

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik  
für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie  
des Klinikums rechts der Isar der  
Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

## **Bestrahlungsinduzierte Regulation des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region**

**Meri Tuuli Artman**

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 29.01.2014 angenommen.

1	<b>Einleitung</b> .....	4
	<b>1.1 Kopf-Hals-Tumoren</b> .....	4
	<b>1.2 Hypoxie</b> .....	5
	1.2.1 Bedeutung von Hypoxie in der Strahlentherapie .....	5
	1.2.2 Entstehung der Tumorhypoxie .....	6
	1.2.3 Messmethoden der Hypoxie .....	8
	1.2.4 Hypoxie-bedingte Mutationen und Adaptationen.....	9
	<b>1.3 Das Plasminogenaktivierungssystem (PAS)</b> .....	10
	1.3.1 Aufbau des PAS .....	10
	1.3.2 Funktion des PAS im Rahmen maligner Erkrankungen.....	10
	1.3.3 Plasmin.....	10
	1.3.4 Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Rezeptor uPAR .....	11
	1.3.5 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) .....	12
	1.3.6 Prognostische Bedeutung des PAS .....	13
	1.3.7 PAI-1 und Tumorprogression .....	14
	<b>1.4 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)</b> .....	15
	1.4.1 VEGF und seine Rezeptoren.....	15
	1.4.2 VEGF und Angiogenese.....	15
	1.4.3 VEGF als prognostischer Marker .....	18
	<b>1.5 Zusammenhang von PAS und VEGF</b> .....	18
	<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	21
2	<b>Material und Methoden</b> .....	22
	<b>2.1 Methoden der Zellkultur</b> .....	22
	2.1.1 Verwendete Zelllinien .....	22
	2.1.2 Zellkulturbedingungen .....	23
	2.1.3 Proliferation .....	23
	2.1.4 Probengewinnung für PAI-1- und VEGF-ELISA .....	24
	<b>2.2 Bestrahlung</b> .....	25
	<b>2.3 ELISA</b> .....	27
	2.3.1 Double-Antibody-Sandwich-ELISA.....	27
	2.3.2 PAI-1 – ELISA .....	28
	2.3.3 VEGF-ELISA .....	29
	<b>2.4 Zusätzliche Materialien</b> .....	30
	<b>2.5 Statistik</b> .....	31

3	<b>Ergebnisse</b> .....	32
	3.1 Proliferative Aktivität ohne Bestrahlung .....	32
	3.2 Proliferative Aktivität nach Bestrahlung .....	33
	3.3 Strahlensensibilität .....	35
	3.4 Entwicklung der Zellzahlen nach Bestrahlung .....	36
	3.5 Basale PAI-1-Sekretion .....	38
	3.6 Bestrahlungsinduzierte PAI-1-Sekretion .....	39
	3.7 Basale VEGF-Sekretion .....	42
	3.8 Bestrahlungsinduzierte VEGF-Sekretion .....	43
	3.9 Korrelationsanalysen .....	46
4	<b>Diskussion</b> .....	47
	4.1 Unterschiede in der Strahlenresistenz der sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	47
	4.2 Zusammenhang zwischen basaler PAI-1- oder VEGF-Sekretion und Strahlenresistenz .....	48
	4.3 Einfluss der Bestrahlung auf die Sekretion von PAI-1 und VEGF und der Zusammenhang mit der Strahlenresistenz .....	50
	4.4 PAI-1 und VEGF als Marker für das Ansprechen auf eine Strahlentherapie .....	53
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	55
6	<b>Anhang</b> .....	56
	6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	56
	6.2 Publikationen .....	57
	6.3 Lizenzen .....	58
	6.4 Literaturverzeichnis .....	61
	6.5 Danksagung .....	71

# 1 Einleitung

## 1.1 Kopf-Hals-Tumoren

Unter dem Begriff Kopf-Hals-Tumoren wird eine Gruppe maligner Neoplasien mit Ursprung im oberen aerodigestiven Trakt - im Bereich des Kopfes und des Halses - summiert. Zu diesen zählen Tumoren der Mundhöhle, der Nasenhaut- sowie Nasennebenhöhlen, des Pharynx und des Larynx. Den größten Anteil bilden die Plattenepithelkarzinome (Englisch: head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) mit 90%. Sehr viel seltener kommen Sarkome und Lymphome vor.

Mit einem Anteil von 6% an allen soliden Tumoren erreichen Kopf-Hals-Tumore den sechsten Rang in der Häufigkeit der Krebserkrankungen weltweit (Duvvuri und Myers, 2009). Dies bestätigt sich auch in der deutschen Krebsstatistik des Robert-Koch-Instituts, in der Kopf-Hals-Tumore bei Männern im Jahr 2008 5,3% aller Tumorerkrankungen ausmachten. Bei Frauen hingegen sind Kopf-Hals-Tumore mit nur 1,8% aller neuen Krebserkrankungen deutlich seltener (Kaatsch et al., 2012). Die erkrankten Patienten sind im Mittel meist jünger verglichen zu den meisten anderen Krebsentitäten. Der Erkrankungsgipfel liegt bei einem Alter von 55-65 Jahren (Kaatsch et al., 2012). Nach Angaben des Deutschen Krebsforschungszentrums verstarben im Jahr 2008 in Deutschland 6430 Menschen an Kopf-Hals-Tumoren.

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren gehören Tabak- und Alkoholkonsum (Pai und Westra, 2009). Hervorzuheben ist, dass sich bei Vorliegen beider Risikofaktoren - Tabak- und Alkoholkonsum - das Krebsrisiko nicht nur addiert sondern über die Summe beider hinaus wächst. Zunehmend an Relevanz gewinnt als weiterer Risikofaktor eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV), insbesondere Typ 16. HPV scheint vor allem bei jüngeren Patienten ohne klassische Risikofaktoren an der Tumorentstehung beteiligt zu sein (Chaturvedi et al., 2008; Psyrri et al., 2008).

Therapieoptionen bei Kopf-Hals-Tumoren hängen vor allem von Lokalisation und Ausbreitung ab. In früheren Stadien (Stadium I-II nach UICC) kann die Therapie mittels alleiniger Operation oder alleiniger Strahlentherapie erfolgen. Beide Verfahren liefern vergleichbare Ergebnisse. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (Stadium III-IV nach UICC) erfolgt in der Regel eine operative Therapie mit adjuvanter Radiotherapie oder adjuvanter Radiochemotherapie (Bootz, 2008). Um ein funktionell gutes Ergebnis zu erzielen, sind die rekonstruktiven Möglichkeiten vor einer chirurgischen Therapie zu eruieren. Eine alleinige

Radiochemotherapie ist einer Operation vorzuziehen, wenn keine ausreichenden rekonstruktiven Möglichkeiten gegeben sind. Ebenfalls erfolgt die Therapie lokal fortgeschrittener, nicht resektabler Tumoren mittels alleiniger Radiochemotherapie. Zusätzlich werden neue Therapieansätze, wie die gezielte Blockade des endothelialen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), evaluiert und bereits erfolgreich klinisch eingesetzt (Cognetti et al., 2008; Licitra und Felip, 2009).

## **1.2 Hypoxie**

### **1.2.1 Bedeutung von Hypoxie in der Strahlentherapie**

Als Hypoxie wird ein kritisch erniedrigter Sauerstoffpartialdruck im Gewebe bezeichnet. Hierdurch werden die physiologischen Stoffwechselforgänge der betroffenen Zellen beeinträchtigt. Eine klare Grenze, bei deren Unterschreitung Zellen als hypoxisch gelten, besteht nicht. Der minimal benötigte Sauerstoffpartialdruck ist für verschiedene Zelltypen und die Funktion ihrer Stoffwechselforgänge unterschiedlich. Es wird jedoch im Allgemeinen davon ausgegangen, dass bei Sauerstoffpartialdrücken unter 8-10 mmHg im Gewebe eine schädigende Wirkung der Hypoxie eintritt (Höckel und Vaupel, 2001).

Tumorhypoxie stellt ein wesentliches Problem der Strahlentherapie dar. Sie kann in unterschiedlichem Maße in Tumoren nachgewiesen werden und führt hier zu einer vermehrten Resistenz gegenüber Bestrahlung. Erste Hinweise auf die Bedeutung des Sauerstoffs für die Radiosensitivität ergaben sich bereits Anfang des 20. Jahrhunderts durch Mitteilungen von Schwarz. Er beobachtete, dass die radiogene Dermatitis geringer ausfiel, wenn der Radium-Applikator fest auf die Haut gedrückt wurde. Er führte diesen radioprotektiven Effekt auf die verminderte Durchblutung der komprimierten Haut zurück (Schwarz, 1909). Mottram et al. stellten 1936 in histologischen Tumorschnitten eine ungleichmäßige Verteilung von Strahlenschäden fest. Hier zeigten sich verstärkte Strahlenschäden in nah an Kapillaren gelegenen Arealen.

Die tödliche Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen kommt durch verschiedene Mechanismen zu Stande. Man unterscheidet dabei zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung. Die direkte Strahlenwirkung beruht auf der Interaktion ionisierender Strahlung mit DNA. Sie führt zu irreparablen DNA-Schäden, wie z.B. Doppelstrangbrüchen. Dabei ist die direkte Strahlenwirkung jedoch nur für einen kleinen Teil der Strahlenschäden verantwortlich. Eine größere Bedeutung kommt der indirekten Strahlenwirkung zu. Dabei kommt es durch Interaktion der ionisierenden Strahlung mit intrazellulärem Wasser zur Bildung von Hydroxylradikalen. Diese reagieren wiederum mit der DNA und führen zur Bildung von DNA-Radikalen. In Abwesenheit von Sauerstoff können die entstandenen DNA-

Radikale mittels chemischer Reduktion durch Reaktion mit Sulfhydrylgruppen in ihre ursprüngliche Form zurückgeführt und die DNA-Schäden damit repariert werden. Bei Anwesenheit von Sauerstoff kann es jedoch vor der Reparatur der DNA-Schäden zu einer Reaktion von Sauerstoff mit den DNA-Radikalen kommen. Die hierdurch gebildeten Peroxidprodukte fixieren den entstandenen DNA-Schaden. Somit erhöht sich bei Anwesenheit von Sauerstoff die schädigende Wirkung der Strahlung auf die Zelle (Brown, 2002; Hall und Giaccia, 2006; Harrison und Blackwell, 2004; Molls et al., 1998).

Der radiosensibilisierende Effekt des Sauerstoffs wird als Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER = Oxygen Enhancement Ratio) bezeichnet. Die OER ist abhängig von der Art der verwendeten Strahlung. Bei Bestrahlung mit Alpha-Teilchen spielt Hypoxie keine Rolle, die OER beträgt somit 1. In der Medizin wird jedoch meist locker ionisierende Strahlung, wie Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung, verwendet. Deren OER liegt bei etwa 2-3. Dies bedeutet, dass unter hypoxischen Bedingungen eine 2-3 Mal höhere Strahlendosis benötigt wird, um denselben biologischen Effekt wie unter normoxischen Bedingungen zu erzielen. Bei Neutronenstrahlung spielt Hypoxie eine intermediäre Rolle. Die OER liegt hier bei etwa 1,6 (Hall und Giaccia, 2006).

Die Strahlensensibilität korreliert mit dem Sauerstoffpartialdruck in den Zellen. Der Sauerstoffpartialdruck normal oxygenierter Gewebe beträgt häufig 20-60 mmHg (Vaupel et al., 1989). Im Bereich des Sauerstoffpartialdrucks von 0 mmHg bis 10 mmHg steigt die Strahlensensibilität steil an. Ab einem Sauerstoffpartialdruck von 10 mmHg flacht der Kurvenverlauf ab und geht ab einem Sauerstoffpartialdruck von über 30 mmHg in eine Plateauphase über. Bei Sauerstoffpartialdrücken über 30 mmHg steigt die Strahlensensibilität praktisch nicht mehr an (Hall und Giaccia, 2006).

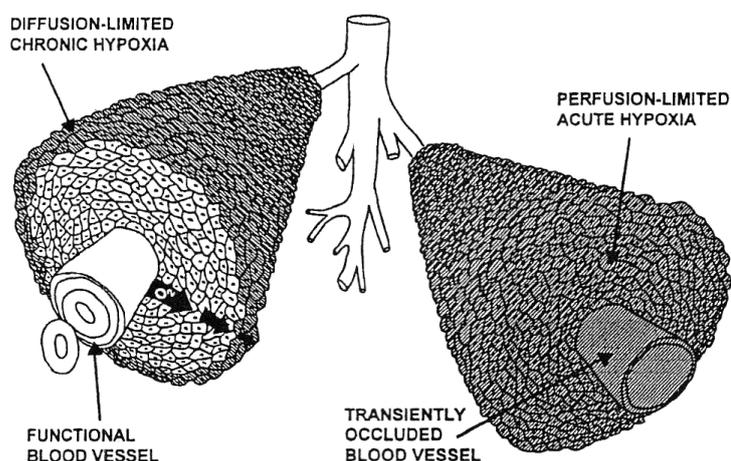
### **1.2.2 Entstehung der Tumorhypoxie**

Etwa 50-60% aller lokal fortgeschrittenen Tumore enthalten hypoxische Areale. Rezidivtumore weisen zudem eine größere hypoxische Fraktion als die jeweiligen Primärtumore auf (Vaupel und Mayer, 2007). Diese Tumorhypoxie kommt durch unterschiedliche Mechanismen zu Stande. Zum einen sind Tumorgefäße strukturell und funktionell minderwertig mit einer meist ungeordneten Gefäßarchitektur und häufigen Shuntverbindungen (Dewhirst et al., 2008). Hieraus resultiert eine gestörte Sauerstoffversorgung im Tumorgewebe. Zum anderen führt starkes Tumorwachstum zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecken und letztlich zu einem Sauerstoffmangel in der Gefäßperipherie. Weiterhin bewirkt eine mit der Tumorerkrankung einhergehende oder durch eine Tumortherapie induzierte Anämie eine erniedrigte Sauerstofftransportkapazität des

Blutes. Hieraus resultiert als dritter Faktor die so genannte anämische Hypoxie (Vaupel und Mayer, 2007).

Grundlegend wird die Hypoxie in zwei Formen unterteilt: die akute und die chronische Hypoxie (Abb. 1-1). Die chronische Form wird auch diffusionslimitierte Hypoxie genannt. Sie ist bedingt durch die maximale Distanz, die Sauerstoff im Gewebe per diffusionem überwinden kann. Bereits ab einer Entfernung von 70  $\mu\text{m}$  zum nächsten Gefäß kommt es im Gewebe zu einer diffusionsbedingten Hypoxie (Hall und Giaccia, 2006; Vaupel et al., 2001). Ab einer Distanz von über 100-150  $\mu\text{m}$  sinkt der Sauerstoffpartialdruck soweit ab, dass das betroffene Gewebe nekrotisch wird (Horsman, 1998). Thomlinson und Gray beschrieben 1955 erstmals diese Form der Hypoxie. In histologisch aufgearbeiteten Lungentumoren fanden sie Nekrosezonen ab 100-150  $\mu\text{m}$  von den versorgenden Blutgefäßen entfernt (Thomlinson und Gray, 1955).

Die akute Form der Hypoxie wird als perfusionslimitierte Hypoxie bezeichnet. Sie ist bedingt durch ein intermittierend bzw. zyklisch auftretendes Sistieren der Blutzirkulation in Blutgefäßen bzw. durch starke Schwankungen des Erythrozytenflusses. Der Stillstand der Blutzirkulation kann durch Aggregate von Blut- oder Tumorzellen verursacht werden. Die akute Hypoxie betrifft somit auch Zellen, die nah an Blutgefäßen liegen (Bayer et al., 2011; Brown, 1979; Chaplin et al., 1987).



**Abb. 1-1** \*: Schematische Darstellung der chronischen, diffusionslimitierten Hypoxie und der akuten, perfusionslimitierten Hypoxie. Hypoxische Zellen sind dunkel dargestellt, normoxische hell (Horsman, 1998).

\* Reprinted from *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 1; 42(4), Horsman MR, Measurement of tumor oxygenation, p. 701-4, ©1998, with permission from Elsevier.

### 1.2.3 Messmethoden der Hypoxie

Die Hypoxie stellt aufgrund der oben beschriebenen Mechanismen im Rahmen der Strahlentherapie ein wesentliches Problem dar. Die Messung und Quantifizierung der Hypoxie ist somit von besonderem Interesse.

Die ersten Methoden zur Hypoxiemessung waren polarographische Sauerstoffelektroden. Mit ihrer Hilfe wurde die direkte invasive Messung des Sauerstoffpartialdrucks in Tumoren ermöglicht (Raleigh et al., 1996; Vaupel, 1977). Anhand dieser Methode konnte später in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass hypoxische Areale in Tumoren mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung, höheren Rezidivraten sowie einer schlechteren Prognose einhergehen (Brizel et al., 1996; Brizel et al., 1997; Höckel et al., 1993; Höckel et al., 1996; Nordmark et al., 2005; Stadler et al., 1999). Nachteil der Hypoxiemessung mittels Sauerstoffelektrode ist zum einen die Invasivität. Zum Anderen ist die Anwendung dieser Methode auf gut zugängliche Tumore begrenzt. Zudem ist die Unterscheidung zwischen nekrotischem und noch lebensfähigem Gewebe in einigen dieser Untersuchungen nicht sicher möglich.

Aufgrund der geschilderten Probleme hat sich in den letzten Jahren der Gebrauch von Nitroimidazolen als Nachweismethode für Hypoxie durchgesetzt. Nitroimidazole, wie Pimonidazol oder Misonidazol, werden hauptsächlich in sauerstoffdefizienten Zellen metabolisiert. Somit kommt es zu einer Akkumulierung dieser Stoffe in hypoxischen Arealen. Ein Nachweis ist immunhistochemisch möglich (Horsman, 1998). Nachteil dieser Methode ist die Invasivität, da die Untersuchung nur an einem entnommenen Tumor oder einer Biopsie möglich ist. Als Weiterentwicklung dieser Methode ist jedoch ein nichtinvasives Verfahren verfügbar. Misonidazol wird mit positronenemittierendem  $^{18}\text{F}$  gekoppelt und mittels PET bildgebend nachgewiesen ( $^{18}\text{F}$ -MISO-PET). Eine weitere Möglichkeit der Bildgebung ist der Nachweis mittels SPECT mit  $^{123}\text{I}$  markiertem Iodoazomycinarabinosid ( $^{123}\text{I}$ -IAZA-SPECT) (Raleigh et al., 1996). Mehrere Studien konnten bei Kopf-Hals-Tumoren einen Zusammenhang zwischen geringerer Misonidazol-Aufnahme in der PET-Bildgebung und einem besseren Outcome nach Strahlentherapie nachweisen (Eschmann et al., 2005; Thorwarth et al., 2005). Die aktuellste präklinische Methodik zur Darstellung von Tumorhypoxie stellt das electron paramagnetic resonance imaging (EPRI) dar. Hierbei wird eine Magnetresonanztechnik im Niederfrequenzbereich angewendet. Die Vorteile dieser Technik liegen bei fehlender Invasivität in der Möglichkeit einer dynamischen Darstellung des Oxygenierungsstatus mit einer hohen Auflösung der absoluten pO<sub>2</sub>-Werte von 3-4 mmHg (Matsumoto et al., 2008; Matsumoto et al., 2010).

#### 1.2.4 Hypoxie-bedingte Mutationen und Adaptationen

Neben dem oben beschriebenen radioprotektiven Effekt (und chemoprotektiven Mechanismen) fördert Hypoxie auch auf eine andere Weise die Tumorprogression. Hypoxischer Stress setzt eine Reihe von Prozessen in Gang. Hierdurch entstehen u.a. Zellklone mit einem aggressiveren Phänotyp (Giaccia, 1996; Vaupel und Mayer, 2007). Aus einer ausgeprägten Hypoxie resultiert ein hoher Selektionsdruck und es entwickeln sich bei bestehender genetischer Instabilität aggressivere Zelltypen. Diese sind in der Lage, trotz schlechter Umweltbedingungen zu überleben (Vaupel und Harrison, 2004).

Die Expression einer Vielzahl von Genen wird vorallem durch den durch Hypoxie induzierten Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) reguliert. HIF-1 $\alpha$  führt hierbei durch Bindung an das „Hypoxia Response Element“ (HRE) zu einer Aktivierung der Transkription zahlreicher Gene (Semenza, 2010). Diese Gene sind an der Hypoxie-induzierten Tumorprogression und damit der Steigerung der Aggressivität der Tumorzellen beteiligt (Semenza, 2000; Vaupel, 2004). Unter hypoxischem Stress wird die Expression einer bedeutenden Anzahl von Adhäsionsmolekülen herunterreguliert. Hierdurch wird eine Loslösung von malignen Zellen aus dem Zellverband und deren Absiedlung (Metastasierung) ermöglicht (Vaupel, 2004).

Hypoxie fördert außerdem die Entstehung von neuen Blutgefäßen (Neoangiogenese). Diese erfolgt über eine Induktion der VEGF-Expression aber auch durch Beeinflussung weiterer komplexer Regulationsmechanismen mit der Angiogenese assoziierter Moleküle (Vaupel, 2004).

Hypoxie beeinflusst zudem auf verschiedenen Ebenen das Plasminogenaktivierungssystem. U.a. kann Hypoxie zu einer Erhöhung des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 und des Rezeptors uPAR führen (Bayer et al., 2008; Graham et al., 1999; Kietzmann et al., 1999; Li et al., 2005; Schilling et al., 2007). Eine aktuelle Arbeit aus dem Jahr 2012 konnte diesen Zusammenhang jedoch nicht bestätigen. Hier zeigte sich bei 43 Zervixkarzinompatientinnen kein statistisch signifikanter direkter Zusammenhang zwischen Tumorphypoxie und PAI-1-Expression (Lara et al., 2012). Die komplexen Modulationswege von PAI-1 und der Einfluss von Hypoxie auf die Regulation verschiedener Onkoproteine, werden von den Autoren als mögliche Ursache für die diskrepanten Ergebnisse diskutiert. Doch fanden sich auch in dieser Arbeit indirekte Assoziationen zwischen hypoxie-induzierten Onkoproteinen und PAI-1.

## 1.3 Das Plasminogenaktivierungssystem (PAS)

### 1.3.1 Aufbau des PAS

Das Plasminogenaktivierungssystem (PAS) besteht aus mehreren Komponenten. Hierzu gehören zum einen die Serinproteasen Plasmin und Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA), zum anderen der uPA-Rezeptor (uPAR). Eine weitere Komponente stellen die Serpine (serine protease inhibitor) alpha2-Antiplasmin und Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2) dar. Das PAS ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. Vorrangig ist dabei die Fibrinolyse zu nennen, jedoch werden auch andere pathophysiologische Vorgänge, wie die Wundheilung, Spermatogenese und Entzündungsreaktionen maßgeblich durch das PAS beeinflusst (Andreasen et al., 1990). Ebenso ist das PAS am malignen Geschehen beteiligt. Eine zentrale Rolle spielt es in der Regulation des Tumorwachstums sowie in der Befähigung maligner Zellen zur Invasion und Metastasierung. Auf letztgenannte Funktionen soll im Weiteren näher eingegangen werden.

### 1.3.2 Funktion des PAS im Rahmen maligner Erkrankungen

Die Metastasierung, die Absiedlung maligner Tumorzellen, erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Vorgänge. Dazu gehören die Ablösung von Tumorzellen aus ihrem ursprünglichen Zellverband, die Zellmigration und die Invasion der Krebszellen in das umgebende Gewebe. Hierfür sind der Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) und das Eindringen von Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße notwendig. Schließlich erfolgt die erneute Zelladhäsion am Endothel und nachfolgend die Bildung einer Metastase (Andreasen et al., 1997). Das PAS ist auf mehreren Ebenen an diesem Prozess beteiligt.

### 1.3.3 Plasmin

Plasmin ist eine Serinprotease mit einem breiten Wirkungsspektrum. Die inaktive Vorstufe des Plasmins, das Plasminogen, wird in erster Linie in der Leber synthetisiert. Die Aktivierung von Plasminogen in Plasmin erfolgt durch proteolytische Spaltung einer Peptidbindung. Für diesen Aktivierungsschritt sind Plasminogenaktivatoren vom Urokinasetyp (uPA) und vom Gewebetyp (tPA) notwendig. Durch diesen Vorgang entsteht aus der einkettigen Polypeptidkette Plasminogen das zweikettige aktive Plasmin (Andreasen et al., 1997; Mignatti und Rifkin, 1993; Saksela und Rifkin, 1988).

Der Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA) ist hauptsächlich für die Plasminogenaktivierung im Rahmen von Gerinnungsvorgängen verantwortlich. tPA-aktiviertes Plasmin spaltet im Rahmen der Fibrinolyse Fibrin und begrenzt die Blutgerinnung.

Dem Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp kommt jedoch eine andere Funktion zu. uPA versetzt Plasminogen durch Aktivierung zu Plasmin in die Lage, verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) abzubauen. (Dano et al., 2005; Vassalli, 1994). Zu den wichtigsten Substraten von Plasmin gehören hierbei Zelladhäsionsmoleküle wie Fibronectin, Vitronectin und Fibrin. Zudem vermag Plasmin verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aus ihren inaktiven Vorstufen in eine aktive Form zu überführen (Andreasen et al., 1997). Die so aktivierten MMPs tragen ihrerseits zum Abbau der ECM bei.

Neben dem Abbau der ECM kommt Plasmin eine weitere Rolle im Rahmen der Tumorinvasion und Metastasierung zu. Plasmin ist in der Lage, bestimmte Wachstumsfaktoren zu aktivieren und freizusetzen. Zu diesen zählen der hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) und der transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Diese Faktoren sind ihrerseits durch Stimulation der Zellproliferation, Apoptosesuppression, Verstärkung der Zellmigration und Förderung der Angiogenese an der Tumorprogression beteiligt (Duffy und Duggan, 2004).

#### **1.3.4 Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Rezeptor uPAR**

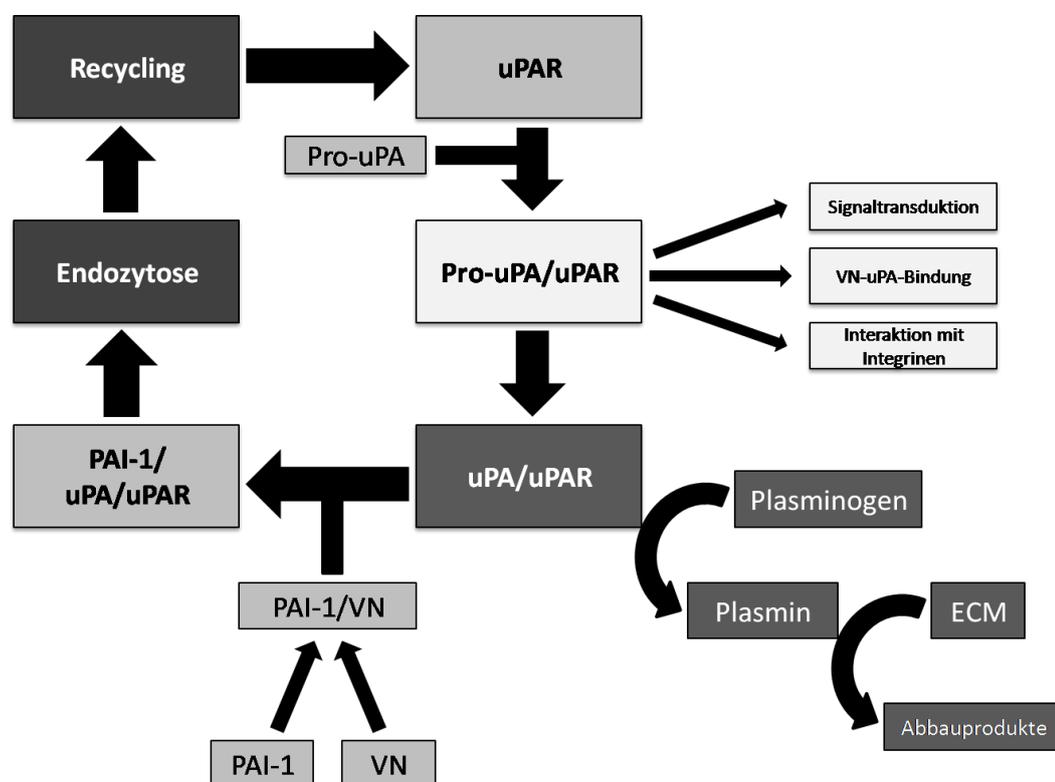
Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) wird in Form der aus einer Polypeptidkette bestehenden Vorstufe pro-uPA intrazellulär gebildet und sezerniert. Die Proteaseaktivität des pro-uPA ist im Vergleich zu aktiviertem uPA mehrere hundertfach niedriger. Die Konversion von pro-uPA zu aktivem uPA erfolgt durch Spaltung einer Peptidbrücke, wodurch die aktive zweikettige Form des uPA entsteht. Als Katalysator dieser Reaktion dient wiederum Plasmin (Andreasen et al., 1997). Andere Proteinasen, wie Kathepsin B (Kobayashi et al., 1991), Plasma Kallikrein und Faktor XIIa (Ichinose et al., 1986) sind ebenfalls zu dieser Katalysereaktion fähig.

Der zelluläre uPA-Rezeptor (uPAR) ist zellmembranständig und durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) mit dieser verbunden. uPAR besitzt eine hohe Affinität zu pro-uPA und uPA (Blasi und Carmeliet, 2002). Das von der Zelle sezernierte pro-uPA kann mit hoher Affinität an uPAR binden und wird in der Regel erst nach der Bindung aktiviert. uPA in seiner aktivierten Form katalysiert die Reaktion von inaktivem Plasminogen zu aktivem Plasmin. Aufgrund der hohen Affinität der Bindung zwischen uPA und uPAR kommt es zu einer stark gesteigerten Produktion von Plasmin in der unmittelbaren Umgebung der Zelle. Dies bewirkt einen gezielten lokalen Abbau der extrazellulären Matrix und dient als Grundlage für die Zellinvasion (Ploug und Ellis, 1994).

### 1.3.5 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

Die proteolytische Aktivität des uPA-uPAR-Komplexes wird durch Inhibitoren des uPA reguliert. Zu diesen Inhibitoren gehören die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2). Der Fokus dieser Arbeit liegt in erster Linie auf PAI-1. Aus diesem Grund wird im Folgenden vorrangig auf dessen Funktion eingegangen.

PAI-1 ist ein Glykoprotein aus der Familie der Serpine (serine protease inhibitor). Es kommt in zwei unterschiedlichen Formen, der latenten und der aktiven Form, vor. Lediglich die aktive Form des PAI-1 ist in der Lage, mit dem uPA-uPAR-Komplex zu interagieren. Die aktive Form des PAI-1 ist instabil. Sie kann jedoch durch die zusätzliche Bindung an Vitronectin (VN) stabilisiert werden. Dadurch verlängert sich die Halbwertszeit von PAI-1 deutlich (Dellas und Loskutoff, 2005). Aktiviert bindet PAI-1 an den uPA-uPAR-Komplex und inhibiert dessen Aktivität. Die Fähigkeit des uPA-uPAR-Komplexes zur Plasminkatalysierung wird dadurch gestoppt (Andreasen et al., 1997). Der neu formierte Komplex aus uPAR, uPA und PAI-1 wird daraufhin rasch internalisiert (Cubellis et al., 1990). Intrazellulär werden uPA und PAI-1 abgebaut. Der Rezeptor uPAR hingegen wird rezirkuliert und wird erneut an der Zelloberfläche präsentiert (Nykjaer et al., 1997). Abbildung 1-1 zeigt schematisch die Komponenten des PAS und ihre Funktionen.



**Abb. 1-2:** Übersicht über das Plasminogenaktivierungssystem; modifiziert nach Andreasen et al., 1997

### 1.3.6 Prognostische Bedeutung des PAS

Erste Hinweise auf die Bedeutung des uPA als prognostischer Marker ergaben sich Ende der 80er Jahre. Duffy et al. wiesen nach, dass eine erhöhte Aktivität von uPA im Primärtumorgewebe von Mammakarzinompatientinnen mit einer signifikant kürzeren tumorfreien Überlebenszeit einhergeht (Duffy et al., 1988). In weiteren Studien konnte eine Korrelation zwischen hohen uPA-Werten und einer verkürzten Überlebenszeit bei Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden (Duffy et al., 1990). In Folgestudien konnte die Rolle des uPA als unabhängiger prognostischer Marker für das Mammakarzinom bestätigt werden (Duffy et al., 1999; Ferno et al., 1996; Look et al., 2002). uPA kommt auch bei anderen malignen Erkrankungen prognostische Bedeutung zu. Dazu zählen das kolorektale Karzinom, das Magenkarzinom, das Plattenepithel- und Adenokarzinom des Ösophagus sowie einige gynäkologische Tumore (Cho et al., 1997; Duffy und Duggan, 2004; Nekarda et al., 1994; Nekarda et al., 1998; Skelly et al., 1997; Tecimer et al., 2001; Torzewski et al., 1997).

Wie uPA erwies sich PAI-1 im Rahmen des Mammakarzinoms ebenfalls als prognostischer Marker. Jänicke et al. zeigten 1993, dass hohe PAI-1-Werte bei Patientinnen mit Mammakarzinom mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf korrelierten. Erniedrigte uPA-Werte bei gleichzeitig vorliegenden niedrigen PAI-1-Konzentrationen waren prognostisch für ein geringes Rezidivrisiko (Janicke et al., 1993). Mehrere Studien konnten die Bedeutung des PAI-1 als unabhängiger prognostischer Marker beim Mammakarzinom bestätigen (Foekens et al., 1994; Grondahl-Hansen et al., 1993; Harbeck et al., 1999; Harbeck et al., 2001). Hohe PAI-1-Werte korrelierten mit einer schlechteren Prognose der malignen Erkrankung. Dies konnte zusätzlich auch bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (Chin et al., 2005; Hundsdorfer et al., 2005), dem Magenkarzinom (Nekarda et al., 1994) und dem Adenokarzinom der Lunge nachgewiesen werden (Pedersen et al., 1994).

Prognostische Faktoren sind in der Lage, das Outcome betroffener Patienten nach Therapie vorherzusagen. Prädiktive Faktoren hingegen ermöglichen es, Ansprechen oder Resistenz auf eine spezifische Therapie im Vorfeld einzuschätzen. Neben der Bedeutung von uPA und PAI-1 als prognostischer Marker ergaben sich auch Hinweise auf einen prädiktiven Nutzen dieser beiden Faktoren. Durch Messung der uPA- und PAI-1-Konzentrationen bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom vor geplanter Therapie ist eine Aussage über das wahrscheinliche Ansprechen und somit über den Nutzen einer Chemo- oder Tamoxifentherapie möglich (Duffy und Duggan, 2004; Foekens et al., 1995; Harbeck et al., 2002).

### 1.3.7 PAI-1 und Tumorprogression

Viele Studien belegen die Bedeutung des PAI-1 als prognostischer Marker für eine schlechte Prognose einer Krebserkrankung. Grundlegende Funktion des PAI-1 ist die Hemmung der durch uPA katalysierten Plasminproduktion. PAI-1 käme somit ein dem uPA entgegengesetzter, hemmender Effekt bei der Migration und Invasion von Tumorzellen aufgrund eines verminderten Abbaus der ECM zu. Der Gegensatz zwischen den hypothetisch erwarteten Funktionen und den in Studien gewonnenen Beobachtungen verdeutlicht, dass die Funktion des PAS, insbesondere des PAI-1, deutlich komplexer scheint als bislang angenommen. PAI-1 bleibt weiterhin Gegenstand der Forschung und aufgrund gegensätzlicher Forschungsergebnisse sind zum jetzigen Zeitpunkt nur hypothetische Aussagen zu seiner endgültigen Funktion möglich. Andreasen et al. nehmen an, dass PAI-1 durch seine modulierende Wirkung auf uPA und uPAR an der Schaffung eines spezifischen Tumorstromas beteiligt ist. Dieses Stroma könnte optimale Bedingungen für die Zellmigration und -invasion bieten (Andreasen, 2007).

PAI-1 besitzt neben der Hemmung des uPA noch viele weitere Funktionen. Es beeinflusst Zelladhäsion, -migration und -invasion auf einem von Plasmin unabhängigen Weg. Hierbei besitzt es sowohl pro- als auch anti-adhäsive Effekte auf Zellen. Einerseits fördert PAI-1 durch Hemmung des Abbaus von Vitronectin die VN-abhängige Adhäsion und induziert zudem die vermehrte Expression von adhäsionsvermittelnden Integrinen (Ciambrone und McKeown-Longo, 1990; Durand et al., 2004; Palmieri et al., 2002). Andererseits besitzt PAI-1 einen antiadhäsiven Effekt durch kompetitive Hemmung der Bindung von uPAR und Integrinen an Vitronectin (Deng et al., 2001). Zudem ist PAI-1 in der Lage, die endozytische Aufnahme von uPA-uPAR-Integrin-Komplexen zu stimulieren. Hieraus resultiert wiederum eine vermehrte Ablösung der Zellen aus der extrazellulären Matrix (Czekay et al., 2003).

PAI-1 beeinflusst außerdem in gegensätzlicher Weise die Zellmigration in dem es pro- als auch antimigratorisch wirkt. Ursächlich hierfür könnten unterschiedlich Konzentrationen von PAI-1 sein. Niedrige PAI-1-Konzentrationen scheinen eher stimulierend, hohe Konzentrationen dagegen inhibierend auf die Zellmigration zu wirken (Dellas und Loskutoff, 2005).

Die Zellinvasion ist ein hoch-komplexer Vorgang. Neben der Fortbewegung der Zellen ist eine aktive Penetration in die extrazelluläre Matrix erforderlich. Eine endgültige Aussage zum Effekt von PAI-1 bei der Zellinvasion kann nicht getroffen werden. Während Bruckner et al. berichten, dass PAI-1 die Zellinvasion verschiedener Zelllinien hemmen kann (Bruckner et

al., 1992; Praus et al., 2002), konnten Liu et al. zeigen, dass PAI-1 für eine optimale Zellinvasion benötigt wird (Liu et al., 1995).

Das PAS ist ein sehr komplexes und bislang nur in Ansätzen verstandenes Regelsystem. Es wurde dargestellt, dass ihm eine wichtige Rolle bei Wachstum, Invasion und Metastasierung verschiedener Tumore zukommt. Hierbei wurden vor allem uPA und PAI-1 als wichtige Prognoseparameter hervorgehoben.

## **1.4 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)**

### **1.4.1 VEGF und seine Rezeptoren**

Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren stellen eine Gruppe löslicher Glykoproteine aus der Familie der Blutplättchen-Wachstumsfaktoren (PDGF) dar. Zu dieser Gruppe zählen die Faktoren VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E sowie PlGF (placental growth factor). VEGF-A ist der am längsten und intensivsten erforschte Faktor dieser Gruppe und wird in der Literatur und ebenso in dieser Arbeit synonym mit dem Begriff VEGF gebraucht. (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Takahashi und Shibuya, 2005). VEGF vermittelt seine Wirkung durch Bindung an zwei verschiedene VEGF-Rezeptoren (VEGF-Rezeptor-1 und -2). Diese werden auf Endothelzellen exprimiert (Thomas, 1996). Die VEGF-Rezeptoren sind Transmembranproteine mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität. Sie aktivieren durch Phosphorylierung eine Signalkaskade und bewirken so eine Signaltransduktion ins Zellinnere (Carmeliet, 2005; Thomas, 1996). Man nimmt an, dass die VEGF-vermittelten Prozesse in erster Linie über VEGF-Rezeptor-2 erfolgen. VEGF-Rezeptor-1 wird hauptsächlich eine modulierende Funktion in diesem Regelkreis zugeschrieben (Carmeliet, 2005; Waltenberger et al., 1994).

Die VEGF-Expression wird durch mehrere Faktoren reguliert. Einerseits wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1), die Expression von VEGF induziert (Ferrara, 2004). Andererseits bewirkt auch Hypoxie eine Induktion der VEGF-Genexpression (Rossler et al., 1999; Shweiki et al., 1992; Ziemer et al., 2001). Unter hypoxischen Bedingungen wird vermehrt der durch Hypoxie induzierbare Faktor HIF-1 $\alpha$  gebildet. Dieser bewirkt wiederum eine gesteigerte VEGF-Expression (Forsythe et al., 1996; Ryan et al., 1998).

### **1.4.2 VEGF und Angiogenese**

Eine herausragende Rolle spielt VEGF in der Angiogenese. Als endothelspezifisches Mitogen kommt ihm eine bedeutende Funktion bei der Entstehung neuer Blutgefäße zu. Die

Entwicklung des Blutgefäßsystems eines Embryos wird maßgeblich durch VEGF beeinflusst. Fehlt ein VEGF-Allel bei Mäuseembryonen so führt dies zu einer abnormen Blutgefäßausbildung und schließlich zum Absterben im Embryonalstadium (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Im erwachsenen Organismus spielt VEGF eine deutlich geringere Rolle. Seine Wirkung entfaltet es hier vor allem im Bereich physiologischer Prozesse. Dazu gehören Vorgänge im Bereich der Wundheilung und des weiblichen Reproduktionstraktes (Folkman und Shing, 1992; Hanahan und Folkman, 1996; Li et al., 2003).

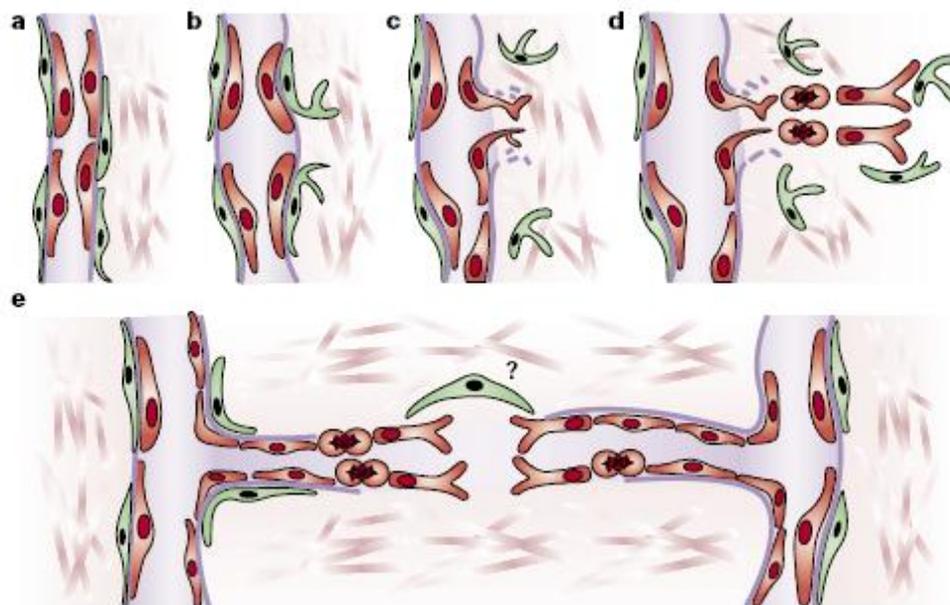
Eine bedeutendere Funktion kommt VEGF in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen zu, deren Gemeinsamkeit in einer gesteigerten Neovaskularisation liegt. Insbesondere zählt hierzu die Neoangiogenese im Rahmen des malignen Wachstums.

Solide Tumoren können ohne adäquate eigene Blutversorgung nur eine kritische Größe von 1-2 mm erreichen. Eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen per diffusionem ist über eine weitere Distanz nicht mehr gewährleistet. Um ihre Versorgung bei weiterem Wachstum sicherzustellen, müssen Tumore die Fähigkeit zur Bildung neuer Gefäße erlangen. Dieser essentielle Schritt wird „angiogenic switch“ genannt. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen einer Vielzahl pro-angiogener und anti-angiogener Faktoren. Beim „angiogenic switch“ wird dieses Gleichgewicht in Richtung pro-angiogener Faktoren verschoben. Ein Tumor entwickelt so eine eigenständige Blutversorgung und kann sich fortan „selbständig“ mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (Bergers und Benjamin, 2003; Carmeliet, 2005; Folkman, 1972). Eine wichtige Funktion in diesem Prozess nimmt VEGF ein. Maligne Tumore aktivieren über verschiedene Mechanismen die Bildung von VEGF. Zu diesen Mechanismen gehören die bereits beschriebenen Faktoren Hypoxie und Wachstumsfaktoren, wie PDGF, TNF, FGF und IL-1. Zudem kann die Genexpression von VEGF auch durch die Aktivierung von Onkogenen oder die Inhibition von Tumor-Suppressor-Genen induziert werden (Ferrara, 2004; Rak et al., 2000).

Die Neoangiogenese ist ein komplexer Prozess, der aus einer Vielzahl verschiedener Einzelschritte besteht. VEGF ist maßgeblich an vielen dieser Schritte beteiligt. Kurzgefasst stellt sich dieser Prozess wie folgt dar: In bestehenden Kapillaren oder postkapillären Venolen kommt es durch Vasodilatation und Permeabilitätserhöhung zur Extravasation von Plasmaproteinen. Außerhalb des Gefäßsystems bilden diese Proteine eine provisorische Matrix, die Endothelzellen eine Migration erlaubt. Zeitgleich werden die vaskuläre Basalmembran und die bestehende extrazelluläre Matrix lokal degradiert. Durch die aufgelockerte Umgebung können Endothelzellen über die provisorische Matrix im perizellulären Raum in Richtung chemotaktischer angiogener Stimuli migrieren. Die

ausgewanderten Endothelzellen teilen sich und bilden Säulen, die so das Grundgerüst der neuen Blutgefäße bilden. Um dieses Gerüst zu stabilisieren werden Perizyten angelockt und eine neue Basalmembran gebildet. Die von außen stabilisierten Endothelzellsäulen bilden ein Lumen aus. Zum Ende dieses Prozesses gewinnen die antiangiogenen Faktoren erneut die Überhand. Unter dem Einfluss von inhibitorischen Faktoren, wie PAI-1, reifen die Gefäße häufig vollständig aus (Bergers und Benjamin, 2003; Yancopoulos et al., 2000). Abbildung 1-3 stellt die Bildung neuer Blutgefäße schematisch dar.

VEGF ist an den beschriebenen Schritten insbesondere an der frühen Phase der Permeabilitätssteigerung und Vasodilatation beteiligt. Weiterhin fördert VEGF vor allem die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Carmeliet und Jain, 2000). Zudem vermittelt VEGF die Sekretion und Aktivierung von Enzymen, die am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Unemori et al., 1992). Des Weiteren induziert VEGF die Bildung antiapoptotischer Faktoren wie Bcl-2 und Survivin und besitzt hierdurch einen protektiven Effekt auf neu gebildete Blutgefäße (Harmey und Bouchier-Hayes, 2002; Tran et al., 1999).



**Abb. 1-3** \*: Schematische Darstellung der Bildung neuer Blutgefäße. **a:** vorbestehende Kapillare oder postkapilläre Venole. **b:** Perizyten (grün) lösen sich ab, das Blutgefäß dilatiert, die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix werden degradiert. **c:** Endothelzellen (rot) migrieren in den perivaskulären Raum in Richtung angiogener Stimuli. **d:** Endothelzellen proliferieren. **e:** Endothelzellen adhären aneinander und bilden ein neues Gefäßlumen, es entsteht eine neue Basalmembran und Perizyten werden angelockt (Bergers und Benjamin, 2003).

\* Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nat Rev Cancer](#). 3(6): 401-10 ; © 2003

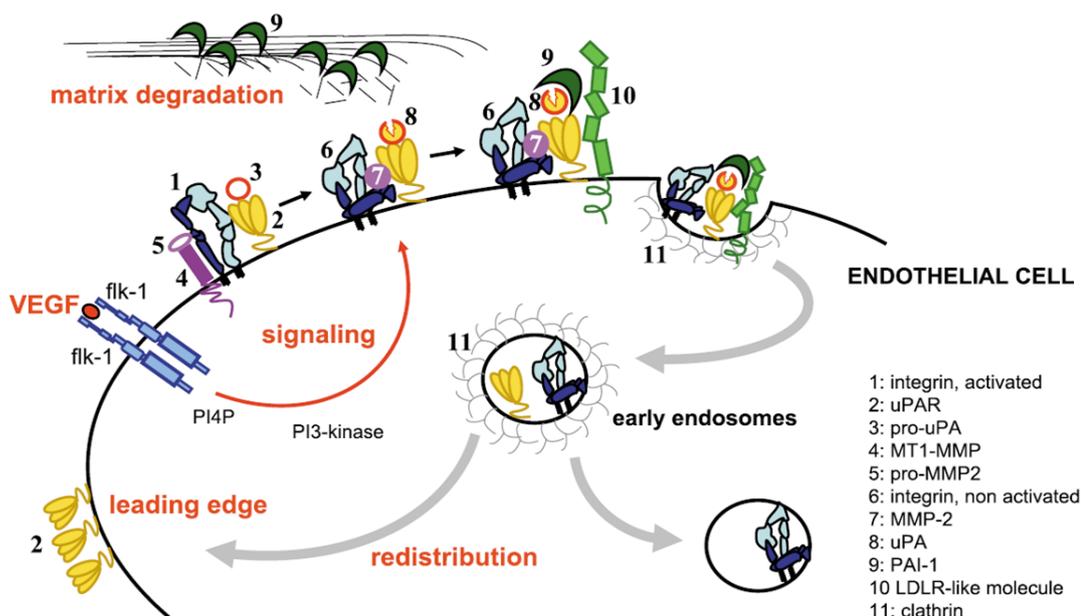
Gefäßneubildungen, die unter einem unphysiologisch hohen Stimulus durch VEGF entstehen, unterscheiden sich in Form und Funktionalität von physiologischen Blutgefäßen. Sie sind unregelmäßig geformt, dilatiert und enden oft blind. Zudem neigen sie oft zur Hyperpermeabilität und Hämorrhagien. Im Vergleich zum normalen Gefäßsystem sind Tumorgefäße durch ihre ungeordnete Gefäßarchitektur qualitativ minderwertig und können dadurch oftmals keine ausreichende Versorgung des Tumors gewährleisten. Aus der schlechten Perfusion des Tumors resultiert erneut Hypoxie und ein mangelndes Nährstoffangebot. Dies führt zu einer weiteren Erhöhung der VEGF-Expression mit konsekutiver Stimulation einer fortgesetzten Neoangiogenese (Bergers und Benjamin, 2003; Carmeliet, 2005; Jain, 2003).

### **1.4.3 VEGF als prognostischer Marker**

Die Datenlage zu VEGF als Marker mit prognostischer Signifikanz ist widersprüchlich. Hierin unterscheidet sich VEGF von Mitgliedern des PAS, bei denen ein signifikanter prognostischer Wert gesichert ist. Kyzas et al. wiesen für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region eine Korrelation zwischen VEGF-Expression in Tumorbiopsien und schlechterem Überleben bzw. aggressiverem Phänotyp nach (Kyzas et al., 2005). Ähnliche Zusammenhänge ließen sich auch bei weiteren Tumorentitäten identifizieren, darunter mehrere gynäkologische Krebserkrankungen (Frumovitz und Sood, 2007; Gasparini et al., 1997) sowie bei Kolonkarzinomen (Cao et al., 2009), Pankreaskarzinomen (Ikeda et al., 1999) und Adenokarzinomen der Lunge (Shibusu et al., 1998). Die Datenlage zu VEGF ist jedoch komplexer. So zeigten andere Studien zu den oben genannten Tumorentitäten keinen signifikant prognostischen Wert für VEGF (Decaussin et al., 1999; Ellis et al., 1998; Lee et al., 2009).

## **1.5 Zusammenhang von PAS und VEGF**

Für eine effektive Tumorprogression und Metastasierung sind sowohl die Funktionen des PAS als auch des VEGF essenziell. Ein gut aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel dieser beiden Systeme ist im Rahmen dieses pathologischen Prozesses notwendig. Zwischen beiden Systemen bestehen Zusammenhänge und gegenseitige Regulationsmechanismen. Pepper et al. konnten dies bereits 1991 beweisen. Sie zeigten, dass VEGF in der Lage ist, sowohl die uPA- als auch die PAI-1-Expression zu induzieren (Pepper et al., 1991). Ebenso wird uPAR unter VEGF-Einfluss vermehrt exprimiert (Mandriota et al., 1995). Weiterhin besitzt VEGF die Fähigkeit, die Aktivierung von pro-uPA zu induzieren. Über die Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase Signalkaskade wird eine Konformationsänderung von Integrinen hervorgerufen. Dies führt zu einer Aktivierung



**Abb. 1-4\*:** Schematische Darstellung der Effekte von VEGF auf das PAS: Aktivierung von an uPAR gebundenem pro-uPA, LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose des uPAR-uPA-PAI-1-Komplexes, Recycling von uPAR. Induktion der uPA- und PAI-1-Expression (nicht dargestellt) (Binder et al., 2007).

\*Reprinted by permission from Schattauer: *Thromb Haemost.* 2007; 97: 336–342

von integrinassoziertem pro-MMP-2. MMP-2 vermag wiederum, an uPAR gebundenes pro-uPA in die aktive Form uPA zu überführen (Prager et al., 2004).

Auf der anderen Seite ist PAI-1 als ein Vertreter des PAS in der Lage, die VEGF-Expression zu stimulieren (Hjortland et al., 2004). uPA kann indirekt über die Aktivierung der Protease Plasmin extrazellulär gebundenes VEGF freisetzen (Park et al., 1993). Die Hemmung von uPA mittels siRNA bewirkt eine Erniedrigung der VEGF-Freisetzung (Kong et al., 2007).

Wie VEGF ist auch PAI-1 maßgeblich an der Neoangiogenese beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass bei PAI-1-defizienten Nacktmäusen das Fehlen von PAI-1 zu einer stark reduzierten Tumorneoangiogenese führt (Bajou et al., 1998; Devy et al., 2002; Maillard et al., 2005). Es ist jedoch nicht vollständig geklärt, auf welchem Weg PAI-1 die Angiogenese beeinflusst. Für eine optimale Zellinvasion ist eine Balance zwischen Proteasen und Inhibitoren, wie PAI-1, notwendig. Hypothetisch kann die Rolle von PAI-1 im Rahmen der Angiogenese hauptsächlich darin bestehen, einer übermäßigen Plasminproduktion durch Hemmung von uPA und einem darauffolgenden überschießenden Abbau der ECM entgegenzuwirken (Bajou et al., 2001). Eine weitere Rolle könnte PAI-1 bei der Steuerung der komplexen Interaktionen zwischen uPAR, Integrinen und Vitronectin zukommen. Dadurch könnten Adhäsions-, Migrations- und Wachstumseigenschaften von Endothelzellen reguliert werden (Pepper, 2001).

Es gibt bislang nur wenige Studien, die den Zusammenhang von Komponenten des PAS und VEGF auf ihre prognostische Signifikanz untersucht haben. Bislang lässt sich nur aus einigen wenigen Studien auf eine schlechtere Prognose bei erhöhten Werten des PAS in Kombination mit hohen VEGF-Werten schließen (Konno et al., 2001; Linderholm et al., 2008; Meo et al., 2004).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit untersucht die Auswirkungen von Bestrahlung auf die Sekretion von PAI-1 und VEGF und dient der Charakterisierung der Proliferationsgeschwindigkeit und der Strahlenresistenz in sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region *in vitro*. Es galt auf experimentellem Wege folgende Fragen zu klären:

- Unterscheiden sich die sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region bezüglich ihrer Strahlenresistenz *in vitro* von der in früheren Studien untersuchten Strahlenresistenz *in vivo*?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der basalen PAI-1- oder VEGF-Sekretion der sechs Zelllinien und ihrer Strahlenresistenz?
- Welchen Einfluss hat die Bestrahlung auf die Sekretion von PAI-1 und VEGF? Lässt sich ein Zusammenhang mit der *in-vitro*-Strahlenresistenz der einzelnen Zelllinien identifizieren?
- Können aufgrund dieser Ergebnisse Marker abgeleitet werden, anhand derer ein Ansprechen auf eine Strahlentherapie vorhergesagt werden kann?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Methoden der Zellkultur

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien

Sechs etablierte Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf- und Halsbereichs wurden für die *in-vitro*-Versuche verwendet (Yaromina et al., 2007). Es handelte sich dabei im einzelnen um die Zelllinien UT-SCC-5, UT-SCC-14, UT-SCC-15, FaDu, SAS und XF354. Die Zelllinien UT-SCC-5, UT-SCC-14 und UT-SCC-15 (University Turku Squamous Cell Carcinoma 5, 14 und 15) stammen aus dem Labor von Prof. Grénman der Universität Turku, Finnland. Die anderen drei verwendeten Zelllinien wurden wie folgt erworben: SAS von Health Science Research Resources Bank der Japan Health Sciences Foundation, FaDu von American Type Culture Collection, Rockville, MD und XF354 vom Deutschen Krebsforschungszentrum.

Die Zelllinie UT-SCC-15 wurde aus einem gut differenzierten (G1) Primärtumor der Zunge eines 51-jährigen Mannes isoliert. UT-SCC-14 stammt von einem mäßig differenziert wachsendem (G2) Rezidivtumor der Zunge, der nach Operation und Bestrahlung einem 25-jährigen Mann entnommen wurde. Bei UT-SCC-5 handelt es sich um eine mäßig differenzierte Lymphknotenmetastase eines Zungentumors eines 58-jährigen Mannes. Die Zellen der FaDu-Zelllinie stammen aus einem schlecht differenziert wachsendem (G3) Primärtumor des Hypopharynx eines 56-jährigen Mannes. Bei XF354 handelt es sich um Zellen einer Lymphknotenmetastase eines gut differenzierten (G1) Tumors im Mundbodenbereich eines 51-jährigen Mannes. SAS-Zellen sind wiederum isoliert aus einem schlecht differenzierten (G3) Primärtumor der Zunge.

Alle sechs Zelllinien unterscheiden sich bezüglich ihrer Strahlenresistenz. Die Strahlenresistenz lässt sich anhand des  $TCD_{50}$ -Wertes (tumor control dose 50%) charakterisieren. Die  $TCD_{50}$  wird definiert als Strahlendosis, die bei *in-vivo*-Xenografttumoren der Maus benötigt wird, um in 50% der bestrahlten Tumoren eine lokale Kontrolle des Tumors zu erreichen. Die  $TCD_{50}$ -Werte der sechs verwendeten Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Baumann (OncoRay Dresden) ermittelt. Sie lassen sich bezüglich ihrer Strahlenresistenz in drei verschiedene Kategorien einteilen. XF354 und UT-SCC-14 weisen eine niedrige Strahlenresistenz auf. Mit einer intermediären Strahlenresistenz bilden FaDu und UT-SCC-15 die mittlere Gruppe. SAS und UT-SCC-5 sind dagegen durch eine hohe Strahlenresistenz gekennzeichnet (Yaromina et al., 2006; Yaromina et al., 2007). Die nachfolgende Tabelle (Tab. 2-1) stellt die Strahlenresistenz der verschiedenen Zelllinien anhand der  $TCD_{50}$ -Werte dar.

**Tab. 2-1:** TCD<sub>50</sub>-Werte der sechs Tumorzelllinien (Yaromina et al., 2007)

Zelllinie	<i>in-vivo</i> -Strahlenresistenz (TCD <sub>50</sub> ) (Gy)
XF354	47,4
UT-SCC-14	52,1
UT-SCC-15	78,1
FaDu	85,2
UT-SCC-5	117,2
SAS	126,7

### 2.1.2 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO® DMEM, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem Kulturmedium wurden 10% fetales Kälberserum (FCS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 0,05 mg/ml Penicillin, 0,05 mg/ml Streptomycin und 0,1 mg/ml Neomycin (PSN, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Zur Passagierung wurden anhaftende Zellen mit PBS (GIBCO® PBS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gespült und mit Trypsin (GIBCO® Trypsin, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) abgelöst. Je nach Verwendungszweck wurde eine definierte Anzahl an Zellen mit frischem Medium versetzt und erneut ausgesät. Zur Quantifizierung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Um eine Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen zu ermöglichen, wurde die Zellsuspension zuvor im Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau gefärbt.

### 2.1.3 Proliferation

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des AlamarBlue® Assay bestimmt. Diese Methode basiert auf der Detektion einer metabolischen Aktivität. AlamarBlue® (Biosource-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) enthält den Redoxindikator Resazurin. Dieser wird durch metabolisch aktive Zellen zu Resorufin reduziert. Durch diese Reaktion entsteht aus dem blauen und nicht fluoreszierenden Resazurin das farbene und stark fluoreszierende Resorufin. Fluoreszenz als auch Farbumschlag können zur Quantifizierung der Proliferation herangezogen werden. AlamarBlue® hat kaum toxische Einflüsse auf lebende Zellen und zeigte bislang auch keine karzinogene Potenz. Somit ist AlamarBlue® gut zur Messung der Zellproliferation *in vitro* geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur der AlamarBlue® Assay zur Messung der Zellproliferation herangezogen. Der etablierte Koloniebildungsassay

kam für dieses Projekt nicht in Frage, da nicht alle der sechs untersuchten Zelllinien Kolonien bilden.

Die Proliferationsmessungen wurden in 96-Loch-Platten durchgeführt. Hierfür wurden Zellen auf diesen Platten ausgesät. Für jede Zellreihe wurde in Vorversuchen die ideale Zellzahl, bei der sich die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum in der Phase exponentiellen Wachstums befanden, ermittelt. Diese Zellzahl betrug bei XF354, SAS, UT-SCC-14, UT-SCC-5 und FaDu 1000 Zellen pro Loch, bei UT-SCC-15 2000 Zellen pro Loch. In Vorversuchen wurden zudem die optimalen Messzeitpunkte für die Zellproliferation bestimmt. Dies hatte zum Ziel, ein exponentielles Wachstum der Zellen sowie eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Zelllinien zu ermöglichen. Als optimale Messzeitpunkte stellten sich Tag 1, 4, 5 und 6 nach Aussaat der Zellen heraus. Die jeweils genannte Zellzahl pro Loch wurde in 96-Loch-Platten ausgesät und 24 h nach Aussaat - entsprechend Tag 1 - am Röntgengerät RT-100 (Philips, Hamburg, Deutschland) mit jeweils 0, 2, 6 oder 10 Gy bestrahlt. Die Messung der Zellproliferation erfolgte direkt im Anschluss an die Bestrahlung an Tag 1 sowie an den Tagen 4, 5 und 6. Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde pro Well 10 µl AlamarBlue® Lösung zugegeben und nach 6 h Inkubationszeit die Absorption bei 570 nm mit einem ELISA-Reader (BioTek EL808, Firma BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt. Es wurden dabei Mehrfachwerte (n=3) erhoben und gemittelt. Als Referenz diente DMEM ohne Zellen.

#### **2.1.4 Probengewinnung für PAI-1- und VEGF-ELISA**

Ein Ziel dieses Projektes stellte die Bestimmung der PAI-1- und VEGF-Sekretion sowie die Bestimmung des Anteils der überlebenden Zellen nach Bestrahlung dar. Hierfür wurden Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Wiederum wurde in Vorversuchen für jede Zelllinie die optimale Zellzahl, bei welcher ein exponentielles Wachstum über den gesamten Versuchsverlauf gewährleistet werden konnte, ermittelt. Eine Zahl von 100 000 Zellen pro Loch bewährte sich für XF354, FaDu, UT-SCC-14 und UT-SCC-5. Für SAS war eine Zahl von 50 000 Zellen pro Loch sowie für UT-SCC-15 eine Zahl von 200 000 Zellen pro Loch nötig. Nach Aussaat wurden die Zellen über Nacht zur Adhäsion inkubiert und am Folgetag mit jeweils 0, 2, 6 oder 10 Gy bestrahlt. Die Zellüberstände wurden jeweils 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung abpipettiert und 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. 1,5 ml des zentrifugierten Überstandes wurden für eine spätere Bestimmung von PAI-1 und VEGF bei -80°C eingefroren. Das Zellpellet wurde nicht verworfen. Die auf den Platten adhärent gebliebenen Zellen wurden mit 500 µl Trypsin pro Loch abgelöst, mit frischem Medium versorgt und mit dem bereits abzentrifugierten Pellet in 10 ml Röhrchen zusammengeführt. Die Röhrchen wurden anschließend erneut 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und der

Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in einer definierten Menge PBS resuspendiert. Zur Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen wurde wiederum mit Trypanblau gefärbt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur Auswertung wurden jeweils Überstände und Zellzahlen zweier Löcher gepoolt.

## 2.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der sechs Zelllinien erfolgte am Röntgengerät RT-100 (Philips, Hamburg, Deutschland). Die für die jeweilige Dosis erforderliche genaue Bestrahlungszeit wurde vor jeder Bestrahlung mittels Dosimetrie ermittelt. Des Weiteren diente die Dosimetrie zur Qualitätskontrolle der Stabilität des Röntgengerätes und weiterhin dazu, eine identische Bestrahlungsdosis während der an unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Experimente zu gewährleisten. Für die Dosimetrie wurde eine Ionisationskammer sowie ein Elektrometer (Dosimeter, Physikalisch-technische Werkstätten (PTW), Freiburg, Typ: PTW-SN4) verwendet. Die Ionisationskammer wurde in einem Zellkulturgefäß auf eine 1cm dicke Plexiglasplatte gelegt und mit dem Elektrometer verbunden (siehe Abb. 2-1). Es wurden drei Messungen mit jeweils unterschiedlicher Lage der Ionisationskammer im Strahlenfeld durchgeführt: Bei der ersten Messung in der Mitte des Strahlenfeldes, bei der zweiten am Oberrand und bei der dritten Messung am Unterrand eines Feldes der Größe einer 96-Loch-Platte. Die Bestrahlungsdauer pro Lage wurde mit je 5 Minuten gewählt. Ein Mittelwert der Bestrahlungsdosis dieser drei Bestrahlungen wurde gebildet und daraus die Bestrahlungsdosis pro Minute ermittelt. Um die genaue Bestrahlungsdosis zu ermitteln, war eine Korrektur der Unterschiede der Luftdichte zwischen der Ionisationskammer und ihrer Umgebung vorzunehmen. Hierzu verwendet man den Faktor K. In diesen Faktor gehen Luftdruck und Temperatur nach folgender Formel ein:

$$K = \frac{p_0 \times T}{p \times T_0}$$

$p_0$  : Luftdruck unter Standardbedingungen 1013 hPa

$p$ : Aktueller Luftdruck

$T_0$  : Temperatur unter Standardbedingungen 293 K (= 20°C)

$T$  : Aktuelle Raumtemperatur

Der aktuelle Luftdruck ( $p$ ) wurde von der Internetseite des meteorologischen Instituts München (<http://www.meteo.physik.uni-muenchen.de>) abgefragt.

Unter Berücksichtigung des variierenden Korrekturfaktors K wurde die Dosis wie folgt errechnet ( $D_{\text{mess}}$  : Mittelwert der drei Messungen in mGy/min):

$$D = D_{\text{mess}} \times K$$

Die notwendige Bestrahlungszeit für 2, 6 und 10 Gy wurde mit Hilfe dieses errechneten D-Wertes festgelegt. Die Tabelle 2-2 zeigt die anhand aller durchgeführten Dosimetrien ermittelten mittleren Bestrahlungszeiten für die unterschiedlichen Dosen.

**Tab. 2-2:** Mittlere Bestrahlungszeiten

<b>Dosis (Gy)</b>	<b>Bestrahlungszeit (min)</b>
1	0,96
2	1,92
6	5,76
10	9,60

Mittels entsprechender Abstandshalter wurden die zu bestrahlenden 96- oder 6-Loch-Platten auf die exakt gleiche Ebene mit dem Fenster der Ionisationskammer gebracht (siehe Abb. 2-1). Um für alle Zellkulturen gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden alle Zellkulturen einer Versuchsreihe – sowohl unbestrahlte als auch bestrahlte – zum gleichen Zeitpunkt aus dem Inkubationssystem entnommen und nach Abschluss der Bestrahlung dorthin zurückgebracht.

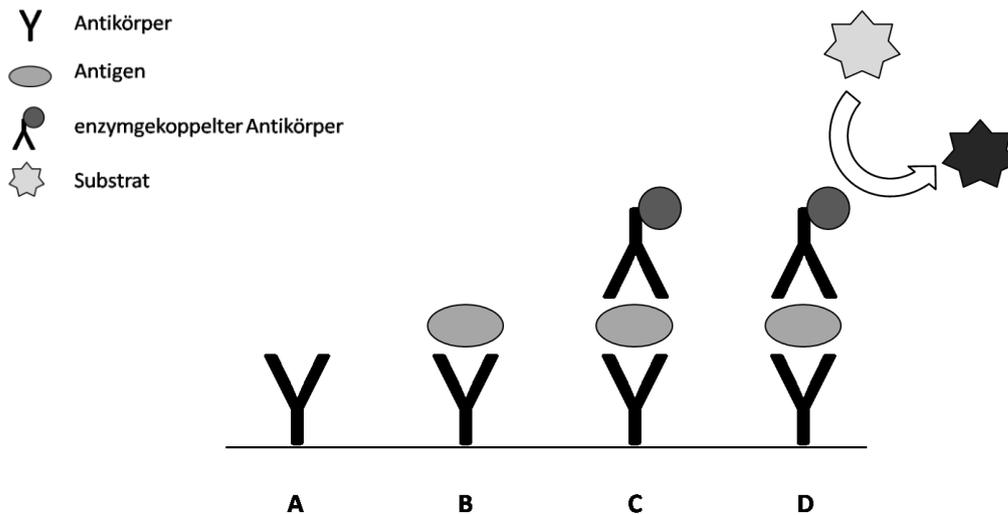


**Abb. 2-1:** Versuchsaufbau zur Bestrahlung am RT-100. Das linke Bild zeigt den Aufbau bei der Dosimetrie, die Ionisationskammer liegt in einem leeren Zellkulturgefäß und wird darauf fixiert. Das rechte Bild zeigt den Aufbau bei Bestrahlung der Zellen. Der Boden des Zellkulturgefäßes und das Fenster der Ionisationskammer befinden sich auf einer Höhe.

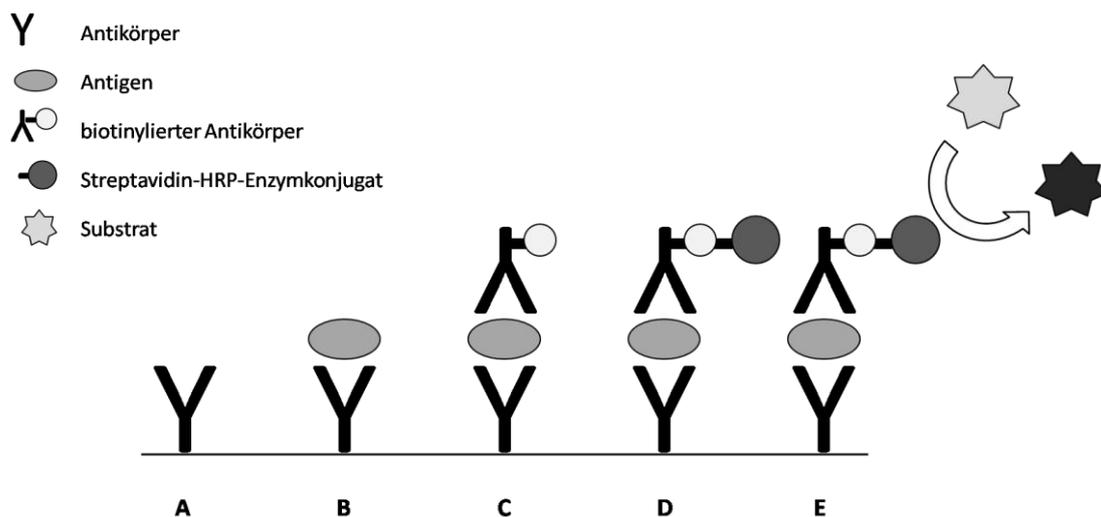
## 2.3 ELISA

### 2.3.1 Double-Antibody-Sandwich-ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Zur Quantifizierung von VEGF wurde ein Detektions-Antikörper eingesetzt, der bereits enzymgekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert nach Zugabe eines chromogenen Substrats eine Farbreaktion (Abb. 2-2). Für die Messung von PAI-1 wurde ein anderes Prinzip verwendet. An Stelle einer primären Enzymaktivität ist hier der Detektions-Antikörper biotinyliert. Ein Enzymkonjugat aus Streptavidin und Meerrettichperoxidase bindet an das Biotin des Antikörpers. Analog zum VEGF-ELISA setzt auch hier die Enzymaktivität ein chromogenes Substrat um. Es entsteht ein quantifizierbarer Farbstoff (Abb. 2-3). Zur Steigerung der Sensitivität dieses Nachweisverfahrens wird die Reaktion in beiden Fällen nach einer definierten Zeit mittels Schwefelsäure gestoppt. Die Farbintensität wird in einem ELISA-Reader bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Hierdurch lässt sich die Antigenkonzentration quantifizieren.



**Abb. 2-2:** Funktionsprinzip des VEGF-ELISA. **A** Mit coating-AK beschichtete Mikrotiterplatte. **B** Antigen bindet an AK. **C** Zugabe des enzymgekoppelten Detektionsantikörpers. **D** Zugabe des chromogenen Substrats und anschließend Messung des Farbumschlags.



**Abb. 2-3:** Funktionsprinzip des PAI-1-ELISA. **A** Mit coating-AK beschichtete Mikrotiterplatte. **B** Antigen bindet an AK. **C** Zugabe des biotinylierten Detektionsantikörpers. **D** Zugabe des Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Enzymkonjugats. **E** Zugabe des chromogenen Substrats (Tetramethylbenzidin) und anschließend Messung des Farbumschlags.

### 2.3.2 PAI-1 – ELISA

Zur Bestimmung von PAI-1 standen bereits vorgefertigte, kommerziell erhältliche mit PAI-1-Antikörper beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatten zur Verfügung (IMUBIND® Tissue PAI-1 ELISA Kit, Product No. 821, American Diagnostica, Stamford, CT, USA). An Tag 1 wurden pro Loch wahlweise 100 µl PAI-1-Standard oder verdünnter Überstand aus den unter 2.1.3 beschriebenen Versuchen eingebracht. Die Platten wurden über Nacht in einer feuchten

Kammer bei 4 °C inkubiert. An Tag 2 wurden die Platten vier Mal mit Waschpuffer (0,1% Triton X-100 in PBS) gewaschen. Anschließend folgte das Auftragen von 100 µl des Nachweis-Antikörpers pro Loch und eine Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte erneut ein viermaliges Waschen mit Waschpuffer. Daraufhin wurden pro Loch 100 µl des verdünnten Enzym-Konjugats zugegeben und erneut 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte nach erneutem viermaligem Waschen mit Waschpuffer die Zugabe von 100 µl Substratlösung pro Loch und wiederum wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Durch die Enzymaktivität kam es in dieser Phase zu einer bläulichen Farbreaktion. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung (0,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Loch unterbrochen. Unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung erfolgte die Messung der Lichtabsorption in einem ELISA-Lesegerät (BioTek EL808, Firma BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Ausgehend von einer ebenfalls kommerziell erhältlichen Standardreihe wurden die PAI-1-Konzentrationen ermittelt. Aus den gemessenen PAI-1-Konzentrationen wurden die absoluten sezernierten PAI-1-Mengen (ng) errechnet, zu den ebenfalls gemessenen Zellzahlen in Relation gesetzt und zur Standardisierung rechnerisch auf 10<sup>6</sup> Zellen bezogen.

### 2.3.3 VEGF-ELISA

Zur Quantifizierung von VEGF standen bereits vorgefertigte, kommerziell erhältliche mit VEGF-Antikörper beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatten zur Verfügung (Quantikine® Human VEGF Immunoassay, Kat.Nr. DVE00, SVE00, PDVE00, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Zu Beginn wurden pro Loch 50 µl des „Assay diluent“ auf die Platte aufgetragen. Anschließend wurden 200 µl Standard oder verdünnte Probe aus den Überständen der unter 2.1.3 beschriebenen Versuche aufgetragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde drei Mal mit Waschpuffer (0,1% Triton X-100 in PBS) gewaschen. Je Loch wurden 200 µl des Enzymkonjugats zugegeben und das Reaktionsgemisch erneut zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurde drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und pro Loch 200 µl Substratlösung aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Loch beendet. Unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung erfolgte die Messung der Lichtabsorption in einem ELISA-Lesegerät (BioTek EL808, Firma BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Ausgehend von einer ebenfalls kommerziell erhältlichen Standardreihe wurden die VEGF-Konzentrationen ermittelt. Aus den gemessenen VEGF-Konzentrationen wurden die absoluten sezernierten VEGF-Mengen (ng) errechnet, zu den

ebenfalls gemessenen Zellzahlen in Relation gesetzt und zur Standardisierung rechnerisch auf  $10^6$  Zellen bezogen.

## 2.4 Zusätzliche Materialien

Tab. 2-3: Weitere verwendete Materialien

<b><u>ELISA-Kits:</u></b>	
IMUBIND Tissue PAI-1 ELISA Kit # 821	American Diagnostica, Stamford, CT, USA
Quantikine® Human VEGF Immunoassay, # DVE00, SVE00, PDVE00	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
<b><u>Geräte:</u></b>	
Dosimeter PTW-SN4	Physikalisch-technische Werkstätten, Freiburg, Deutschland
ELISA-Reader BioTek EL808	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Inkubator, BB 6060 CuO2	Heraeus Thermo Scientific, Hanau, Deutschland
Laminarflow Werkbank Lamin Air LB48L	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ohaus AS60 Analytical Standard Waage	Ohaus, Pine Brook, NJ, USA
Röntgengerät RT-100	Philips, Hamburg, Deutschland
Schüttelapparat mit Kreisbewegungen GFL-3017	hilab.de, E. Baghini, Düsseldorf, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Mikro 22 R	Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland
<b><u>Lösungen, Medien, Puffer:</u></b>	
DMEM, PBS, PSN, TBS, Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
AlamarBlue	Biosource-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
BSA	Vector, Burlingame, CA, USA
<b><u>Pipetten:</u></b>	
Biohit Proline 50 Mehrkanalpipette 300 µl	Biohit Deutschland, Rosbach v. d. Höhe, Deutschland
Eppendorf Combitips plus 0,1 ml, 1 ml, 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen 0,5-20 µl, 20-300 µl, 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Pipette 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Glaspipette Serological Pipet 1 ml, 2 ml, 5 ml, 20 ml, 50 ml	Becton Dickinson France S.A.S BD, Le Pont-de-Claix, Frankreich
Sarstedt Pipettenspitzen 200 µl gelb	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

<b><u>Zellkulturmaterial:</u></b>	
B. Braun Omnifix 50 ml Spritze	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 / 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Standard Reaktionsgefäß 3810 X 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon BlueMax 50 ml conical tube	Becton Dickinson France S.A.S BD, Le Pont-de-Claix, Frankreich
Nalgene Cryoware Cryogenic Vials	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Sempercure Edition Handschuhe	Semperit Technische Produkte, Wien, Österreich
TPP Zentrifugenröhrchen 15 ml konisch	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen Corning 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> Flask	Corning, Corning, NY, USA
Zellkultur-Testplatten 6 well	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkultur-Testplatten 96 well	Biochrom, Berlin, Deutschland

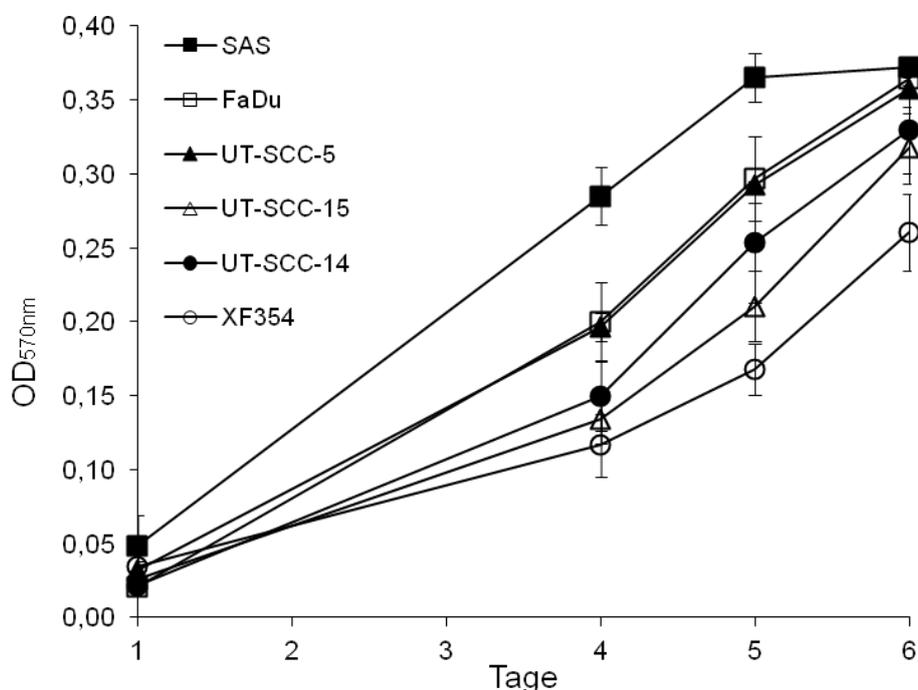
## 2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA). Zum Vergleich der Sekretionswerte ohne Bestrahlung und nach jeweils unterschiedlicher Bestrahlungsdosis wurde der Student's T-Test verwendet. Der Pearson Koeffizient (r) und die lineare Regressionsanalyse wurden angewendet, um Korrelationen zwischen basaler PAI-1- bzw. VEGF-Sekretion und Strahlenresistenz sowie bestrahlungsinduzierter PAI-1- und VEGF-Sekretion nachzuweisen. Als Signifikanzniveaus wurden folgende Werte definiert: Ein Wert von  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen, Werte von  $p > 0,05$  hingegen als nicht signifikant. In den Abbildungen dieser Arbeit sind die im T-Test ermittelten signifikanten Änderungen der PAI-1- und VEGF-Sekretion wie folgt dargestellt: Signifikante Werte ( $p \leq 0,05$ ) werden mit einem Stern (\*), besonders signifikante ( $p \leq 0,01$ ) mit zwei Sternen (\*\*) und höchst signifikante ( $p \leq 0,001$ ) mit drei Sternen (\*\*\*) gekennzeichnet. Die Abbildungen und Tabellen wurden mittels Word 2007®, Excel 2007® und PowerPoint 2007® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Proliferative Aktivität ohne Bestrahlung

Die Wachstumsrate der sechs Tumorzelllinien wurde mit Hilfe des AlamarBlue® Assay bestimmt. Diese Messmethode bestimmt die metabolische Aktivität der Zellen. Aus dem metabolischen Umsatz kann auf die proliferative Aktivität geschlossen werden. Die folgende Abbildung zeigt die Proliferationsraten der sechs Zelllinien ohne Bestrahlung an Tag 1, 4, 5 und 6 (Abb. 3-1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Mit abgebildet ist der Standardfehler des Mittelwerts (= MW  $\pm$  SEM).



**Abb. 3-1:** Proliferative Aktivität der sechs unbestrahlten Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region an Tag 1, 4, 5 und 6 nach Aussaat; ermittelt anhand des AlamarBlue® Assay ( $OD_{570nm}$  = optische Dichte (Absorption) bei 570 nm)

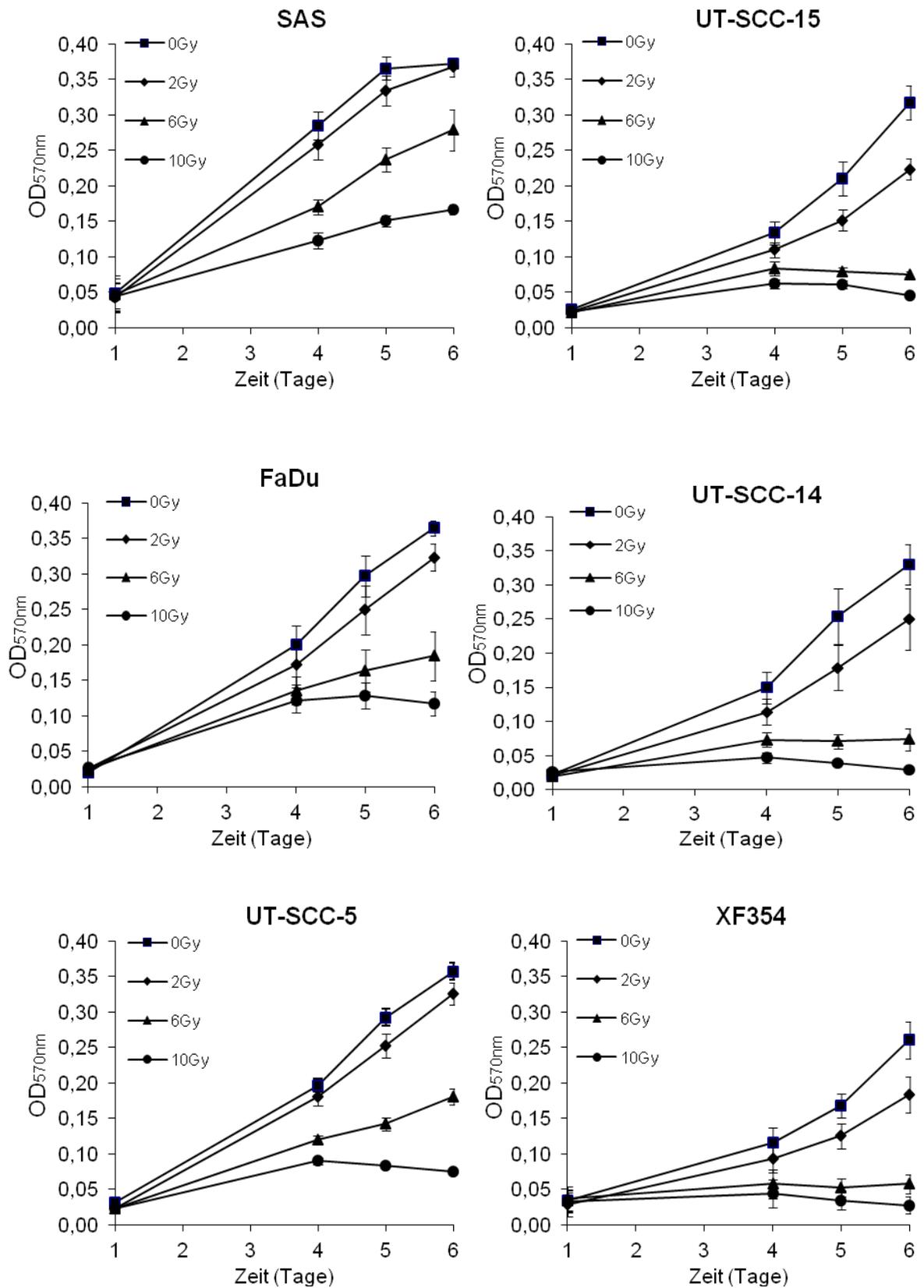
Zu erkennen ist die Variabilität des Wachstumsverhaltens der sechs Zelllinien. XF354 stellt die Zelllinie mit der langsamsten Wachstumsrate dar, SAS wächst dagegen besonders schnell. FaDu und UT-SCC-5 zeigen beide eine hohe Proliferationsgeschwindigkeit mit einem fast identischen Wachstumsverhalten. Ihre Proliferationsgeschwindigkeit liegt dennoch deutlich unter der von SAS. Eine mittlere Wachstumsgeschwindigkeit zeigt die Zelllinie UT-SCC-14. Es folgt UT-SCC-15 mit einer relativ langsamen Proliferationsgeschwindigkeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Unterschiede der Proliferationsraten aller Zelllinien am Tag 5 am deutlichsten ausgeprägt sind. Alle Zelllinien befinden sich zu diesem Zeitpunkt in einer Phase exponentiellen Wachstums. Dieser Zeitpunkt wurde daher für die Darstellung der Strahlensensibilität als besonders geeignet angesehen.

### **3.2 Proliferative Aktivität nach Bestrahlung**

Alle sechs Zelllinien wurden mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt und anschließend die Proliferationsraten bestimmt. Die Bestimmung erfolgte über sechs Tage mit Hilfe des AlamarBlue® Assay (Abb. 3-2). Die Bestrahlung erfolgte am Tag 1. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Proliferationsraten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert  $\pm$  SEM).

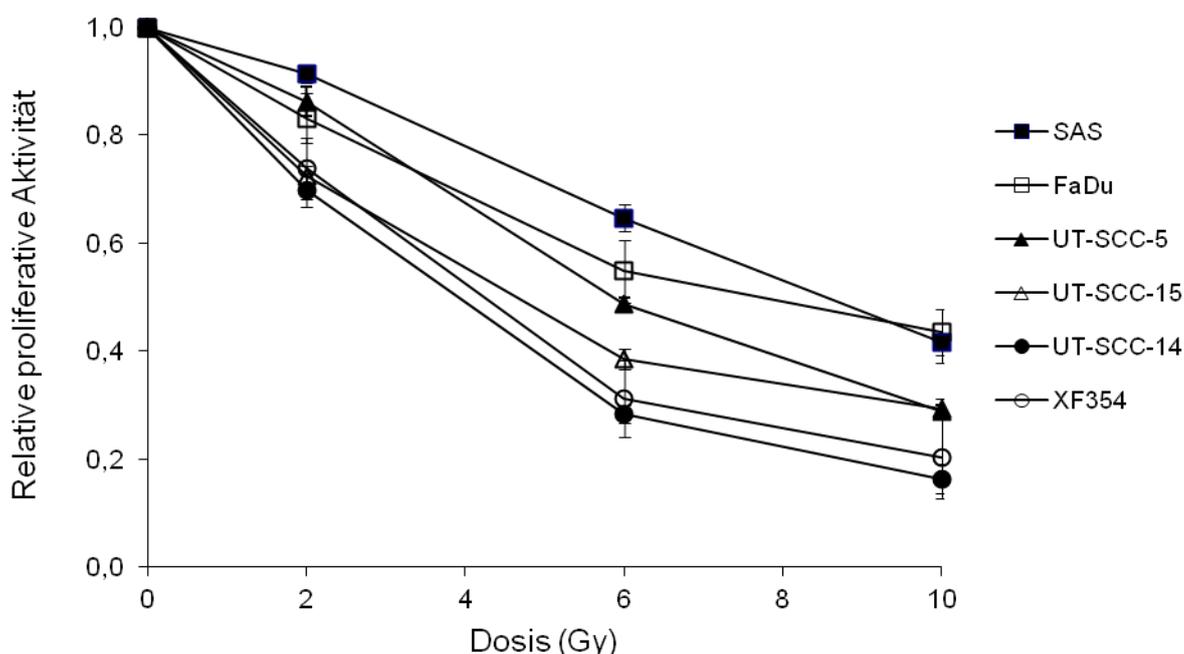
Die Ergebnisse zeigen eine für jede Zelllinie mit steigender Strahlendosis sinkende Proliferationsrate. Besonders deutlich ist dieser Effekt bei den Zelllinien XF354, UT-SCC-14 und UT-SCC-15 ausgeprägt. Hier kam es bereits nach einer Bestrahlung mit 6 Gy zu keinem weiteren Anstieg der Proliferationsrate an Tag 5 und 6. Die Zelllinien SAS, FaDu und UT-SCC-5 hingegen zeigten nach Bestrahlung mit 6 Gy auch an Tag 5 und 6 eine weiterhin steigende Proliferationsrate. Erst nach Bestrahlung mit 10 Gy kam es bei FaDu und UT-SCC-5 zu einer Stagnation der Proliferation an den Tagen 5 und 6. Die Zelllinie SAS zeigte im Gegensatz dazu ein unterschiedliches Wachstumsmuster mit selbst unter 10 Gy weiterhin steigender Proliferationsrate.



**Abb. 3-2:** Proliferative Aktivität nach Bestrahlung mit 0, 2, 6 oder 10 Gy. (OD<sub>570nm</sub> = optische Dichte (Absorption) bei 570 nm)

### 3.3 Strahlensensibilität

In Xenografttumoren der sechs Zelllinien wurde deren Strahlensensibilität *in vivo* ausführlich untersucht (Yaromina et al., 2007; Yaromina et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deren Strahlensensibilität *in vitro* geprüft. Am fünften Tag zeigte der Proliferationsassay ein exponentielles Wachstum. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Proliferation der bestrahlten und unbestrahlten Zelllinien bestimmt. Für die Ermittlung der relativen proliferativen Aktivität wurde der bestimmte Wert jeweils auf den 0 Gy Wert der jeweiligen Zelllinie bezogen. Durch diese Art der Darstellung kann aus der proliferativen Aktivität (bezogen auf den Nullpunkt) die Strahlensensibilität abgelesen werden. Die so ermittelte Strahlensensibilität der sechs Zelllinien ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 3-3). Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte der relativen proliferativen Aktivität aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert  $\pm$  SEM).



**Abb. 3-3:** Relative Strahlensensibilität der sechs Tumorzelllinien gemessen am Tag 5 nach Bestrahlung mit 0, 2, 6 oder 10 Gy; Proliferative Aktivität bezogen auf die jeweiligen Werte unbestrahlter Zellen.

*In vitro* zeigte die Zelllinie SAS die höchste Strahlenresistenz, ihr folgte an zweiter Stelle die Zelllinie FaDu. Als besonders strahlensensibel erwies sich die Tumorzelllinie UT-SCC-14. Ähnlich verhielt sich die Zelllinie XF354 mit jedoch leichtgradig geringerer Strahlensensibilität. Als intermediär strahlensensibel reihten sich die Zelllinien UT-SCC-15 und UT-SCC-5 ein. Die *in vitro* erhobenen Daten ermöglichen somit zusammengefasst folgende absteigende Aufreihung der Zelllinien bezüglich ihrer Strahlenresistenz beginnend

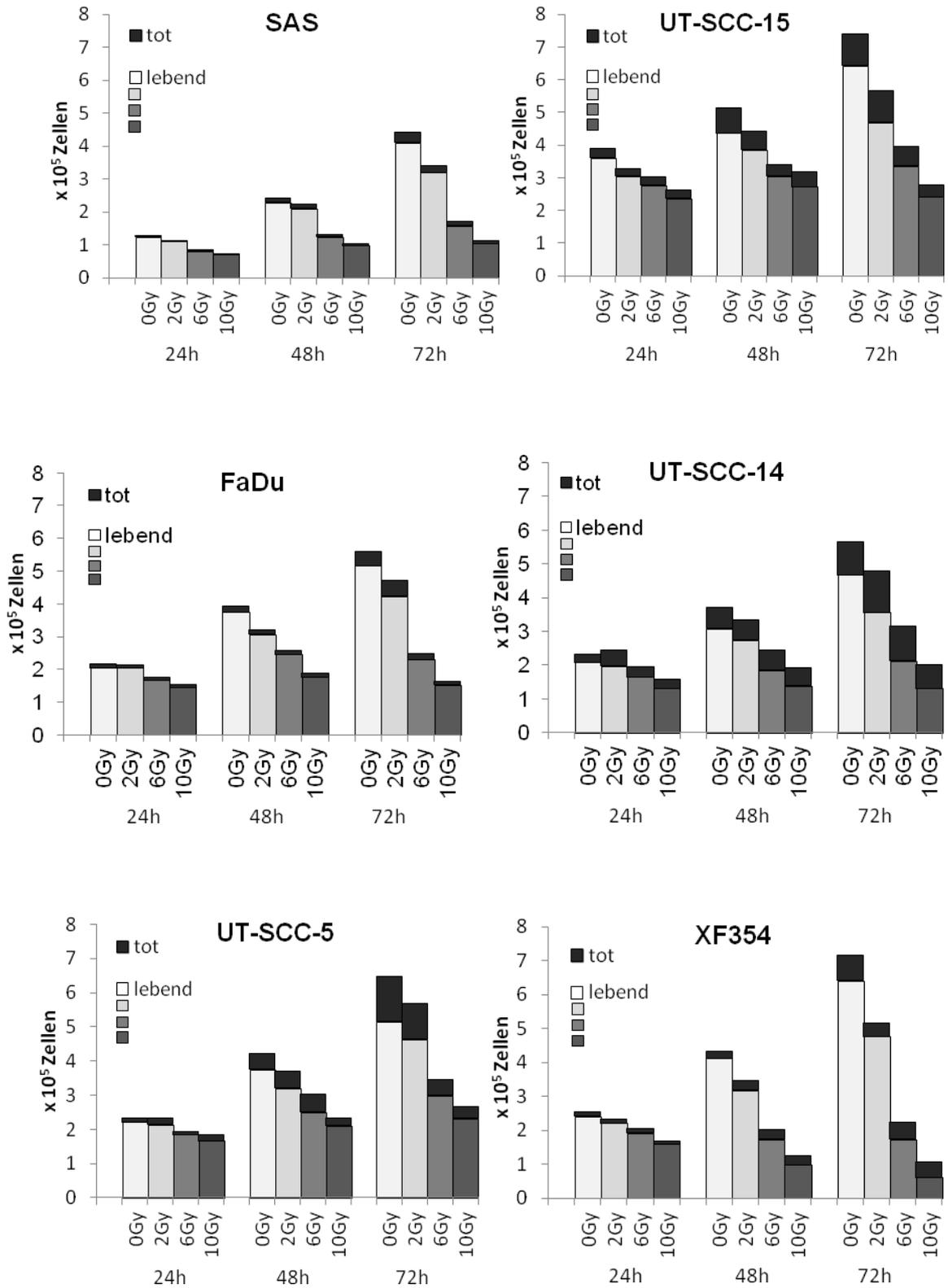
mit der strahlenresistentesten Zelllinie: SAS, FaDu, UT-SCC-5, UT-SCC-15, XF354, UT-SCC-14.

### **3.4 Entwicklung der Zellzahlen nach Bestrahlung**

Ein Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der PAI-1- und VEGF-Sekretion der Zelllinien nach Bestrahlung. Um die verschiedenen Zelllinien bezüglich ihrer basalen und durch Bestrahlung induzierten PAI-1- und VEGF-Sekretion zu vergleichen, musste die ermittelte Menge von PAI-1 und VEGF auf die jeweils an der Sekretion beteiligte Zahl an vitalen Zellen bezogen werden. Hierfür wurde für jede Zelllinie eine unterschiedliche, optimierte Zellzahl (siehe hierzu Material und Methoden) in 6-Loch-Platten ausgesät. Die 6-Loch-Platten wurden mit einer Dosis von 0, 2, 6 oder 10 Gy bestrahlt und die Zellzahl 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung bestimmt. Die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte hier mittels Färbung durch Trypanblau.

Abbildung 3-4 zeigt die Zellzahlen der sechs Tumorzelllinien 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0, 2, 6 oder 10 Gy. Es wird zwischen lebenden und toten Zellen differenziert. Es sind die Mittelwerte der Zellzahlen aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

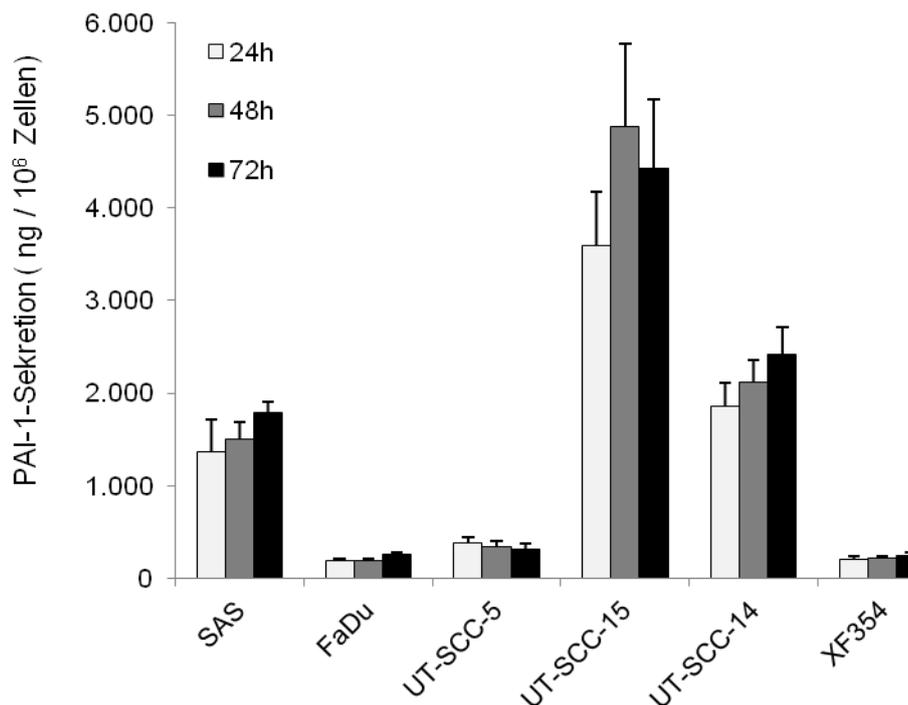
Jede Zelllinie zeigte eine dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums. Die Zunahme der Zellzahl pro Tag verringerte sich mit steigender Bestrahlungsdosis. Die Zellzahl der mit 10 Gy bestrahlten Zellen stieg kaum oder gar nicht an. Im Falle der Zelllinie XF354 nahm sie sogar stark ab. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl blieb bei allen Zelllinien - außer UT-SCC-14 und XF354 - unabhängig von der Bestrahlungsdosis nahezu auf dem Niveau unbestrahlter Zellen. Bei den besonders strahlensensiblen Zelllinien UT-SCC-14 und XF354 stieg der Anteil der toten Zellen mit der Bestrahlungsdosis und im Verlauf der Zeit nach Bestrahlung deutlich an.



**Abb. 3-4:** Zellzahlen 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0, 2, 6 oder 10 Gy. Differenzierung von toten und lebenden Zellen.

### 3.5 Basale PAI-1-Sekretion

Eine Vergleichbarkeit zwischen den Zelllinien wurde dadurch gewährleistet, dass die gemessenen PAI-1-Mengen jeweils auf die Zahl vitaler Zellen bezogen wurden. Die nachfolgende Abbildung zeigt die basalen PAI-1-Sekretionsmengen unbestrahlter Zellen in  $\text{ng}/10^6$  Zellen nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72 Stunden (Abb. 3-5). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der basalen PAI-1-Sekretion aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert  $\pm$  SEM).



**Abb. 3-5:** Basale PAI-1-Sekretion unbestrahlter Zellen in  $\text{ng}/10^6$  Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Aussaat

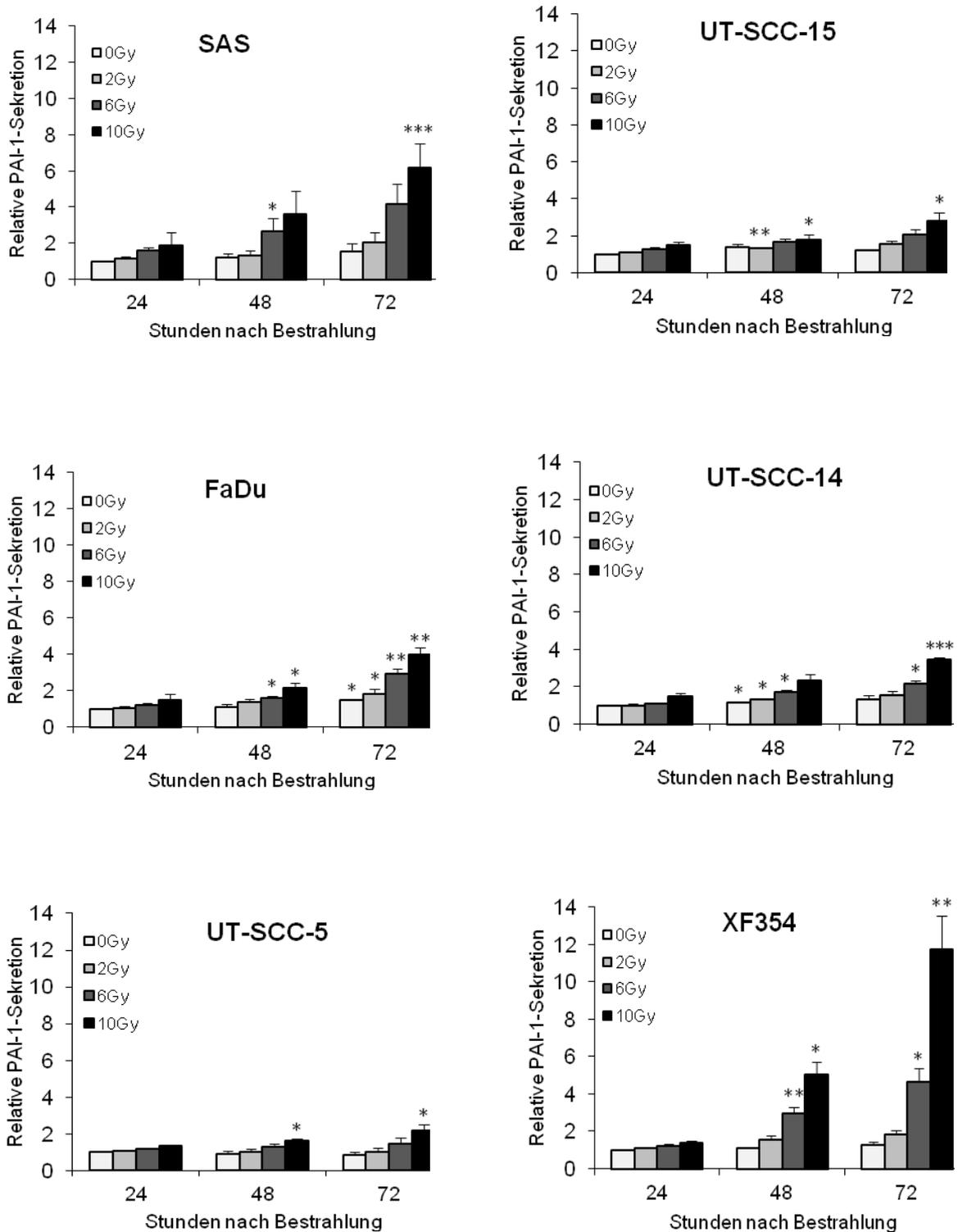
Die Zelllinien SAS, UT-SCC-15 und UT-SCC-14 sezernierten große Mengen an PAI-1. UT-SCC-15 zeigte dabei die höchste basale PAI-1-Sekretion. Darauf folgten UT-SCC-14 und SAS. Bei den Zelllinien FaDu, UT-SCC-5 und XF354 lag die PAI-1-Sekretion auf einem deutlich geringeren Niveau. In keiner Zelllinie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der PAI-1-Sekretion nach 72 h im Vergleich zum Wert nach 24 h.

### 3.6 Bestrahlungsinduzierte PAI-1-Sekretion

Alle Zelllinien wurden mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt und die PAI-1 Menge in ng/10<sup>6</sup> Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden ermittelt. Die gemessenen Werte wurden auf den Ausgangswert 0 Gy und 24 h bezogen und somit eine relative PAI-1-Sekretion im Bezug auf den Ausgangswert unbestrahlter Zellen dargestellt. Die folgende Abbildung zeigt die bestrahlungsinduzierte PAI-1-Sekretion der sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien (Abb. 3-6). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der bestrahlungsinduzierten PAI-1-Sekretion aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert ± SEM).

Alle sechs Zelllinien zeigten eine vergleichbare dosisabhängige Steigerung der PAI-1-Sekretion. Am stärksten war diese ausgeprägt bei XF354, gefolgt von SAS. Die niedrigste Sekretionssteigerung wies die Zelllinie UT-SCC-5 auf. FaDu, UT-SCC-14 und UT-SCC-15 zeigten eine Sekretionssteigerung auf ähnlichem Niveau. Die maximale Induktion der PAI-1-Sekretion wurde bei allen Zelllinien 72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy erreicht.

Die erhobenen Daten zur Induktion der PAI-1-Sekretion wurden mittels T-Test auf signifikante Veränderungen ( $p \leq 0,05$ ) zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen überprüft. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 3-1 dargestellt.



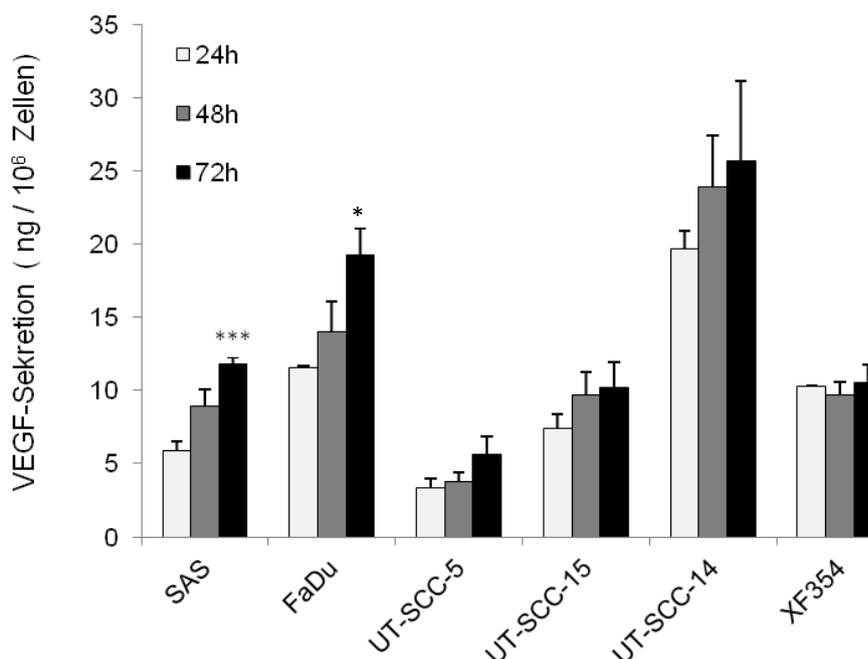
**Abb. 3-6:** Bestrahlungsinduzierte PAI-1-Sekretion der sechs Tumorzelllinien 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit 0, 2, 6, oder 10 Gy.  
\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

**Tab. 3-1:** Signifikanzniveaus (p-Werte) der Induktion der PAI-1-Sekretion von sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region ermittelt durch T-Test

SAS	0 - 0 Gy	2 - 0 Gy	6 - 0 Gy	10 - 0 Gy
24 h	-	0,420	0,074	0,212
48 h	0,632	0,299	<b>0,031</b>	0,064
72 h	0,474	0,205	0,064	<b>0,001</b>
FaDu				
24 h	-	0,624	0,126	0,18
48 h	0,542	0,077	<b>0,025</b>	<b>0,025</b>
72 h	<b>0,017</b>	<b>0,014</b>	<b>0,006</b>	<b>0,004</b>
UT-SCC-5				
24 h	-	0,464	0,124	0,063
48 h	0,538	0,914	0,248	<b>0,012</b>
72 h	0,433	0,97	0,241	<b>0,024</b>
UT-SCC-15				
24 h	-	0,088	0,234	0,118
48 h	0,092	<b>0,008</b>	0,084	<b>0,045</b>
72 h	0,058	0,056	0,062	<b>0,012</b>
UT-SCC-14				
24 h	-	0,855	0,166	0,104
48 h	<b>0,032</b>	<b>0,033</b>	<b>0,016</b>	0,056
72 h	0,223	0,119	<b>0,021</b>	<b>0,001</b>
XF354				
24 h	-	0,232	0,106	0,113
48 h	0,118	0,120	<b>0,006</b>	<b>0,026</b>
72 h	0,189	0,073	<b>0,042</b>	<b>0,004</b>

### 3.7 Basale VEGF-Sekretion

Eine Vergleichbarkeit zwischen den Zelllinien wurde dadurch gewährleistet, dass die gemessenen VEGF-Mengen jeweils auf die Zahl vitaler Zellen bezogen wurden. Die nachfolgende Abbildung zeigt die basalen VEGF-Sekretionsmengen unbestrahlter Zellen in  $\text{ng}/10^6$  Zellen nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72 Stunden (Abb. 3-7). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der basalen VEGF-Sekretion aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert  $\pm$  SEM).



**Abb. 3-7:** Basale VEGF-Sekretion unbestrahlter Zellen in  $\text{ng}/10^6$  Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Aussaat

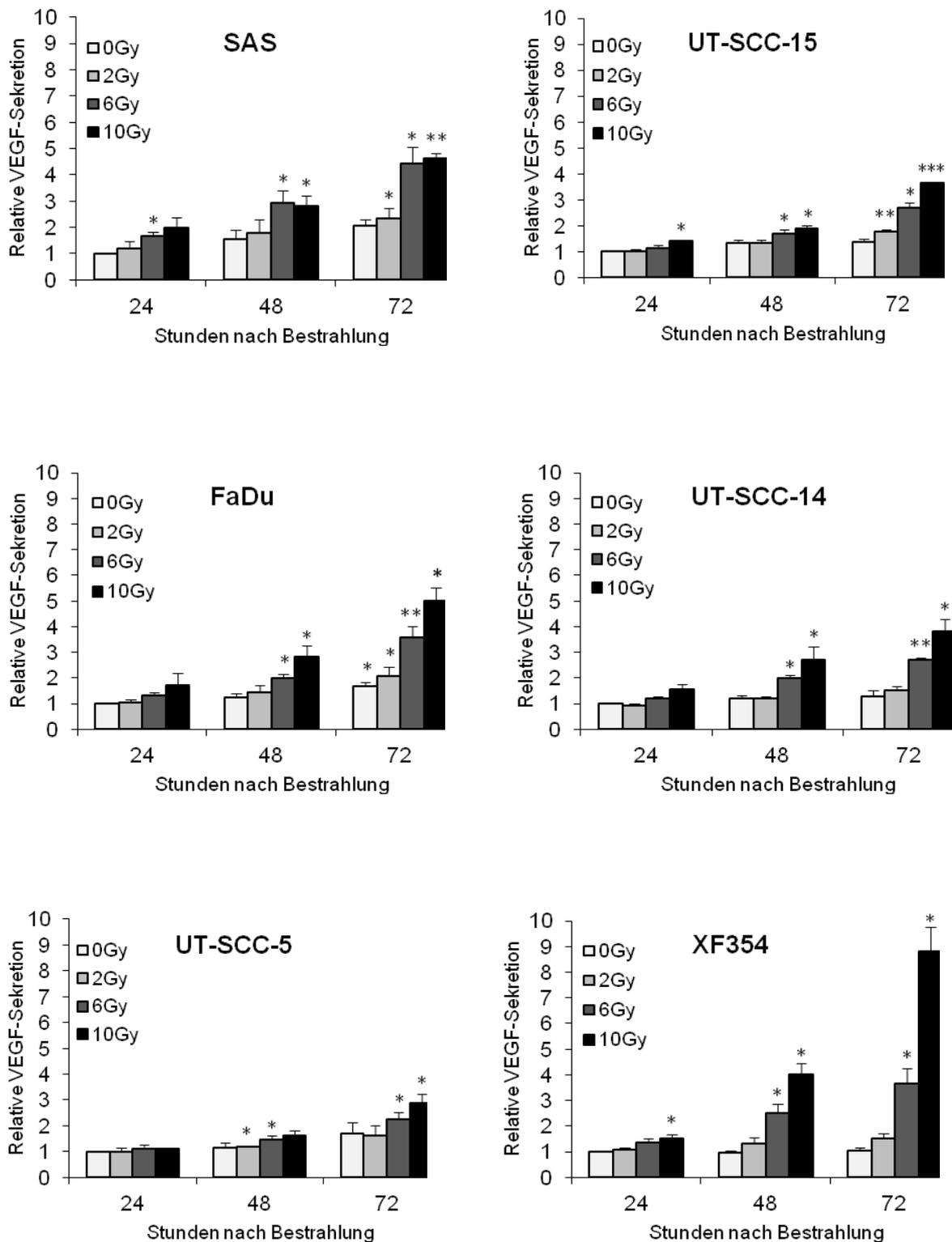
Die Zelllinien SAS, FaDu und UT-SCC-14 sezernierten größere Mengen an VEGF. UT-SCC-14 zeigte dabei die höchste basale VEGF-Sekretion. Darauf folgten FaDu und SAS. Bei den Zelllinien UT-SCC-5, UT-SCC-15 und XF354 lag die basale VEGF-Sekretion auf einem niedrigeren Niveau. UT-SCC-5 zeigte hierbei die niedrigste VEGF-Sekretionsrate aller sechs Zelllinien. Die Zelllinien SAS und FaDu zeigten einen signifikanten Anstieg der VEGF-Sekretion nach 72 h im Vergleich zum Wert nach 24 h.

### 3.8 Bestrahlungsinduzierte VEGF-Sekretion

Alle Zelllinien wurden mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt und die VEGF Menge in ng/10<sup>6</sup> Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden ermittelt. Die gemessenen Werte wurden auf den Ausgangswert 0 Gy und 24 h bezogen und somit eine relative VEGF-Sekretion im Bezug auf den Ausgangswert unbestrahlter Zellen dargestellt. Die folgende Abbildung zeigt die bestrahlungsinduzierte VEGF-Sekretion der sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien (Abb. 3-8). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der bestrahlungsinduzierten VEGF-Sekretion aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert ± SEM).

Alle sechs Zelllinien zeigten eine vergleichbare dosisabhängige Steigerung der VEGF-Sekretion. Diese war am stärksten ausgeprägt bei XF354, gefolgt von FaDu und SAS. Die niedrigste Sekretionssteigerung wies die Zelllinie UT-SCC-5 auf. UT-SCC-14 und UT-SCC-15 zeigten eine Sekretionssteigerung auf ähnlichem Niveau. Die maximale Induktion der VEGF-Sekretion wurde bei allen Zelllinien 72 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy erreicht.

Die erhobenen Daten zur Induktion der VEGF-Sekretion wurden mittels T-Test auf signifikante Veränderungen ( $p \leq 0,05$ ) zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen überprüft. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 3-2 dargestellt.



**Abb. 3-8:** Bestrahlungsinduzierte VEGF-Sekretion der sechs Tumorzelllinien 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit 0, 2, 6, oder 10 Gy.

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

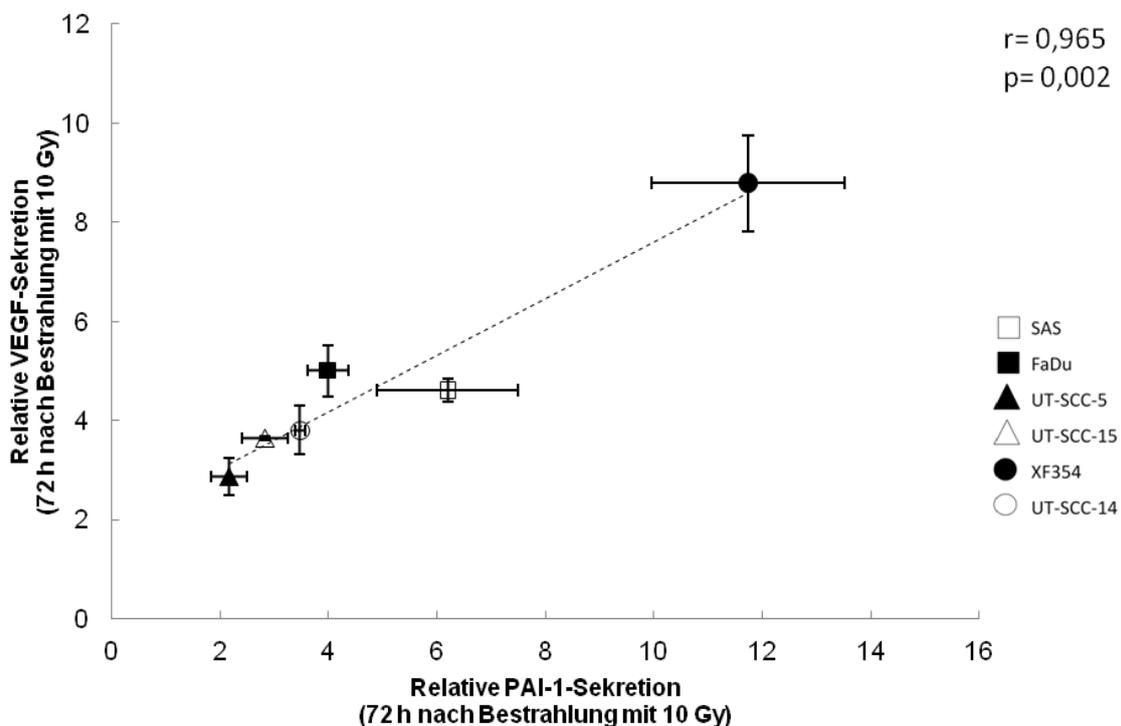
**Tab. 3-2:** Signifikanzniveaus (p-Werte) der Induktion der VEGF-Sekretion von sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region ermittelt durch T-Test

<b>SAS</b>	<b>0 - 0 Gy</b>	<b>2 - 0 Gy</b>	<b>6 - 0 Gy</b>	<b>10 - 0 Gy</b>
24 h	-	0,467	<b>0,013</b>	0,074
48 h	0,162	0,273	<b>0,018</b>	<b>0,047</b>
72 h	0,051	<b>0,035</b>	<b>0,035</b>	<b>0,004</b>
<b>FaDu</b>				
24 h	-	0,793	0,063	0,197
48 h	0,354	0,232	<b>0,031</b>	<b>0,049</b>
72 h	<b>0,012</b>	<b>0,033</b>	<b>0,004</b>	<b>0,016</b>
<b>UT-SCC-5</b>				
24 h	-	0,992	0,456	0,083
48 h	0,486	<b>0,025</b>	<b>0,034</b>	0,101
72 h	0,233	0,256	<b>0,045</b>	<b>0,039</b>
<b>UT-SCC-15</b>				
24 h	-	0,789	0,248	<b>0,015</b>
48 h	0,101	0,109	<b>0,037</b>	<b>0,019</b>
72 h	0,066	<b>0,002</b>	<b>0,014</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<b>UT-SCC-14</b>				
24 h	-	0,452	0,185	0,113
48 h	0,192	0,078	<b>0,019</b>	<b>0,034</b>
72 h	0,331	0,087	<b>0,004</b>	<b>0,029</b>
<b>XF354</b>				
24 h	-	0,149	0,078	<b>0,032</b>
48 h	0,616	0,225	<b>0,045</b>	<b>0,022</b>
72 h	0,829	0,141	<b>0,047</b>	<b>0,015</b>

### 3.9 Korrelationsanalysen

Mögliche signifikante Korrelationen zwischen basaler PAI-1- bzw. VEGF-Sekretion und Strahlenresistenz sowie bestrahlungsinduzierter PAI-1- und VEGF-Sekretion wurden mittels linearer Korrelationsanalysen und Pearson-Koeffizient ( $r$ ) überprüft. Hierbei ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen basaler PAI-1-Sekretion und der Strahlenresistenz der untersuchten Zelllinien ( $r = -0,230$ ;  $p = 0,661$ ). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang im Vergleich der basalen VEGF-Sekretion mit der Strahlenresistenz ( $r = -0,282$ ;  $p = 0,588$ ).

Eine statistisch signifikante Korrelation konnte jedoch zwischen der bestrahlungsinduzierten Sekretion von PAI-1 und VEGF nachgewiesen werden ( $r = 0,965$ ;  $p = 0,002$ ) (siehe Abb. 3-9).



**Abb. 3-9:** Korrelation zwischen bestrahlungsinduzierter PAI-1- und VEGF-Sekretion der sechs Tumorzelllinien. Dargestellt ist die relative PAI-1- bzw. VEGF-Sekretion 72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in Bezug auf den Ausgangswert (24 h) unbestrahlter Zellen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Unterschiede in der Strahlenresistenz der sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region *in vitro* und *in vivo*

Bislang ist die Strahlenresistenz der sechs in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region *in vivo* in Xenografttumormodellen der Maus untersucht worden. In diesen *in-vivo*-Modellen ließen sich die Zelllinien in zwei strahlenresistente (SAS, UT-SCC-5), zwei intermediär strahlenresistente (FaDu, UT-SCC-15) und zwei strahlensensible Zelllinien (UT-SCC-14, XF354) einteilen (siehe 2.1.1) (Yaromina et al., 2006; Yaromina et al., 2007; Yaromina et al., 2011). Um diese Untersuchungen fortführen zu können und Fragestellungen, die im Tiermodell in dieser Form nicht zu beantworten sind, war es notwendig, diese Zelllinien im ersten Schritt anhand ihrer Strahlenresistenz *in vitro* zu charakterisieren und einzuteilen. Diese Einteilung ermöglichte weitere, in dieser Form nur *in vitro* mögliche Untersuchungen zur PAI-1- und VEGF-Sekretion.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die sechs Zelllinien bezüglich ihrer Strahlenresistenz *in vitro* zu charakterisieren. Als Grundlage diente die Proliferationsrate der Zellen vier Tage nach Bestrahlung mit 0, 2, 6 oder 10 Gy. Für die Ermittlung der relativen proliferativen Aktivität wurde der ermittelte Wert jeweils auf den 0 Gy Wert der jeweiligen Zelllinie bezogen. Durch diese Methode der Darstellung war es möglich, aus der proliferativen Aktivität bezogen auf den Nullpunkt die Strahlenresistenz abzulesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der *in-vivo*- und *in-vitro*-Strahlenresistenz der Zelllinien (Tab 4-1). Ebenso wie in den *in-vivo*-Versuchen erwies sich die Zelllinie SAS in den *in-vitro*-Versuchen als besonders strahlenresistent. In der *in-vitro*-Strahlenresistenz folgte an zweiter Stelle die Zelllinie FaDu, welche *in vivo* als intermediär strahlenresistent eingeordnet wurde. UT-SCC-5, welche sich *in vivo* als stark strahlenresistent dargestellt hatte, zeigte *in vitro* nur eine intermediäre Strahlenresistenz. In der Gruppe der strahlensensiblen Zelllinien stellte sich *in vitro* im Gegensatz zu den *in-vivo*-Versuchen nicht XF354, sondern UT-SCC-14 als strahlensensibelste Zelllinie heraus.

**Tab. 4-1:** Vergleich der *in-vivo*-Strahlenresistenz (TCD<sub>50</sub>) mit der *in-vitro*-Strahlenresistenz (relative proliferative Aktivität vier Tage nach Bestrahlung mit 6 Gy)

<i>in-vivo</i> -Strahlenresistenz TCD <sub>50</sub> (Gy)	<i>in-vitro</i> -Strahlenresistenz (Relative proliferative Aktivität vier Tage nach Bestrahlung mit 6 Gy)
XF354 (47,4)	UT-SCC-14 (0,2830)
UT-SCC-14 (52,1)	XF354 (0,3125)
UT-SCC-15 (78,1)	UT-SCC-15 (0,3862)
FaDu (85,2)	UT-SCC-5 (0,4863)
UT-SCC-5 (117,2)	FaDu (0,5478)
SAS (126,7)	SAS (0,6470)

Aufgrund unterschiedlicher Endpunkte der *in-vivo*- und *in-vitro*-Untersuchungen ist eine direkte Vergleichbarkeit nicht gegeben. Dies muss bei der Bewertung der Unterschiede bedacht werden. *In vivo* wurde der TCD<sub>50</sub>-Wert der jeweiligen Zelllinie zur Unterscheidung dieser in Hinblick auf ihre Strahlenresistenz herangezogen. Im Gegensatz dazu wurde in den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuchen die Strahlenresistenz anhand der Proliferationsrate ermittelt. Zusätzlich spielen Unterschiede im Tumormikromilieu eine bedeutende Rolle. Als Beispiel ist hier die hypoxiebedingte Strahlenresistenz der Tumorzellen zu nennen. So zeigten die Xenografttumoren *in vivo* ein variables Ausmaß hypoxischer Anteile (Yaromina et al., 2006). Möglicherweise führte diese inhomogene Verteilung hypoxischer Anteile *in vivo* zu einer veränderten Strahlenresistenz im Vergleich zu den homogen normoxischen Bedingungen der *in-vitro*-Versuche. Fehlende Interaktionen, wie z.B. Zell-Zell-Kontakte oder parakrine Effekte, zwischen malignen und nichtmalignen Zellen sowie der extrazellulären Matrix könnten eine weitere Modulation der Strahlensensibilität im Vergleich von *in vitro* zu *in vivo* erklären.

## 4.2 Zusammenhang zwischen basaler PAI-1- oder VEGF-Sekretion und Strahlenresistenz

Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen basaler PAI-1- oder VEGF-Sekretion und der Strahlenresistenz der untersuchten Zelllinien *in vitro* war ein primäres Ziel dieser Arbeit. Frühere Untersuchungen hatten bereits in Tumorlysaten aus 9 SCCHN-Xenografttumoren – darunter auch die sechs Zelllinien dieser Arbeit - einen signifikanten Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expression und einer erhöhten Strahlenresistenz aufzeigen können (Bayer et al., 2008). Zelllinien mit einer hohen PAI-1-Expression zeigten hierbei in der Regel

auch eine hohe Strahlenresistenz. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie FaDu, die trotz einer hohen Strahlenresistenz nur geringe Mengen an PAI-1 exprimierte. Im Gegensatz zu PAI-1 konnte für VEGF *in vivo* bisher kein entsprechender Zusammenhang festgestellt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse der *in-vitro*-Versuche zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen basaler PAI-1-Sekretion und der Strahlenresistenz der untersuchten Zelllinien. Die intermediär strahlenresistente Zelllinie UT-SCC-15 zeigte hierbei die höchste PAI-1-Sekretion gefolgt von der strahlensensibelsten Zelllinie UT-SCC-14 und der strahlenresistentesten Zelllinie SAS. Unterschiedlich erwiesen sich auch die vergleichbar strahlensensiblen Zelllinien XF354 und UT-SCC-14. XF354 zeichnete sich durch eine deutlich geringere PAI-1-Sekretion als UT-SCC-14 aus. FaDu hingegen zeigte eine, wie schon *in-vivo*-Versuchen vorbeschriebene, niedrige PAI-1-Sekretion.

Bislang konnte ein Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression und der Strahlenresistenz von Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region nicht belegt werden. Jedoch bestehen Hinweise aus Untersuchungen an Glioblastomzelllinien, dass hohe basale VEGF-Spiegel mit einer erhöhten Strahlenresistenz der Tumorzelllinien einhergehen können (Hovinga et al., 2005).

Die vorliegenden Ergebnisse der *in-vitro*-Versuche zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen basaler VEGF-Sekretion und der Strahlenresistenz der untersuchten Zelllinien. Die strahlensensible Zelllinie UT-SCC-14 zeigte hierbei die höchste VEGF-Sekretion. Ihr folgten die strahlenresistenten Zelllinien FaDu und SAS. Die niedrigste VEGF-Sekretion wies die intermediär strahlenresistente Zelllinie UT-SCC-5 auf.

Obwohl in vorausgegangenen Untersuchungen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expression in Xenografttumoren der Maus und ihrer Strahlenresistenz festgestellt wurde (Bayer et al., 2008), konnten diese Ergebnisse *in vitro* in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. So ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen basaler PAI-1- oder VEGF-Sekretion und der Strahlenresistenz der jeweiligen Zelllinie erkennen. Die Untersuchung der PAI-1-Expression in Xenografttumoren wurde an 9 Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region durchgeführt. Kritisch ist anzumerken, dass womöglich die geringere Anzahl von nur sechs untersuchten Zelllinien *in vitro* in dieser Arbeit im Gegensatz zu 9 Zelllinien *in vivo* zu einem Fehlen einer statistischen Signifikanz bezüglich einer erhöhten basalen PAI-1-Sekretionsmenge und einer höheren Strahlenresistenz führen könnte. Die Annahme, dass mehr als 6 Zelllinien für eine statistische Signifikanz notwendig sind, stützt eine neuere Veröffentlichung: Unter identischen Vorgaben wie in der 2008 veröffentlichten Arbeit konnte an eben diesen sechs in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien *in vivo* kein Zusammenhang

zwischen PAI-1-Mengen und Strahlenresistenz - gemessen anhand der  $TCD_{50}$  - festgestellt werden (Bayer et al., 2012).

Zudem zeigen einige Zelllinien deutliche Unterschiede in den gemessenen PAI-1- und VEGF-Mengen im Vergleich der *in-vitro*-Daten dieser Arbeit mit den *in-vivo*-Versuchen an Xenografttumoren. Die ermittelte PAI-1-Expression von UT-SCC-5 in Xenografttumoren war beispielsweise deutlich höher als die ermittelten PAI-1-Sekretionswerte im Rahmen der *in-vitro*-Versuche. In die Überlegungen muss mit einbezogen werden, dass die Versuchsanordnungen aufgrund unterschiedlicher Methodik nur eingeschränkt vergleichbar sind. Für die *in-vivo*-Versuche wurde die PAI-1 oder VEGF-Expression der Tumoren auf die Gesamtproteinmenge bezogen, die Proteinmasse der avitalen Zellen ging in die Berechnung mit ein. In den *in-vitro*-Versuchen dieser Arbeit hingegen wurde die PAI-1- oder VEGF-Sekretion jeweils pro  $10^6$  Zellen ermittelt. Es erfolgte eine Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen. Die PAI-1 oder VEGF-Sekretion wurde nur auf vitale Zellen bezogen.

Zwar konnten im Rahmen dieser Untersuchungen keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen VEGF-Sekretion und Strahlenresistenz festgestellt werden, zahlreiche Literaturdaten weisen jedoch auf einen radioprotektiven Effekt von VEGF auf Tumor- und Endothelzellen hin (Gorski et al., 1999; Gupta et al., 2002; Hess et al., 2001). Ob und in welchem Ausmaß dies auch auf PAI-1 zutrifft wurde zudem in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Hier konnte kein Überlebensvorteil bei vor Bestrahlung mit exogenem PAI-1 behandelten Zellen nachgewiesen werden (Artman et al., 2010). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Menge des sezernierten PAI-1 keinen direkten Einfluss auf die Strahlenresistenz der untersuchten Tumorzellen hat.

### **4.3 Einfluss der Bestrahlung auf die Sekretion von PAI-1 und VEGF und der Zusammenhang mit der Strahlenresistenz**

Die Untersuchung des Einflusses der Bestrahlung auf die Sekretion von PAI-1 und VEGF war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Rückschlüsse aufgrund des bestrahlungsinduzierten Sekretionsverhaltens auf die Strahlenresistenz der jeweiligen Zelllinie möglich sind. Hierfür wurden die sechs Tumorzelllinien mit 0, 2, 6 oder 10 Gy bestrahlt und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels ELISA die Mengen an PAI-1 oder VEGF in den Überständen ermittelt.

Alle Zelllinien zeigten nach Bestrahlung eine Induktion der PAI-1-Sekretion. Diese war am höchsten 72 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy. Durch Erhöhung der Bestrahlungsdosis stieg auch jeweils die sezernierte PAI-1-Menge. Eine Sekretionssteigerung ließ sich bei allen

Zelllinien, mit Ausnahme von UT-SCC-15, bereits ab einer Dosis von 2 Gy nachweisen. Es ließ sich somit in allen sechs untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region eine Induktion der PAI-1-Sekretion durch Bestrahlung feststellen. Diese war dosisabhängig. Eine Hochregulation von PAI-1 durch Bestrahlung wurde für andere Zelllinien bereits beschrieben. Dies gilt sowohl auf mRNA-Ebene (Hageman et al., 2005; Milliat et al., 2008; Scharpfenecker et al., 2009; Zhao et al., 2001) als auch auf Proteinebene (Scharpfenecker et al., 2009; Zhao et al., 2001).

Die höchste Induktion der PAI-1-Sekretion zeigte mit einer 11,7-fachen Erhöhung der PAI-1-Menge 72 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy die strahlensensible Zelllinie XF354. Entsprechend ergab sich für die strahlenresistente SAS eine 6,2-fache Erhöhung im Vergleich zum Basalwert. Die relative PAI-1-Sekretion der Zelllinien UT-SCC-15, UT-SCC-14 und FaDu stellte sich untereinander sehr ähnlich dar mit einer Induktion dieser durch Bestrahlung um einen Faktor 2,8-4 (siehe Tabelle 4-2). Die intermediär strahlenresistente Zelllinie UT-SCC-5 zeigte eine 2,2-fache Induktion der PAI-1-Sekretion 72 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy und somit im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien die niedrigste Steigerung der PAI-1-Sekretion. Es war somit kein signifikanter Zusammenhang zwischen der bestrahlungsinduzierten PAI-1-Sekretion und der Strahlenresistenz der jeweiligen Zelllinie erkennbar.

**Tab. 4-2:** Induktion der PAI-1-Sekretion 72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Zelllinie	Induktion der PAI-1-Sekretion (72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy)
XF354	11,7 fach
SAS	6,2 fach
FaDu	4,0 fach
UT-SCC-14	3,5 fach
UT-SCC-15	2,8 fach
UT-SCC-5	2,2 fach

Analog zu den Beobachtungen von PAI-1 verhielten sich die sechs untersuchten Zelllinien hinsichtlich der Sekretionssteigerung von VEGF durch Bestrahlung. Alle Zelllinien zeigten nach Bestrahlung eine Induktion der VEGF-Sekretion. Diese Sekretion war am höchsten 72 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Induktion der VEGF-Sekretion war dosisabhängig und konnte, mit Ausnahme von UT-SCC-5, bereits ab einer Dosis von 2 Gy nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit mehreren Untersuchungen, die in Tumor-

und Endothelzelllinien ebenfalls eine Steigerung der VEGF-Expression und –Sekretion nach Bestrahlung belegen konnten (Gorski et al., 1999; Hovinga et al., 2005; Lund et al., 2004; Park et al., 2001).

Die sechs Zelllinien stellten sich im Hinblick auf die Induktion der VEGF-Sekretion nach Bestrahlung im Vergleich zu PAI-1 homogener dar. Die höchste Induktion der VEGF-Werte zeigte mit einer 8,8-fachen Erhöhung 72 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy erneut XF354. Die Zelllinie mit der niedrigsten Sekretionssteigerung war, wie auch bei PAI-1, UT-SCC-5 mit einem entsprechenden Wert von 2,9. Die restlichen vier Zelllinien stellten sich hinsichtlich ihrer durch Bestrahlung induzierten VEGF-Sekretion untereinander vergleichbar mit einer 3,7-5-fachen Erhöhung der Werte dar (siehe Tabelle 4-3). Somit war auch hier kein Zusammenhang zwischen der bestrahlungsinduzierten VEGF-Sekretion und der Strahlenresistenz der jeweiligen Zelllinie erkennbar.

**Tab. 4-3:** Induktion der VEGF-Sekretion 72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Zelllinie	Induktion der VEGF-Sekretion (72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy)
XF354	8,8 fach
FaDu	5,0 fach
SAS	4,6 fach
UT-SCC-14	3,8 fach
UT-SCC-15	3,7 fach
UT-SCC-5	2,9 fach

Statistisch ist eine signifikante Korrelation zwischen der bestrahlungsinduzierten Sekretion von PAI-1 und VEGF in allen sechs Zelllinien erkennbar ( $r = 0,965$ ,  $p = 0,002$ ). Zelllinien, deren PAI-1-Sekretion durch Bestrahlung stark induziert wurde, zeigten ebenfalls eine stark induzierte VEGF-Sekretion und umgekehrt. Dies legt den Schluss nahe, dass die Regulation von PAI-1 und VEGF im Rahmen einer Bestrahlung zumindest in Teilen über verwandte Regulationsmechanismen erfolgt.

Die Mechanismen, die zur Hochregulation von PAI-1 und VEGF nach Bestrahlung führen, sind bislang nicht vollständig bekannt und verstanden. So weiß man, dass TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) an der Regulation der PAI-1- und VEGF-Produktion beteiligt ist. TGF- $\beta$  ist in der Lage, die Expression von PAI-1 (Hageman et al., 2005; Sawdey et al., 1989) als auch von VEGF (Benckert et al., 2003; Sugano et al., 2003) zu induzieren. Zudem ist erwiesen, dass eine Bestrahlung und TGF- $\beta$  durch einen kooperativen Effekt die

Transkription von PAI-1 erhöhen (Hageman et al., 2005). Man vermutet hier einen zugrunde liegenden Mechanismus über einen p53-abhängigen Stoffwechselweg. In unserer Arbeitsgruppe konnte mittels knock-down von TGF- $\beta$ 1 für die zwei Zelllinien XF354 und SAS nach Bestrahlung eine stärkere Reduktion der VEGF-Sekretion in XF354 und eine schwächere Reduktion der VEGF-Sekretion in SAS gezeigt werden. Gleichzeitig zeigte sich jedoch eine Steigerung der PAI-1-Sekretion in beiden Zelllinien (Artman et al., 2010). Dies lässt darauf schließen, dass TGF- $\beta$ 1 nicht für die Steigerung der PAI-1-Sekretion nach Bestrahlung verantwortlich ist, auf die bestrahlungsinduzierte Steigerung der VEGF-Sekretion jedoch zumindest einen partiellen Effekt haben könnte. Als weiterer möglicher Regulator der bestrahlungsinduzierten PAI-1 und VEGF-Sekretion wird der Hypoxie-induzierte Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) diskutiert (Moeller et al., 2004). Lund et al. konnten in Versuchen mit Glioblastomzelllinien zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  die basale VEGF-Sekretion dieser Zellen deutlich beeinflusst, jedoch keinen Effekt auf die durch Bestrahlung induzierte VEGF-Sekretion hat (Lund et al., 2004). In einer vorangegangenen Publikation konnte in den Zelllinien SAS und XF354 eine sinkende PAI-1 und VEGF-Sekretion nach knock-down von HIF-1 $\alpha$  mittels siRNA nachgewiesen werden (Artman et al., 2010). Diese Reduktion war bei XF354 marginal. Eine Signifikanz zeigte sich lediglich bei SAS in Hinblick auf die PAI-1-Sekretion. Dennoch lassen sich aus diesen Ergebnissen zumindest Hinweise darauf ableiten, dass an der bestrahlungsinduzierten Regulation von PAI-1 und VEGF in Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region HIF-1 $\alpha$  zumindest partiell beteiligt ist.

#### **4.4 PAI-1 und VEGF als Marker für das Ansprechen auf eine Strahlentherapie**

Die Strahlentherapie hat einen festen Platz in der interdisziplinären Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. Strahlenresistenz, verursacht durch Hypoxie oder andere Faktoren, stellt dabei ein großes klinisches Problem dar und nimmt Einfluss auf den Erfolg einer strahlentherapeutischen Behandlung. Hieraus leitet sich das Interesse ab, Marker zu identifizieren, die es erlauben, vor oder im Laufe einer Strahlentherapie eine Aussage über eine potentielle Strahlenresistenz des zu behandelnden Tumors abzuleiten. Ziel ist eine individuell auf den einzelnen Patienten abgestimmte Therapie und die Minimierung von Nebenwirkungen bei einem möglichst optimalen therapeutischen Erfolg.

Anders als bei Kopf-Hals-Tumoren ist PAI-1 als molekularer Marker im Rahmen der Therapie des Mammakarzinoms weitgehend etabliert. Hier wurden die Bestimmung der Invasionsfaktoren uPA und PAI-1 aus Tumorgewebe bereits in die S3-Leitlinie für Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms aufgenommen. Sie dienen hier der

Abschätzung des Rezidivrisikos bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom. Insbesondere bei Patientinnen mit mäßig differenziertem (G2) Tumor kann bei niedrigen uPA- und PAI-1-Werten auf eine belastende adjuvante Chemotherapie verzichtet werden (Kreienberg et al., 2008).

Die Frage, ob PAI-1 und VEGF eine Rolle als Marker für das Ansprechen auf Strahlentherapie bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region spielt, kann anhand der vorliegenden Arbeit nicht abschließend beurteilt werden. In den vorliegenden *in-vitro*-Untersuchungen der sechs Zelllinien konnte weder ein Zusammenhang der basalen PAI-1- oder VEGF-Sekretion mit der Strahlenresistenz, noch ein Zusammenhang zwischen der bestrahlungsinduzierten Sekretionssteigerung und der Strahlenresistenz aufgezeigt werden. Die *in-vitro*-Daten alleine erlauben es jedoch nicht, einen möglichen Zusammenhang auszuschließen. So konnte im Tiermodell, anders als *in vitro*, eine Korrelation zwischen basaler PAI-1-Expression und Strahlenresistenz nachgewiesen werden (Bayer et al., 2008). Die Strahlenresistenz von Tumoren wird durch multiple modulierende Faktoren, wie Hypoxie und Tumorstroma, beeinflusst. Diese Vorgänge sind *in vivo* deutlich komplexer, als sie in einem *in vitro* Tumormodell dargestellt werden können. Zur weiteren Evaluation der untersuchten Marker PAI-1 und VEGF kann als Ergebnis dieser Arbeit abschließend gefolgert werden, dass sich zukünftige Untersuchungen zur Wertigkeit dieser Marker auf diesem Gebiet vor allem auf *in-vivo*-Modelle stützen sollten.

## 5 Zusammenfassung

Kopf-Hals-Tumoren gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. Wichtiger Bestandteil der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren besteht in der Strahlentherapie. Bislang ist kein prädiktiver Marker für das Ansprechen auf Strahlentherapie bei Kopf-Hals-Tumoren etabliert. Präklinisch gibt es Hinweise, dass PAI-1 und VEGF ein Potential als prädiktive Marker bezüglich der Strahlenresistenz in Tumoren besitzen. Ziel der Arbeit war die Evaluation der Wertigkeit von PAI-1 und VEGF als prädiktive Marker für eine mögliche Strahlenresistenz von Kopf-Halstumorzelllinien *in vitro*.

Die Strahlenresistenz der Zelllinien *in vitro* wurde anhand von Proliferationsassays bestimmt. Des Weiteren wurde mittels ELISA die basale und bestrahlungsinduzierte PAI-1- und VEGF-Sekretion ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten Unterschiede zwischen der *in-vivo*- und *in-vitro*-Strahlenresistenz der Zelllinien. Hinsichtlich ihrer basalen PAI-1 und VEGF-Sekretion stellten sich die sechs Zelllinien sehr heterogen dar. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen der basalen PAI-1 oder VEGF-Sekretion und der Strahlenresistenz der Zelllinien feststellen. In allen Zelllinien zeigte sich eine dosisabhängige bestrahlungsinduzierte Sekretionssteigerung von PAI-1 und VEGF. Bezüglich der Induktion der beiden Faktoren durch Bestrahlung stellten sich die Zelllinien heterogen dar. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen der bestrahlungsinduzierten PAI-1- oder VEGF-Sekretion und der Strahlenresistenz der Zelllinien erkennen. Eine signifikante Korrelation zeigte sich zwischen bestrahlungsinduzierter PAI-1- und VEGF-Sekretion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise, dass die Regulation von PAI-1 und VEGF im Rahmen einer Bestrahlung zumindest in Teilen über verwandte Regulationsmechanismen erfolgt. Es ist kein Marker erkennbar, anhand dessen die Strahlenresistenz von Kopf-Hals-Tumoren bereits vor Beginn einer Strahlentherapie eingeschätzt werden könnte. Ein grundsätzlicher Zusammenhang zwischen PAI-1 oder VEGF und der Strahlenresistenz der Zelllinien ist jedoch anhand dieser Arbeit nicht auszuschließen. Es bedarf weiterer Untersuchungen, vorrangig *in vivo*, um einen möglichen Zusammenhang genauer beschreiben und eventuell bestätigen zu können.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	Bovine serum albumin (=Bovines Serumalbumin)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extracellular matrix (=Extrazelluläre Matrix)
EGF	Epidermal Growth Factor (= Epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPRI	Electron paramagnetic resonance imaging
FGF	Fibroblast Growth Factor (= Fibroblasten Wachstumsfaktor)
GPI-Anker	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HGF	hepatocyte growth factor
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
HNSCC	Head and Neck Squamos Cell Carcinoma (= Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region)
HPV	Humanes Papillomavirus
HRE	Hypoxia Response Element
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IL-1	Interleukin-1
LDH	Lactatdehydrogenase
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MW	Mittelwert
OER	Oxygen Enhancement Ratio (= Sauerstoffverstärkungsfaktor)
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1 (= Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1)
PAI-2	Plasminogen activator inhibitor-2 (= Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 2)
PAS	Plasminogenaktivierungssystem
PBS	Phosphat-Buffered-Saline (= Phosphat-Salzpufferlösung)

---

PDGF	Platelet-derived Growth Factor (= Blutplättchen- Wachstumsfaktor)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIGF	Placental Growth Factor
rpm	revolutions per minute (=Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
SEM	Standard Error of the Mean (= Standardfehler des Mittelwerts)
Tab.	Tabelle
TCD <sub>50</sub>	Mittlere Bestrahlungsdosis, die in 50% der Fälle zur lokalen Tumorkontrolle führt ( = Tumor-Kontrolldosis )
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$ (= Transformierender Wachstumsfaktor beta)
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	tissue-type plasminogen activator (= Plasminogenaktivator vom Gewebetyp)
uPA	urokinase-type plasminogen activator (=Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp)
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor (= Plasminogenaktivator-Rezeptor vom Urokinasetyp)
VEGF	vascular endothelial growth factor (= Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VN	Vitronektin

## 6.2 Publikationen

Teile der Ergebnisse dieser Dissertation wurden wie folgt publiziert:

Artman, T., Schilling, D., Gnann, J., Molls, M., Multhoff, G. und Bayer, C. (2010). Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76(2): 574-582.

## 6.3 Lizenzen

### Erklärung:

Die mit \* gekennzeichneten Abbildungen (Abb. 1-1, 1-3 und 1-4) unterliegen dem Urheberrecht. Eine Verwendung und der Abdruck ohne Genehmigung/Lizenzierung durch den Rechteinhaber sind untersagt. Für die gekennzeichneten Abbildungen liegen folgende Lizenzen zum alleinigen Abdruck in dieser Arbeit vor:

### Copyright-Declaration:

The \*-marked illustrations/pictures (Abb. 1-1, 1-3 and 1-4) are protected by copyright. Reuse and reprint are prohibited. Licenses for this thesis are as followed:

### Lizenz Abb. 1-1:

#### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 26, 2012

This is a License Agreement between Tuuli Artman ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Tuuli Artman
Customer address	Nordendstr. 2 München, 80799
License number	2976690055184
License date	Aug 26, 2012
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics
Licensed content title	Measurement of tumor oxygenation
Licensed content author	Michael R Horsman
Licensed content date	1 November 1998
Licensed content volume number	42
Licensed content issue number	4
Number of pages	4
Start Page	701
End Page	704
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your	Bestrahlungsinduzierte Regulation des Plasminogenaktivator-

thesis/dissertation	Inhibitor Typ 1 (PAI-1) und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region
Expected completion date	Jan 2013
Estimated size (number of pages)	70
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

**Lizenz Abb. 1-3:**

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 26, 2012

---

This is a License Agreement between Tuuli Artman ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2976671043710
License date	Aug 26, 2012
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	Tumorigenesis and the angiogenic switch
Licensed content author	Gabriele Bergers and Laura E. Benjamin
Licensed content date	Jun 1, 2003
Volume number	3
Issue number	6
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 3
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Bestrahlungsinduzierte Regulation des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in sechs Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region
Expected completion date	Jan 2013
Estimated size (number of pages)	70
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

**Lizenz Abb. 1-4:**

**Copyright Permission No 278/10/2012**

Dear Ms. Artman,

Thank you for your permission request of 29 October.

We grant you permission to reprint from:

Journal: Thrombosis and Haemostasis, 2007

Author: **Binder BR, Mihaly J, Prager GW**

Title: **uPAR – uPA – PAI-1 interactions and signaling: A vascular biologist's view**

Pages: **fig. 2, p. 340**

The permission is granted for reprint in:

Publication: **your dissertation**

Terms and conditions:

The permission is granted only for scientific purposes on a non-exclusive, one-time only or life of the edition basis with distribution rights in the English language throughout the world.

Permission fee: none

Credit line: Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPAR – uPA – PAI-1 interactions and signaling:  
A vascular biologist's view. Thromb Haemost 2007; 97: 336–342

## 6.4 Literaturverzeichnis

- Andreasen, P. A., Georg, B., Lund, L. R., Riccio, A. und Stacey, S. N. (1990). Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Mol Cell Endocrinol* 68(1): 1-19.
- Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L. und Duffy, M. J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72(1): 1-22.
- Andreasen, P. A. (2007). PAI-1 - a potential therapeutic target in cancer. *Curr Drug Targets* 8(9): 1030-1041.
- Artman, T., Schilling, D., Gnann, J., Molls, M., Multhoff, G. und Bayer, C. (2010). Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76(2): 574-582.
- Bajou, K., Noel, A., Gerard, R. D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N. E., Carmeliet, P., Collen, D. und Foidart, J. M. (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 4(8): 923-928.
- Bajou, K., Masson, V., Gerard, R. D., Schmitt, P. M., Albert, V., Praus, M., Lund, L. R., Frandsen, T. L., Brunner, N., Dano, K., Fusenig, N. E., Weidle, U., Carmeliet, G., Loskutoff, D., Collen, D., Carmeliet, P., Foidart, J. M. und 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): 777-784.
- Bayer, C., Schilling, D., Hoetzel, J., Egermann, H. P., Zips, D., Yaromina, A., Geurts-Moespot, A., Sprague, L. D., Sweep, F., Baumann, M., Molls, M. und 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): 361-368.
- Bayer, C., Shi, K., Astner, S. T., Maftei, C. A. und Vaupel, P. (2011). Acute versus chronic hypoxia: why a simplified classification is simply not enough. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80(4): 965-968.
- Bayer, C., Kielow, A., Schilling, D., Maftei, C. A., Zips, D., Yaromina, A., Baumann, M., Molls, M. und Multhoff, G. (2012). Monitoring PAI-1 and VEGF Levels in 6 Human Squamous Cell Carcinoma Xenografts During Fractionated Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.
- Benckert, C., Jonas, S., Cramer, T., Von Marschall, Z., Schafer, G., Peters, M., Wagner, K., Radke, C., Wiedenmann, B., Neuhaus, P., Hocker, M. und Rosewicz, S. (2003). Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 63(5): 1083-1092.
- Bergers, G. und Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3(6): 401-410.
- Binder, B. R., Mihaly, J. und Prager, G. W. (2007). uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost* 97(3): 336-342.
- Blasi, F. und Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12): 932-943.
- Bootz, F., Howaldt, H.-P. (2008). Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008: Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen.
- Brizel, D. M., Scully, S. P., Harrelson, J. M., Layfield, L. J., Bean, J. M., Prosnitz, L. R. und Dewhirst, M. W. (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56(5): 941-943.

- Brizel, D. M., Sibley, G. S., Prosnitz, L. R., Scher, R. L. und Dewhirst, M. W. (1997). Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38(2): 285-289.
- Brown, J. M. (1979). Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol* 52(620): 650-656.
- Brown, J. M. (2002). Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther* 1(5): 453-458.
- Bruckner, A., Filderman, A. E., Kirchheimer, J. C., Binder, B. R. und Remold, H. G. (1992). Endogenous receptor-bound urokinase mediates tissue invasion of the human lung carcinoma cell lines A549 and Calu-1. *Cancer Res* 52(11): 3043-3047.
- Cao, D., Hou, M., Guan, Y. S., Jiang, M., Yang, Y. und Gou, H. F. (2009). Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer* 9: 432.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. und Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573): 435-439.
- Carmeliet, P. und Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801): 249-257.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3: 4-10.
- Chaplin, D. J., Olive, P. L. und Durand, R. E. (1987). Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res* 47(2): 597-601.
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Anderson, W. F. und Gillison, M. L. (2008). Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 26(4): 612-619.
- Chin, D., Boyle, G. M., Williams, R. M., Ferguson, K., Pandeya, N., Pedley, J., Campbell, C. M., Theile, D. R., Parsons, P. G. und Coman, W. B. (2005). Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer* 113(5): 789-797.
- Cho, J. Y., Chung, H. C., Noh, S. H., Roh, J. K., Min, J. S. und Kim, B. S. (1997). High level of urokinase-type plasminogen activator is a new prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 79(5): 878-883.
- Ciambrone, G. J. und McKeown-Longo, P. J. (1990). Plasminogen activator inhibitor type I stabilizes vitronectin-dependent adhesions in HT-1080 cells. *J Cell Biol* 111(5 Pt 1): 2183-2195.
- Cognetti, D. M., Weber, R. S. und Lai, S. Y. (2008). Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer* 113(7 Suppl): 1911-1932.
- Cubellis, M. V., Wun, T. C. und Blasi, F. (1990). Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *Embo J* 9(4): 1079-1085.
- Czekay, R. P., Aertgeerts, K., Curriden, S. A. und Loskutoff, D. J. (2003). Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 160(5): 781-791.
- Dano, K., Behrendt, N., Hoyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L. R., Ploug, M. und Romer, J. (2005). Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost* 93(4): 676-681.
- Decaussin, M., Sartelet, H., Robert, C., Moro, D., Claraz, C., Brambilla, C. und Brambilla, E. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 188(4): 369-377.
- Dellas, C. und Loskutoff, D. J. (2005). Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 93(4): 631-640.
- Deng, G., Curriden, S. A., Hu, G., Czekay, R. P. und Loskutoff, D. J. (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Cell Physiol* 189(1): 23-33.

- Dewhirst, M. W., Cao, Y. und Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 8(6): 425-437.
- Devy, L., Blacher, S., Grignet-Debrus, C., Bajou, K., Masson, V., Gerard, R. D., Gils, A., Carmeliet, G., Carmeliet, P., Declerck, P. J., Noel, A. und Foidart, J. M. (2002). The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *Faseb J* 16(2): 147-154.
- Duffy, M. J., O'Grady, P., Devaney, D., O'Siorain, L., Fennelly, J. J. und Lijnen, H. J. (1988). Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 62(3): 531-533.
- Duffy, M. J., Reilly, D., O'Sullivan, C., O'Higgins, N., Fennelly, J. J. und Andreasen, P. (1990). Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 50(21): 6827-6829.
- Duffy, M. J., Maguire, T. M., McDermott, E. W. und O'Higgins, N. (1999). Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol* 71(2): 130-135.
- Duffy, M. J. und 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): 541-548.
- Durand, M. K., Bodker, J. S., Christensen, A., Dupont, D. M., Hansen, M., Jensen, J. K., Kjølgaard, S., Mathiasen, L., Pedersen, K. E., Skeldal, S., Wind, T. und Andreasen, P. A. (2004). Plasminogen activator inhibitor-I and tumour growth, invasion, and metastasis. *Thromb Haemost* 91(3): 438-449.
- Duvvuri, U. und Myers, J. N. (2009). Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide. *Curr Probl Surg* 46(2): 114-117.
- Ellis, L. M., Takahashi, Y., Fenoglio, C. J., Cleary, K. R., Bucana, C. D. und Evans, D. B. (1998). Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 34(3): 337-340.
- Eschmann, S. M., Paulsen, F., Reimold, M., Dittmann, H., Welz, S., Reischl, G., Machulla, H. J. und Bares, R. (2005). Prognostic impact of hypoxia imaging with 18F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. *J Nucl Med* 46(2): 253-260.
- Ferno, M., Bendahl, P. O., Borg, A., Brundell, J., Hirschberg, L., Olsson, H. und Killander, D. (1996). Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay. *Eur J Cancer* 32A(5): 793-801.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J. und Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380(6573): 439-442.
- Ferrara, N. und Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18(1): 4-25.
- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 9 Suppl 1: 2-10.
- Foekens, J. A., Schmitt, M., van Putten, W. L., Peters, H. A., Kramer, M. D., Janicke, F. und Klijn, J. G. (1994). Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 12(8): 1648-1658.
- Foekens, J. A., Look, M. P., Peters, H. A., van Putten, W. L., Portengen, H. und Klijn, J. G. (1995). Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87(10): 751-756.
- Folkman, J. (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175(3): 409-416.
- Folkman, J. und Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16): 10931-10934.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. und Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16(9): 4604-4613.

- Frumovitz, M. und Sood, A. K. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway as a therapeutic target in gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol* 104(3): 768-778.
- Gasparini, G., Toi, M., Gion, M., Verderio, P., Dittadi, R., Hanatani, M., Matsubara, I., Vinante, O., Bonoldi, E., Boracchi, P., Gatti, C., Suzuki, H. und Tominaga, T. (1997). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 89(2): 139-147.
- Giaccia, A. J. (1996). Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol* 6(1): 46-58.
- Gorski, D. H., Beckett, M. A., Jaskowiak, N. T., Calvin, D. P., Mauceri, H. J., Salloum, R. M., Seetharam, S., Koons, A., Hari, D. M., Kufe, D. W. und Weichselbaum, R. R. (1999). Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 59(14): 3374-3378.
- Graham, C. H., Forsdike, J., Fitzgerald, C. J. und Macdonald-Goodfellow, S. (1999). Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer* 80(4): 617-623.
- Grondahl-Hansen, J., Christensen, I. J., Rosenquist, C., Brunner, N., Mouridsen, H. T., Dano, K. und Blichert-Toft, M. (1993). High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 53(11): 2513-2521.
- Gupta, V. K., Jaskowiak, N. T., Beckett, M. A., Mauceri, H. J., Grunstein, J., Johnson, R. S., Calvin, D. A., Nodzenski, E., Pejovic, M., Kufe, D. W., Posner, M. C. und Weichselbaum, R. R. (2002). Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance. *Cancer J* 8(1): 47-54.
- Hageman, J., Eggen, B. J., Rozema, T., Damman, K., Kampinga, H. H. und Coppes, R. P. (2005). Radiation and transforming growth factor-beta cooperate in transcriptional activation of the profibrotic plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Clin Cancer Res* 11(16): 5956-5964.
- Hall, E. und Giaccia, A. Lippincott Williams & Wilkins (2006). Radiobiology for the Radiologist.
- Hanahan, D. und Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3): 353-364.
- Harbeck, N., Thomssen, C., Berger, U., Ulm, K., Kates, R. E., Hofler, H., Janicke, F., Graeff, H. und Schmitt, M. (1999). Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. *Breast Cancer Res Treat* 54(2): 147-157.
- Harbeck, N., Kruger, A., Sinz, S., Kates, R. E., Thomssen, C., Schmitt, M. und Janicke, F. (2001). Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1--a multifaceted proteolytic factor. *Onkologie* 24(3): 238-244.
- Harbeck, N., Kates, R. E., Look, M. P., Meijer-Van Gelder, M. E., Klijn, J. G., Kruger, A., Kiechle, M., Janicke, F., Schmitt, M. und Foekens, J. A. (2002). Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res* 62(16): 4617-4622.
- Harmey, J. H. und Bouchier-Hayes, D. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays* 24(3): 280-283.
- Harrison, L. und Blackwell, K. (2004). Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* 9 Suppl 5: 31-40.
- Hess, C., Vuong, V., Hegyi, I., Riesterer, O., Wood, J., Fabbro, D., Glanzmann, C., Bodis, S. und Pruschy, M. (2001). Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth. *Br J Cancer* 85(12): 2010-2016.
- Hjortland, G. O., Lillehammer, T., Somme, S., Wang, J., Halvorsen, T., Juell, S., Hirschberg, H., Fodstad, O. und Engebraaten, O. (2004). Plasminogen activator inhibitor-1

- increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp Cell Res* 294(1): 130-139.
- Horsman, M. R. (1998). Measurement of tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42(4): 701-704.
- Hovinga, K. E., Stalpers, L. J., van Bree, C., Donker, M., Verhoeff, J. J., Rodermond, H. M., Bosch, D. A. und van Furth, W. R. (2005). Radiation-enhanced vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in glioblastoma multiforme cell lines--a clue to radioresistance? *J Neurooncol* 74(2): 99-103.
- Hundsdoerfer, B., Zeilhofer, H. F., Bock, K. P., Dettmar, P., Schmitt, M., Kolk, A., Pautke, C. und Horch, H. H. (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): 191-196.
- Höckel, M., Knoop, C., Schlenger, K., Vorndran, B., Bausmann, E., Mitze, M., Knapstein, P. G. und Vaupel, P. (1993). Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 26(1): 45-50.
- Höckel, M., Schlenger, K., Aral, B., Mitze, M., Schaffer, U. und Vaupel, P. (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56(19): 4509-4515.
- Höckel, M. und Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93(4): 266-276.
- Ichinose, A., Fujikawa, K. und Suyama, T. (1986). The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* 261(8): 3486-3489.
- Ikeda, N., Adachi, M., Taki, T., Huang, C., Hashida, H., Takabayashi, A., Sho, M., Nakajima, Y., Kanehiro, H., Hisanaga, M., Nakano, H. und Miyake, M. (1999). Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 79(9-10): 1553-1563.
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9(6): 685-693.
- Janicke, F., Schmitt, M., Pache, L., Ulm, K., Harbeck, N., Hofler, H. und Graeff, H. (1993). Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24(3): 195-208.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A. und Hentschel, S. Robert-Koch-Institut (2012). Krebs in Deutschland 2007-2008 Häufigkeiten und Trends.
- Kietzmann, T., Roth, U. und 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): 4177-4185.
- Kobayashi, H., Schmitt, M., Goretzki, L., Chucholowski, N., Calvete, J., Kramer, M., Gunzler, W. A., Janicke, F. und Graeff, H. (1991). Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J Biol Chem* 266(8): 5147-5152.
- Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S. und Sarkar, F. H. (2007). Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 67(7): 3310-3319.
- Konno, H., Abe, J., Kaneko, T., Baba, M., Shoji, A., Sunayama, K., Kamiya, K., Tanaka, T., Suzuki, S., Nakamura, S. und Urano, T. (2001). Urokinase receptor and vascular endothelial growth factor are synergistically associated with the liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res* 92(5): 516-523.
- Kreienberg, R., Kopp, I., Albert, U., Bartsch, H. H., Beckmann, M. W., Berg, D., Bick, U., du Bois, A., Budach, W., Dunst, J., Engel, J., Ernst, B., Geraedts, M., Henschler, U., Hölzel, D., Jackisch, C., König, K., Kreipe, H., Kühn, T., Lebeau, A., Leinung, S., Link, H., Lück, H.-J., Madjar, H., Maiwald, A., Maiwald, G., Marschner, N., Marx, M., von Minckwitz, G., Naß-Griegoleit, I., Possinger, K., Reiter, A., Sauerbrei, W., Schlake, W., Schmutzler, R., Schreer, I., Schulte, H., Schulz, K.-D., Souchon, R., Thomssen, C., Untch, M., Wagner, U., Weis, J. und Zentgraf, T. Deutsche

- Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) (2008). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.
- Kyzas, P. A., Stefanou, D., Batistatou, A. und Agnantis, N. J. (2005). Hypoxia-induced tumor angiogenic pathway in head and neck cancer: an in vivo study. *Cancer Lett* 225(2): 297-304.
- Lara, P. C., Lloret, M., Valenciano, A., Clavo, B., Pinar, B., Rey, A. und Henriquez-Hernandez, L. A. (2012). Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in relation to hypoxia and oncoproteins in clinical cervical tumors. *Strahlenther Onkol* 188(12): 1139-1145.
- Lee, S. J., Kim, J. G., Sohn, S. K., Chae, Y. S., Moon, J. H., Kim, S. N., Bae, H. I., Chung, H. Y. und Yu, W. (2009). No Association of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) and VEGF-C Expression with Survival in Patients with Gastric Cancer. *Cancer Res Treat* 41(4): 218-223.
- Li, J., Zhang, Y. P. und Kirsner, R. S. (2003). Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* 60(1): 107-114.
- Li, X., Kimura, H., Hirota, K., Kasuno, K., Torii, K., Okada, T., Kurooka, H., Yokota, Y. und Yoshida, H. (2005). Synergistic effect of hypoxia and TNF-alpha on production of PAI-1 in human proximal renal tubular cells. *Kidney Int* 68(2): 569-583.
- Licitra, L. und Felip, E. (2009). Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4: 121-122.
- Linderholm, B. K., Gruvberger-Saal, S., Ferno, M., Bendahl, P. O. und Malmstrom, P. (2008). Vascular endothelial growth factor is a strong predictor of early distant recurrences in a prospective study of premenopausal women with lymph-node negative breast cancer. *Breast* 17(5): 484-491.
- Liu, G., Shuman, M. A. und Cohen, R. L. (1995). Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells. *Int J Cancer* 60(4): 501-506.
- Look, M. P., van Putten, W. L., Duffy, M. J., Harbeck, N., Christensen, I. J., Thomssen, C., Kates, R., Spyrtatos, F., Ferno, M., Eppenberger-Castori, S., Sweep, C. G., Ulm, K., Peyrat, J. P., Martin, P. M., Magdelenat, H., Brunner, N., Duggan, C., Lisboa, B. W., Bendahl, P. O., Quillien, V., Daver, A., Ricolleau, G., Meijer-van Gelder, M. E., Manders, P., Fiets, W. E., Blankenstein, M. A., Broet, P., Romain, S., Daxenbichler, G., Windbichler, G., Cufer, T., Borstnar, S., Kueng, W., Beex, L. V., Klijn, J. G., O'Higgins, N., Eppenberger, U., Janicke, F., Schmitt, M. und Foekens, J. A. (2002). Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 94(2): 116-128.
- Lund, E. L., Hog, A., Olsen, M. W., Hansen, L. T., Engelholm, S. A. und Kristjansen, P. E. (2004). Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma. *Int J Cancer* 108(6): 833-838.
- Maillard, C., Jost, M., Romer, M. U., Brunner, N., Houard, X., Lejeune, A., Munaut, C., Bajou, K., Melen, L., Dano, K., Carmeliet, P., Fusenig, N. E., Foidart, J. M. und Noel, A. (2005). Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia* 7(1): 57-66.
- Mandriota, S. J., Seghezzi, G., Vassalli, J. D., Ferrara, N., Wasi, S., Mazzieri, R., Mignatti, P. und Pepper, M. S. (1995). Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270(17): 9709-9716.
- Matsumoto, S., Hyodo, F., Subramanian, S., Devasahayam, N., Munasinghe, J., Hyodo, E., Gadiseti, C., Cook, J. A., Mitchell, J. B. und Krishna, M. C. (2008). Low-field paramagnetic resonance imaging of tumor oxygenation and glycolytic activity in mice. *J Clin Invest* 118(5): 1965-1973.
- Matsumoto, S., Yasui, H., Mitchell, J. B. und Krishna, M. C. (2010). Imaging cycling tumor hypoxia. *Cancer Res* 70(24): 10019-10023.

- Meo, S., Dittadi, R., Peloso, L. und 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): 282-288.
- Mignatti, P. und Rifkin, D. B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73(1): 161-195.
- Milliat, F., Sabourin, J. C., Tarlet, G., Holler, V., Deutsch, E., Buard, V., Tamarat, R., Atfi, A., Benderitter, M. und Francois, A. (2008). Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am J Pathol* 172(3): 691-701.
- Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y. und Dewhirst, M. W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5(5): 429-441.
- Molls, M., Stadler, P., Becker, A., Feldmann, H. J. und Dunst, J. (1998). Relevance of oxygen in radiation oncology. Mechanisms of action, correlation to low hemoglobin levels. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 4: 13-16.
- Nekarda, H., Schmitt, M., Ulm, K., Wenninger, A., Vogelsang, H., Becker, K., Roder, J. D., Fink, U. und Siewert, J. R. (1994). Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 54(11): 2900-2907.
- Nekarda, H., Schlegel, P., Schmitt, M., Stark, M., Mueller, J. D., Fink, U. und Siewert, J. R. (1998). Strong prognostic impact of tumor-associated urokinase-type plasminogen activator in completely resected adenocarcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 4(7): 1755-1763.
- Nordsmark, M., Bentzen, S. M., Rudat, V., Brizel, D., Lartigau, E., Stadler, P., Becker, A., Adam, M., Molls, M., Dunst, J., Terris, D. J. und 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.
- Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E. I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J. und Blasi, F. (1997). Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *Embo J* 16(10): 2610-2620.
- Pai, S. I. und Westra, W. H. (2009). Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol* 4: 49-70.
- Palmieri, D., Lee, J. W., Juliano, R. L. und Church, F. C. (2002). Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 breast cancer cells. *J Biol Chem* 277(43): 40950-40957.
- Park, J. E., Keller, G. A. und Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4(12): 1317-1326.
- Park, J. S., Qiao, L., Su, Z. Z., Hinman, D., Willoughby, K., McKinstry, R., Yacoub, A., Duigou, G. J., Young, C. S., Grant, S., Hagan, M. P., Ellis, E., Fisher, P. B. und Dent, P. (2001). Ionizing radiation modulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression through multiple mitogen activated protein kinase dependent pathways. *Oncogene* 20(25): 3266-3280.
- Pedersen, H., Grondahl-Hansen, J., Francis, D., Osterlind, K., Hansen, H. H., Dano, K. und Brunner, N. (1994). Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res* 54(1): 120-123.
- Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L. und 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): 902-906.
- Pepper, M. S. (2001). Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 86(1): 346-355.
- Ploug, M. und Ellis, V. (1994). Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. *FEBS Lett* 349(2): 163-168.

- Prager, G. W., Breuss, J. M., Steurer, S., Mihaly, J. und Binder, B. R. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid pro-urokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood* 103(3): 955-962.
- Praus, M., Collen, D. und Gerard, R. D. (2002). Both u-PA inhibition and vitronectin binding by plasminogen activator inhibitor 1 regulate HT1080 fibrosarcoma cell metastasis. *Int J Cancer* 102(6): 584-591.
- Psyrrri, A., Prezas, L. und Burtness, B. (2008). Oropharyngeal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 6(8): 604-612.
- Rak, J., Yu, J. L., Klement, G. und Kerbel, R. S. (2000). Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5(1): 24-33.
- Raleigh, J. A., Dewhirst, M. W. und Thrall, D. E. (1996). Measuring Tumor Hypoxia. *Semin Radiat Oncol* 6(1): 37-45.
- Rosler, J., Breit, S., Havers, W. und Schweigerer, L. (1999). Vascular endothelial growth factor expression in human neuroblastoma: up-regulation by hypoxia. *Int J Cancer* 81(1): 113-117.
- Ryan, H. E., Lo, J. und Johnson, R. S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17(11): 3005-3015.
- Saksela, O. und Rifkin, D. B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* 4: 93-126.
- Sawdey, M., Podor, T. J. und Loskutoff, D. J. (1989). Regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. Induction by transforming growth factor-beta, lipopolysaccharide, and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 264(18): 10396-10401.
- Scharpfenecker, M., Kruse, J. J., Sprong, D., Russell, N. S., Ten Dijke, P. und Stewart, F. A. (2009). Ionizing radiation shifts the PAI-1/ID-1 balance and activates notch signaling in endothelial cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 73(2): 506-513.
- Schilling, D., Bayer, C., Geurts-Moespot, A., Sweep, F. C., Pruschy, M., Mengele, K., Sprague, L. D. und 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.
- Schwarz, G. (1909). Ueber Desensibilisierung gegen Röntgen- und Radiumstrahlen. *München Med Wochen* 56: 1217-1218.
- Semenza, G. L. (2000). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35(2): 71-103.
- Semenza, G. L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29(5): 625-634.
- Shibusu, T., Shijubo, N. und Abe, S. (1998). Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 4(6): 1483-1487.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. und Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359(6398): 843-845.
- Skelly, M. M., Troy, A., Duffy, M. J., Mulcahy, H. E., Duggan, C., Connell, T. G., O'Donoghue, D. P. und Sheahan, K. (1997). Urokinase-type plasminogen activator in colorectal cancer: relationship with clinicopathological features and patient outcome. *Clin Cancer Res* 3(10): 1837-1840.
- Stadler, P., Becker, A., Feldmann, H. J., Hänsgen, G., Dunst, J., Würschmidt, F. und 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): 749-754.
- Sugano, Y., Matsuzaki, K., Tahashi, Y., Furukawa, F., Mori, S., Yamagata, H., Yoshida, K., Matsushita, M., Nishizawa, M., Fujisawa, J. und Inoue, K. (2003). Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 22(15): 2309-2321.

- Takahashi, H. und Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 109(3): 227-241.
- Tecimer, C., Doering, D. L., Goldsmith, L. J., Meyer, J. S., Abdulhay, G. und Wittliff, J. L. (2001). Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and its inhibitor type 1 in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 80(1): 48-55.
- Thomas, K. A. (1996). Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 271(2): 603-606.
- Thomlinson, R. H. und Gray, L. H. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9(4): 539-549.
- Thorwarth, D., Eschmann, S. M., Scheiderbauer, J., Paulsen, F. und Alber, M. (2005). Kinetic analysis of dynamic 18F-fluoromisonidazole PET correlates with radiation treatment outcome in head-and-neck cancer. *BMC Cancer* 5: 152.
- Torzewski, M., Sarbia, M., Verreet, P., Dutkowski, P., Heep, H., Willers, R. und Gabbert, H. E. (1997). Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator expression in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Clin Cancer Res* 3(12 Pt 1): 2263-2268.
- Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S. D., LaCasse, E., Korneluk, R. G. und Kerbel, R. S. (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264(3): 781-788.
- Unemori, E. N., Ferrara, N., Bauer, E. A. und Amento, E. P. (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 153(3): 557-562.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. und Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269(43): 26988-26995.
- Vassalli, J. D. (1994). The urokinase receptor. *Fibrinolysis* 8(Supplement 1): 172.
- Vaupel, P. (1977). Hypoxia in neoplastic tissue. *Microvasc Res* 13(3): 399-408.
- Vaupel, P., Kallinowski, F. und Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49(23): 6449-6465.
- Vaupel, P., Kelleher, D. K. und Höckel, M. (2001). Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28(2 Suppl 8): 29-35.
- Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 9 Suppl 5: 10-17.
- Vaupel, P. und Harrison, L. (2004). Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 9 Suppl 5: 4-9.
- Vaupel, P. und Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 26(2): 225-239.
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. und Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407(6801): 242-248.
- Yaromina, A., Zips, D., Thames, H. D., Eichele, W., Krause, M., Rosner, A., Haase, M., Petersen, C., Raleigh, J. A., Quennet, V., Walenta, S., Mueller-Klieser, W. und 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): 122-129.
- Yaromina, A., Krause, M., Thames, H., Rosner, A., Krause, M., Hessel, F., Grenman, R., Zips, D. und Baumann, M. (2007). Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 83(3): 304-310.
- Yaromina, A., Kroeber, T., Meinzer, A., Boeke, S., Thames, H., Baumann, M. und Zips, D. (2011). Exploratory study of the prognostic value of microenvironmental parameters

- during fractionated irradiation in human squamous cell carcinoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80(4): 1205-1213.
- Zhao, W., Spitz, D. R., Oberley, L. W. und Robbins, M. E. (2001). Redox modulation of the pro-fibrogenic mediator plasminogen activator inhibitor-1 following ionizing radiation. *Cancer Res* 61(14): 5537-5543.
- Ziemer, L. S., Koch, C. J., Maity, A., Magarelli, D. P., Horan, A. M. und Evans, S. M. (2001). Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors. *Neoplasia* 3(6): 500-508.

## 6.5 Danksagung

Mein Dank geht zunächst an Herrn Prof. Dr. Michael Molls für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit an der Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie zu verwirklichen.

Frau Dr. Daniela Schilling und dem gesamten Team der experimentellen Radioonkologie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und stete Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Christine Bayer für ihre hervorragende Betreuung und Begleitung in allen Phasen der Arbeit. Von den ersten Schritten im Labor bis zum Abfassen der Dissertation unterstützte und motivierte sie mich stets mit Geduld und konstruktiver Kritik.

Bei meinen Eltern, Pirkko und Heikki Artman, bedanke ich mich für ihre langjährige Unterstützung während meines Studiums.

Zuletzt danke ich herzlich meinem Freund Philipp. Seine Motivationsgabe während der experimentellen Phase und viele konstruktive Diskussionen während der Phase des Schreibens trugen entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit bei.