 n.s.	p = 0,680 n.s.
<b>Zell. uPA – sez. uPA</b>	p = 0,161 n.s.	p < 0,001 ***

Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001, n.s.= nicht signifikant

## D Diskussion

### 1 Änderung der Proteinsekretion in Tumorzellen im Vergleich mit Fibroblasten

#### 1.1 Änderung der Proteinmengen von VEGF

Entsprechend dem Kenntnisstand bei Verfassung der Arbeit waren auch in den von uns untersuchten Zelllinien die Antigenmengen von VEGF signifikant höher als in der Vergleichskultur. In Tumorlysaten oder immunhistochemischen Färbungen wurde bereits für eine ganze Reihe von Tumorentitäten, unter anderem Mammakarzinome, Bronchialkarzinome, kolorektale Karzinome, Ösophaguskarzinome oder Pankreaskarzinome, die Bedeutung einer Zunahme der VEGF-Menge im Tumorgewebe gezeigt. In der überwiegenden Mehrheit der Studien war eine Zunahme der Antigenmenge ein negativer prognostischer Marker und korrelierte mit einem gesteigerten Tumorwachstum und einer geringeren Überlebensrate (Bremnes et al. 2006, Iwasaki et al. 2004, Poon et al. 2001). Jedoch existieren zu verschiedenen Tumorentitäten auch Studien, bei denen kein Zusammenhang zwischen VEGF-Mengen und Überlebensrate beziehungsweise rezidivfreiem Intervall bestand (Ellis et al. 1998). Eine Steigerung der VEGF-Expression korreliert auch bei SCCHN mit einer schlechten Prognose, jedoch gibt es im Vergleich zu den anderen Tumorentitäten nur wenige Studien. Diese zeigen jedoch, sowohl was lokale Rezidive (Kyzas et al. 2004) als auch Metastasen oder das Gesamtüberleben anbelangt, eine Verschlechterung der Prognose (Kyzas et al. 2005, Smith et al. 2000, Smith et al. 2001).

Bezüglich der Plasma- beziehungsweise Serumkonzentrationen ergibt sich ein unterschiedliches Bild. Obwohl hier einige Studien keine Korrelation zwischen den Konzentrationen und der Prognose finden konnten (Choi et al. 2001, Lebrecht et al. 2002), zeigen doch andere Untersuchungen einen solchen Zusammenhang (Bremnes et al. 2006, Kondo et al. 1994, Matsuyama et al. 2000, Poon et al. 2001, Shimada et al. 2001). Zusätzlich ist zu erwähnen, dass es Untersuchungen gibt, die belegen, dass VEGF ein nützlicher Marker bezüglich der Reaktion auf eine Strahlentherapie sein kann (Zlobec et al. 2005).

## 1.2 Änderung der Proteinmengen von PAI-1 und uPA

Auch die Serinproteasen PAI-1 und uPA wurden entsprechend der Studienlage in unseren Versuchen signifikant überexprimiert. Dies wurde zuvor bereits für die meisten soliden Tumorentitäten gezeigt, so zum Beispiel bei Mamma-, Bronchial-, Blasen-, Magen-, Kolon-, Rektum-, Ovarial- und Nierenkarzinomen (Andreasen et al. 1997, Papadopoulou et al. 2002, Terada et al. 2005). Auch für SCCHN wurde die erhöhte Expression der einzelnen Komponenten bereits beschrieben (Chin et al. 2005, Hundsdorfer et al. 2005, Pasini et al. 2001, Strojan et al. 2000).

Die Änderung der Antigenmengen von PAI-1 und uPA im Tumorgewebe hat, wie die des Wachstumsfaktors VEGF, Einfluss auf die Prognose beziehungsweise den Erfolg bestimmter Therapieformen. Vor allem an Mammakarzinomen ist der Einfluss erhöhter uPA-, uPAR-, PAI-1- und PAI-2-Mengen erforscht. Foekens et al. (2000) zeigten schließlich in einer groß angelegten Studie bei 2780 Patientinnen mit Mammakarzinomen die prognostische Bedeutung von uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2. So fand sich bei hohen Antigenmengen von uPA, PAI-1 und uPAR ein niedrigeres rezidivfreies Intervall und eine insgesamt geringere Überlebensrate. PAI-2 hingegen erwies sich als positiver prognostischer Marker. Meo et al. (2004) fanden ebenfalls signifikante Korrelationen zwischen einer hohen PAI-1-Menge im Zytosol der Tumorzellen und einer schlechten Prognose. Eine hohe uPA-Menge deutete auf eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit hin. Interessant bei dieser Studie ist der Zusammenhang zwischen dem PAS und VEGF. Bei einer hohen VEGF-Menge war der Zusammenhang zwischen PAI-1 und der Prognose signifikant, bei einer niedrigen VEGF-Menge hingegen konnte diese Korrelation nicht nachgewiesen werden. Es existieren weitere Studien zu verschiedenen gynäkologischen und gastrointestinalen Tumoren, außerdem zu Lungen-, Blasen-, und Schilddrüsenkarzinomen, die zeigen, dass die Komponenten des PAS als unabhängige prognostische Marker dienen können (Duffy et al. 2004, Han et al. 2005, Horvatic Herceg et al. 2006, Kaneko et al. 2003, Mulcahy et al. 1994, Terada et al. 2005, Yang et al. 2000).

Es existieren einige wenige Studien, die sich speziell mit der prognostischen Wertigkeit der Komponenten des PAS bezüglich der verschiedenen Karzinomtypen des Kopf- und Halsbereiches beschäftigen. Hier wurde gezeigt, dass sich erhöhte uPA- und PAI-1-Antigenmengen negativ auf das rezidivfreie Intervall, die lokale Tumorkontrolle und das Gesamtüberleben auswirken (Chin et al. 2005, Hundsdorfer et al. 2005).

### 1.3 Folgen der veränderten Proteinsekretion

Die Steigerung der Sekretion von VEGF und den Komponenten des PAS im Vergleich zwischen Tumorzellen und normalen Fibroblasten gilt sowohl für Zellen unter normoxischen Bedingungen als auch für Zellen unter Hypoxie. Dies macht VEGF und die Komponenten des PAS zu möglichen endogenen Markern bezüglich der Prognose und eventuell zu therapeutischen Ansatzpunkten bei SCCHN. Da in unserer Studie die Antigenmengen in zellfreien Überständen gemessen wurden, ergibt sich ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende in vivo-Studien. Die Serum- beziehungsweise Plasmakonzentrationen von VEGF, PAI-1 und uPA wären leicht zugängliche und messbare Marker, die unter Umständen eine genauere Einordnung bezüglich der Aggressivität und der Prognose des Tumors und somit ein spezifischeres Therapiekonzept ermöglichen könnten.

### 2 Änderung der Proteinsekretion unter Einfluss einer Hypoxie

Die hypoxischen Bedingungen in unseren Versuchen haben aufgrund der eingeschränkten Versorgung mit Sauerstoff erwartungsgemäß einen negativen Einfluss auf das Zellüberleben und die Koloniebildungsfähigkeit der untersuchten Tumorzellen. Jedoch bleibt ein Teil der untersuchten Tumorzellen auch nach 24h Inkubation unter hypoxischen Bedingungen vital und koloniebildungsfähig. Diese Zellen zeigen weitere deutliche Veränderungen in der sezernierten Menge von VEGF sowie von PAI-1 und uPA.

Ein Merkmal, welches SCCHN auszeichnet und zu deren Aggressivität maßgeblich beiträgt, ist ein relativ großer Anteil an hypoxischen Arealen in diesen Tumoren (Adam et al. 1999, Nordmark et al. 2005). Inzwischen wurde mehrfach gezeigt, dass Hypoxie ein bedeutender Faktor hinsichtlich der Prognose und der zu erwartenden Therapieerfolge bei unterschiedlichen Tumorarten darstellt. Die meisten Studien hierzu wurden an Zervixkarzinomen, Weichteilsarkomen und Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches durchgeführt. Für alle diese Tumorarten gibt es Studien, die die Bedeutung von Hypoxie als unabhängigen, negativen prognostischen Marker zeigen (Brizel et al. 1999, Höckel et al. 1996, Sundfor et al. 2000) .

Speziell für SCCHN stellten Adam et al. (1999), die eine polarographische Nadelelektrode zum Nachweis von hypoxischen Arealen im Tumor verwendeten, den Zusammenhang zwischen Hypoxie und einem schlechten Therapieergebnis sowohl bezüglich der regionalen Tumorkontrolle als auch des Gesamtüberlebens her; jedoch erreichten diese Ergebnisse keine

statistische Signifikanz. Noch im selben Jahr zeigten allerdings zwei weitere Studien einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Oxygenierung des Tumors auf der einen Seite und der regionalen Tumorkontrolle nach zwei Jahren, dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben der Patienten auf der anderen Seite (Brizel et al. 1999, Stadler et al. 1999). Schließlich zeigte 2005 eine internationale, gepoolte Studie, die 397 Patienten umfasste, eine deutliche Korrelation zwischen der Hypoxie bei SCCHN und einer schlechten Prognose (Nordsmark et al.).

Zudem beeinflusst Hypoxie die Prognose von Kopf- und Halstumoren sekundär, da eine Reihe von Behandlungsmöglichkeiten direkt von der Oxygenierung des Tumors abhängt. Einige Studien hierzu belegen allgemein und im Speziellen für SCCHN, dass Hypoxie die Wirksamkeit von Strahlentherapie und zytotoxischer Chemotherapie negativ beeinflusst kann (Janssen et al. 2005, Teicher 1994).

Beim Vergleich der drei untersuchten Tumorentitäten fällt auf, dass sich die höchsten Proteinmengen bei den Zellen der Linie UT-SCC-14 finden. Auch die Steigerungen in der Sekretion von PAI-1 und uPA sowie die Zunahme der uPA-Aktivität sind hier am größten. Die kleinsten gemessenen Antigenmengen fanden sich über alle Versuche bei der Zelllinie UT-SCC-5. Die hier verwendeten Zelllinien wurden von Yaromina et al. (2006) in einem Mausmodell hinsichtlich ihrer Oxygenierung untersucht. Hierbei wurden die hypoxischen Areale mittels Pimonidazol markiert und durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Interessanterweise fand sich bei dieser Studie der größte Anteil an hypoxischen Arealen bei der Zelllinie UT-SCC-5 und der kleinste bei der Zelllinie UT-SCC-14. Dies könnte dafür sprechen, dass bei in vivo wachsenden Tumoren die Veränderungen in der Proteinexpression der Zelllinie UT-SCC-14 bereits zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung und somit zu einer Reduktion der hypoxischen Areale geführt haben.

## 2.1 Einfluss einer Hypoxie auf VEGF

In den von uns untersuchten Zellreihen nahm die VEGF-Proteinmenge in den Zellüberständen nach Inkubation unter Hypoxie generell zu, Signifikanz erreichte diese Zunahme jedoch nur für die Zelllinie UT-SCC-5. Diese Ergebnisse passen zu verschiedenen Studien an unterschiedlichen Zelllinien, welche belegen, dass ein hypoxisches Mikromilieu die mRNA-Level und die Transkriptionsrate von VEGF erhöhen kann (Levy et al. 1995, Liu et al. 1995). Der Zusammenhang zwischen Hypoxie, HIF-1 und Überexpression von VEGF wurde inzwischen in vitro für Pankreaskarzinome und Glioblastome belegt (Buchler et al. 2003,

Duffy et al. 2003, Jensen et al. 2006). In einer klinischen Studie konnten Dunst et al. (2001) außerdem zeigen, dass bei Patienten mit Kopf- und Halstumoren die Konzentration von VEGF im Serum signifikant mit dem hypoxischen Tumolvolumen korreliert.

In Anbetracht der Studienlage könnte sich VEGF (sowohl im Serum gemessene Konzentration, als auch im Tumor direkt ermittelte Antigenmengen) bei bestimmten Kopf- und Halstumoren als Marker für die Prognose, für hypoxische Areale und für den Erfolg einer Strahlentherapie eignen. Bei den hier durchgeführten in vitro-Versuchen erreichte die Steigerung bei der Zelllinie UT-SCC-5 das höchste Signifikanzniveau, die Steigerung bei FaDu war nur schwach signifikant. In den gepoolten Daten jedoch findet sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Steigerung der VEGF-Sekretion und der Inkubation unter hypoxischen Bedingungen. Daraus folgt, dass Hypoxie allein nicht bei allen Tumorentitäten des Kopf-Hals-Bereiches zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion führt. Dass der Zusammenhang zwischen Hypoxie und schlechter Prognose nicht allein durch diesen Mechanismus zustande kommt, wird auch durch andere Studien gestützt (vgl. Raleigh et al. 1998). Die VEGF-Menge im Tumor muss also für einzelne Tumorentitäten gesondert betrachtet werden und kann nicht als spezifischer Marker für Hypoxie verwendet werden.

## 2.2 Einfluss von Hypoxie auf PAI-1

Die Menge des sezernierten PAI-1 nahm über alle untersuchten Tumorzellreihen hinweg signifikant zu. Die Induktion der Expression von PAI-1-mRNA und die daraus resultierende Erhöhung der Antigenmenge durch Hypoxie wurde bereits von anderen Gruppen beschrieben (Kimura et al. 2002, Koong et al. 2000, Weinmann et al. 2002). Es soll hier erwähnt werden, dass die meisten dieser Studien die Proteinmengen mittels ELISA aus Tumorlysaten bestimmt haben. Die prognostische Wertigkeit der Plasmakonzentration hingegen ist bislang weniger untersucht. Rha et al. (2000) sowie Grebenchtchikov et al. (2005) zeigten für Mammakarzinome, dass weder die Konzentration von uPA oder PAI-1 noch die des Komplexes aus uPA und PAI-1 im Plasma eine Korrelation mit den im Tumor gemessenen Mengen aufweisen. Auch bei Magenkarzinomen konnte keine solche Korrelation gefunden werden (Ho et al. 1998). Trotzdem gibt es auch Studien, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen Plasmakonzentrationen einzelner Komponenten des PAS und der Prognose zeigen – so zum Beispiel für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (Pappot et al. 1997, Yang et al. 2005), metastasierte Mammakarzinome (Nijziel et al. 2003), Blasenkarzinome (El-Kott et al. 2004) und Ovarialkarzinome (Ho et al. 1999). Weiterhin

testeten Koong et al. (2000) in einer kleinen Gruppe von SCCHN Patienten die Serumkonzentration von PAI-1. Hierbei fanden sie bei einem  $pO_2 < 4$  mmHg signifikant höhere PAI-1-Konzentrationen als bei einem  $pO_2 > 4$  mmHg. Die Ergebnisse deuten aber im Allgemeinen darauf hin, dass die im Tumor gemessenen Mengen einen höheren prädiktiven Wert haben, als die im Blutplasma gemessene Konzentration.

Im ersten Moment erscheint es überraschend, dass eine hohe PAI-1-Antigenmenge zu einer schlechteren Prognose führt. Dies ist insofern verwunderlich, da man vermuten würde, eine hohe PAI-1-Menge würde durch eine Hemmung der Proteolyse (durch Inaktivierung von uPA) das Tumorwachstum und die Invasionsfähigkeit vermindern. Die Ursache für diesen Zusammenhang liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen Funktionen und Interaktionen, die PAI-1 im Bereich des Tumors innehat. PAI-1 führt zwar auf der einen Seite zu einer Verminderung der Proteolyse durch die Inaktivierung von uPA. Auf der anderen Seite jedoch ist dies notwendig, um den proteolytischen Prozess in der Umgebung der Zellen zu kontrollieren. So fokussiert PAI-1 die Aktivität des Systems neu, da uPAR nach der Internalisation der Komplexe und der lysosomalen Degradation an die Zelloberfläche zurückkehren kann. Es wird weiterhin vermutet, dass PAI-1 neben der Regulation der proteolytischen Aktivität aktiv an der Migration der Zelle durch die extrazelluläre Matrix beteiligt ist. Hierbei spielt die Bindung der Zelle an Vitronektin und die Lösung dieser Verbindung eine Rolle (Brooks et al. 2000, Durand et al. 2004).

In den drei Tumorzelllinien sowie in den gepoolten Daten zeigte sich beim sezernierten PAI-1 die signifikanteste Steigerung der Antigenmengen im zellfreien Überstand nach Inkubation unter Hypoxie. Außerdem wies PAI-1 die höchsten absoluten Antigenmengen auf. Dies würde vermuten lassen, dass Hypoxie einen größeren Einfluss auf die Regulation von PAI-1 hat als auf alle anderen hier untersuchten Proteasen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den bisherigen Studien, könnte sich PAI-1 als Marker für hypoxische Areale im Tumor eignen. In einer weiterführenden Arbeit zu dieser Studie wurde weiterhin für die hier verwendeten Tumorzelllinien in einem Mausmodell gezeigt, dass nach fraktionierter Strahlentherapie eine deutliche Korrelation zwischen PAI-1 und der hypoxischen Fraktion sowie zwischen PAI-1 und der lokalen Tumorkontrolle zu erkennen ist (Bayer et al. 2008). PAI-1 könnte sich also zusätzlich als Marker für eine geplante Radiotherapie eignen und kommt als therapeutischer Ansatzpunkt in Frage.

### 2.3 Einfluss einer Hypoxie auf uPA

In den zellfreien Überständen nahm im Gegensatz zu den oben besprochenen Proteinen die uPA-Antigenmenge ab. Die Abnahme des in die Überstände sezernierten uPA war signifikant für zwei der untersuchten Zelllinien (UT-SCC-5 und UT-SCC-14) und leicht signifikant für die gepoolten Daten. In Anbetracht der wichtigen Rolle, welche uPA im PAS einnimmt, wurde daraufhin die Menge an zellgebundenem uPA in den Zelllysaten untersucht. Hier zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse: Während sich für die Zelllinie FaDu keine nennenswerte Änderung der zellulären uPA Menge ergab, zeigte sich für die beiden anderen Zelllinien ein leichter Anstieg (jedoch signifikant nur für UT-SCC-14).

Bisher existieren nur wenige Studien, die die Auswirkungen einer Hypoxie auf uPA untersuchen. Für eine kleine Gruppe von Patienten mit Kopf- und Halstumoren wurde 2000 nachgewiesen, dass Hypoxie zu signifikant erhöhten uPA-Antigenmengen im Tumor führt (Stadler et al. 2000). Es existieren jedoch auch Studien, die eine signifikante Reduktion der uPA mRNA-Mengen unter hypoxischen Bedingungen belegen (Pinsky et al. 1998, Sprague et al. 2006)

Ein Hauptgrund für die Abnahme des sezernierten uPA ist sicherlich die große Menge an PAI-1, welche nach Inkubation unter Hypoxie festgestellt werden konnte. Die Unterschiede im zellfreien Überstand und den Zelllysaten könnten damit zu erklären sein, dass uPA an den uPA-Rezeptor binden muss, um aktiviert zu werden. Nach einer Studie von Graham et al. (1998) wird dieser unter hypoxischen Bedingungen in bestimmten Tumorzellen stärker exprimiert als unter Normoxie. Dieselbe Arbeitsgruppe fand nur ein Jahr später in verschiedenen anderen Zelllinien ebenfalls eine Hochregulation der zellgebundenen uPA-Menge und eine Abregulation der freien uPA-Antigenmenge durch Hypoxie (Graham et al. 1999). Für SCCHN ist dieser Zusammenhang noch unbestätigt und müsste in einer weiteren Studie genauer untersucht werden.

### 2.4 Einfluss einer Hypoxie auf die uPA-Aktivität

Es wurde weiterhin versucht, die Aktivität des vorhandenen uPA sowohl in den Überständen als auch in den Zelllysaten zu messen. In den Überständen konnte hier eine leichte, nicht signifikante Steigerung der Aktivität beobachtet werden. Diese Aktivitätssteigerung würde die These stützen, dass uPA unter hypoxischen Bedingungen verstärkt an den uPA-Rezeptor



bindet und in seine aktive Form überführt wird. Die Aktivität in den Zelllysaten war leider generell zu gering, um mit unserer Messmethode nachgewiesen werden zu können. Ein Grund, der diese geringe Aktivität erklären könnte, wäre die große Menge an PAI-1 in den zellfreien Überständen, welche mit uPA Komplexe bildet und das zellgebundene uPA inaktiviert. Es existieren generell wenige Arbeiten, die sich mit den Auswirkungen der Hypoxie auf die uPA-Aktivität beschäftigen. Die uPA-Aktivität war in den hier durchgeführten Untersuchungen sehr gering, was auch auf die an sich schon geringe Menge an uPA in Überständen und Zelllysaten zurückgeführt werden kann. Zusätzlich änderte sich die uPA-Aktivität nur sehr geringfügig und nicht signifikant. Sie kann demnach für die untersuchten Zelllinien nicht als prognostischer oder prädiktiver Marker verwendet werden.

### 3 Korrelationen zwischen den Komponenten des PAS und VEGF

Für verschiedene Gewebetypen und Zelllinien wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Komponenten des PAS und VEGF sowohl untereinander als auch mit verschiedenen anderen Faktoren wie dem Tumorstadium, der Prognose und dem Ansprechen auf verschiedene Therapieformen korrelieren (Baker et al. 2000, Duffy et al. 2004, Foekens et al. 2000, Kaneko et al. 2003). Bezüglich Kopf- und Halstumoren existieren jedoch nur wenige Studien, die die komplexen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Komponenten untersucht haben. Lediglich eine Korrelation zwischen uPA und PAI-1 im Tumorgewebe – verglichen mit normaler Schleimhaut - wurde beschrieben (Hundsdorfer et al. 2005).

In unseren Untersuchungen korrelierten unter normoxischen Bedingungen uPA, PAI-1 und VEGF-Antigenmengen in den zellfreien Überständen signifikant miteinander. Dies bestätigt die Annahme, dass die Komponenten des PAS und VEGF untereinander enge Verbindungen besitzen.

Die signifikanteste Korrelation fand sich bei normoxischen Bedingungen zwischen freiem uPA und PAI-1. Dies verwundert insofern nicht, als die beiden Komponenten nach dem gängigen Verständnis des PAS direkte Gegenspieler sind. Unser Ergebnis wird von vielen Studien an anderen Tumoren gestützt, die ebenfalls die Korrelation zwischen uPA und PAI-1 bestätigen konnten, so zum Beispiel für kolorektale Karzinome (Papadopoulou et al. 2002), für Schilddrüsenkarzinome (Horvatic Herceg et al. 2006) und für Mammakarzinome (Meo et al. 2004, Minisini et al. 2007). Auch für SCCHN wurde ein solcher Zusammenhang bereits beschrieben (Hundsdorfer et al. 2005). Die Wechselwirkungen zwischen uPA und PAI-1 sind

jedoch sehr komplex. Vor allem die intrazellulären Wirkmechanismen sind bis heute nicht vollständig verstanden (Crippa 2007, Durand et al. 2004).

Die zweitbeste Korrelation, zwischen PAI-1 und VEGF, lässt sich dadurch erklären, dass aktives PAI-1 die Expression von VEGF mRNA und die Sekretion von VEGF-Protein induzieren kann. Dies wurde zum Beispiel für humane Gliomzellen bereits gezeigt (Hjortland et al. 2003). Umgekehrt konnte für Endothelzellen eine Induktion von PAI-1 und uPA durch VEGF belegt werden (Olofsson et al. 1998, Pepper et al. 1991). Einige Gruppen haben außerdem bestätigt, dass PAI-1 eine zentrale Rolle für die Angiogenese spielt (Bajou et al. 2004, Brooks et al. 2004, Devy et al. 2002). Hierfür mitverantwortlich könnte nach unseren Daten die Interaktionen zwischen PAI-1 und VEGF sein.

Und schließlich zeigten auch uPA und VEGF eine deutliche und signifikante Korrelation. Auch dieser Zusammenhang wurde bereits von einigen anderen Gruppen, vor allem für Endothelzellen, beschrieben. Wie bei PAI-1 kann VEGF anscheinend die Sekretion von uPA induzieren (Basire et al. 2006, Olofsson et al. 1998, Pepper et al. 1991). Außerdem wurde beschrieben, dass VEGF über einen VEGF-Rezeptor die Umwandlung von scuPA zu aktivem uPA beschleunigen kann (Prager et al. 2004).

Unter hypoxischen Bedingungen konnten diese Korrelationen weitestgehend bestätigt werden, jedoch waren sie weniger signifikant. Ein Hauptgrund dafür könnte das veränderte Verhältnis der Proteinmengen zueinander sein. Das PAS spielt auch in gesundem Gewebe bei verschiedenen Umwandlungsprozessen eine wichtige Rolle. Im malignen Tumorgewebe zeigt das PAS zwar Ähnlichkeiten zu dieser normalen Funktion, jedoch wird seine Funktion durch die ansteigenden Antigenmengen verstärkt und erleichtert so die Invasion der Tumorzellen (Johnsen et al. 1998). Unter hypoxischen Bedingungen ändert sich das Verhältnis der Komponenten weiter. So zeigt hier das zellgebundene uPA den größten Anstieg, gefolgt von sezerniertem PAI-1 und VEGF. Daraus resultiert wahrscheinlich eine zwar durch die erhöhten Antigenmengen gesteigerte Aktivität des Systems, jedoch werden die normalerweise fein abgestimmten Wechselwirkungen zunehmend unkontrolliert und chaotisch. Dies könnte wiederum die Ablösung einzelner Tumorzellen aus dem Verband und somit die Metastasierung erleichtern.

Eine deutliche Korrelation fand sich zwischen dem zellgebundenen uPA und der sezernierten Menge an uPA-Antigen. Dieser Zusammenhang könnte durch den uPAR zustande kommen. Wie oben bereits beschrieben, wird dieser unter hypoxischen Bedingungen in bestimmten Tumorzellen stärker exprimiert als unter Normoxie (Graham et al. 1999). Hierdurch wird unter hypoxischen Bedingungen freies uPA verstärkt gebunden, was in Übereinstimmung mit

der direkten Korrelation, der abnehmenden freien uPA-Menge und der zunehmenden Menge an zellgebundenem uPA steht.

#### 4 Therapeutische Ansätze

##### 4.1 Eingriffe in das PAS und Beeinflussung von VEGF

Schon seit einiger Zeit wird versucht, durch Hemmung bestimmter Proteasen das Tumorwachstum und die Invasionsfähigkeit von Tumoren zu vermindern – mit gemischten Ergebnissen. Dies liegt möglicherweise daran, dass relativ unspezifische Inhibitoren verwendet wurden, beziehungsweise an den großen Unterschieden in der Expression dieser Proteasen in verschiedenen Tumoren. Um eine effektive Therapie zu ermöglichen und gleichzeitig die Toxizität und die Nebenwirkungen einer solchen Therapie zu minimieren, ist also eine genaue Kenntnis der beteiligten Proteine und ihrer Wechselwirkungen notwendig (Dano et al. 2005).

Als Grund für das rasche Wachstum verschiedener solider Tumoren wird oft ein Ungleichgewicht zwischen angiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren innerhalb des Tumors angesehen. Demzufolge wird versucht, durch Wiederherstellung des Gleichgewichts zwischen Angiogenese und Antiangiogenese durch Gabe von antiangiogenetischen Faktoren das Tumorwachstum zu verlangsamen oder gar zu stoppen. Solche Faktoren sind zum Beispiel der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®), oder Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitoren, die spezifisch den VEGF-Rezeptor blockieren, wie Vatalanib oder AE-941, und Breitspektrums-substanzen, die den VEGF-Rezeptor und andere Tyrosinkinasen in Endothel- und Tumorzellen als Ziel haben, zum Beispiel Sorafenib und Sunitinib (Abdollahi et al. 2005, Ferrara et al. 2005, Jain et al. 2006, Roskoski 2007). Obwohl der Nutzen von einigen dieser Substanzen bereits für verschiedene Tumorentitäten in Phase III Trials bestätigt werden konnte, müssen immer noch verlässliche Biomarker gefunden werden, um Hilfen bei der Patientenauswahl und dem Protokoll-Design zu geben (Gille 2006, Jain et al. 2006, Roskoski 2007). Auch in diesem Zusammenhang können die Ergebnisse dieser Arbeit neue Anregungen geben.

Ein weiterer Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie ist uPA und sein zellgebundener Rezeptor. Es gibt einige vielversprechende Studien, die bei verschiedenen Tumorentitäten das Wachstum des Tumors und die Ausbreitung beziehungsweise Metastasierung einschränken können. Dies wurde unter anderem in Mausmodellen für spezifische uPA-Inhibitoren, für

einen Blocker der uPA-Aktivität an der Zelloberfläche, für einen Inhibitor der uPA/uPAR Interaktion sowie für einen löslichen uPAR, der als Fänger für freies uPA fungiert, gezeigt (Crowley et al. 1993, Jo et al. 2003, Lutz et al. 2001, Magdolen et al. 2001, 2003, Nozaki et al. 2006, Sato et al. 2002, Schweinitz et al. 2004).

Paradoxerweise existieren auch Studien, die belegen, dass ein Antikörper gegen PAI-1 die Invasions- und Migrationsfähigkeit dieser Tumorzellen negativ beeinflussen kann. Dies wurde an Fibrosarkom- und Melanomzellen gezeigt (Brooks et al. 2000).

Außerdem wäre es denkbar, die Hochregulation der Proteine durch eine hypoxische Umgebung zu verhindern. Hier kommt zum Beispiel ein HIF-Blocker in Frage, um die Überexpression von PAI-1 und VEGF zu vermeiden. Es wurden bereits einige Substanzen in dieser Hinsicht getestet, allerdings müssen auf diesem Gebiet noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Wirksamkeit und die Verträglichkeit dieser Substanzen zu prüfen (Powis et al. 2004).

#### 4.2 Strahlentherapie

Eine breit angewendete Therapieform bei SCCHN ist die Strahlentherapie. Hypoxie und die in dieser Arbeit untersuchten Proteasen haben Auswirkungen auf die Effektivität einer durchgeführten Radiotherapie. So wurde in einigen Untersuchungen belegt, dass hypoxische Tumoren eine größere Radioresistenz aufweisen als besser oxygenierte. Andererseits führt eine Radiotherapie umgekehrt auch zu einer Erhöhung der hypoxischen Fraktion innerhalb eines Tumors (Rofstad et al. 2004, Stadler et al. 1998). Außerdem gibt es Studien, die zeigen, dass ionisierende Strahlung zu einer Erhöhung der Expression von Wachstumsfaktoren führt. Gezeigt wurde dies bei verschiedenen Karzinomtypen für VEGF (Brieger et al. 2005, Gorski et al. 1999, Hageman et al. 2005, Hovinga et al. 2005), für uPAR (Rofstad et al. 2004) und für PAI-1 bei SCCHN (Schilling et al. 2007). Die freigesetzten Faktoren scheinen dann einen zytoprotektiven Effekt zu besitzen; sie erhöhen das Zellüberleben der verbleibenden Zellen und führen zu einer erhöhten Radioresistenz.

In einer weiterführenden Arbeit zu der vorliegenden Arbeit wurde für die hier verwendeten Tumorzelllinien in einem Mausmodell gezeigt, dass nach fraktionierter Strahlentherapie eine deutliche Korrelation zwischen PAI-1 und der hypoxischen Fraktion sowie zwischen PAI-1 und der lokalen Tumorkontrolle zu erkennen ist (Bayer et al. 2008). Eine Radiotherapie hat neben den erwünschten zytotoxischen Effekten also auch Auswirkungen auf das PAS und VEGF. Hier erscheint eine Kombination der Strahlentherapie mit Medikamenten, die gegen

bestimmte Teile des PAS oder gegen VEGF gerichtet sind, sinnvoll. Diese Versuche machen deutlich, dass ein detailliertes Verständnis der Vorgänge innerhalb eines soliden Tumors notwendig ist, um eine optimale Therapie zu ermöglichen.

## **E Zusammenfassung**

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (bestehend aus Karzinomen der Mundhöhle, des Nasopharynx und Larynx) machen weltweit einen Anteil von etwa 6 % der malignen Tumorerkrankungen aus und gehören damit zu den zehn häufigsten Tumorentitäten insgesamt. Trotz intensiver Forschungen auf diesem Gebiet hat sich die Prognose in den letzten Jahren jedoch kaum verbessert. Es bleibt schwierig, prädiktive Aussagen über die Aggressivität des Tumors, sein Rezidivpotential und vor allem den Erfolg einer bestimmten Therapieform zu machen. Ein Grund für die Schwierigkeiten bei der Einordnung und Behandlung der Tumoren besteht in der intra- und intertumoralen Heterogenität. Diese Änderungen umfassen sowohl Expression und Sekretion verschiedener Proteine und Wachstumsfaktoren als auch ein verändertes Tumormikromilieu.

Die vorliegende Arbeit untersucht daher für drei Zelllinien von Kopf- und Halstumoren die Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-System, uPA, PAI-1 sowie den Wachstumsfaktor VEGF. Zum einen wird der Unterschied in der Expression der Komponenten gegenüber einer Normalzelllinie untersucht, zum anderen werden die Auswirkungen einer Hypoxie auf das komplexe System aufgezeigt.

Es wurden drei Zelllinien humaner Kopf- und Halstumoren (FaDu, UT-SCC-5, UT-SCC-14) sowie eine Vergleichszelllinie von Mausfibroblasten (NIH3T3) verwendet. Vergleichbare Kulturen wurden angelegt und unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen (~0,66 % O<sub>2</sub>) inkubiert. Um die Antigenmengen der einzelnen Komponenten zu bestimmen, wurden daraufhin ELISA-Assays durchgeführt. Zusätzlich wurde die uPA-Aktivität in einem Aktivitäts-Assay gemessen. Schließlich wurden die Ergebnisse statistisch auf Signifikanz und mögliche Zusammenhänge geprüft.

Die Ergebnisse zeigten signifikante Erhöhungen der Antigenmengen von uPA, PAI-1 und VEGF im Vergleich zur Fibroblastenkultur. Unter hypoxischen Bedingungen nahm die Menge an sezerniertem VEGF sowie PAI-1 weiter zu. Für PAI-1 zeigte sich diese Zunahme signifikant über alle Zelllinien. Die sezernierte uPA-Menge nahm über alle Zelllinien hinweg ab, jedoch erreichte diese Änderung nicht bei allen Zelllinien Signifikanz. Die Untersuchung der zellulären Expression von uPA ergab unterschiedliche Ergebnisse. Zeigte sich für eine der Zelllinien keine nennenswerte Änderung der uPA-Antigenmengen in den Zelllysaten, konnten bei den beiden anderen Zelllinien Steigerungen der uPA-Menge nach 24h Hypoxie beobachtet werden. Bezüglich der Aktivität des sezernierten uPA wurde eine leichte, nicht signifikante Steigerung der Aktivität über alle Zelllinien beobachtet.

---

Es wurde unter normoxischen Bedingungen eine Korrelation zwischen den Antigenmengen der sezernierten Proteine uPA, PAI-1 und VEGF beobachtet, die unter hypoxischen Bedingungen in den meisten Fällen, wenn auch mit niedrigerer Signifikanz, erhalten blieb. Weiterhin zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen dem zellulären Anteil an uPA und PAI-1 sowie zwischen zellulärem und sezerniertem uPA unter hypoxischen Bedingungen. Die beobachteten Korrelationen der untersuchten Komponenten des PAS werden durch verschiedene Studien bei anderen Tumorentitäten gestützt und belegen die engen Wechselwirkungen der Komponenten des PAS und VEGF untereinander.

Vor dem Hintergrund der Studienlage geben unsere Ergebnisse Hinweise darauf, dass sich vor allem die Menge an PAI-1 im Tumor, welche unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante weitere Zunahme über alle Zelllinien zeigte, als Marker für sauerstoffarme Areale im Tumor eignen könnte. In Zusammenschau der veröffentlichten Literatur kommt PAI-1 weiterhin als Marker für lokale Tumorkontrolle, für eine geplante Radiotherapie und eventuell als therapeutischer Ansatzpunkt in Frage.

**F Literaturverzeichnis**

1. Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE (2005). "Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy." *Drug Resist Updat* 8(1-2): 59-74.
2. Adam MF, Gabalski EC, Bloch DA, Oehlert JW, Brown JM, Elsaid AA, Pinto HA, Terris DJ (1999). "Tissue oxygen distribution in head and neck cancer patients." *Head Neck* 21(2): 146-53.
3. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review." *Int J Cancer* 72(1): 1-22.
4. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH (2000). "The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis." *Cell Mol Life Sci* 57(1): 25-40.
5. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A (2001). "The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies." *J Cell Biol* 152(4): 777-84.
6. Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A (2004). "Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth." *Oncogene* 23(41): 6986-90.
7. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ (2000). "Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression." *Mol Pathol* 53(6): 307-12.
8. Basire A, Sabatier F, Ravet S, Lamy E, Mialhe A, Zabouo G, Paul P, Gurewich V, Sampol J, Dignat-George F (2006). "High urokinase expression contributes to the angiogenic properties of endothelial cells derived from circulating progenitors." *Thromb Haemost* 95(4): 678-88.
9. Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C, Bertz J, Haberland J, Wolf U (2008). "Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends." In: Book Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.



10. Bayer C, Schilling D, Hoetzel J, Egermann HP, Zips D, Yaromina A, Geurts-Moespot A, Sprague LD, Sweep F, Baumann M, Molls M, Adam M (2008). "PAI-1 levels predict response to fractionated irradiation in 10 human squamous cell carcinoma lines of the head and neck." *Radiother Oncol* 86(3): 361-8.
11. Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A (2004). "Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy?" *Oral Oncol* 40(2): 110-9.
12. Binder BR, Mihaly J, Prager GW (2007). "uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view." *Thrombosis and haemostasis* 97(3): 336-42.
13. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J (2006). "The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion." *Bull Cancer* 93(8): E73-80.
14. Bremnes RM, Camps C, Sirera R (2006). "Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood." *Lung Cancer* 51(2): 143-58.
15. Brieger J, Schroeder P, Gosepath J, Mann WJ (2005). "Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are released by squamous cell carcinoma cells after irradiation and increase resistance to subsequent irradiation." *Int J Mol Med* 16(1): 159-64.
16. Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, Dewhirst MW (1999). "Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome." *Radiother Oncol* 53(2): 113-7.
17. Brooks TD, Slomp J, Quax PH, De Bart AC, Spencer MT, Verheijen JH, Charlton PA (2000). "Antibodies to PAI-1 alter the invasive and migratory properties of human tumour cells in vitro." *Clin Exp Metastasis* 18(6): 445-53.
18. Brooks TD, Wang SW, Brunner N, Charlton PA (2004). "XR5967, a novel modulator of plasminogen activator inhibitor-1 activity, suppresses tumor cell invasion and angiogenesis in vitro." *Anticancer Drugs* 15(1): 37-44.
19. Buchler P, Reber HA, Buchler M, Shrinkante S, Buchler MW, Friess H, Semenza GL, Hines OJ (2003). "Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer." *Pancreas* 26(1): 56-64.

20. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* 394(6692): 485-90.
21. Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, Campbell CM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB (2005). "Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer." *Int J Cancer* 113: 789-97.
22. Choi JH, Kim HC, Lim HY, Nam DK, Kim HS, Yi JW, Chun M, Oh YT, Kang S, Park KJ, Hwang SC, Lee YH, Hahn MH (2001). "Vascular endothelial growth factor in the serum of patients with non-small cell lung cancer: correlation with platelet and leukocyte counts." *Lung Cancer* 33(2-3): 171-9.
23. Crippa MP (2007). "Urokinase-type plasminogen activator." *Int J Biochem Cell Biol* 39(4): 690-4.
24. Crowley CW, Cohen RL, Lucas BK, Liu G, Shuman MA, Levinson AD (1993). "Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(11): 5021-5.
25. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. Cancer Incidence in Five Continents Volume IX. 2007.
26. Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, Romer J (2005). "Plasminogen activation and cancer." *Thromb Haemost* 93(4): 676-81.
27. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noel A, Foidart JM (2002). "The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent." *Faseb J* 16(2): 147-54.
28. Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ (2003). "Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer." *Mol Cancer* 2: 12.
29. Duffy MJ, Duggan C (2004). "The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer." *Clin Biochem* 37(7): 541-8.

- 
30. Dunst J, Stadler P, Becker A, Kuhnt T, Lautenschläger C, Molls M, Haensgen G (2001). "Tumor hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck cancers." *Strahlenther Onkol* 177(9): 469-73.
31. Durand MK, Bodker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, Kjelgaard S, Mathiasen L, Pedersen KE, Skeldal S, Wind T, Andreasen PA (2004). "Plasminogen activator inhibitor-I and tumour growth, invasion, and metastasis." *Thromb Haemost* 91(3): 438-49.
32. El-Kott AF, Khalil AM, El-Kenawy Ael M (2004). "Immunohistochemical expressions of uPA and its receptor uPAR and their prognostic significant in urinary bladder carcinoma." *Int Urol Nephrol* 36(3): 417-23.
33. Ellis LM, Takahashi Y, Fenoglio CJ, Cleary KR, Bucana CD, Evans DB (1998). "Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma." *Eur J Cancer* 34(3): 337-40.
34. Ferrara N, Davis-Smyth T (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." *Endocr Rev* 18(1): 4-25.
35. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W (2005). "Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy." *Biochem Biophys Res Commun* 333(2): 328-35.
36. Fink T, Kazlauskas A, Poellinger L, Ebbesen P, Zachar V (2002). "Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1." *Blood* 99(6): 2077-83.
37. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brunner N, Janicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL, Klijn JG (2000). "The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients." *Cancer Res* 60(3): 636-43.
38. Folkman J (1990). "What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?" *J Natl Cancer Inst* 82(1): 4-6.

39. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." *Mol Cell Biol* 16(9): 4604-13.
40. Gille J (2006). "Antiangiogenic cancer therapies get their act together: current developments and future prospects of growth factor- and growth factor receptor-targeted approaches." *Exp Dermatol* 15(3): 175-86.
41. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, Seetharam S, Koons A, Hari DM, Kufe DW, Weichselbaum RR (1999). "Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation." *Cancer Res* 59(14): 3374-8.
42. Graham CH, Fitzpatrick TE, McCrae KR (1998). "Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme protein-dependent pathway." *Blood* 91(9): 3300-7.
43. Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald-Goodfellow S (1999). "Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression." *Int J Cancer* 80(4): 617-23.
44. Grebenchtchikov N, Maguire TM, Riisbro R, Geurts-Moespot A, O'Donovan N, Schmitt M, McGreal G, McDermott E, O'Higgins N, Brunner N, Sweep CG, Duffy MJ (2005). "Measurement of plasminogen activator system components in plasma and tumor tissue extracts obtained from patients with breast cancer: an EORTC Receptor and Biomarker Group collaboration." *Oncol Rep* 14(1): 235-9.
45. Hageman J, Eggen BJ, Rozema T, Damman K, Kampinga HH, Coppes RP (2005). "Radiation and transforming growth factor-beta cooperate in transcriptional activation of the profibrotic plasminogen activator inhibitor-1 gene." *Clin Cancer Res* 11(16): 5956-64.
46. Han B, Nakamura M, Mori I, Nakamura Y, Kakudo K (2005). "Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer (Review)." *Oncol Rep* 14(1): 105-12.
47. Hjortland GO, Lillehammer T, Somme S, Wang J, Halvorsen T, Juell S, Hirschberg H, Fodstad O, Engebraaten O (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells." *Exp Cell Res* 294(1): 130-9.

48. Hjortland GO, Lillehammer T, Somme S, Wang J, Halvorsen T, Juell S, Hirschberg H, Fodstad O, Engebraaten O (2004). "Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells." *Exp Cell Res* 294(1): 130-9.
49. Ho CH, Chao Y, Lee SD, Chau WK, Wu CW, Liu SM (1998). "Diagnostic and prognostic values of plasma levels of fibrinolytic markers in gastric cancer." *Thromb Res* 91(1): 23-7.
50. Ho CH, Yuan CC, Liu SM (1999). "Diagnostic and prognostic values of plasma levels of fibrinolytic markers in ovarian cancer." *Gynecol Oncol* 75(3): 397-400.
51. Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P (1996). "Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix." *Cancer Res* 56(19): 4509-15.
52. Höckel M, Vaupel P (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." *J Natl Cancer Inst* 93(4): 266-76.
53. Horvatic Herceg G, Herceg D, Kralik M, Bence-Zigman Z, Tomic-Brzac H, Kulic A (2006). "Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in thyroid neoplasms: a cytosol study." *Wien Klin Wochenschr* 118(19-20): 601-9.
54. Hovinga KE, Stalpers LJ, van Bree C, Donker M, Verhoeff JJ, Rodermond HM, Bosch DA, van Furth WR (2005). "Radiation-enhanced vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in glioblastoma multiforme cell lines--a clue to radioresistance?" *J Neurooncol* 74(2): 99-103.
55. Hundsdorfer B, Zeilhofer HF, Bock KP, Dettmar P, Schmitt M, Kolk A, Pautke C, Horch HH (2005). "Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value." *J Craniomaxillofac Surg* 33(3): 191-6.
56. Iwasaki A, Kuwahara M, Yoshinaga Y, Shirakusa T (2004). "Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC." *Eur J Cardiothorac Surg* 25(3): 443-8.
57. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS (2006). "Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer." *Nat Clin Pract Oncol* 3(1): 24-40.

- 
58. Janssen HL, Haustermans KM, Balm AJ, Begg AC (2005). "Hypoxia in head and neck cancer: how much, how important?" *Head Neck* 27(7): 622-38.
59. Jensen RL, Ragel BT, Whang K, Gillespie D (2006). "Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas." *J Neurooncol* 78(3): 233-47.
60. Jo M, Thomas KS, Wu L, Gonias SL (2003). "Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling." *J Biol Chem* 278(47): 46692-8.
61. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K (1998). "Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation." *Curr Opin Cell Biol* 10(5): 667-71.
62. Kaneko T, Konno H, Baba M, Tanaka T, Nakamura S (2003). "Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer." *Cancer Sci* 94(1): 43-9.
63. Kietzmann T, Roth U, Jungermann K (1999). "Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes." *Blood* 94(12): 4177-85.
64. Kimura D, Imaizumi T, Tamo W, Sakai T, Ito K, Hatanaka R, Yoshida H, Tsushima T, Satoh K, Fukuda I (2002). "Hypoxia enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human lung cancer cells, EBC-1." *Tohoku J Exp Med* 196(4): 259-67.
65. Klagsbrun M, D'Amore PA (1996). "Vascular endothelial growth factor and its receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* 7(3): 259-70.
66. Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I, Suzuki H (1994). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients." *Biochim Biophys Acta* 1221(2): 211-4.
67. Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ (2000). "Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype." *Cancer Res* 60(4): 883-7.

68. Künzel G, Sprague L, Hieber E, Auer F, Adam M, Molls M (2001). "Construction and evaluation of aluminium hypoxic chambers for the establishment of hypoxia (pO<sub>2</sub> < 10mm Hg) in vitro." *Strahlenther Onkol Suppl*:1: 109.
69. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ (2004). "Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip." *Oral Oncol* 40(9): 941-7.
70. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ (2005). "Hypoxia-induced tumor angiogenic pathway in head and neck cancer: an in vivo study." *Cancer Lett* 225(2): 297-304.
71. Lebrecht A, Ludwig E, Huber A, Klein M, Schneeberger C, Tempfer C, Koelbl H, Hefler L (2002). "Serum vascular endothelial growth factor and serum leptin in patients with cervical cancer." *Gynecol Oncol* 85(1): 32-5.
72. Lefebvre JL (2005). "Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN." *Ann Oncol* 16 Suppl 6: vi7-vi12.
73. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA (1995). "Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia." *J Biol Chem* 270(22): 13333-40.
74. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S (1995). "Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer." *Circ Res* 77(3): 638-43.
75. Lutz V, Reuning U, Kruger A, Luther T, von Steinburg SP, Graeff H, Schmitt M, Wilhelm OG, Magdolen V (2001). "High level synthesis of recombinant soluble urokinase receptor (CD87) by ovarian cancer cells reduces intraperitoneal tumor growth and spread in nude mice." *Biol Chem* 382(5): 789-98.
76. Magdolen V, Burgle M, de Prada NA, Schmiedeberg N, Riemer C, Schroeck F, Kellermann J, Degitz K, Wilhelm OG, Schmitt M, Kessler H (2001). "Cyclo19,31[D-Cys19]-uPA19-31 is a potent competitive antagonist of the interaction of urokinase-type plasminogen activator with its receptor (CD87)." *Biol Chem* 382(8): 1197-205.
77. Magdolen V, Krüger A, Sato S, Nagel J, Sperl S, Reuning U, Rettenberger P, Magdolen U, Schmitt M (2003). "Inhibition of the tumor-associated urokinase-type

plasminogen activation system: effects of high-level synthesis of soluble urokinase receptor in ovarian and breast cancer cells in vitro and in vivo." *Recent Results Cancer Res* 162: 43-63.

78. Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, Iwami F, Kawabata M, Arimura K, Osame M (2000). "Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer." *Chest* 118(4): 948-51.

79. Medcalf RL, Stasinopoulos SJ (2005). "The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2." *Febs J* 272(19): 4858-67.

80. Meo S, Dittadi R, Peloso L, Gion M (2004). "The prognostic value of vascular endothelial growth factor, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in node-negative breast cancer." *Int J Biol Markers* 19(4): 282-8.

81. Minisini AM, Fabbro D, Di Loreto C, Pestrin M, Russo S, Cardellino GG, Andreetta C, Damante G, Puglisi F (2007). "Markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer." *Am J Clin Pathol* 128(1): 112-7.

82. Mohamed KM, Le A, Duong H, Wu Y, Zhang Q, Messadi DV (2004). "Correlation between VEGF and HIF-1alpha expression in human oral squamous cell carcinoma." *Exp Mol Pathol* 76(2): 143-52.

83. Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP, Sheahan K (1994). "Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes' B colorectal cancer." *Lancet* 344(8922): 583-4.

84. Nijziel MR, Van Oerle R, Hellenbrand D, Van Pampus EC, Hillen HF, Hamulyak K (2003). "The prognostic value of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (s-uPAR) in plasma of breast cancer patients with and without metastatic disease." *J Thromb Haemost* 1(5): 982-6.

85. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J (2005). "Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study." *Radiother Oncol* 77(1): 18-24.



- 
86. Nozaki S, Endo Y, Nakahara H, Yoshizawa K, Ohara T, Yamamoto E (2006). "Targeting urokinase-type plasminogen activator and its receptor for cancer therapy." *Anticancer Drugs* 17(10): 1109-17.
87. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U (1998). "Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11709-14.
88. Papadopoulou S, Scorilas A, Yotis J, Arnogianaki N, Plataniotis G, Agnanti N, Talieri M (2002). "Significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in human colorectal carcinomas." *Tumour Biol* 23(3): 170-8.
89. Pappot H, Hoyer-Hansen G, Ronne E, Hansen HH, Brunner N, Dano K, Grondahl-Hansen J (1997). "Elevated plasma levels of urokinase plasminogen activator receptor in non-small cell lung cancer patients." *Eur J Cancer* 33(6): 867-72.
90. Pasini FS, Brentani MM, Kowalski LP, Federico MH (2001). "Transforming growth factor beta1, urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in head and neck squamous carcinoma and normal adjacent mucosa." *Head Neck* 23(9): 725-32.
91. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1991). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 181(2): 902-6.
92. Pinsky DJ, Liao H, Lawson CA, Yan SF, Chen J, Carmeliet P, Loskutoff DJ, Stern DM (1998). "Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition." *J Clin Invest* 102(5): 919-28.
93. Poon RT, Fan ST, Wong J (2001). "Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients." *J Clin Oncol* 19(4): 1207-25.
94. Powis G, Kirkpatrick L (2004). "Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target." *Mol Cancer Ther* 3(5): 647-54.

- 
95. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid pro-urokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells." *Blood* 103(3): 955-62.
96. Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L, Lambert V, Foidart JM, Noel A (2003). "Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis." *Cell Mol Life Sci* 60(3): 463-73.
97. Raleigh JA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Ballenger CA, Weissler MC, Fowler WC, Jr., Novotny DB, Varia MA (1998). "Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker." *Cancer Res* 58(17): 3765-8.
98. Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, Liu W, Stoeltzing O, Fan F, Takeda A, Akagi M, Ellis LM (2003). "Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract." *Microsc Res Tech* 60(2): 199-207.
99. Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM (1996). "Genetic instability induced by the tumor microenvironment." *Cancer Res* 56(24): 5754-7.
100. Rha SY, Yang WI, Gong SJ, Kim JJ, Yoo NC, Roh JK, Min JS, Lee KS, Kim BS, Chung HC (2000). "Correlation of tissue and blood plasminogen activation system in breast cancer." *Cancer Lett* 150(2): 137-45.
101. Riva C, Chauvin C, Pison C, Leverve X (1998). "Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis." *Anticancer Res* 18(6B): 4729-36.
102. Rofstad EK, Mathiesen B, Galappathi K (2004). "Increased metastatic dissemination in human melanoma xenografts after subcurative radiation treatment: radiation-induced increase in fraction of hypoxic cells and hypoxia-induced up-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor." *Cancer Res* 64(1): 13-8.
103. Roskoski R, Jr. (2007). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression." *Crit Rev Oncol Hematol* 62(3): 179-213.
104. Sato S, Kopitz C, Schmalix WA, Muehlenweg B, Kessler H, Schmitt M, Kruger A, Magdolen V (2002). "High-affinity urokinase-derived cyclic peptides inhibiting

urokinase/urokinase receptor-interaction: effects on tumor growth and spread." *FEBS Lett* 528(1-3): 212-6.

105. Schilling D, Bayer C, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Pruschy M, Mengele K, Sprague LD, Molls M (2007). "Induction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) by hypoxia and irradiation in human head and neck carcinoma cell lines." *BMC Cancer* 7: 143.

106. Schweinitz A, Steinmetzer T, Banke IJ, Arlt MJ, Sturzebecher A, Schuster O, Geissler A, Giersiefen H, Zeslawska E, Jacob U, Kruger A, Sturzebecher J (2004). "Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents." *J Biol Chem* 279(32): 33613-22.

107. Semenza GL (2000). "Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35(2): 71-103.

108. Semenza GL (2001). "HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing." *Curr Opin Cell Biol* 13(2): 167-71.

109. Shimada H, Takeda A, Nabeya Y, Okazumi SI, Matsubara H, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Kobayashi S, Suzuki T, Ochiai T (2001). "Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma." *Cancer* 92(3): 663-9.

110. Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG (2000). "Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma." *J Clin Oncol* 18(10): 2046-52.

111. Smith BD, Smith GL, Carter D, DiGiovanna MP, Kasowitz KM, Sasaki CT, Haffty BG (2001). "Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(7): 780-5.

112. Sprague LD, Mengele K, Schilling D, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Stadler P, Schmitt M, Molls M (2006). "Effect of reoxygenation on the hypoxia-induced up-regulation of serine protease inhibitor PAI-1 in head and neck cancer cells." *Oncology* 71(3-4): 282-91.

113. Stadler P, Feldmann HJ, Creighton C, Kau R, Molls M (1998). "Changes in tumor oxygenation during combined treatment with split-course radiotherapy and chemotherapy in patients with head and neck cancer." *Radiother Oncol* 48(2): 157-64.

- 
114. Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Hänsgen G, Dunst J, Würschmidt F, Molls M (1999). "Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44(4): 749-54.
115. Stadler P, Feldmann HJ, Creighton C, Zeilhofer HF, Zimmermann V, Schmitt M, Molls M (2000). "Clinical evidence for correlation of insufficient tissue oxygen supply (hypoxia) and tumor-associated proteolysis in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Int J Biol Markers* 15(3): 235-6.
116. Stoppelli MP (2001). "The Plasminogen Activation System in Cell Invasion." In: Cell Invasion.
117. Strojjan P, Budihna M, Smid L, Vrhovec I, Skrk J (2000). "Urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 and cathepsin D: analysis of their prognostic significance in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Anticancer Res* 20(5C): 3975-81.
118. Sundfor K, Lyng H, Trope CG, Rofstad EK (2000). "Treatment outcome in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix: relationships to pretreatment tumor oxygenation and vascularization." *Radiother Oncol* 54(2): 101-7.
119. Teicher BA (1994). "Hypoxia and drug resistance." *Cancer metastasis reviews* 13(2): 139-68.
120. Terada H, Urano T, Konno H (2005). "Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer." *Eur Surg Res* 37(3): 166-72.
121. Vaupel P (2004a). "The role of hypoxia-induced factors in tumor progression." *Oncologist* 9 Suppl 5: 10-7.
122. Vaupel P, Harrison L (2004). "Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response." *Oncologist* 9 Suppl 5: 4-9.
123. Vaupel P (2004b). "Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology." *Semin Radiat Oncol* 14(3): 198-206.
124. Vaupel P (2009). "Pathophysiology of Solid Tumors." In: The Impact of Tumor Biology on Cancer Treatment and Multidisciplinary Strategies *Medical Radiology*: 4, 51-92.

- 
125. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1993). "Head and neck cancer." *N Engl J Med* 328(3): 184-94.
126. Weinmann M, Thews O, Schroeder T, Vaupel P (2002). "Expression pattern of the urokinase-plasminogen activator system in rat DS-sarcoma: role of oxygenation status and tumour size." *Br J Cancer* 86(8): 1355-61.
127. Weinmann M, Belka C, Plasswilm L (2004). "Tumour hypoxia: impact on biology, prognosis and treatment of solid malignant tumours." *Onkologie* 27(1): 83-90.
128. Wendt TG, Bank P (2002). "Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Onkologie* 25(3): 208-12.
129. Yang JL, Seetoo D, Wang Y, Ranson M, Berney CR, Ham JM, Russell PJ, Crowe PJ (2000). "Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets." *Int J Cancer* 89(5): 431-9.
130. Yang SF, Hsieh YS, Lin CL, Hsu NY, Chiou HL, Chou FP, Chu SC (2005). "Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients." *Clin Chim Acta* 354(1-2): 91-9.
131. Yaromina A, Zips D, Thames HD, Eicheler W, Krause M, Rosner A, Haase M, Petersen C, Raleigh JA, Quennet V, Walenta S, Mueller-Klieser W, Baumann M (2006). "Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies." *Radiother Oncol* 81(2): 122-9.
132. Zlobec I, Steele R, Compton CC (2005). "VEGF as a predictive marker of rectal tumor response to preoperative radiotherapy." *Cancer* 104(11): 2517-21.

## **G Danksagung**

Mein Dank gilt besonders Dr. Christine Bayer, die diese Arbeit angeregt hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihr habe ich auch die Einarbeitung in die wissenschaftliche Laborarbeit und in die zellbiologischen Arbeitstechniken zu verdanken.

Gleichermaßen danke ich Herrn Prof. Dr. M. Molls, dem Leiter der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie am Klinikum rechts der Isar in München, der mir die Arbeit in einem Universitätslabor erst ermöglicht hat.

Meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen, allen voran Daniela Schilling, gebührt ein großes Lob. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich und konnten mir bei vielen technischen Fragen weiterhelfen. Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Aufnahme ins Labor und das freundliche und offene Arbeitsklima bedanken.

Ohne die Unterstützung und die Geduld meiner Eltern wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, auch ihnen danke ich von ganzem Herzen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Linda, die mir jederzeit zur Seite stand und der ich diese Arbeit widmen möchte. Ihre fachlichen und persönlichen Anregungen waren und werden immer wichtig für mich sein, und ihr Anteil an dieser Arbeit ist kaum zu ermessen.

**H Curriculum Vitae****Persönliche Daten**

Name	Jörg Volker Hötzel
Geburtsdatum	23.07.1979
Geburtsort	Gräfelfing
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

**Ausbildung**

18. Juni 2008	<b>Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)</b>
2003 – 2008	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
2001 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1999 – 2001	Studium der Physik an der Technischen Universität München
25. Juni 1999	<b>Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,9)</b>
1990 – 1999	Max-Born-Gymnasium Germering

**Praktische Arbeitserfahrung****Beruflicher Werdegang**

Seit 03/2012	Assistenzarzt am Chirurgisch-Traumatologischen Zentrum <b>Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg, Deutschland</b>
03/2009 – 02/2012	Assistenzarzt am Department für Orthopädie und Traumatologie <b>Universitätsklinikum Freiburg, Deutschland</b>

**Praktisches Jahr**

04/2007 – 07/2007	<b>Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan</b> Departement of Internal Medicine
12/2006 – 02/2007	<b>Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland</b> Chirurgische Klinik und Poliklinik
08/2006 – 12/2006	<b>Rotkreuzklinikum München, Deutschland</b> Abteilung für Orthopädie

**Famulaturen**

03/2006	<b>Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland</b> Abteilung für Gastroenterologie
09/2005 – 10/2005	<b>Krankenhaus München-Bogenhausen, München, Deutschland</b> Abteilung für Orthopädie und Sportorthopädie
09/2004 – 10/2004	<b>Radiologisches Zentrum München-Pasing, München, Deutschland</b> Praxisfamulatur Radiologie

---

08/2004 **Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland**  
Pathologisches Institut

09/2003 **Dr. M. Schorr, Germering, Deutschland**  
Praxisambulatur ambulante Chirurgie

**Nebentätigkeiten**

10/2004 – 10/2008 **Radiologisches Zentrum München-Pasing, Deutschland**

08/2001 **SWITCH Biotech AG, München Martinsried, Deutschland**

02/2001 – 04/2001 **Eurofins Medigenomix GmbH, Planegg, Deutschland**