

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie

Klinikum rechts der Isar, München

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

Vergleichende Untersuchung zum Einfluss von Hypoxie auf das Plasminogenaktivierungssystem und den Wachstumsfaktor VEGF in vier Plattenepithelkarzinomzelllinien

Hannes Peter Egermann

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Molls
2. apl. Prof. Dr. U. Reuning

Die Dissertation wurde am 01.07.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.09.2011 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
Prolog	8
1 <u>Einleitung</u>	9
1.1 Tumorbiologie	10
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der Kopf-Hals-Tumoren	10
1.1.2 Tumorentstehung und Kanzerogenese	13
1.1.3 Charakteristika maligner Tumore	13
1.1.3.1 <i>Tumorneoangiogenese</i>	15
1.1.3.2 <i>Invasion und Metastasierung</i>	16
1.1.4 Mikromilieuveränderungen in Tumoren	18
1.1.4.1 <i>Tumor pH</i>	20
1.1.4.2 <i>Tumorhypoxie</i>	21
1.2 Besondere Forschungsgegenstände	24
1.2.1 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor: VEGF	24
1.2.2 Das Plasminogenaktivierungssystem: PAS	26
1.3 Strahlenbiologie und Radiotherapie	32
2 <u>Material und Methoden</u>	35
2.1 Materialverzeichnis	35
2.2 Tumorzelllinien und Tumormodell	36
2.3 Zellkultur und Hypoxie-Inkubation	37
2.4 Proteinmengen, ELISAs und uPA-Aktivitätsassays	38
2.5 Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit	41
2.6 pH-Wert Messung	42
2.7 Statistische Auswertung	42

3	<u>Ergebnisse</u>	43
3.1	Einfluss von Hypoxie auf die Koloniebildungsfähigkeit, die Gesamtproteinkonzentration und das Mikromilieu	43
3.2	VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivität der einzelnen Zelllinien	45
3.3	VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivität gepoolt über alle Zelllinien	48
3.4	Korrelationsanalysen	49
4	<u>Diskussion</u>	53
4.1	Überleben, Koloniebildungsfähigkeit und Proteinsekretion in Hypoxie	53
4.2	VEGF in Hypoxie	54
4.3	PAS in Hypoxie	56
4.4	Korrelationen der potenziellen Hypoxie- und Prognosemarker	60
4.5	Therapeutische Bedeutung und Ausblick	62
	Zusammenfassung	66
	Literaturverzeichnis	67
	Anhang	82
	Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

α -2-AP	α -2-Antiplasmin
AP-1	activator protein-1
bar	Druckeinheit
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius; Temperatureinheit
c.i.s	carcinoma in situ
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
Cu	Kupfer
d	Tag
DFI	disease-free interval
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco`s modified eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid, Gefrierschutzmittel in der Kryokonservierung
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECM	extra cellular matrix
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et altera
etc.	et cetera
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Gy	Gray, Energiedosis ionisierender Strahlung
h	Stunde
HGF	hepatocyt growth factor
HIF-1	hypoxia inducible factor-1
H/N-Ratio	Hypoxie zu Normoxie Ratio bzw. Quotient
HNSCC	squamous cell carcinoma of the head and neck
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRE	Hypoxie-reaktive Elemente
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin

INF	Interferon
kDa	kilo-Dalton, Einheit atomarer Masse
KHK	koronare Herzkrankheit
kPa	kilo-Pascal, Druckeinheit
kV	kilo-Volt
LCC	large cell lung carcinoma
LDLR	low-density lipoprotein receptor
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule, Druckeinheit
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
MSP	macrophage stimulating protein
mRNA	Messenger bzw. Boten-Ribonucleinsäure (-acid)
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NGF-γ	nerve growth factor-γ
NFκB	Nekrosefaktor-κ-B
ng	Nanogramm
O ₂	Sauerstoff
OS	overall survival
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor-1
PAS	Plasminogenaktivierungssystem
PBS	phosphate buffered saline
PCI	Protein-C-Inhibitor
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	Plattierungseffizienz
pH	lat. pondus / potentia hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration in Säuren und Basen
PIGF	placental growth factor
pM	Picomolar
PN-1	Proteinase Nexin-1

pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PSN	Penizillin, Streptomycin, Neomycin
r	Pearson Koeffizient der Korrelation
R ²	Lineare Regressionsanalyse
ras	Protoonkogen (rat sarcoma)
rpm	rounds per minute
SCC	small cell lung carcinoma
SCCHN	squamous cell carcinoma of the head and neck
SEM	standard error of the mean
SF	scatter factor = HGF
SPARC	secreted protein that is acidic and rich in cysteine
SPSS	statistical package of social science
s.o.	siehe oben
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline + Tween 20
TCD ₅₀	tumor control dose
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF- α	tumor necrosis factor- α
tPA	tissue-typ Plasminogenaktivator
u.a.	unter anderem
ÜF	Überlebensfraktion
Units/mg	Units pro Milligramm Enzymaktivität
uPA	urokinase-typ Plasminogenaktivator
uPAR	urokinase-typ Plasminogenaktivator-Rezeptor
UV	Ultraviolettstrahlung
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VN	Vitronectin
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1	Weltweite Inzidenzen solider Tumoren	S.10
Abb.2	Die wichtigsten Tumoreigenschaften von Krebszellen	S.14
Abb.3	Der mehrstufige Invasionsprozess der Metastasierung	S.17
Tab.1	Die charakteristischen "P" des Mikromilieus solider Tumoren	S.19
Abb.4	Ursachen und Konsequenzen der Tumorhypoxie	S.22
Abb.5	Der "circulus vitiosus" der Tumorhypoxie	S.23
Abb.6	VEGF und PAS: Berührungspunkte und Zusammenhänge	S.26
Abb.7	Hypoxie-vermittelte Mechanismen erworbener Therapieresistenz	S.33
Tab.2	Tumorcharakteristika	S.36
Abb.8a	Plattierungseffizienzen mit Überlebensfraktionen	S.43
Abb.8b	Gesamtproteinmenge in Normoxie und Hypoxie Vergleichskulturen	S.44
Abb.8c	pH-Werte unter Normoxie und Hypoxie	S.44
Abb.9a	Durchschnittliche VEGF-Konzentration	S.45
Abb.9b	Durchschnittliche PAI-1-Konzentration	S.46
Abb.9c	Durchschnittliche uPA-Konzentration	S.46
Abb.10	Durchschnittliche uPA-Aktivität	S.47
Tab.3	Signifikanzniveaus (p-Werte) sämtlicher Analysen	S.48
Tab.4	gepoolte Normoxie-/Hypoxie-Daten über alle Zelllinien	S.48
Abb.11	H/N-Ratio der gepoolten Daten über alle Zelllinien	S.49
Abb.12a	Korrelation zwischen VEGF und uPA	S.50
Abb.12b	Korrelation zwischen VEGF und PAI-1	S.50
Abb.12c	Korrelation zwischen VEGF und uPA-Aktivität	S.50
Abb.12d	Korrelation zwischen PAI-1 und uPA	S.51
Abb.12e	Korrelation zwischen PAI-1 und uPA-Aktivität	S.51
Abb.12f	Korrelation zwischen uPA und uPA-Aktivität	S.51
Tab.5	Korrelationen [r] mit Signifikanzniveau [p]	S.52

Prolog

Der Geist der Medizin ist leicht zu fassen:
Ihr durchstudiert die groß` und kleine Welt,
Um es am Ende gehn zu lassen,
Wie`s Gott gefällt.

[Goethe, 1997, S.75]

Für meine Familie.

1 Einleitung

“All diseases are in the last analysis reducible to disturbances, either active or passive, of large or small groups of living units, whose functional capacity is altered in accordance with the state of their molecular composition and is thus dependent on physical and chemical changes of their contents.” [Baserga, 1971, S.iii]

Mehr als 150 Jahre nach Veröffentlichung dieser Zeilen aus der Hand Rudolf Virchows im Jahre 1855 sind zahlreiche Forschungsgruppen rund um den Erdball damit beschäftigt, diesem molekularpathologischen Ansatz gerecht zu werden. Es werden experimentell wie klinisch Vorgänge auf zellulärer Ebene untersucht, die das Entstehen, die Ursachen und die Folgen sämtlicher Erkrankungen erklären und darüber hinaus Therapie- und Diagnostikansätze ermöglichen sollen. Speziell auf dem Feld der Tumorforschung haben sich in den letzten Jahrzehnten Erkenntnisse eingestellt, die vielversprechende Türen öffneten, dieser steten Herausforderung immer erfolgreicher zu begegnen. So können heute 45 bis 50 % aller Tumorpatienten geheilt werden. Strahlentherapie spielt dabei in ca. 70 % der geheilten Fälle als alleinige, wie z.B. bei verschiedenen Plattenepithelkarzinomen, darunter auch die des Kopf und Halses, oder in Kombination mit anderen Therapiemodalitäten eine entscheidende Rolle [Molls, 1998, S.1].

Diese Arbeit ist Teil des DFG-geförderten multiinstitutionellen Projekts: „Bedeutung von Hypoxie und des metabolischen Mikromilieus für die Strahlentherapie solider Tumoren“ (PAK 124, AD 132/3-2). Das Teilprojekt aus München beschäftigt sich mit dem Einfluss von Hypoxie auf das Tumormikromilieu. Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, die Wirkung von Hypoxie auf die Mengen des urokinase-typ Plasminogenaktivators (uPA), des Plasminogenaktivatorinhibitors-1 (PAI-1) und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in vier Plattenepithelkarzinomzelllinien von Kopf-Hals-Tumoren – CAL33, HSC4, SAS und XF354 – zu untersuchen. Es wurden zudem Korrelationsanalysen der Spiegel von VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivität untereinander sowie von Hypoxie und Normoxie erhoben. Inwiefern die sezernierten Proteine VEGF, uPA und PAI-1 als unabhängige endogene Marker für Tumorphoxie verwendet werden können, stellt eine weitere Fragestellung dieser Arbeit dar. Die Folge wäre die Möglichkeit einer individuelleren, besser angepassten Therapiemodalität.

Das Forschungsspektrum erweiternd wurden zur Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien verschiedene Modelle verwendet. Hierunter wurden zum einen Plättierungseffizienzen (PE) herangezogen, um das Klonogenitätsverhalten nach Hypoxie zu charakterisieren. Zum anderen wurden pH-Wert-Analysen normoxischer und hypoxischer Proben zur Untersuchung des Tumormikromilieus durchgeführt.

1.1 Tumorbiologie

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der Kopf-Hals-Tumoren

Die Kopf-Hals-Malignome stellen in ihrer Summe der einzelnen Entitäten und geschätzten 640.000 Neuerkrankten pro Jahr weltweit die sechsthäufigste solide Krebserkrankung dar (Abb.1). Aus den Daten M. D. Parkins errechnet sich somit ein 6,5 prozentiger Anteil an allen malignen Neuerkrankungen weltweit [Parkin, 2005, S.78]. Die Kopf-Hals-Malignome sind in sich keine einheitliche Tumorart. Sie setzen sich zusammen aus Malignomen unterschiedlicher anatomischer Lokalisation wie unterschiedlicher Histologie.

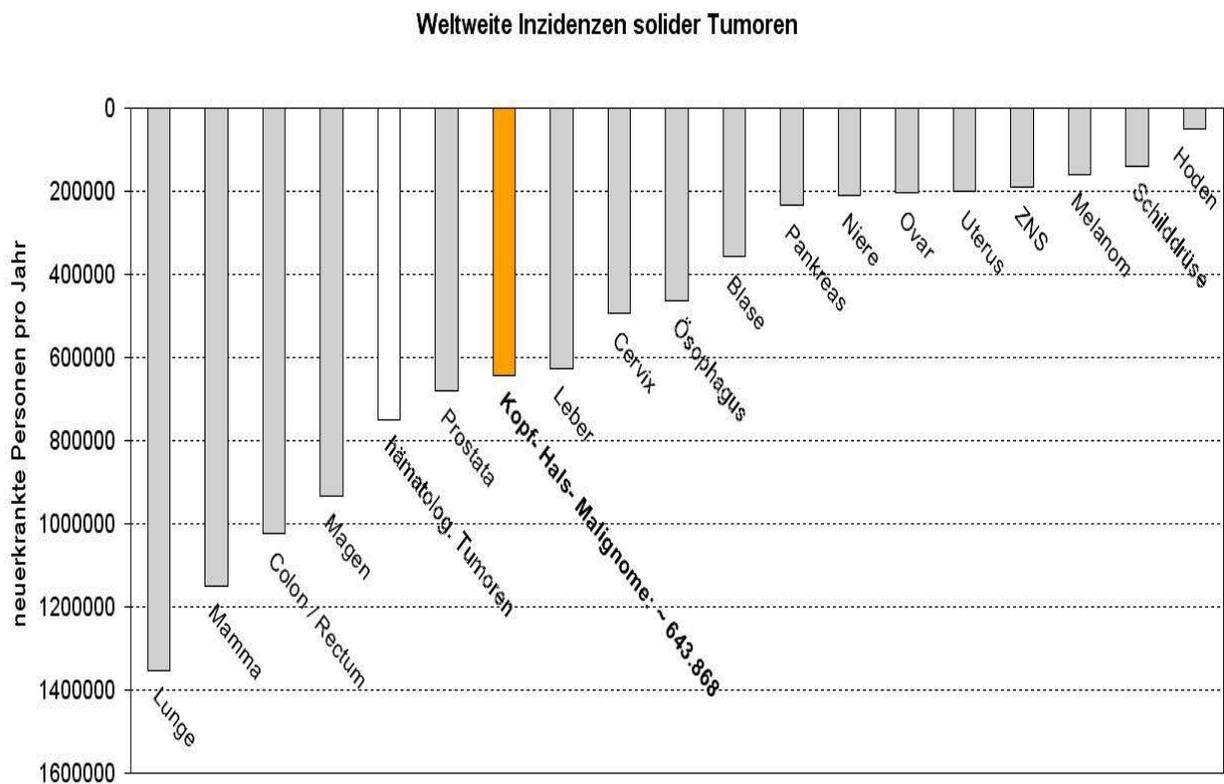


Abb.1: geschätzte Inzidenzen weltweit, verschiedener solider Tumorentitäten in neuerkrankten absoluten Personen pro Jahr. (modifiziert nach Parkin, 2005, S.78)

Etwas mehr als 40 % aller Kopf-Hals-Tumoren machen die Karzinome der Mundhöhle aus. Das Mundhöhlenkarzinom ist zu 90 bis 95 % ein Plattenepithelzellkarzinom. Karzinome des Nasopharynx, der Nase und der Nasennebenhöhlen sowie des restlichen Oropharynx stellen zusammen ca. 30 % aller Kopf-Hals-Malignome. Bei den Nasopharynx-Karzinomen unterscheidet man verhornende (keratinisierende), nicht verhornende und undifferenzierte. Die Erkrankung verläuft lange Zeit klinisch stumm bis meist palpabel vergrößerte Lymphknoten auffallen. Zu diesem Zeitpunkt sind diese Karzinome bereits lymphogen in die zervikalen Lymphknoten oder seltener hämatogen fernmetastasiert. Das Nasopharynxkarzinom ist strahlensensibel. Mit moderner

Strahlentherapie wird eine 50 bis 70 prozentige Überlebensrate erreicht. Mit 25 % ist das Larynxkarzinom die dritthäufigste Neoplasie des Kopf-Hals-Bereiches. Fast alle Tumoren des Larynx sind Plattenepithelzellkarzinome. Zwei Drittel sind Glottis-Karzinome, die meist nur eine Stimmbandseite befallen und relativ spät lymphogen metastasieren. Sie besitzen eine relativ gute Prognose. Die Geschlechtsverteilung Männer zu Frauen rangiert in allen Entitäten zwischen 2:1 und 10:1 (♂:♀) [Cotran, 1999, S.760 ff.; Wenig, 2008, S.1061 ff.; Strong, 1986, S.447; Lorè, 1986, S.467].

Jede der kurz dargestellten Entitäten hat einen mehr oder weniger großen Anteil des plattenepithelialen Karzinoms. Da in der vorliegenden Arbeit die „squamous cell carcinoma of the head and neck“ (SCCHN / HNSCC) im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen, sollen sie in ihrer Summe als eigenständige Tumorentität aufgefasst werden. Dies scheint ein notwendiger und legitimer Schritt zu sein, sind die SCCHN doch bezüglich Ätiologie, Pathogenese, Histologie, Therapie und Prognose sehr ähnlich.

Ätiologisch unterscheidet man exogene von endogenen Faktoren. Zu letzteren zählen Alter, Geschlecht und genetische Determinanten. Der Erkrankungsgipfel der Plattenepithelzellkarzinome liegt typischerweise zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade [El Husseiny, 2000, S.197]. Und wie oben bereits einzeln angedeutet gibt es eine klare Geschlechtsverteilung im Verhältnis Männer zu Frauen. Je nach Autor wird von einer 1,5:1 bis zu einer 4:1 Verteilung ausgegangen [Erisen, 1996, S.225; Levy, 1991, S.330; Reichard, 1993, S.239]. Als genetische Determinanten wurden Mutationen vor allem des p53-Tumorsuppressorgens beschrieben. Koch *et al.* konnte 1995 zeigen, dass vor allem jüngere, an SCCHN erkrankte Patienten häufig eine p53-Genmutation aufwiesen [Koch, 1995, S.262]. Für die Entstehung von Karzinomen werden aber vor allem exogene Faktoren verantwortlich gemacht. Hierzu zählt an erster Stelle der Konsum von Tabak und Alkohol [Koch, 1995, S.262]. Der Tabakkonsum ist der wichtigste ursächliche Faktor in der Entstehung oraler Karzinome und umfasst das Rauchen von Zigaretten, Zigarren, Pfeifen – aber auch von Marihuana. Das Larynxkarzinom zum Beispiel ist zu annähernd 100 % mit Tabakrauchen und Alkoholgenuss assoziiert. Treten sie zusammen auf, potenziert sich das Erkrankungsrisiko sogar. Weitere Risikofaktoren sind gesteigerter Alkoholkonsum, UV-Bestrahlung, Betelnuss-Konsum, Kanzerogene wie Nickel, Chrom und aromatische Kohlenwasserstoffe oder auch die Infektion mit onkogenen Viren, wie z.B. dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem humanen Papilloma Virus (HPV) [Cotran, 1999, S.760 ff.; Baker, 1986, S.443; Strong, 1986, S.453].

Histologisch lassen sich Plattenepithelzellkarzinome in gut differenzierte bis hin zu entdifferenzierten bzw. anaplastischen unterscheiden. Sporadisch imponieren Plattenepithelzellkarzinome auch sarkomartig. Es gilt die Regel von der umgekehrten

Proportionalität zwischen Differenzierungsgrad und Malignität. Die Dysplasie-Karzinom-Sequenz beschreibt die stufenweise Entdifferenzierung der Plattenepithelkarzinome. Ein zunächst gesundes Epithel wird durch zunehmende Zell- und Kernatypien zu einem dysplastischen Gebilde. Bleibt die Basalmembran zwar zunächst undurchbrochen, die Zellschichten sind aber bereits aufgehoben, so beschreibt man ein *carcinoma in situ* (*c.i.s.*). Dieses bildet keine Metastasen. Das klassische Karzinom hat die Basalmembran durchbrochen und kann potentiell metastasieren. Die meisten Karzinome wachsen zunächst infiltrativ ehe sie metastasieren. Mehr als die Hälfte der Patienten, die an Plattenepithelkarzinomen versterben, weisen bereits hämatogene Fernmetastasen, v.a. in Lunge, Leber oder Knochen, auf [Cotran, 1999, S.761; Strong, 1986, S.460; Roessner, 2004, S.196, 203].

Im Jahr 2005 bemerken Chin *et al.* treffend: „Head and neck cancer (HNSCC) is one of the most distressing human cancers, causing pain and affecting the basic survival functions of breathing and swallowing.“ [Chin, 2005, S.789]. So verlangt das Therapiemanagement der Kopf-Hals-Malignome die besondere multidisziplinäre Zusammenarbeit von Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Die Chirurgie umfasst in frühen Stadien die Resektion des Primärtumors, in späteren Stadien zudem die Entfernung lokaler Lymphknotenstationen und Rekonstruktion entstandener Defekte. Sie erzielt prinzipiell die besten Langzeitergebnisse. Allerdings birgt sie gerade bei großen oder weit fortgeschrittenen Tumoren die Gefahr gehäufter Komplikationen mit Entstellung, Schmerz und geringem Benefit. Chemo- und insbesondere Strahlentherapie bieten alternative und additive Ansätze zur Behandlung. So werden in etwa die Hälfte aller Kopf-Hals-Tumoren von Strahlentherapeuten behandelt, entweder primär als alleinige Modalität der Therapie oder (neo-)adjuvant in Kombination mit Chirurgie. Im Falle einer frühzeitigen Diagnostizierung können heutige Therapiemodalitäten in Kombination ein 75 prozentiges 5-Jahres-Überleben erreichen. Da die meisten Patienten aber erst spät, in metastasiertem Zustand erkannt werden, sinkt das 5-Jahres-Überleben auf ca. 35 %. Parkin *et al.* rechnet insgesamt mit einem „fatality score“ (Mortalität/Inzidenz) von 0,54. Dieser Wert bedeutet, dass 54 % aller Erkrankten auch an ihrer Erkrankung versterben. Vergleichsweise stellt dies eine moderate Mortalität dar, hat doch das Lungenkarzinom zum Beispiel einen „fatality score“ von 0,87 [Parkin, 2005, S.78; Baker, 1986, S.440; Strong, 1986, S.449].

Es wäre also von großer Bedeutung neben den klassischen klinisch-pathologischen Faktoren (Alter, Geschlecht, TNM-Klassifikation) prädiktive Marker der Aggressivität des Tumors, seines Rezidiv-/Metastasierungspotentials und v.a. des Behandlungserfolges einer bestimmten Therapieform (Sensitivität gegenüber Radio-/Chemotherapie) zu finden. Dies würde die Entwicklung individueller Therapieschemata ermöglichen.

1.1.2 Tumorentstehung und Kanzerogenese

In gesunden Organismen sind Zellwachstumsprozesse sehr genau reguliert. Während des jugendlichen Wachstums überwiegt die Zellproliferation. Im Erwachsenenalter halten sich die proliferativen und apoptotischen Prozesse die Waage. Es kommt zwar zu einer steten Erneuerung, z.B. von Epithelgewebe des Dünndarmes oder von zirkulierenden Blutzellen, gleichzeitig aber gehen im Sinne eines „steady state“ viele Zellen zu Grunde [Lodish, 2001, S.1140]. Gerät dieses Gleichgewicht aus den Fugen, entsteht ein „neoplasma“ (griech. neo = neu; plasma = geformte Sache). Tumorwachstum reflektiert somit entweder einen Zellproliferationsexzess, der größer ist, als der programmierte Zelltod oder normale Wachstumsraten bei deutlich reduzierter Apoptoserate. Unabhängig davon, ist es erst zur progressiven Zellzahlvermehrung gekommen und bilden sich solide Geschwülste aus, so spricht man von Tumoren. Diese können als benigne Form meist lokalisiert bleiben, als maligner Tumor aber auch lokal verdrängend oder weit streuend wachsen [Giordano, 2008, S.137, 151].

Ohne auf Details der genetischen Grundlagen der Tumorentstehung genauer einzugehen, bedient man sich zur Erklärung folgendem vereinfachten Modell: Im Laufe des Lebens ist die Desoxyribonucleinsäure (DNS) jeder lebenden Zelle chronischen wie akuten, äußeren wie inneren Einflüssen (z.B. ionisierende Strahlung, Chemikalien, viralen Infektionen, etc.) ausgesetzt, die zu Mutationen im Genom führen. Versagen zelluläre Reparationsvorgänge, entstehen zum einen aus Protoonkogenen, die das Zellwachstum physiologischerweise regulieren, Onkogene („Krebsgene“) mit gesteigerter, unkontrollierter Funktion. Zum anderen kommt es zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (Antionkogenen, z.B. p53). Daraus resultieren genetische Imbalancen wichtiger, das Zellwachstum steuernder Funktionen [Hanahan, 2000, S.57]. So können ein einziger transformierter Zellklon und seine Vorläuferzellen entsprechend der klonalen Selektion des „multi-hit“ Modells der Kanzerogenese erbliche Veränderungen anhäufen und an die nächste Zellgeneration weitervererben, die schließlich zum zellulären Phänotyp eines malignen Karzinoms führen. Krebs stellt damit eine erworbene genetische Erkrankung dar [Knudson, 2001, 157 ff.; Klausner, 2002, S. 3].

1.1.3 Charakteristika maligner Tumore

Alle Tumoren, benigne wie maligne, bestehen im Wesentlichen aus drei Hauptkomponenten. Mehr oder weniger unkontrolliert proliferierende neoplastische Zellen bilden das eigentliche Tumorparenchym. Dies macht in der Tat meist weniger als 1 % der Tumormasse aus. Das restliche Tumorstroma setzt sich zu fast 90 % aus Bindegewebe

sowie 1 bis 10 % Blutgefäßen zusammen. In manchen Tumoren können flüssigkeitsgefüllte Nekrosezonen eine vierte Komponente darstellen [Stubbs, 1998, S.115 ff.].

Hanahan und Weinberg fassten im Jahr 2000 die bedeutendsten Eigenschaften von Tumorzellen wie folgt zusammen: Tumorzellen besitzen Apoptoseresistenz (1), zeigen keine Reaktion auf externe Wachstumssignale und steuern ihre Wachstumssignale selbst (2). Sie besitzen darüber hinaus ein unbegrenzt Replikationspotential (3), die Fähigkeit zur selbstständigen Neoangiogenese (4), zur Invasion (5) und zur Metastasierung (6) (Abb.2) [Hanahan, 2000, S.57].

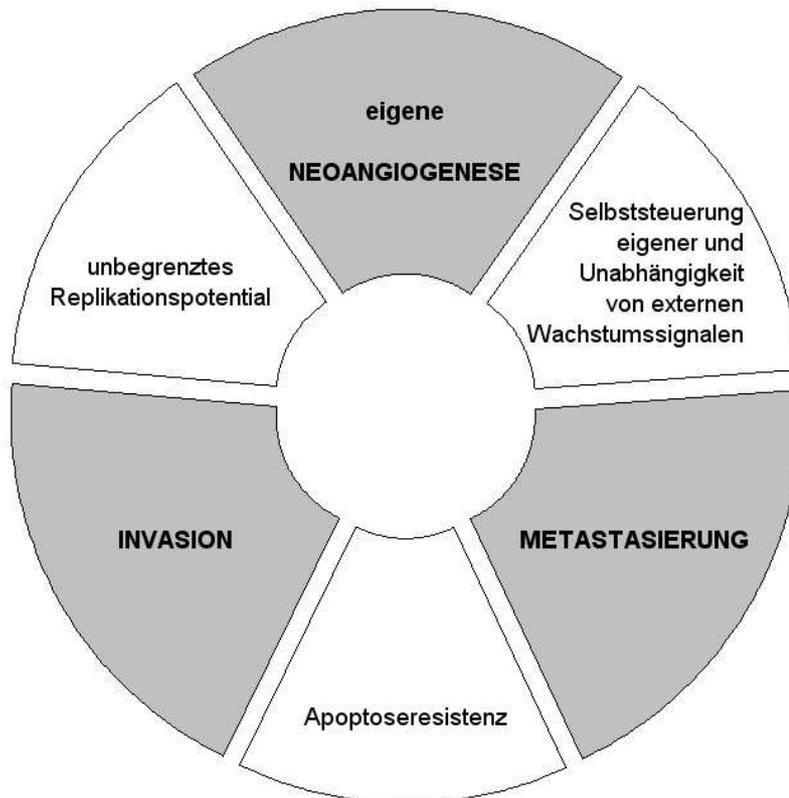


Abb.2: Die wichtigsten Tumoreigenschaften von Krebszellen
(modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2000, S.58)

Bezüglich der Basisprozesse der Zellteilung, Zelllösung, Zellmigration, Zellinvasion und Kolonienbildung bestehen zwischen Tumor- oder Normalzellen, wie Makrophagen, Trophoblasten und Endothelzellen, keine qualitativen Unterschiede. Tumorzellen zeigen diese Prozesse aber charakteristischerweise zu Zeiten und an Orten, die unvereinbar sind mit normaler, geregelter Zellfunktion [Liotta, 1991, S.328; van Roy, 1992, S.163].

Da im Fokus dieser Arbeit vor allem Untersuchungsparameter von Invasions-, Metastasierungs- und Neoangiogeneseprozessen stehen, soll auf diese molekularbiologischen Vorgänge genauer eingegangen werden.

1.1.3.1 Tumorneoangiogenese

Angiogenese findet im erwachsenen Organismus nur selten statt: In manchen physiologischen Prozessen, während des weiblichen Reproduktionszyklus z.B. bei der Follikelreifung, im Corpus luteum während der Ovulation oder während einer Schwangerschaft in der Plazenta. Aber auch in Reparationsprozessen bei der Wund- bzw. Knochenbruchheilung kommt es zur strengregulierten Neubildung von Gefäßen. Für das normale Wachstum und die Entwicklung von Geweben ist die Proliferation von Blutgefäßen essentiell. Unkontrollierte Angiogenese findet sich v.a. in pathologischen Prozessen wieder [Klagsbrun, 1991, S.217].

So haben Untersuchungen des Tumorwachstums *in vivo* gezeigt, dass die rasche, exponentielle Tumorprogression erst mit entsprechender Gefäßversorgung einsetzt bzw. unterhalten wird. Andernfalls bleibt das Tumorwachstum auf die Sauerstoffdiffusionsstrecke von circa 1 bis 2 mm³ beschränkt. Somit stellt die Fähigkeit eines Tumors, Gefäße zu bilden, um eine suffiziente Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu ermöglichen, eine Schlüsselfähigkeit von Neoplasmen dar. Gleichzeitig wird es Tumorzellen so ermöglicht, Anschluss an die Kreislaufzirkulation zu erlangen, um im zweiten Schritt Metastasen in fernen Organen bilden zu können (siehe Kapitel 1.1.3.2) [Folkman, 1990, S.4].

Per definitionem meint „Angiogenese“ die Etablierung einer neuwertigen Blutversorgung aus vorbestehenden Blutgefäßen. Die Bildung völlig neuer Kapillaren und Gefäße aus mesodermalen Vorläuferzellen hingegen wird „Vasculogenese“ genannt. So darf die „Tumorneoangiogenese“ genau genommen als Kombination beider Prozesse verstanden werden. Die Hauptblutversorgung eines Tumors wird zunächst durch vorbestehende Gefäße gewährleistet. Aus zirkulierenden Endothelvorläuferzellen wird aber schließlich auch die Neubildung eines eigenständigen Gefäßbaumes organisiert [Reinmuth, 2003, S.199].

Die Tumorneoangiogenese ist ein mehrstufiger Prozess. Ruhende Endothelzellen werden induziert, ihre Basalmembran lokal aufzubrechen und neue Blutgefäße zu bilden, indem sie in das Umgebungsstroma aussprießen. Die kritischsten Schritte hierbei schließen die Degradation der Extrazellulärmatrix (ECM), die Endothelzellproliferation und -migration sowie die Organisation der Endothelzellen in einer höheren Ordnung zur Ausbildung eines Gefäßlumens ein. Dieses komplexe Zusammenspiel wird von einer großen Zahl an pro-angiogenetischen wie anti-angiogenetischen Faktoren reguliert. Allen voran zu stellen ist VEGF (vascular endothelial growth factor), der bedeutendste Angiogenesefaktor. Hierauf geht die Arbeit später noch genauer ein (siehe Kapitel 1.2.1). Der vielleicht zweitwichtigste Faktor ist FGF (fibroblast growth factor). Indem FGF die Produktion von Gewebsproteasen, Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) und des urokinase-typ

Plasminogenaktivators (uPA) steigert, verbessert er die Motilität und das Überleben der Endothelzellen im ECM. Gleichzeitig hat FGF positiven Einfluss auf die höhere Organisation der neu entstehenden Gefäße [Chen, 2000, S.648; Mandriotta, 1995, S.9709].

Weitere Stimulatoren der Gefäßneubildung sind PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor), Angiopoetin, IL-8 und IL-1 (Interleukin), verschiedene Integrine, TGF- α , TGF- β (transforming growth factor), TNF- α (tumor necrosis factor), HGF (hepatocyt growth factor), Interferon- α (INF), INF- β , INF- γ sowie IGF-1 und IGF-2 (insulin growth factor). Einige dieser Faktoren steigern über spezifische Mechanismen die VEGF-Ausschüttung oder wirken als Co-Faktor mit diesem in Kombination pro-angiogenetisch. Angiopoetin z.B. bewirkt für sich allein sogar eine Rückbildung von Gefäßen. In Anwesenheit von bzw. in Kombination mit VEGF scheint aber die Gefäßdestabilisierung durch Angiopoetin eine pro-angiogenetische Antwort zu induzieren [Akagi, 1998, S.4008; Reinmuth, 2003, S.201].

Bestimmte Schlüsselreize wie Hypoxie, niedriger pH-Wert, Tumorgöße, Wachstumsfaktoren, Zytokine, aktivierte Onkogene oder der Verlust der Tumorsuppressorgenfunktionen tragen zu einer gesteigerten Ausschüttung pro-angiogenetischer Faktoren bei.

1.1.3.2 Invasion und Metastasierung

Die meisten Karzinome beginnen ein lokalisiertes Wachstum. Ungezügelter Tumorwachstum führt *per se* nicht zwingend zu Metastasierung. Solange die Basalmembran des Ursprungsepithels nicht penetriert wird, sind rein proliferative Erkrankungen und „carcinoma in situ“ durch vollständige Exzision heilbar und wenig maligne. Zur Abgrenzung wahrer Malignität von Karzinomen gehören aber gerade und fatalerweise exklusive Fähigkeiten, die es Tumorzellen ermöglichen Gewebsbarrieren zu überwinden. Damit gefährden sie das umliegende Gewebe und erlangen die Möglichkeit zu metastasieren [Liotta, 1991, S.327]. In diesem Sinne bauen Tumorinvasion und Metastasierung aufeinander auf und müssen als mehrstufige Ereignisse aufgefasst werden (Abb.3). Erster und essentieller Schritt ist die Loslösung aus dem Ursprungszellverband. Es kommt zur Penetration der Basalmembran, Invasion in und Migration durch das umgebende Gewebe [van Roy, 1992, S.164].

Zellmigration bedeutet die Bewegung jeder Zelle durch die extrazelluläre Matrix. Dies benötigt die Extension des vorangehenden Zellteils und die Retraktion seines Zellendes. Im Inneren wandernder Zellen wird das Aktin-Zytoskelett andauernd erneuert. Am führenden Ende werden Aktin-Filamente an-, am nachrückenden Zellteil abgebaut. So

entsteht eine mechanische Kraft der Fortbewegung, die Zellkontraktion. In der ECM ist die Extension des führenden Zellstücks mit „Adhäsion“, Anheftung, assoziiert – hier befinden sich v.a. uPA und sein Rezeptor (uPAR). Die Retraktion des nachziehenden Stückes ist an „Detachment“, Loslösung, von der ECM geknüpft. Der Fortschritt von Zellmigration zu Zellinvasion bedingt einen zusätzlichen komplexen Schritt, da Invasion eben nicht nur Zell-Lokomotion, sondern die aktive Penetration durch Basalmembranen in die ECM darstellt. Und es bedarf hierzu insbesondere der Aufspaltung alter und der Knüpfung neuer Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Verbindungen. Wichtig sind dabei u.a. Wachstumsfaktoren, verschiedene proteolytische Enzyme und Adhäsionsmoleküle [Friedl, 2009, S.132; Andreasen, 1997, S.8].

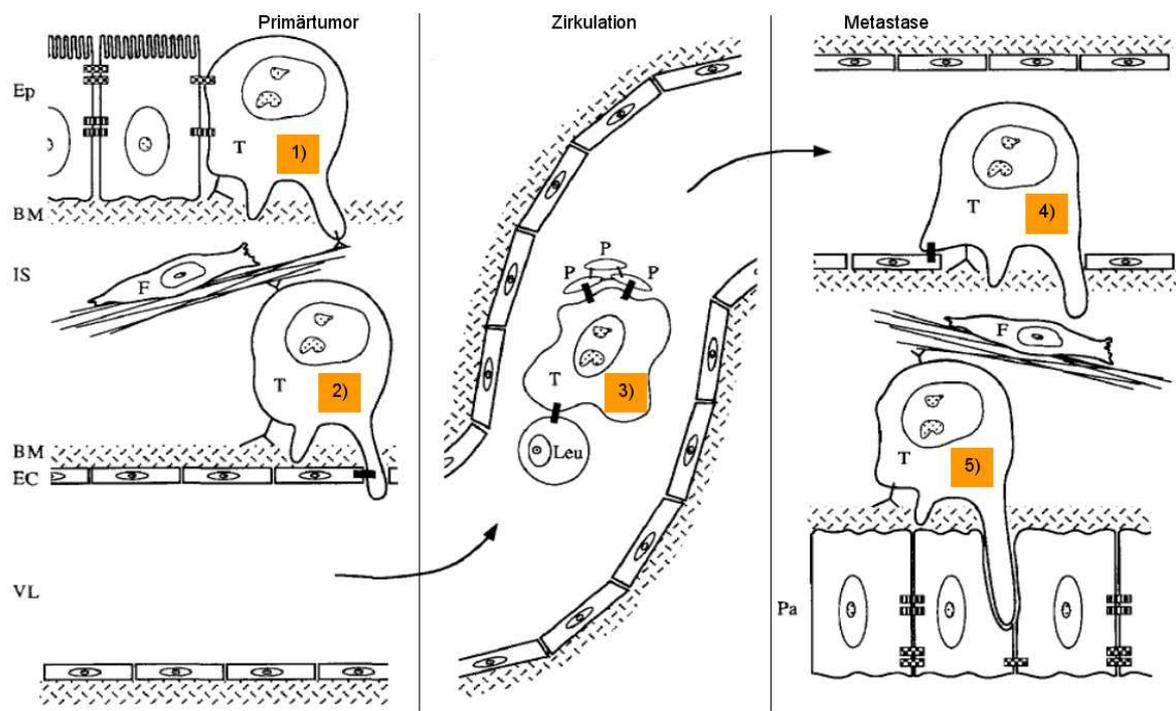


Abb.3: Der mehrstufige Invasionsprozess der Metastasierung; 1) Loslösung des Primärtumor aus dem Ursprungsgewebe, Migration durch und Invasion in das Umgebungsgewebe; 2) Intravasation; 3) Transport mit der Zirkulation; 4) Extravasation; 5) Invasion in das Organ der Metastasierung;
 Legende: Tumorzelle (T), Epithel (Ep), Basalmembran (BM), Interstitium (IS), Fibroblast (F), Endothelzelle (EC), aggregierte Blutplättchen (P), Leukozyt (Leu), Gefäßlumen (VL), metastatisch befallenes Organ (Pa). (modifiziert nach Van Roy, 1992, S.164)

Letztere vermitteln als Adhäsionsrezeptoren Zell-Matrix- und Zell-Zell-Bindungen direkt. Zudem werden durch Bindung an ihre Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden mit Auswirkungen auf Zellproliferation, Differenzierung und Migration ausgelöst. Integrine und ihre entsprechenden Liganden (z.B. Vitro- und Fibronectin) z.B. vermitteln die Expression aus Stromazellen und die anschließende Anbindung an die Tumorzelloberfläche verschiedener Kollagenasen (v.a. MMPs). So konzentriert sich die Proteinaseaktivität gewissermaßen an der „Invasionsfront“.

Matrix-Metallo-Proteinase und die Serinproteasen des Plasminogenaktivierungssystems (PAS) sind die bedeutendsten Vertreter der in diesem Prozess involvierten Enzyme mit

proteolytischer Aktivität. Der uPA wandelt Plasminogen zu Plasmin um, dieses spaltet z.B. Laminin und aktiviert u.a. die Prokollagenase Typ IV, sowie verschiedene ruhende MMPs. Diese werden auch physiologischerweise bei Wundheilungsprozessen oder bei der plazentaren Einnistung sezerniert. Die Basalmembran, die u.a. aus Kollagen IV, Laminin und Proteoglykan besteht, wird durch solche Proteasen aufgebrochen. In Tumoren ist die Ausgewogenheit dieses Zusammenspiels von uPA und MMPs sowie deren Inhibitoren PAI-1 und TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase) gestört. Sie werden vermehrt ausgeschüttet und besitzen zudem veränderte Substratspezifität. Tumorzellmigration und Invasion werden dadurch erst möglich.

Als weiterer Schritt hin zur Metastasierung gilt es, nach Überwindung der Basalmembran und Durchwanderung der ECM, den Eintritt in das Gefäßsystem zu erlangen. Da bei Lymphgefäßen nur große Stämme mit Basalmembranen ausgestattet sind, aber in lymphatischen Kapillaren fehlen, penetrieren invasive Tumorzellen diese leichter und schneller als Blutgefäße. Dies könnte die Beobachtung erklären, dass SCCHN meist früh lymphogen und spät hämatogen metastasieren. Ist der Eintritt durch die gleichen molekularen Mechanismen wie oben beschrieben gelungen, kommen als nächste Schritte das Überleben im Blut- bzw. Lymphstrom und die Arretierung am Gefäßendothel sowie die neuerliche Penetration durch dasselbige. Nur ca. 0,1 % der ins Blutgefäßsystem gelangten Tumorzellen überleben ihre „Reise“ und entkommen dem Blutkreislauf an neuer Stelle. Gemäß der „seed and soil“-Theorie Pagets von 1889 angekommen, nistet sich die Filia entsprechend ein, etabliert ihr lokales Wachstum und betreibt erneut Neoangiogenese mittels Eigenproduktion autokriner Stimulatoren bzw. Wachstumsfaktoren [Blasi, 1997, S.415; Brooks, 2001, S.451; Weinmann, 2002, S.1355; van Roy, 1992, S.164, 167; Ribatti, 2006, S.146; Giordano, 2008, S.148; Graham, 1999, S.617].

Als Überschrift dieser molekularen Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen fand Andreasen 1997 passend den Begriff des „cancer cell-directed tissue remodelling“. Die Grundmechanismen dieser Neumodellierung mögen dieselben sein wie bei Wundheilungsprozessen oder der Embryonalentwicklung. Aber während Angiogenese, Migration, Invasion und Metastasierung zeigen sie besonders fatal ihr Entartungs- bzw. „Missbrauchspotential“ [Andreasen, 1997, S.1].

1.1.4 Mikromilieuveränderungen in Tumoren

Die Gefäßversorgung eines Organs steht entsprechend der metabolischen Aktivität der jeweiligen Zellen in ausgewogenem Verhältnis zu dem benötigten Blutfluss. In Tumoren ist dieses Prinzip nicht anwendbar, denn während ihres rasanten, ungezügelten,

unkontrollierten Wachstums bleibt die Zellordnung sowie eine geregelte Morpho- und Angiogenese auf der Strecke [Chaplin, 1998, S.133].

Die neu entstandenen tumorösen Gefäße zeigen zahlreiche Veränderungen gegenüber der normalen Gefäßarchitektur. Sie bilden ein chaotisches Netzwerk aus zahllosen Mikrogefäßen. Diese „eilig“ gebildeten Blutkanäle sind allenfalls einlagig mit Endothel ausgekleidet und weisen zahlreiche Leckagen auf. Kontraktile Elemente, im Sinne einer Schicht glatter Muskelzellen, fehlen ebenso wie neuronale Strukturen für eine adäquate Innervation. Auch entsprechende Rezeptoren physiologischer wie pharmakologischer Botenstoffe sind kaum vorhanden. Somit sind sie zur Autoregulation nicht fähig. Es treten häufig arteriovenöse Shunts und irreguläre Gefäßverzweigungen auf. Morphologisch regelhafte Gefäße in Tumoren hält man für solche, um die der Tumor gewachsen ist. In Tumoren findet sich zudem meist kein funktionierendes Lymphgefäßsystem. Somit ist es nicht überraschend, dass der interstitielle Druck in Tumoren bis zu 45 mmHg beträgt. Aus all diesen Faktoren resultiert ein chaotischer, träger, heterogener und definitiv inadäquater Blutfluss, der gepaart mit einem deutlich erhöhten Grundumsatz der rasant proliferierenden Tumormasse zu einer mangelhaften Sauerstoff und Nährstoffversorgung führt [Endrich, 1998, S.26; Song, 1998, S.193; Vaupel, 2004, S.11]. Für das lebensfeindliche metabolische Mikromilieu solider Tumoren beschrieb Vaupel 2004 seine charakteristischen „P“ (Tab.1) [Vaupel, 2004, S.203; Weinmann, 2002, S.1356].

Tab. 1: Die charakteristischen "P" des lebensfeindlichen, metabolischen Mikromilieus solider Tumoren

P erfusion inadequacies and vascular chaos	↑
P erfusion heterogeneities	↑
P ermeability of tumor microvessel	↑
P ressure of interstitial fluid	↑
P roduction of lactate	↑
P aucity of nutrients	↑
P artial pressure of oxygen (pO ₂)	↓
P roduction of high-energy compounds	↓
p H of extracellular compartment	↓

Abkürzungen: ↑ Zunahme; ↓ Abnahme

(modifiziert nach Vaupel, 2004, S.203)

Hauptaugenmerk und Gegenstand lag in den vorliegenden Untersuchungen auf der für solide Tumore typischen Sauerstoffmangelatmosphäre und ihrer Bedeutung für Prognose und Therapie, speziell der Kopf-Hals-Karzinome. Als Nebenaspekt wurde auch der Säure-Basen-Haushalt der Zellkulturen untersucht. Die Bedeutung von Hypoxie und des pH-Wertes in soliden Tumoren wird im Folgenden erläutert.

1.1.4.1 Tumor pH

Viele zelluläre Prozesse hängen vom pH-Wert der Zelle bzw. ihres Umgebungsgewebes ab. In Blut und Serum rangiert der physiologische pH-Wert zwischen 7,37 und 7,45. Der Pankreassaft ist wesentlich alkalischer (pH: 7,5 - 8,8), im Magen herrschen sehr saure Verhältnisse (pH: 1 - 4). Ein saurer, d.h. niedriger pH im Zielorgan spielt eine bedeutende Rolle z.B. für die Zytotoxizität verschiedener Alkylantien oder platinhaltiger Chemotherapeutika [Pschyrembel, 2001, S.1291; Stubbs, 1998, S.117].

Die Regulation des Zell-pHs wird hauptsächlich durch die Aktivität der Na^+/H^+ -Austauscherpumpe ermöglicht. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die auch in den Prozessen der Tumorneoangiogenese involviert sind, steigern die Aktivität der Na^+/H^+ -Pumpe. Zusätzlich konnte in Warburgs klassischer Arbeit von 1930 gezeigt werden, dass Tumorzellen eine besonders große Kapazität für aerobe Glykolyse (= Warburgeffekt) besitzen. Sie wandeln selbst in Gegenwart von Sauerstoff bevorzugt Glukose zu Laktat (Milchsäure) um. Aktuelle Messungen konnten einen durchschnittlichen pH in Tumorzellen von 5,6 bis 7,6 zeigen. In gesunden Zellen hingegen sinkt der pH nie unter Werte um 6,8. Hierbei handelt es sich um die überwiegend extrazellulär gemessene H^+ -Ionenkonzentration. Intrazellulär weisen Tumorzellen einen neutralen bis basischen pH-Wert auf. So ist der pH-Gradient über der Plasmamembran von Tumoren ($\text{pH}_i > \text{pH}_e$) interessanterweise invers zu dem normaler Gewebe ($\text{pH}_i < \text{pH}_e$) [Stubbs, 1998, S.113; Vaupel, 2004, S.202].

Welche Bedeutung der pH-Wert in Tumoren spielen kann, konnten Walenta *et al.* 1997 klinisch zeigen. Insbesondere erhöhte Laktatkonzentrationen in Plattenepithelkarzinomen der Cervix, in SCCHN und in colorektalen Adenokarzinomen spiegelten das jeweilige maligne Potential wieder. Konkret korrelieren erhöhte Laktatspiegel signifikant mit einem erhöhten Risiko für Fernmetastasierung in Kopf-Hals-Malignomen [Walenta, 1997, S.411; Vaupel, 2004, S.205].

1.1.4.2 Tumorhypoxie

Es konnte in vielen klinischen Studien die relative Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) in fortgeschrittenen soliden Tumoren – wie dem Cervix-, dem Mamma-, dem Vulva-, dem Prostata-, dem Rektum-, dem Pankreaskarzinom, den Kopf-Hals-Malignomen oder den Hirntumoren – als pathophysiologisches Charakteristikum beschrieben werden. In gesunder Schleimhaut der Mundhöhle z.B. liegt die mittlere O_2 -Sättigung bei etwa 80 %. Plattenepithelkarzinome hingegen weisen eine niedrigere Sauerstoffsättigung auf (ca. 49 %). Unabhängig von Tumorgroße, Stadium, Grading, Lymphknotenstatus oder individuellen Parametern wird in Mamma-, Cervix- und Kopf-Hals-Tumoren ein niedrigerer Oxigenierungsstatus gemessen als in vergleichbaren Normalgeweben [Vaupel, 1998, S.64; Vaupel, 2004, S.200].

Von Hypoxie bzw. hypoxischen Arealen in Tumoren spricht man abhängig vom jeweiligen Autor ab einem Sauerstoffpartialdruck kleiner als 2 mmHg, 7 mmHg oder 10 mmHg. Zum Vergleich: In den Alveolen der Lunge herrscht ein physiologischer pO_2 von 100 mmHg (= 13,3 kPa), im arteriellen Blut von 95 mmHg (= 12,6 kPa) und im venösen Blut noch immer von 40 mmHg (= 5,3 kPa). Ursache für den relativen Sauerstoffmangel gerade in Tumoren bzw. in der Umgebung von Tumoren sind v.a. ein verändertes Gefäßsystem, eine vergrößerte Diffusionsstrecke, Tumoranämie, pulmonale Einschränkungen und zytotoxische Bedingungen [Vaupel, 2004, S.199, 201; Vaupel, 2004, S.11; Pschyrembel, 2001, S.1483; Höckel, 2001, S.266]. Ursachen und Konsequenzen von Hypoxie in soliden Tumoren werden in Abbildung 4 zusammengefasst.

Hypoxie kann Veränderungen in Tumorzellen induzieren, die zur Beeinträchtigung von Zellwachstum oder zu Zelltod führen. Eine Reaktion vieler Zellen auf Hypoxie ist z.B. der G1/S-Phase-Arrest. Hierzu benötigt es experimentelle Sauerstoffpartialdrücke von weniger als 1 mmHg. Höhere Werte scheinen einen vernachlässigbaren Effekt auf die Proliferationsrate zu haben. Unter hypoxischen Bedingungen, ganz gleich ob in Tumoren oder in minderperfundierten Normalgewebe, reichert sich das Tumorsuppressorgen p53 HIF-1-abhängig (hypoxia inducible factor-1) in Zellen an und induziert so Apoptose. So kann Hypoxie die Zellproliferation verlangsamen oder gar vollständig inhibieren [Vaupel, 2004, S.203; Höckel, 2001, S.268 ff.]. Eine solche Eigenschaft wäre bezüglich der Malignität von Tumoren wünschenswert. Im Gegenteil hierzu scheint sich Hypoxie auswirken zu können. So kann sie Veränderungen in Genom und Proteom induzieren, die es Tumorzellen ermöglichen sich an den Sauerstoff- und Nährstoffmangel zu adaptieren bzw. gar als aggressiverer Phänotyp daraus hervorzugehen. Sie können dadurch unter widrigsten Bedingungen überleben oder werden befähigt, ihre lebensfeindliche Umgebung zu verlassen [Vaupel, 2004, S.203; Vaupel, 2004, S.11].

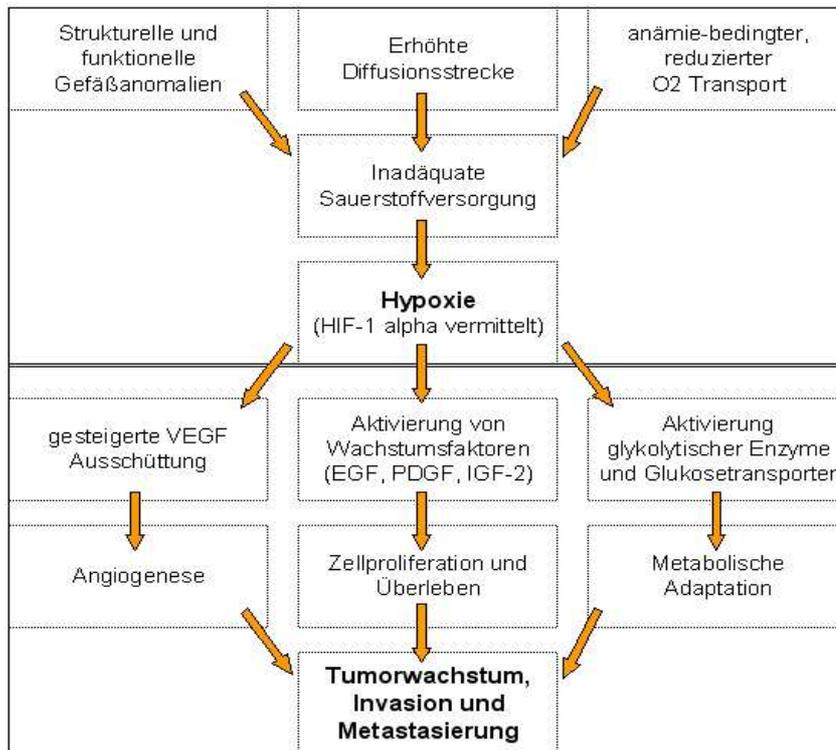


Abb.4: Ursachen und Konsequenzen der Tumorphypoxie (modifiziert nach Vaupel, 2004, S.12)

Hypoxie gilt als wichtiger Regulator des Gefäßtonus und der Gefäßarchitektur, v.a. in normalen Blutgefäßen. In Tumorzellen steigt insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, genauso wie in verschiedenen gesunden Geweben, die Ausschüttung von VEGF. Damit stellt Hypoxie einen Reizstimulus für die Gefäßneubildung in Prozessen der KHK-bedingten (koronare Herzkrankheit), diabetischen Neovaskularisation und Tumorneoangiogenese dar. Detailliert wird die Rolle von VEGF in Kapitel 1.2.1 beschrieben [Liu, 1995, S.638; Smith, 2000, S.2046; Maity, 2000, S.5879; Graham, 1998, S.3300; Levy, 1995, S.13333].

Weitere Mechanismen der Anpassung an O₂-Mangel sind eine gesteigerte Glykolyse, die Hemmung der Apoptose, die Hochregulation von Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, TGF-β, IGF-2, EGF) und Proteinen der Tumordinvasion bzw. -migration. Für letztere sorgt insbesondere die Expression perizellulärer Plasminogenaktivator-Aktivität (siehe Kapitel 1.2.2). Es wird angenommen, dass die gleichen hypoxie-spezifischen Antworten mit Wirkung auf die Zellmigration Prozesse der Entwicklung eines artherosklerotischen Plaques oder der Fröhschwangerschaft, während der Blastozysten Implantation und der uterinen Invasion durch Trophoblastzellen, ermöglichen [Vaupel, 2004, S.11; Graham, 1998, S.3300].

Zusätzlich könnte es zur Verminderung von Adhäsionsmolekülen, die den Tumorzellverband stützen, kommen. Viele solcher Adaptationsprozesse werden genetisch

reguliert durch HIF-1, Nekrosefaktor- κ B (NF- κ B) oder AP-1 (activator protein-1). NF κ B aktiviert u.a. COX-2 (Cyclooxygenase-2) oder Gene zur Aktivierung von uPA und Matrix-Metallo-Proteinasen. Der uPA besitzt insbesondere angiogenetische wie wachstumsstimulierende Eigenschaften. Reynolds *et al.* konnten 1996 zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen in Zellkultur die untersuchten Zellen eine erhöhte Mutationsrate aufwiesen, ähnlich in Anzahl und Muster, wie klassische Mutationen in Tumoren. Wiederholte Hypoxie-Reoxygenierungszyklen scheinen durch Erhöhung der Spiegel von Superoxiden und anderen Sauerstoffradikalen besonders mutagen zu wirken [Vaupel, 2004, S.11, Reynolds, 1996, S.5756].

Die klinische Bedeutung der Tumorphypoxie liegt darin, dass sie ein unabhängiger, prognostischer Marker für die lokale Tumorkontrolle, das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben darstellt. Wiederholt konnte der ungünstige Prognosewert von Hypoxie in verschiedenen Tumorentitäten, darunter Cervixkarzinome, Kopf-Hals-Malignome und Sarkome, gezeigt werden. Niedrige Sauerstofflevel (< 10 mmHg) in Tumoren sind mit gesteigertem Tumorwachstum und metastatischem Potential assoziiert. Ihre Rolle während der malignen Progression wurde durch *in vitro* und *in vivo* Studien belegt. Darin wurden die Fähigkeiten der Metastasierung sowie der Invasion in die ECM in Melanomen, Sarkomen und Plattenepithelkarzinomen durch Hypoxie-Exposition stimuliert. Zudem gibt es Hinweise, dass Hypoxie einen gewissen Selektionsdruck für die Expansion von Subpopulationen innerhalb des Tumors, die z.B. eine Mutation des p53-Suppressorgens erlitten haben und deshalb resistent gegen Apoptose sind, bedeutet [Graeber, 1996, S.91; Young, 1988, S.9536; Evans, 2003, S.3; Brizel, 1999, S.116; Höckel, 2001, S.266; Weinmann, 2002, S.1356].

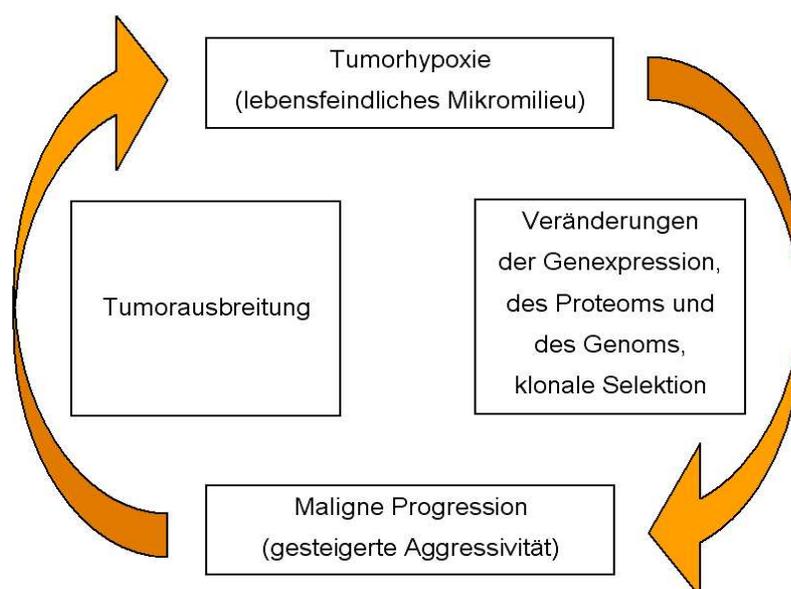


Abb.5: Der „circulus vitiosus“ der Tumorphypoxie
(modifiziert nach Vaupel, 2004, S.15)

Im Sinne Charles Darwins „survival of the fittest“ seines Hauptwerkes „The origin of species“ von 1859 können adaptierte Zellen dem Selektionsdruck widerstehen und innerhalb eines Tumors dominant werden. So wäre das klinische Vorkommen gesteigerter Aggressivität, Invasivität, Metastasierung und Therapieresistenz in fortgeschrittenen Tumorstadien zu erklären (Abb.5) [Ayala, 2008, S.323 ff.; Vaupel, 2004, S.11; Reynolds, 1996, S.5756].

1.2 Besondere Forschungsgegenstände

Wie bereits oben mehrfach angedeutet, erlangen zwei Untersuchungsgegenstände gemäß den jüngsten Forschungsergebnissen besondere Bedeutung und erwecken u.a. auch in unserer Forschungsgruppe besonderes Interesse. Es ist die Rede vom vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und dem Plasminogenaktivierungssystem (PAS).

1.2.1 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor: VEGF

Der „vascular endothelial growth factor“ wird in der Literatur teils auch als „vascular permeability factor“ bezeichnet. Die VEGF-Familie setzt sich aus sechs verschiedenen VEGF-Molekülen zusammen. Sie werden als VEGF-A, -B, -C, -D, -E und als „placental growth factor“ (PlGF) beschrieben. Allgemein ist der Subtyp-A mit dem Überbegriff VEGF gleichzusetzen. Dieser wird wiederum in vier unterschiedlichen Isoformen ausgeschüttet. Verschiedenartige Splice-Vorgänge lassen unterschiedlich lange VEGF-Subunits entstehen, so dass sich jedes VEGF-Molekül aus zwei identischen Untereinheiten, verbunden durch eine Disulfidbrücke, zusammensetzt. Es entstehen 34 bis 50 kDa große Glycoproteine. Die beiden größeren Isoformen VEGF 189 und 209 sind überwiegend zell- bzw. ECM-gebunden. Die kleineren (VEGF 121 und 165) werden größtenteils als lösliche Moleküle sezerniert, besitzen teils aber intermediäre Eigenschaften. Die VEGF-Rezeptoren, derzeit werden drei Typen unterschieden (VEGFR-1, -2, -3), besitzen Tyrosinkinase-Aktivität und befinden sich fast ausschließlich auf der Oberfläche von Endothelzellen (Abb.6) [Conolly, 1989, S.20017; Reinmuth, 2003, S.201; Klagsbrun, 1993, S.699; Meo, 2004, S.282; Wagener, 2010, S.370].

In physiologischen wie pathologischen Vorgängen des Organismus spielt VEGF eine bedeutende Rolle als einer der potentesten Angiogenesestimulatoren überhaupt. Für die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie für die Steuerung verschiedener Proteolysevorgänge, die schlussendlich eine Gefäßneubildung und eine deutlich erhöhte

Gefäßpermeabilität bewirken, ist VEGF essentiell (Pepper, 1991, S.904; Kietzmann, 1999, S.4183; Klagsbrun, 1991, S.220].

In Kopf-Hals-Malignomen ebenso wie in vielen anderen Karzinomen stimuliert VEGF, im Gegensatz zu anderen Angiogenesefaktoren (darunter z.B. FGF), hochspezifisch Endothelzellen. In den weiteren Schritten der Angiogenese kommt es so zu ersten Berührungspunkten mit dem PAS (Abb.6). VEGF induziert an seinen VEGFR gebunden die Aktivierung von pro-uPA. Pro-uPA bindet an uPAR und wird in seine aktive Form uPA umgesetzt. In weiterer Kaskade resultiert eine VEGF-abhängige lokale fibrinolytische wie proteolytische „Maschinerie“, um die Endothelzelle aus ihren Zell-Zell-Kontakten zu lösen, einem der initialen Schritte im angiogenetischen Prozess. Niedrige VEGF-Spiegel sind mit einer reduzierten Blutgefäßnetzwerkdichte assoziiert. Und ferner konnten Studien zeigen, dass VEGF einen protektiven Effekt bezüglich Apoptosevorgängen auf Endothelzellen ausüben könnte. Dies würde wiederum das Gefäßsystem unterstützen [Binder, 2007, S.339; Carmeliet, 1996, S.438; Nör, 1999, S.375].

VEGF wird von verschiedenen Zellen, darunter Neutrophile, Thrombozyten und Tumorzellen, sezerniert. Verschiedene Faktoren wurden beschrieben, die die Ausschüttung von VEGF hochregulieren. Den bedeutendsten Stimulus hierzu stellt Hypoxie dar. Typische Folgen von Entzündungsprozessen, als da wären der pH-Abfall, die Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine (u.a. IL-1 und IL-6, EGF, PDGF, TGF, HGF, IGF) wirken ebenso aktivierend auf VEGF. Der Verlust von Tumorsuppressorgenaktivität oder eine ras-Genmutation können ebenfalls zur Expressionssteigerung von VEGF führen [Akagi, 1998, S.4008; Shweiki, 1992, S.845; Manders, 2003, S.6363].

Bezugnehmend auf die besonderen Bedingungen des Mikromilieus in Tumoren kann festgestellt werden, dass in proliferierenden Tumoren, zum einen aufgrund des erhöhten Sauerstoffumsatzes und zum anderen aufgrund der stetig steigenden Diffusionstrecke für O₂, relative Hypoxie herrscht. Dies führt zur Stimulation von Neoangiogenese. Tumoren mit induzierbarer Blutgefäßbildung zeigen im Allgemeinen einen aggressiveren Phänotyp. Der gute Gefäßanschluss bietet bessere Möglichkeiten dem lebensfeindlichen Sauerstoffmangel zu entkommen und damit hämatogen zu metastasieren. Ist eine Filia abgesiedelt benötigt diese wiederum die Fähigkeit zur VEGF-gesteuerten Neoangiogenese, um eigenständiges Wachstum zu generieren [Vaupel, 2004, S.12; Smith, 2000, S.2051].

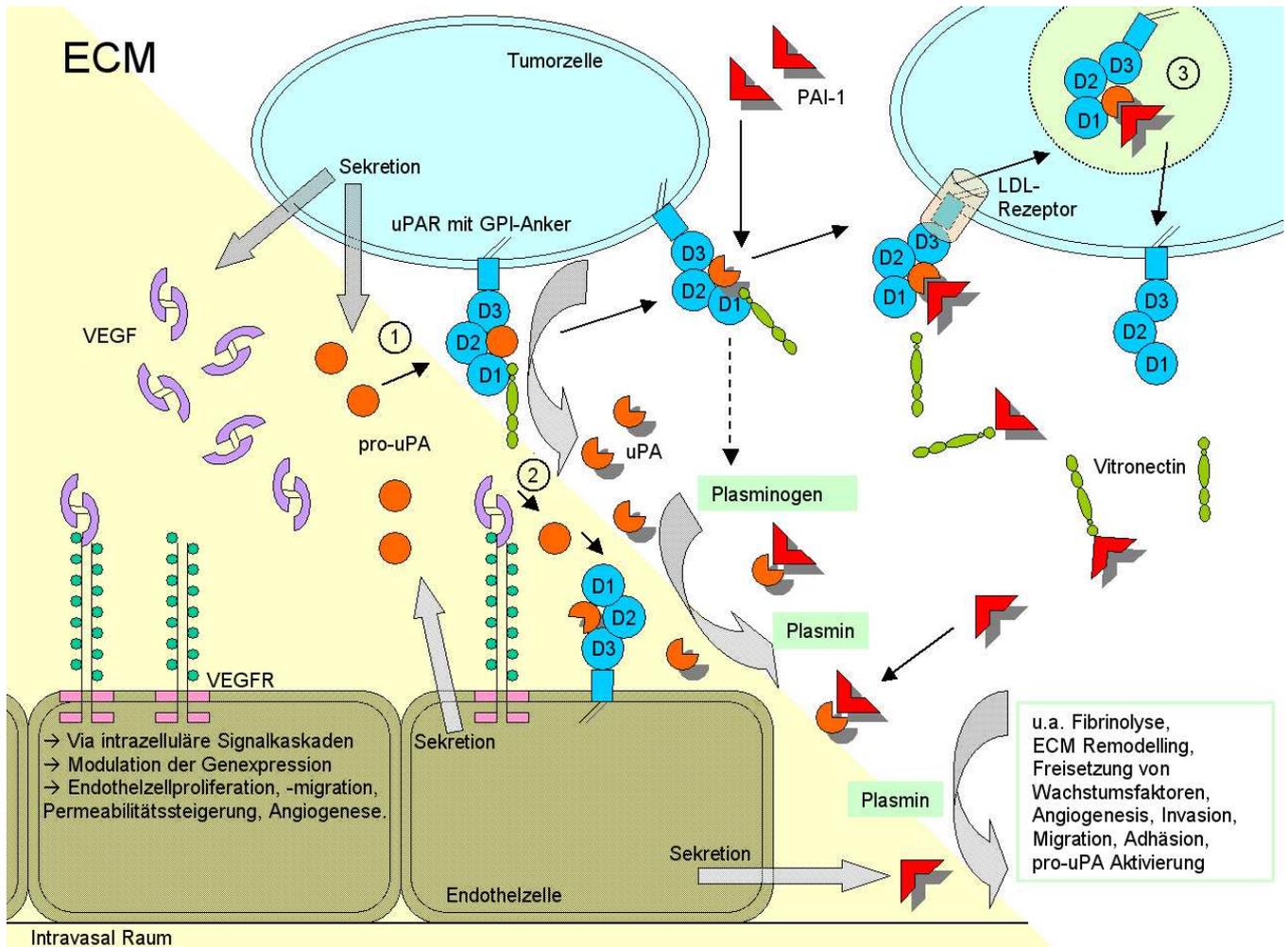


Abb.6: VEGF und PAS: Berührungspunkte und Zusammenhänge (vereinfachte, schematische Darstellung)
 (1) pro-uPA wird an uPAR-gebunden aktiviert → freies uPA und zellgebundenes uPA, mit entsprechender proteolytischen Aktivität → Plasminogen Umwandlung zu Plasmin und ECM Degradation. (2) Involvierung der uPAR-abhängigen pro-uPA Umwandlung zu uPA auf der Endothelzelle, vermittelt durch die VEGF/VEGFR-Bindung. (3) LDL-Rezeptor vermittelte Endozytose, uPAR-Recycling, uPA- und PAI-1-Abbau. Legende: D1, D2, D3 = Rezeptordomänen des uPAR; ECM = extrazelluläre Matrix; GPI-Anker = Glykosylphosphatidylinositol-Anker; LDL-Rezeptor = low density lipoprotein-Rezeptor; PAI-1 = Plasminogenaktivatorinhibitor; PAS = Plasminogenaktivierungssystem; pro-uPA = uPA-Proenzym; uPA = urokinase Plasminogenaktivator; VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; VEGFR = VEGF-Rezeptor. (modifiziert nach Binder, 2007, S.338; Mengele, 2010, S.948; Andreasen 1997, S.3; Laufs, 2006, S.1761, 1762)

1.2.2 Das Plasminogenaktivierungssystem: PAS

Tumorwachstum, Invasions- und Metastasierungsprozesse erfordern eine besondere Regulation adhäsiver, proteolytischer und migratorischer Prozesse sowie die Neovaskularisation des proliferierenden Neoplasmas bzw. der neu entstehenden Filia. Dazu notwendige Ab- und Umbauprozesse, wie z.B. die Degradation von Proteinen der Basalmembran und der extrazellulären Matrix, werden durch verschiedene proteolytische Systeme des Organismus sowie der Tumorzellen vermittelt [Pedersen, 1994, S.4671; Andreasen, 2000, S.25].

Im Rahmen dieses „cancer cell-directed tissue remodelling“ spielt insbesondere das Plasminogenaktivierungssystem eine entscheidende Rolle. Nach jahrzehntelangen Untersuchungen, wurde die Hypothese formuliert, dass von Tumorzellen freigesetzte Plasminogenaktivatoren das inaktive Zymogen Plasminogen katalytisch zur aktiven Proteinase Plasmin umsetzen. Dieses wiederum katalysiert entsprechende Proteindegradationen an Basalmembran und ECM. Somit wird Tumorzellinvasion und -migration möglich. Daneben besitzt die durch das PAS angestoßene proteolytische Kaskade physiologische Funktionen in Thrombolyse, Entzündung, Embryogenese, Wundheilung und Ovulation [Mignatti, 1986, S.487; Devy, 2002, S.147; Andreasen, 1997, S.1; Vassalli, 1985, S.86].

Neben dem PAS existieren im Organismus noch weitere Proteinasesysteme, darunter Matrix-Metallo-Proteinase (MMP-1, -8 und -13 als Kollagenasen; MMP-2, -7 und -9 als Gelatinasen; MMP-3, -10 und -11 als Stromelysine; sowie MMP-12 als Metalloelastase), Cysteinproteinase (Cathepsine B, H, S und L) und Aspartatproteinase (Cathepsin D). In dieser Systematik wird das PAS, neben Cathepsin G, humaner Leukelastase und Proteinase-3, zu den Serinproteinase gezählt. Gemeinsam ist ihnen, dass sie zunächst als inaktive Proteinasevorstufen (Proenzyme oder Zymogene) von Tumor- wie Stromazellen synthetisiert und sezerniert werden. Aktiviert werden sie durch stufenweise proteolytische Abspaltung, ähnlich den Prozessen während der Blutgerinnung oder der Komplementaktivierung. Die verschiedenen Proteinase unterscheiden sich im Mechanismus der Peptidbindungsspaltung, in ihrer Lokalisation (intra-/extrazellulär) und in ihren Zielsubstraten. Die Anwesenheit der Komponenten des PAS auf Fibroblasten deutet z.B. eine Rolle bei der überschießenden Bildung bindegewebiger Anteile im Tumor, Desmoplasie genannt, und dem Gewebsremodelling an. Das Vorkommen auf Endothelzellen suggeriert eine Funktion während der Angiogenese (s.o.). Ihre Expression auf Tumorzellen lässt eine Funktion in der Tumorzellinvasion und -migration annehmen [Look, 2002, S.117; Mignatti, 1986, S.495; Murphy, 2008, S.61; Sephel, 2008, S.85; Andreasen, 2000, S.25; Wagener, 2010, S.327].

Das PAS besteht im Wesentlichen aus den Plasminogenaktivatoren uPA und tPA (tissue-typ Plasminogenaktivator), der Serinprotease Plasmin, ihrer Vorstufe Plasminogen, zudem aus dem zellulären uPA-Rezeptor (uPAR) und den Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 sowie dem Plasmininhibitor α -2-Antiplasmin (α -2-AP) [Andreasen, 1997, S.1,3]. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die komplexen Interaktionen von VEGF und PAS auf der Zelloberfläche bzw. im ECM.

uPA: Es gibt zwei Typen von Plasminogenaktivatoren, den „urokinase-type“ (uPA) und den „tissue-type“ (tPA). Beide sind fähig, die Umwandlung von Plasminogen zu

Plasmin zu katalysieren. Das ca. 70 kDa große tPA generiert Plasmin hauptsächlich für die Prozesse der Thrombolyse. Als rekombinantes, humanes tPA (rtPA, Reteplase) wird es heutzutage therapeutisch bei arteriellen oder venösen Thrombosen und Embolien eingesetzt (z.B. Rapilysin®). Für die in der Tumorbologie so bedeutsamen Degradationsprozesse an Basalmembranen und in der ECM wird dagegen Plasmin insbesondere von uPA aktiviert [Deitcher, 2005, S.687 ff.; Andreasen, 1997, S.1; Mignatti, 1986, S.495; Mandriotta, 1995, S.9709; Andreasen, 2000, S.27].

Der Plasminogenaktivator vom urokinase-typ (uPA) besitzt ein Molekulargewicht von ca. 50 bis 55 kDa. Er besteht aus zwei via Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten. Die Molekularstruktur des uPA weist eine Wachstumsfaktor-Domäne über die es an seinen Rezeptor uPAR bindet auf. Darüberhinaus besitzt es die typische Serin-Proteinase-Domäne. Typischerweise wird zunächst das einkettige Zymogen pro-uPA von Zellen mit migratorischen und invasiven Eigenschaften, wie z.B. Monozyten, polymorphkernigen Leukozyten, Trophoblastzellen, Fibroblasten, Endothel- und Tumorzellen, sezerniert [Vassalli, 1985, S.86; Andreasen, 1997, S.2; Stoppelli, 1986, S.675; Weinmann, 2002, S.1355; Meo, 2004, S.282].

Pro-uPA besitzt eine ca. 700fach niedrigere Aktivität als das zweikettige uPA. Serinproteasen (auch Plasmin), Metallo- und Cysteinproteasen (z.B. Cathepsin L), nerve growth factor- γ (NGF- γ) und viele weitere katalysieren die Umsetzung von pro-uPA zu aktivem uPA [Meo, 2004, S.282; Goretzki, 1992, S.117; Wolf, 1993, S.16330].

Anders als Plasmin ist uPA sehr substratspezifisch und setzt bevorzugt Plasminogen um. Daneben sollte festgehalten werden, dass uPA und Plasmin zusätzlich die proteolytische Aktivierung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. SF (= scatter factor = HGF), MSP (= macrophage stimulating protein), TGF- β und bFGF (= b-fibroblast growth factor), involvieren. Der Blutplasmaspiegel liegt um die 10 bis 20 pM. Der größte Teil von uPA ist an PAI-1, seinem spezifischen Inhibitor, gebunden [Hundsdoerfer, 2005, S.195; Andreasen, 1997, S.3, 7; Vassalli, 1985, S.91; Fan, 1998, S.131].

uPAR: 1985 beschrieben Vassalli *et al.* sowie Stoppelli *et al.* erstmalig unabhängig voneinander den uPA-Rezeptor auf der Zelloberfläche von Monozyten und der promyeloiden Leukämiezelllinie U937. Er bindet uPA und dessen Zymogen pro-uPA. In typischer Lokalisation ist er an den jeweiligen Zelloberflächen der Zell-Substrat-Kontaktstellen und der Zell-Zell-Grenzen anzufinden. Biochemisch stellt er ein cysteinreiches, hochglykosyliertes Polypeptid dar, das durch einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker an die Zellwand gebunden ist und drei Hauptdomänen aufweist. In Abhängigkeit von seinem Glykosylierungsgrad besitzt uPAR ein heterogenes Molekulargewicht von 45 bis 60 kDa. Vollständig deglykosyliert verliert

der uPAR die Fähigkeit uPA zu binden. Daher erscheint die Glykosylierung für die funktionelle Aktivität des uPAR gegenüber uPA essentiell zu sein [Andreasen, 1997, S.5; Roldan, 1990, S.472; Ploug 1991, S.1926, 1931; Vassalli, 1985, S.91; Stoppelli, 1985, S.4943; Meo, 2004, S.282].

Die Bindung von pro-uPA und uPA an uPAR führt zu einer massiven Steigerung der proteolytischen Aktivität. Zum einen wird pro-uPA vermehrt zu uPA umgesetzt. Hauptumsatzsubstrat aber stellt Plasminogen dar. Dieses wird zu Plasmin katalysiert, somit kommt es zu einer effizienten und lokal konzentrierten Proteolyse. An uPAR gebundenes uPA impliziert die Generierung von Plasmin an der Adhäsionsseite der Zelle. Die Bindung von uPA an uPAR induziert in einigen Zellen darüber hinaus, teils noch ungeklärte, intrazelluläre Signalkaskaden, mit z.B. Auswirkung auf die Migration von Glattengefäßmuskelzellen. Dies führt proteolytisch zur Degradation von Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakten und damit zum Detachment der Zelle [Weinmann, 2002, S.1355; Andreasen, 1997, S.8].

Zum anderen fungiert uPAR u.a. als Rezeptor für Vitronectin (VN). Vitronectin ist ein Glykoprotein des ECM und des Blutplasmas, das u.a. mit uPAR und PAI-1 Bindungen eingeht. Bindet VN an uPAR, wird die Bindung von uPA an uPAR zusätzlich gefördert. Bei der Interaktion von uPAR mit Vitronectin konkurrieren uPAR und PAI-1 um dieselbe Bindungsstelle an der Somatomedin-B-Domäne des Vitronectins. Somit kann die Interaktion von Vitronectin mit Integrinen bzw. durch die uPAR/VN-Bindung vermittelte zelluläre Adhäsion an das ECM modelliert werden. Zellgebundene Adhäsionsmoleküle, wie Integrine, besitzen die Fähigkeit, an ihre Liganden, wie z.B. Vitronectin, Kollagen, Fibronectin und Fibrin, zu binden. Eine Bindung von uPAR an β 1- oder β 2-Integrin blockiert die integrin-vermittelte Zelladhäsion an ECM-Komponenten, insbesondere an Fibronectin. Dies zeigt eine direkte Verbindung zwischen dem Plasminogenaktivierungssystem und der integrin-vermittelten Adhäsion und Migration von Zellen [Stefansson, 1996, S.442; Waltz, 1994, S.14749; Binder, 2007, S.337; Graham, 1999, S.617; Andreasen, 2000, S.28; Kanse, 1996, S.351].

Plasmin: Plasmin wird aus Plasminogen mit Hilfe katalytischer Umwandlung durch uPA und tPA gespalten. Das Zymogen Plasminogen entsteht in der Leber als einkettiges Polypeptid. Im Serum erreicht es physiologische Spiegel von ca. 2 μ M, dies repräsentiert ca. 60 % des im Organismus befindlichen Plasminogens. Die restlichen 40 % sind extravaskulär lokalisiert. Sein biologisch aktives Agens ist Plasmin. Diese Serinprotease besitzt ein Molekulargewicht von ca. 90 kDa und besteht aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten [Andreasen, 1997, S.2].

Plasmin besitzt eine breite Substratspezifität und ist fähig viele ECM-Proteine, wie z.B. Kollagen, Fibronectin, Vitronectin oder Fibrin zu spalten. Daneben aktiviert Plasmin u.a. verschiedene MMP's oder Wachstumsfaktoren (z.B. HGF, IGF-1, TGF- β , FGF). Allesamt potentiell Tumorprogressions fördernd. Seine physiologische Rolle erfüllt Plasmin primär während der Gerinnungs- und Fibrinolyseprozesse. Über verschiedene Aktivierungswege der Gerinnungskaskade kommt es in gemeinsamer Endstrecke durch den Prothrombinasekomplex aus aktivierten Faktor Xa und Faktor Va zur Aktivierung des Gerinnungsfaktors II (= Prothrombin). Dieser wird zu Thrombin umgewandelt. Thrombin selbst katalysiert die Fibrinbildung. Damit ermöglicht es die Bildung und Vernetzung eines Gerinnsels. An dieser Stelle kommt Plasmin zum Einsatz. Plasmin sorgt für die Destabilisierung der Kombination von aggregierten Plättchen und geronnenem Blut und wirkt als fibrinolytisches Enzym. Während der Formierung des Thrombus wird Plasminogen teils an Fibrin gebunden und bildet damit einen integrierten Teil des Thrombus. Endothelzellen synthetisieren Plasminogenaktivatoren, so dass fibrin-gebundenes wie freizirkulierendes Plasminogen zu Plasmin umgewandelt wird. An Fibrin gebundenes Plasmin aktiviert ebenfalls Plasminogen. Indem Plasmin Fibrin abbaut, kommt es zur Gerinnselauflösung bzw. Thrombolysen [Andreasen, 1997, S.2; Duffy, 2004, S.542; Gottlieb, 2008, S.394, 396].

PAI-1: Innerhalb des PAS bleibt noch die Gruppe der Serpine zu charakterisieren. Das Akronym „Serpine“ steht für **Ser**inprotease**inh**ibitoren. Zu diesen zählen PAI-1, PAI-2, α -2-AP sowie weniger spezifische wie Proteinase Nexin-1 (PN-1) oder Protein-C-Inhibitor (PCI). Allen gemeinsam sind spezielle Peptidstrukturdomänen, die als Pseudosubstrat für einige Serinproteasen fungieren. So inaktivieren Serpine diese durch Bildung eines stöchiometrisch stabilen Komplexes [Andreasen, 1997, S.3].

PAI-1 ist ein glykosyliertes einkettiges Protein von ca. 52 kDa Molekulargewicht. PAI-1 hemmt beide Plasminogenaktivatoren, uPA und tPA, gleichermaßen. PAI-2 (50 kDa) reagiert ebenfalls mit uPA und tPA, allerdings weniger prompt als PAI-1. PAI-2 kommt auch als intrazelluläre Form vor. Diese scheint Bedeutung bei Apoptoseprozessen zu besitzen. Damit stellen PAI-1 und -2 die Hauptinhibitoren der Plasminogenaktivatoren dar. Alpha-2-Antiplasmin hingegen hemmt Plasmin direkt. Es stellt die kurze Halbwertszeit von Plasmin in Blut und Gewebe sicher und hat Bedeutung bei der Hemmung von Invasionsprozessen [Andreasen, 2000, S.27, 28].

Physiologisch stellt der Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1) den Schlüsselinhibitor vieler Prozesse, wie Fibrinolyse, Proteolyse, Neovaskularisation, Gewebsremodelling und -regeneration, Entzündung und Fibrose, dar. PAI-1 kann von Thrombozyten, Gefäßendothelzellen, glatten Gefäßmyozyten und einigen anderen, nicht vaskulären

Zelltypen, wie Hepatozyten, produziert werden. Darüber hinaus befindet sich PAI-1 in der Extrazellulärmatrix [Kruithof, 1986, S.11207; Kietzmann, 1999, S.4177].

PAI-1 inhibiert die proteolytische Aktivität von uPA direkt. Seine Wirkung entfaltet PAI-1 durch Bindung sowohl an freies, als auch an uPA/uPAR-Komplex-gebundenes uPA. Die Anbindung von PAI-1 an den uPA/uPAR-Komplex bewirkt via eines LDLR-Endozytose-rezeptors (low-density lipoprotein receptor) zunächst die Internalisierung desselben. Der nächste Schritt ist die intrazelluläre Degradation von uPA wie PAI-1 und schließlich das Recycling von uPAR an die Zelloberfläche. Diese Sachverhalte konnten insbesondere an VEGF-aktivierten Endothelzellen gezeigt werden. Die Internalisierung des uPA/uPAR/PAI-1-Komplexes ist PAI-1 abhängig. Die Neuverteilung des uPAR auf der Zelloberfläche geschieht nicht zufällig, sondern fokussiert am führenden Zellende. Die Internalisierung und das Recycling von uPAR spielt also eine gewichtige Rolle in der VEGF-induzierten Endothelzellmigration. [Binder, 2007, S.339] Bindet PAI-2 dagegen an einen uPA/uPAR-Komplex, wird dieser nicht internalisiert. Der uPA wird stattdessen in zwei Teile gespalten und dauerhaft inaktiviert [Andreasen, 2000, S.25; Weinmann, 2002, S.1355; Ragno, 1995, S.518].

Wie bereits ausgeführt kontrolliert PAI-1 die proteolytische Aktivität des Plasminogenaktivierungssystems und beeinflusst Zellmigrations- und Tumorzell-ablösungsprozesse. Der uPAR kann z.B. nach erfolgter Endozytose und intrazellulärem Recycling an einer anderen als der Internalisierungsstelle wieder an die Zelloberfläche gebracht werden, und es kommt so zu einer Fokussierung der proteolytischen Aktivität an bestimmter Lokalisation (s.o.) [Meo, 2004, S.202; Ragno, 1995, S.518]. Damit spielt PAI-1 eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion und Motilität von Zellen. Seine Wirkung ist aber lokalisationsabhängig. Am führenden Zellende wirkt seine inhibitorische Fähigkeit auf die Ausbildung von VN/Integrin- und VN/uPAR-Bindungen anti-migratorisch. Die direkte Hemmung der Plasmin-Bildung an der Kontaktfläche der Zelle durch PAI-1 wirkt ebenfalls anti-migratorisch. Pro-migratorisch wirkt PAI-1 am führenden Zellende durch den Schutz von VN vor uPA-vermittelter Degradation sowie durch die Stimulation der Endozytose des uPAR/uPA/PAI-1-Komplexes [Andreasen, 1997, S.8]. So kommt es zur Lösung der uPA/uPAR-vermittelten Bindung und damit zur Hemmung von Zelladhäsion und zu Zellmigration [Stahl, 1997, S. 120; Sugiura, 1999, S.1327; Deng, 1996, S.1570; Bajou, 2001, S.778].

Perizellulär lokalisiertes, an Vitronectin gebundenes PAI-1 schützt selektiv den Zellverband bzw. das ECM und damit auch Vitronectin selbst vor Degradation. Diese Wirkung ist unabhängig von der Hemmwirkung auf die enzymatische uPA-Aktivität. Im Gegenzug ermöglicht Vitronectin durch Komplexbildung mit PAI-1 diesem eine zwei- bis

vierfach erhöhte Plasmahalbwertszeit, die ungebunden zwischen 10 und 90 Minuten liegt. Die inhibitorische Aktivität von PAI-1 wird durch Bindung an das ECM-Protein Vitronectin, einem für den normalen Gewebsumbau, wie für den von Tumoren, bedeutsamen Zelladhäsionsglykoprotein, stabilisiert. [Minor, 2002, S.10337; Deng, 1996, S.1570; Ciambrone, 1990, S.2191; Sprague, 2006, S.283, 289].

Es gilt festzuhalten, dass die Wahrung einer bestimmten ECM-Integrität eine essentielle Anforderung an die kapilläre Morphogenese darstellt. Indem PAI-1 das Stroma vor den exzessiven proteolytischen Prozessen der Endothelinvasion schützt, ermöglicht es die Balance der uPA- vermittelten perizellulären Proteolyse zu halten [Bajou, 2001, S.783].

Die PAI-1-Funktionen sind dosisabhängig. In physiologischen, nanomolaren Konzentrationen besitzt es mehr Potenz Proteolyseprozesse zu kontrollieren als Zelladhäsion zu moderieren. Dies korrespondiert mit einer pro-angiogenetischen Wirkungskomponente. In höheren, mikromolaren Konzentrationen wirkt PAI-1 anti-angiogenetisch [Devy, 2002, S.112; Sprague, 2006, S.289]. Pro-angiogenetisch wirkt es vermutlich durch Vorbeugung der Bildung des Angiogenese-Inhibitors Angiostatin. Somit übernimmt es Funktionen in den Prozessen der Neoangiogenese und des Tumorwachstums [Bajou, 2001, S.782]. Zuletzt wird ein direkter anti-apoptotischer Effekt von PAI-1 auf Tumor- und Normalzellen beschrieben [Kwaan, 2000, S.1707; Sprague, 2006, S.289].

Aufgrund des komplexen und teils noch unverstandenen Zusammenspiels von PAI-1 und den übrigen Bestandteilen des PAS bleibt festzuhalten, dass die tatsächliche Wirkung von PAI-1 von der Aktivität bzw. von der Konzentration der beteiligten PAS-Komponenten und ihrer räumlichen Zuordnung zueinander abhängt. (Wagener, 2010, S.310)

1.3 Strahlenbiologie und Radiotherapie

Das Therapiemanagement der Kopf-Hals-Malignome verlangt, wie oben bereits dargestellt, eine besondere Multidisziplinarität. Chirurgie bietet den aussichtsreichsten kurativen Therapieansatz. Chemo- und insbesondere Strahlentherapie sind ergänzende und alternative Ansätze zur Behandlung. Etwa die Hälfte aller Kopf-Hals-Tumore werden von Strahlentherapeuten behandelt [Chin, 2005, S.789; Baker, 1986, S.440].

Die Effektivität und Strahlenempfindlichkeit von Tumoren wird hauptsächlich durch die vier „Rs“ der klassischen Strahlenbiologie bestimmt: „repair, repopulation, reoxygenation and redistribution of cells in the cell cycle [...]“ [Molls, 1998, S.1]. Zudem weiß man um die Zell-Zyklus-Abhängigkeit des letalen Schwellenwerts von Gamma-Strahlung. So sind z.B. Zellen in später S-Phase weit weniger strahlensensibel als Zellen in der G2-M-Phase

des Zellzyklus [Katoh, 1995, S.5691]. Neben angeborener Zellsensitivität, Zellkinetik und Mikromilieu-Faktoren (pH, etc.) gilt v.a. der Oxigenierungsstatus bzw. die Tumorphoxie als bedeutendster unter den multifaktoriellen Ursachen gesteigerter Therapieresistenz von Tumoren.

Bereits 1953 veröffentlichten Gray *et al.* ihre Erkenntnisse zur im Gewebe zum Zeitpunkt der Bestrahlung gelösten Sauerstoffkonzentration als ein wesentlicher Faktor in der Strahlentherapie. Die Strahlenempfindlichkeit sinkt demnach deutlich, sollte in Tumoren der O₂-Partialdruck unter 25 bis 30 mmHg sinken. Molekularer Sauerstoff kann einer DNS-Reparatur vorbeugen. Aufgrund dieses "oxygen-enhancement" genannten Effektes ist die Strahlendosis zum Erreichen des gleichen biologischen Effektes in O₂-Abwesenheit 2,8 bis 3mal höher als in Normoxie. So ist das Auftreten von Tumorphoxie seit Jahren als Problem speziell für die Wirksamkeit der Strahlentherapie erkannt (Abb.7) [Gray, 1953, S.638; Vaupel, 1989, S.6454; Vaupel, 2004, S.203; Vaupel, 1998, S.63; Höckel, 2001, S.266; Feldmann, 1998, S.47; Chaplin, 1998, S.135].

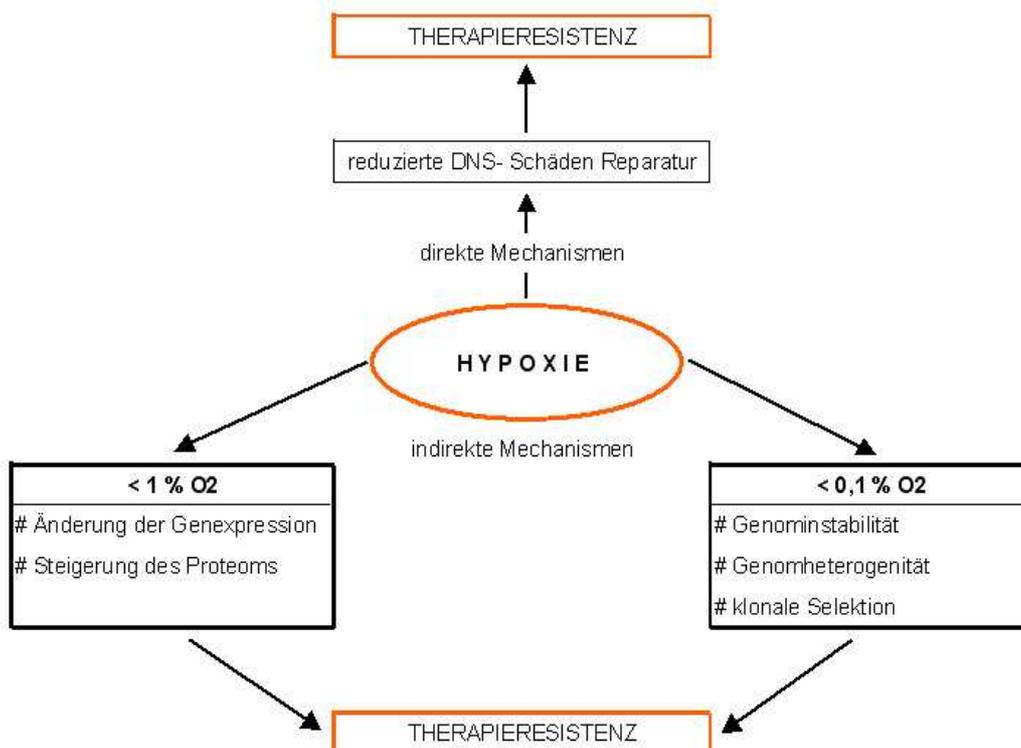


Abb.7: hypoxie- vermittelte Mechanismen erworbener Therapieresistenz (modifiziert nach Vaupel, 2004, S.204)

Es liegen Beweise vor, dass hypoxie-induzierte Proteom- und Genomveränderungen ebenfalls einen Einfluss auf Strahlenresistenz haben können, indem sie die Spiegel von Hitzeschockproteinen oder die Zellzahl derjenigen selektierten Zellklone in einem Tumor

mit verminderter Apoptosefähigkeit bzw. gesteigertem Proliferationspotential erhöhen. Beides wird mit höherer Strahlenresistenz in Verbindung gebracht [Höckel, 2001, S.266].

Weniger oxigeniertes Gewebe erweist sich als weniger strahlenempfindlich. Der Oxigenierungsstatus hängt wiederum u.a. von der Vaskularisation, d.h. indirekt von der Durchblutung des Zielgewebes ab. Und interessanterweise sind Tumore mit gesteigerter Angiogenese ebenfalls weniger strahlenempfindlich. Man könnte in diesem Zusammenhang annehmen, dass bei gesteigerter Angiogenese die Durchblutung verbessert sein sollte. Dem ist nicht so (siehe Kapitel 1.1.3.1). Zudem hängt die erhöhte Strahlenresistenz eventuell mit einem direkten anti-apoptischen Effekt von Angiogenesefaktoren, wie VEGF, zusammen. So stellten Smith *et al.* die Theorie auf, dass VEGF-Proteinlevel als Marker für hypoxische Radioresistenz dienen könnten [Manders, 2003, S.6363; Koukourakis, 2000, S.551; Katoh, 1995, S.5691; Smith, 2000, S.2051].

Anämie *per se* bewirkt relative Hypoxie und steht deshalb mit erhöhter Strahlenresistenz in Zusammenhang. Kohlenmonoxid bedingte Tumorphoxie bei Rauchern resultiert ebenfalls in einem schlechteren Bestrahlungsresponse. Deshalb sollte man rauchende Patienten motivieren, zumindest für die Zeit der Bestrahlung das Rauchen einzustellen. Starke Raucher mit SCCHN zeigen einem signifikant schlechteren Therapieerfolg nach primärer Radiotherapie und ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung neuer bzw. weiterer Tumore [Grau, 1998, S.106 ff.; Siemann, 1998, S.211].

Höckel *et al.* fragten 1998 schließlich sinngemäß: Warum haben hypoxische Karzinome ein schlechteres Outcome? Stellt die Hypoxie nur einen Marker für den höher malignen Phänotyp dar? Oder ist es die Hypoxie *per se*, die direkt Einfluss auf die klinische Aggressivität maligner Tumoren nimmt? Für Letzteres sprechen drei Umstände [Höckel, 1998, S.77]:

- 1.) Der Radiosensitivitätseffekt von molekularem Sauerstoff auf die Photon-Bestrahlung dürfte in Tumoren mit niedrigen pO₂-Level erniedrigt sein.
- 2.) In hypoxischem Milieu könnten Tumorzellen ebenso wie normale Zellen auf Zellstress mit Ausschüttung von „oxygen-regulated proteins“ antworten. Einige davon, darunter p53 oder VEGF, beeinflussen die Aggressivität in Zeiten maligner Progression ebenso wie in Zeiten vermindertem Response während der Behandlung.
- 3.) Hypoxie steigert direkt die genetische Instabilität und Heterogenität. Dies könnte zur Evolution von metastatischen und resistenten Tumorzellvarianten führen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialverzeichnis

Materialien bzw. Reagenzien	Hersteller
96-Well-Mikrotiterplatte: Nunc F96 MicroWell™	Thermo Fisher Scientific (Nunc GmbH & Co. KG); Langensfeld, Deutschland
Bio Tek EL808: Spektralphotometer	Bio Tek Instruments GmbH; Bad Friedrichshall, Deutschland
Cat. # ECM600 (uPA-Aktivität)	Chemicon International Inc.; Temecula, USA
<u>ELISA-Kits:</u> IMUBIND® ELISA # 894 (uPA) IMUBIND® ELISA # 821 (PAI-1) BCA™ Kit Protein Assay Kit (Protein) Quantikine® Cat. # DVE00 (VEGF)	American Diagnostica Inc.; Stamford, USA American Diagnostica Inc.; Stamford, USA Pierce Biotechnology Inc.; Rockford, USA R&D Systems; Minneapolis, USA
Inkubator, BB 6060 CuO ₂	Heraeus Thermo Scientific; Hanau, Deutschland
Lamin Air LB48L	Laminarflow Werkbank von Heraeus; Deutschland
<u>Lösungen, Medien, Puffer:</u> DMEM DMSO, PBS, TBS, TBST, Triton X-100, Tris-Puffer FCS PSN Antibiotic Mixture, Trypsin NaCl 0,9 %, Tween 20	Gibco BRL Life Technologies GmbH; Karlsruhe, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland Biochrom AG; Berlin, Deutschland Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland Merck Schuchardt OHG; Hohenbrunn, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo AG; Schwarzenbach, Schweiz
Slide-a-lyze Dialysis Cassette	Pierce Biotechnology Inc.; USA
SPSS	IBM Company; Chicago, USA
Stereomikroskop Stemi 2000-C mit Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss GmbH; Göttingen, Deutschland Schott AG; Mainz, Deutschland
<u>Zellkulturmaterial:</u> Biohit Proline 50 Mehrkanalpipette (300µl) Eppendorf Research Pipette (1µl, 2,5µl, 10µl, 100µl, 1000µl), Multipette plus, T.I.P.S. Standard Pipettenspitzen (0,5-20µl, 20-300µl, 50-1000µl), Combitips (0,1ml, 1ml, 10ml), Safe-Lock Tubes (1,5 / 2ml), Standard Reaktionsgefäß 3810X (1,5ml) Falcon Glaspipette Serological Pipet (1ml, 2ml, 5ml, 20ml, 50ml), BlueMax conical tube (50ml) Petrischalen, Einmal-Scraper, Zellkulturflaschen (T 75) Sarstedt Pipettenspitzen (200µl) TPP Zentrifugenröhrchen konisch (15ml)	Biohit Deutschland GmbH; Rosbach v.d. Höhe, Deutschland Eppendorf Zentrale; Hamburg, Deutschland Becton Dickinson France S.A.S. BD; Le Pont-de-Claix, Frankreich Biochrom AG; Berlin, Deutschland Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland TPP AG; Trasadingen, Schweiz

Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Zentrifuge Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen, Deutschland
Z2 Coulter Counter	Beckman Coulter Inc.; Hialeah, USA

2.2 Tumorzelllinien und Tumormodell

Diese Arbeit ist Teil eines multiinstitutionellen DFG-geförderten Projektes (PAK 124, AD 132/3-2) vier verschiedener deutscher Hochschulen (München, Dresden, Mainz und Würzburg). Insgesamt wurden zehn etablierte humane Plattenepithelzellkarzinome des Kopfs und des Halses für *in vivo* und *in vitro* Experimente verwendet. Die vorliegende Arbeit untersuchte *in vitro* die folgenden vier Zelllinien: XF354, SAS, CAL33 und HSC4.

SAS und HSC4 leiten sich von primären Plattenepithelzellkarzinomen der Zunge ab (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resources Bank). CAL33 wurden ebenfalls aus einem Zungenkarzinom hergestellt (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). XF354 stammen hingegen von einer Lymphknotenmetastase eines primären Mundbodenkarzinoms (Deutsches Krebsforschungszentrum). Alle Zelllinien sind histologisch wie tumorbiologisch den „squamous cell carcinoma of the head and neck“ (SCCHN) zuzuordnen (Tab.2) [Yaromina, 2006, S.123; Yaromina, 2007, S.305].

Im Rahmen des multiinstitutionellen Studienprojektes wurden die Tumoren *in vivo* auf unterschiedliche Strahlenresistenz untersucht. Nach Transplantation wurden die Tumoren fraktioniert bestrahlt. Als funktioneller Endpunkt der Bestrahlungsresistenz wurde die lokale Tumorkontrolle 120 Tage nach Radiatio bestimmt. Die „tumor control dose-50“ (TCD₅₀) beschreibt dabei diejenige Strahlendosis, die benötigt wird, um 50 % des Tumors lokal zu kontrollieren. Die vier hier verwendeten Tumorzelllinien XF354, SAS, CAL33 und HSC4 wiesen die in Tabelle 2 ersichtlichen unterschiedliche Strahlenresistenzen auf.

Zelllinie	XF354	SAS	CAL33	HSC4
Zellart	LK-Metastase	Primärtumor	Primärtumor	Primärtumor
Lokalisation	Mundboden	Zunge	Zunge	Zunge
Grading	G1	G3	-	-
TCD ₅₀ [Gy]	47,4	126,7	105,2	82,9

Tab.2: Tumorcharakteristika (modifiziert nach Yaromina, 2006 und 2007)

2.3 Zellkultur und Hypoxie-Inkubation

Die Zelllinien wurden in Standard „Dulbecco`s modified Eagle`s medium“ (DMEM) kultiviert. Bestandteile dieses Nährmediums waren u.a. 10 % FCS (fetal calf serum), 4.500 mg/l D-Glukose, 1 % nicht essentielle Aminosäuren und eine 1 prozentige antibiotische Lösung aus Penizillin und Streptomycin mit einer Konzentration von je 0,05 mg/ml sowie 1 mg/ml Neomycin (PSN). Sämtliche an den Zellen durchgeführte Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilwerkbank LaminAir LB48L.

Inkubiert wurden die Zellen in einem angefeuchtetem Brutschrank (Inkubator) unter konstanten Standardbedingungen (Normoxie) bei einer Temperatur von 37°C, in einem Luftgemisch von 95 % Raumluft (ca. 21 % O₂-haltig) und 5 % CO₂. In der Subkultivierung war die Passagierung der konfluenten Zellen alle drei Tage notwendig, um eine mögliche Wachstumshemmung durch Zell-Zellkontakt untereinander zu verhindern. Zur Analyse wurden Zellen der Passage 6 bis 23 verwendet.

Zellen auftauen, aussäen, kultivieren:

1. Zellen aus -80°C Eisfach nehmen und in 37°C Wasserbad vorsichtig auftauen.
2. 2 ml DMEM mit einer 5 ml Pipette langsam auf die Zellen geben, vorsichtig durchmischen und in ein 10 ml Tube geben.
3. Langsam 8 ml DMEM zugeben.
4. 3 min bei 3000 rpm zentrifugieren.
5. DMEM abpipettieren.
6. Rest in 10 ml frisches DMEM resuspendieren.
7. In eine Zellkulturflasche (T 75) pipettieren.
8. 10 ml frisches Medium zugeben.
9. In den 37°C Inkubator stellen.

Subkultivierung

10. DMEM abpipettieren.
11. Den Zellrasen 2x mit PBS (phosphate buffered saline) waschen.
12. Ablösung der Zellen mit 1,5 ml Trypsin (Einwirkzeit bei Raumtemperatur: 10-15 min).
13. Zugabe von 3 ml DMEM.
14. Resuspension der gelösten Zellen.
15. Aussaat mit zelllinienspezifischer Ausgangskonzentration in frische Zellkulturflaschen (T 75) mit 20 ml DMEM.

Nach Kultivierung der Zellen in Kulturflaschen wurden diese auf 10-Zentimeter-Platten bei tumorzellinienspezifischer Ausgangskonzentration ausgesät, so dass sie nach durchschnittlich 72 Stunden Inkubation eine 80 prozentige Konfluenz erreicht hatten. Anschließend wurden die Schalen mit Phosphatpufferlösung (PBS) gewaschen, das Zellmedium gewechselt (cave: für die uPA-Aktivitätsassays wurde ab hier serumfreies Medium verwendet!) und die Platten entweder unter Hypoxie gesetzt und 24 Stunden

inkubiert oder direkt unter Standardbedingungen für weitere 24 Stunden zurück in den Inkubator gestellt.

Die Zellen wurden in milde hypoxische Umgebungsbedingungen gebracht, indem die Platten bei 37°C in luftdichten Aluminium-Kammern inkubiert wurden. Erreicht wurden diese Hypoxiebedingungen mittels einer 2006 bei Sprague *et al.* beschriebenen Vorrichtung. In einem System aus luftdichten Aluminiumzylindern, Luftschläuchen, Barometern, einer Vakuumpumpe und einer Gasflasche konnte durch wechselzeitige Evakuierung (-0,3 bar) und Insufflation eines Luftgemischs aus 95 % Stickstoff (N₂) und 5 % Kohlendioxid (CO₂) bis zu einem Druck von +1,3 bar in der Aluminiumkammer alle zwei Minuten, 11 Zyklen lang, der Sauerstoff durch das N₂/CO₂-Gemischs ersetzt werden, so dass nach 22 Minuten ein durchschnittlicher Sauerstoffgehalt im Medium von ca. 0,66 % erreicht wurde. Dies entspricht in etwa dem Mikromilieu in hypoxischen Arealen von SCCHN. Nach 24 Stunden Normoxie bzw. Hypoxie wurde der Überstand, um den Zellschutt zu entfernen, zentrifugiert und für weitere Analysen bei -20°C aufbewahrt [Sprague, 2006, S.284].

Erzeugen des Hypoxie-Mikromilieus:

1. luftdichte Aluminiumzylinder (Jigs) in 37°C Wasser-/Bewegungsbad wärmen (ca. 20 min).
2. PBS-Waschung und Mediumwechsel der entsprechenden Zellkulturschalen (cave: Zymografie und uPA-Messung mit FCS-freiem Medium!).
3. Petrischalen in Aluminiumzylinder stellen, Jigs verschließen und zurück ins Wasser-/Bewegungsbad geben.
4. Luftschläuche an N₂/CO₂-Druckluftflasche anschließen.
5. Evakuierung bis Erreichen von -0,3 bar Unterdruck.
6. N₂/CO₂ Insufflation bis Erreichen von +1,3 bar Überdruck.
7. Schritte 5 und 6 alle 2 min, 11 Zyklen wiederholen (22 min).
8. Ventil der Aluminiumkammer schließen (Barometer +1,3 bar).
9. Aluminiumzylinder für entsprechende Brutdauer in Inkubator stellen.

2.4 Proteinmengen, ELISAs und uPA-Aktivitätsassays

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge, der VEGF- und PAS-Konzentrationen sowie der uPA-Aktivität setzte die Gewinnung von Überständen und Zelllysaten aus den Proben voraus. Die anschließende Antigenbestimmung erfolgte mit Hilfe kommerzieller ELISA-Kits. „Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) beruhen auf dem sogenannten Sandwich-Prinzip. Ein spezifischer Antikörper wird in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte fest gebunden. Dieser spezifische Antikörper ist wiederum in der Lage, das gesuchte Antigen aus der zu untersuchenden Probe zu erkennen und zu binden. Alle nicht gebundenen Substanzen werden anschließend abgewaschen. Ein zweiter, spezifischer Antikörper wird zugegeben. Nach der Substratzugabe wird die Farbentwicklung des gespaltenen Substrates in einem ELISA-Reader

(Spektralphotometer) gemessen und mittels einer Eichkurve in entsprechende Antigenkonzentrationen umgerechnet.

Die Überstände der einzelnen Proben wurden in 15 ml Falcon Tubes abpipetiert. Anschließend wurde bei 10.000 rpm und 4°C in der Zentrifuge für 10 Minuten der Zellschrott abzentrifugiert. Ohne das Sediment erneut aufzuwühlen wurden 10 ml zellfreien Überstands zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren. Aus den selben Platten wurden Zellysate extrahiert. Hierzu wurde 1 ml eiskalter Lyse-Puffer auf den Zellrasen gegeben. Mechanisch wurden die Zellen mit Einmal-Scrapern vom Boden der Schalen gelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde, um alle Zellen zu lysieren, in einem Eppendorf-Tube über 24 Stunden bei 4°C rotiert. Schließlich wurde der Zelldetritus bei 4°C für 10 Minuten mit 10.000 rpm abzentrifugiert. Die Lysate wurden dann in Kryotubes bei -80°C für weitere Tests aufbewahrt.

Protein-ELISA: Die Gesamtproteinmengen wurden gemäß Herstellerangaben mit Hilfe des BCA™ Kit aus den Lysatproben ermittelt. Jeder Messung wurde zunächst eine standardisierte Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Eichkurve vorangestellt. Die Proteinbestimmungen erfolgten bei einer Wellenlänge des Lichts von 550 nm.

VEGF-ELISA: Die VEGF-Konzentrationen wurden in den Tumorlysaten mit Hilfe des humanen VEGF ELISA-Kits Quantikine® Cat # DVE00 gemäß der Herstelleranleitung bei 450nm gemessen.

In Kürze: 50 µl Aliquots der Proben zusammen mit 200 µl TBST (tris buffered saline + Tween 20) ELISA-Puffer wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgebracht und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um mit dem monoklonalen Antikörper gegen rekombinantes VEGF gebunden zu werden. Nach erster Waschung wurde ein polyklonaler Antikörper zugegeben und nach erneuter Inkubation und Waschung die Substratlösung des Kits zugefügt. Die Farbreaktion wurde im ELISA Reader bei 450 nm gemessen.

uPA und PAI-1-ELISA: Die kommerziell verfügbaren Kits der Firma American Diagnostica Inc. wurden verwendet, um die Konzentrationen von humanen PAI-1 (Imubind® Nr. 821) und uPA (Imubind® Nr. 894) zu bestimmen. Hierbei werden sowohl die aktiven, die inaktiven als auch die komplexgebundenen Formen von PAI-1 oder uPA registriert.

In Kürze: Die Proben wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen uPA bzw. PAI-1 markiert. Nach Spülung wurde der spezifische Antikörper jedem Protein zugegeben. An Streptavidin gebundene Peroxidase mit – wie oben – Tetramethylbenzidine als Substrat erzeugt die messbare Farbreaktion. PAI-1 und uPA wurden im Spektrometer quantitativ bei einer Absorption von 450nm gemessen.

ELISA -Protein Isolierung:

d 0: 150.000 Zellen/ml aussäen.

d 3: Mediumwechsel und begasen (s.o.).

d 4: Aluminiumkammern öffnen und Protein isolieren:

1. 900 µl Überstand in Eppi pipettieren und Zellen 2x mit PBS waschen.
2. Überstand 10 min bei 10.000 rpm, 4°C zentrifugieren, in ein frisches Eppendorfgefäß (Eppi) geben und bei -20°C einfrieren.
3. 900 µl eiskaltes TBST-Puffer (100 ml TBS + 500 µl Tween 20 + 100 µl Triton X-100) auf die Zellen geben, abkratzen und in ein frisches kaltes Eppi pipettieren.
4. Eppi mit Lysat 24 h bei 4°C rotieren.
5. Eppi 10 min bei 10.000 rpm, 4°C zentrifugieren.
6. Lysat-Überstand in ein frisches Eppi geben und ebenfalls bei -20°C einfrieren.

uPA-Aktivität: Für den uPA-Aktivitätsassay wurde das normale Wachstumsmedium durch serumfreies Medium direkt vor der normoxischen bzw. hypoxischen Inkubation ersetzt. Nach 24 Stunden in Normoxie bzw. Hypoxie wurde der zellfreie Überstand abpipettiert. Um uPA-Konzentrationen im messbaren Bereich zu erhalten wurden die Proben mit Hilfe einer Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette konzentriert.

Um die Unterschiede der Ausgangszellzahl in jedem Wachstumsschälchen zu kompensieren, wurden die Konzentrationen aus den ELISA Bestimmungen in [ng/mg Protein] angegeben. Die uPA-Aktivität in den einzelnen Überständen wurde gemessen, in dem ein kommerziell verfügbares kolorimetrisches uPA-activity Kit (Cat. # ECM600) gemäß Herstelleranweisung verwendet wurde. 40 µl bis 160 µl Tumorlysat oder 60 µl Konzentrat aus 30 ml Überstand wurden auf eine einzige 96-Well-Platte gegeben. Die Konzentration der uPA-Aktivität wurde in Units pro Milligramm Protein [Units/mg Protein] angegeben.

uPA-Aktivitätsmessung – Proteinisolierung:

d 0: 150.000 Zellen/ml aussäen.

d 3: 2x 10 ml PBS-Waschung; Medium wechseln mit serumfreiem Medium begasen (s.o.).

d 4: Aluminiumzylinder öffnen und Protein isolieren:

1. 900 µl Überstand (5 ml mit „slide-a-lyze“ konzentrieren) in Eppi pipettieren und Zellen 2x mit PBS waschen.
2. Überstand 10 min bei 10.000 rpm, 4°C zentrifugieren, in ein frisches Eppi geben und bei -20°C einfrieren.
3. 900 µl eiskaltes Lyse-Puffer (5 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,1 + 0,4 % Triton X-100, 200 µl auf 50 ml (H₂O) auf die Zellen geben, abkratzen und in ein frisches kaltes Eppi pipettieren.
4. Eppi mit Lysat 24 h bei 4°C rotieren lassen.
5. Eppi 10 min bei 10.000 rpm, 4°C zentrifugieren.
6. Lysat-Überstand in ein frisches Eppi geben und ebenfalls bei -20°C einfrieren.

2.5 Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit

Zur Bestimmung der jeweiligen Koloniebildungsfähigkeit wurden die einzelnen Tumorzelllinien für 24 Stunden entweder unter Normoxie oder Hypoxie gesetzt und nach Anlegen einer Verdünnungsreihe (z.B. 1000 - 750 - 500 - 250 Zellen/ml) in 6-Well-Platten ausgesät und bebrütet. Zum Zeitpunkt der Entstehung von ca. 50 zellgroßen Kolonien wurde das Wachstum gestoppt. Anschließend wurden die Kolonien mit -20°C kaltem Methanol fixiert und mit 0,1 prozentiger Crystal Violet Lösung angefärbt. Nach dem Trocknen der gefärbten Platten wurde die Anzahl der Kolonien unter dem Stereomikroskop gezählt.

Zum einen konnte nun die Plattierungseffizienz (PE), zum anderen die Überlebensfraktion (ÜF) errechnet werden. Die PE berechnet sich als Quotient aus Anzahl der gebildeten Kolonien mit einer Zellzahl größer 50 durch die ausgesäte Zellzahl multipliziert mit 100 %. Mit der ÜF werden die PE unter Hypoxie ins Verhältnis zu den PE unter Normoxie gesetzt, sie stellt den Hypoxie-Normoxie-Quotienten der PE dar. Insgesamt wurde somit die Fähigkeit der einzelnen Tumorzelllinien einen geschlossenen Zellverband zu bilden unter norm- und hypoxischen Bedingungen verglichen und charakterisiert.

Plattierungseffizienz

- d 0: 100.000 Zellen/ml in 10 cm Schalen aussäen.
 - d 3: Medium wechseln und Schalen begasen (s.o.).
 - d 4: Aluminiumkammer öffnen:
 - 2x mit PBS waschen.
 - Trypsinieren (8 min) und zählen.
 - Verdünnungsreihe anlegen: 10 ml für 3 Ansätze je 3 ml.
 - 3 ml pro Well in 3 Wells einer 6-Well-Platte aussäen und inkubieren.
 - d 7-10: Bei Koloniegrößen von ca. 50 Zellen → Färbung:
 - Absaugen des Mediums.
 - 2x mit PBS spülen (ca. 2 ml).
 - 5 min mit Methanol (-20°C; 1,5 ml) fixieren.
 - 2 min mit 0,1% Crystal Violet Färbelösung färben.
 - mit Wasser abspülen und trocknen.
- Unter einem Mikroskop (Vergrößerung 10fach) zählen.

Plattierungseffizienz (PE) = [Kolonienzahl / Zellzahl ausgesät] x 100 %

Überlebensfraktion (ÜF) = PE Hypoxie / PE Normoxie

2.6 pH-Wert Messung

Als weiteren Aspekt der vergleichenden Untersuchungen wurden vor der jeweiligen Weiterverwendung der Zellproben im Mediumüberstand der Wachstumsschälchen mit Hilfe eines pH-Meters der pH-Wert in normoxischem wie hypoxischem Material gemessen und für weitere Auswertungen dokumentiert.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des statistischen Pakets für Sozialwissenschaften (statistical package of social science, SPSS, Chicago, IL, USA) vorgenommen. Die Ergebnisse der VEGF-, PAI-1-, uPA- und uPA-Aktivitätslevel sind als Mittelwert mit dem entsprechenden SEM (standard error of the mean) angegeben. Der Pearson Koeffizient der Korrelation [r] und die lineare Regressionsanalyse [R²] wurden dazu benutzt, die Beziehungen zwischen VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivität aufzudecken. Der Students t-Test wurde in Abhängigkeit des Levene-Tests verwendet, um die Unterschiede zwischen normoxischen und hypoxischen VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivitätslevel bezüglich ihrer Signifikanz zu beurteilen. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Signifikanzniveau:

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Hypoxie auf die Koloniebildungsfähigkeit, die Gesamtproteinkonzentration und das Mikromilieu

Um den Effekt von Hypoxie auf die Tumorzelllinien zu testen, wurde deren Koloniebildungsfähigkeit untersucht. In Abbildung 8a sind die gemittelten Plattierungseffizienzen (PE) der normoxischen und der hypoxischen Proben für die vier untersuchten Zelllinien in Prozent gegenübergestellt. In drei von vier Tumoren ist eine Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit nach Hypoxie erkennbar. CAL33-Tumoren wiesen mit einer Überlebensfraktion (ÜF) von 0,19 die ausgeprägteste Reduktion der Bildung eines soliden Zellverbandes auf. Auch die XF354-Tumoren organisierten sich wesentlich schlechter in Kolonien mit einem Hypoxie/Normoxie-Quotienten (H/N-Ratio oder ÜF) von 0,43. Bei den Proben von HSC4 war der Unterschied geringer, wenn auch mit einer H/N-Ratio von 0,46 immer noch deutlich ausgeprägt. Nur die SAS-Zellverbände wiesen eine schwach gegenläufige Tendenz auf. Mit einer ÜF von 1,08 zeigten die Zellen in Hypoxie eine minimal größere Koloniebildungsfähigkeit als in vermeintlich lebensfreundlicher Normoxie.

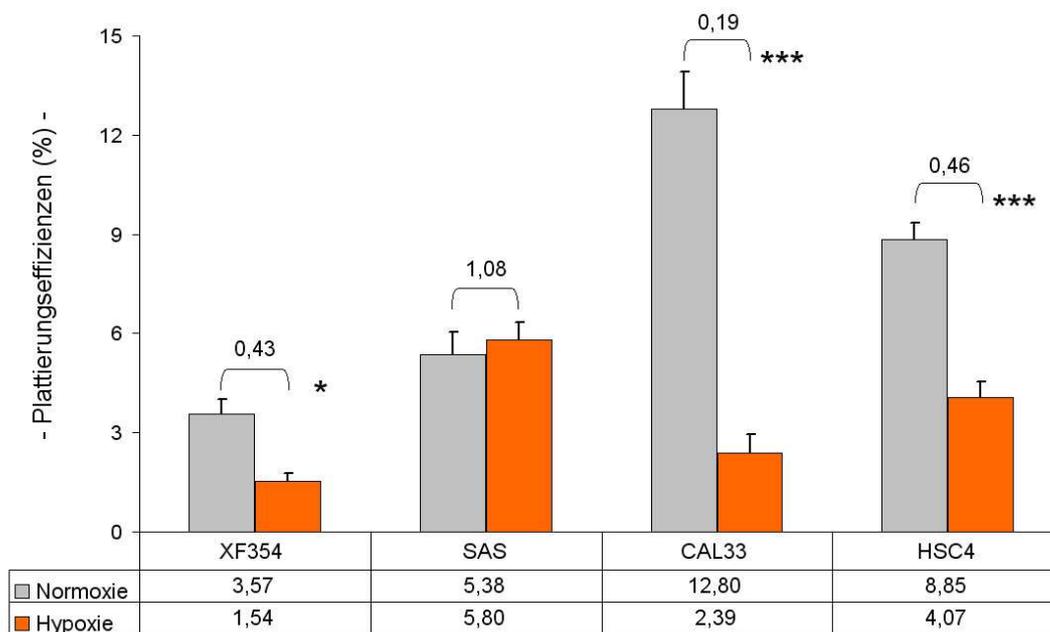


Abb.8a: Plattierungseffizienzen (PE) in % mit entsprechenden Überlebensfraktionen. (ÜF: Werte über den Balken)

Die Untersuchung der sezernierten Gesamtproteinmengen zeigte über alle Tumorzelllinien hinweg eine deutliche Abnahme der Proteinbiosynthese in hypoxischen Umgebungsbedingungen. HSC4 produzierten sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie die größten Proteinmengen. In absteigender Reihe folgten CAL33, SAS und XF354 (Abb.8b). Unter hypoxischen Bedingungen war erwartungsgemäß die Proteinsynthese in allen

Proben reduziert. Am geringsten fiel der Abfall bei XF354 (H/N-Ratio: 0,93) aus. HSC4 (H/N-Ratio: 0,78), SAS (H/N-Ratio: 0,72) und CAL33 (H/N-Ratio: 0,67) konnten ihre Syntheseleistung unter Hypoxie hingegen deutlich schlechter aufrechterhalten. Indirekt kann dieser beobachtete Abfall auf die reduzierte Proliferation bzw. die erhöhte Apoptoserate zurückgeführt werden. Entsprechend ist die quantitative Angabe der weiteren untersuchten Proteine (uPA, PAI-1, VEGF) nur in Relation zur ausgeschütteten Gesamtproteinmenge als [ng/mg Protein]-Einheit sinnvoll.

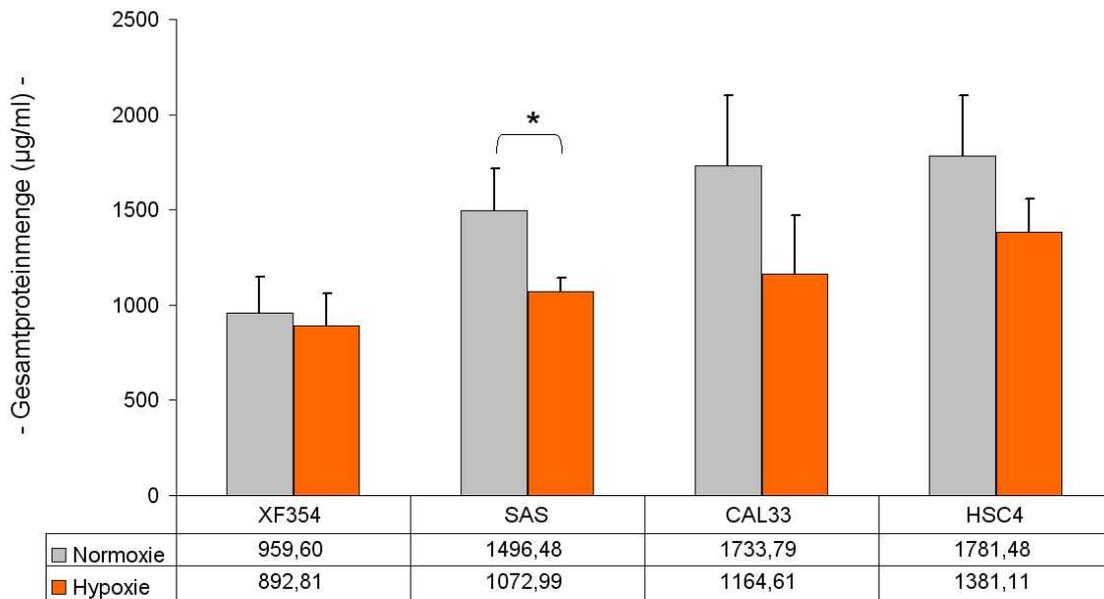


Abb.8b: Ausgeschüttete Gesamtproteinmenge [µg/ml] in Normoxie und Hypoxie Vergleichskulturen.

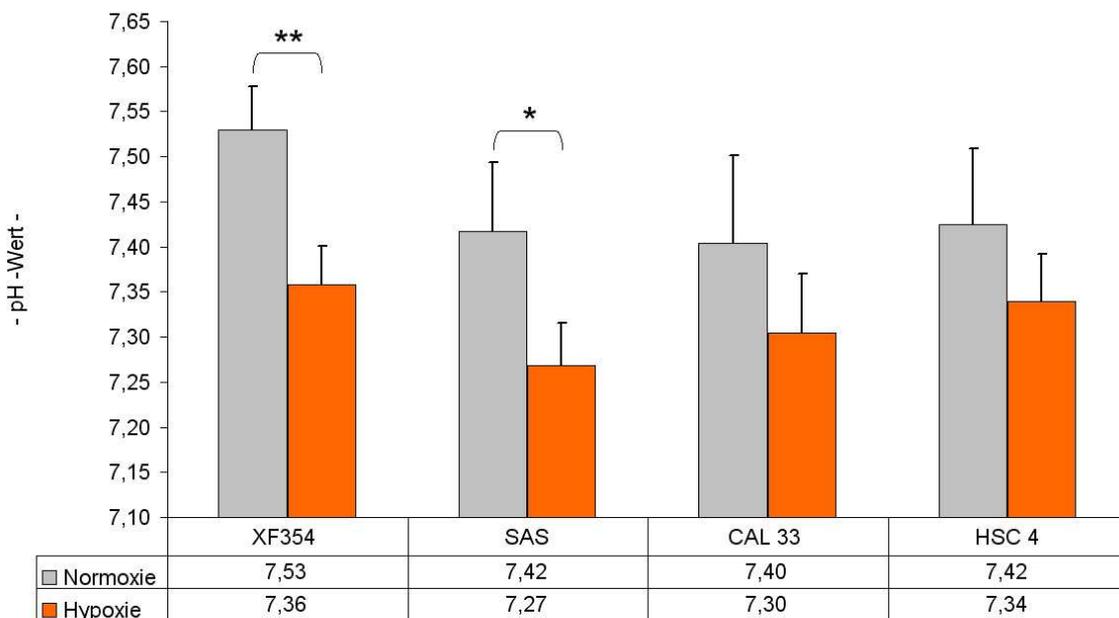


Abb.8c: pH-Werte von XF354, SAS, CAL33 und HSC4 im Vergleich Normoxie vs. Hypoxie.

Bei Analyse des Mikromilieus mittels der über alle Ausgangskonzentrationen gemittelten pH-Werte konnte für die Zelllinien XF354 und SAS eine signifikante Ansäuerung unter Sauerstoffmangelbedingungen aufgezeigt werden. HSC4 und CAL33 verhielten sich vergleichbar und auch wenn sie die statistische Signifikanztestung verfehlten, so war ein pH-Abfall doch messbar (Abb.8c).

3.2 VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivität der einzelnen Zelllinien

Da VEGF und PAI-1 Sekretionsproteine sind und PAI-1 mit aktiven uPA interagiert wurde der Einfluss von Hypoxie auf die Sekretion von VEGF, PAI-1 und uPA sowie die uPA-Aktivitätslevel ermittelt. Hierzu wurden die Zellen für 24 Stunden entweder unter normoxische (ca. 21 % O₂) oder hypoxische (< 1 % O₂) Zellkulturbedingungen gesetzt.

In den Abbildungen 9a-c sind die durchschnittlichen VEGF-, PAI-1- und uPA-Ausschüttungen in den zellfreien Überständen der vier Zelllinien dargestellt. Wie bereits in 2.4 erläutert, wurden die Daten in [ng/mg Protein] angegeben, um die Verhältnismäßigkeit bei unterschiedlichen Bedingungen zu berücksichtigen bzw. zu extrapolieren.

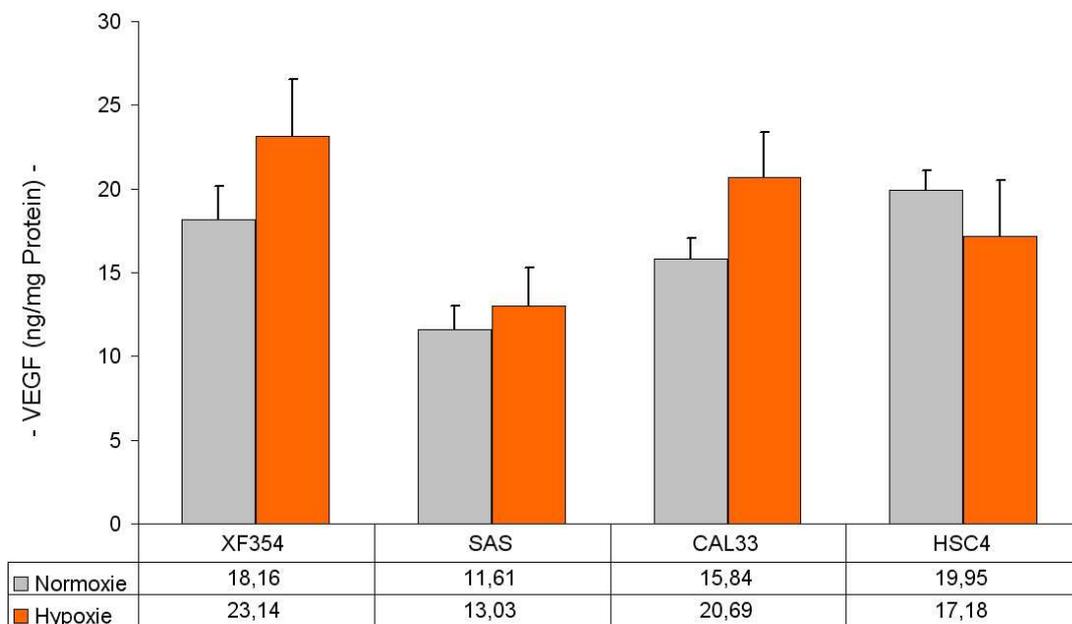


Abb.9a: durchschnittliche VEGF-Konzentration [ng/mg Protein] von XF354, SAS, CAL33 und HSC4.

XF354-, SAS- und CAL33-Zellen wiesen unter hypoxischen Konditionen eine deutliche Mehrsekretion von **VEGF** auf. Mit einem Hypoxie- zu Normoxie-Verhältnis von 1,3 war der Unterschied bei XF354 und CAL33 am ausgeprägtesten. SAS zeigte ebenfalls einen Anstieg der VEGF-Sekretion (1,1fach). Bei den Proben von HSC4 konnte hingegen eine Verminderung der VEGF-Ausschüttung aufgedeckt werden (H/N-Ratio: 0,9). Die Daten erreichten keine Signifikanz (Abb.9a; Tab.3).

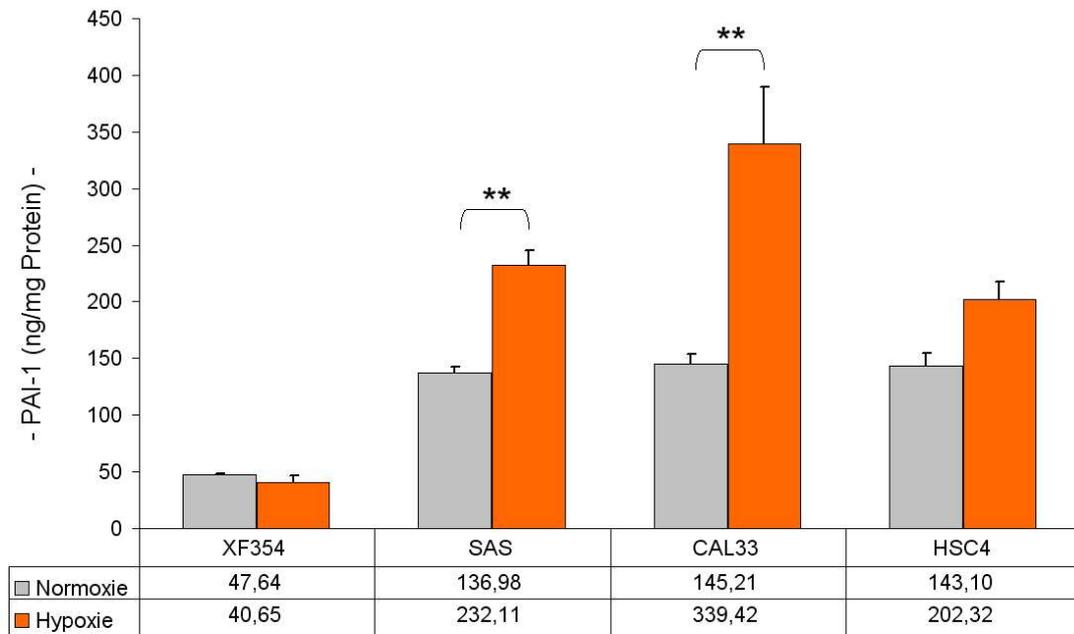


Abb.9b: durchschnittliche PAI-1-Konzentration [ng/mg Protein] von XF354, SAS, CAL33 und HSC4.

Bei den durchschnittlichen **PAI-1**-Konzentrationen verhielten sich die Linien SAS und CAL33 – aber auch HSC4 – ähnlich. CAL33 konnte die PAI-1-Ausschüttung am stärksten steigern, nämlich 2,3fach. SAS folgte CAL33 mit einer H/N-Ratio von 1,7. Die HSC4-Tumoren wiesen immerhin noch eine Mehrsekretion mit dem Faktor 1,4 auf. Für XF354 konnte keine Sekretionssteigerung gezeigt werden. Im Gegenteil: Die PAI-1-Sekretion sank auf den Faktor 0,9. In der statistischen Auswertung waren die Werte für SAS und CAL33 signifikant. XF354 und HSC4 hingegen verfehlten die Signifikanztestung (Abb.9b; Tab.3).

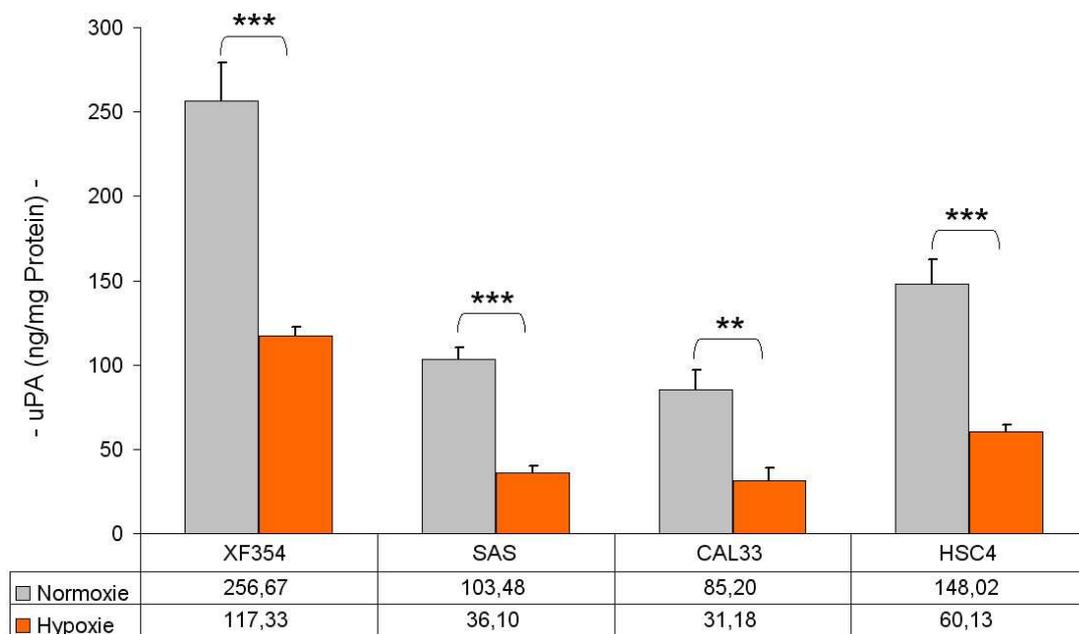


Abb.9c: durchschnittliche uPA-Konzentration [ng/mg Protein] von XF354, SAS, CAL33 und HSC4.

Die Daten der **uPA**-Sekretion waren bis auf CAL33-Proben sämtlich statistisch höchstsignifikant (Tab.3). Festzuhalten ist aber, dass hier keine Sekretionssteigerung sondern bei allen Zelllinien deutliche Minderausschüttungen von freiem uPA aufgedeckt werden konnten. Am deutlichsten war dies bei den Proben von SAS (H/N-Ratio: 0,35) und CAL33 (H/N-Rati: 0,37) die knapp auf ein Drittel reduziert waren. Und auch HSC4 (H/N-Ratio: 0,41) wie XF354 (H/N-Ratio: 0,46) wiesen mehr als eine Halbierung der uPA-Mengen auf (Abb.9c).

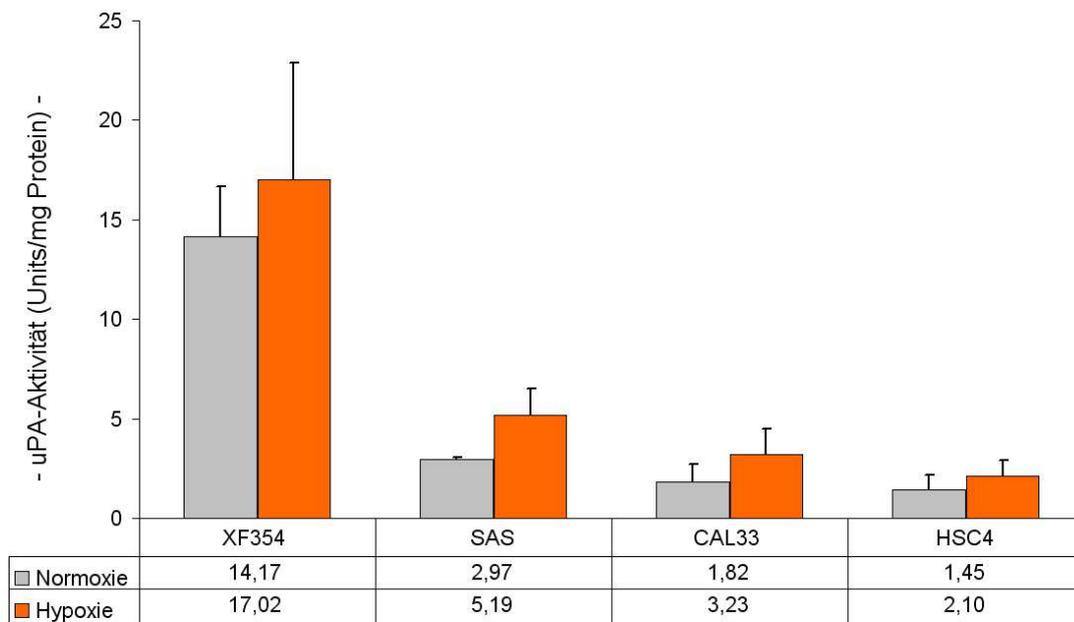


Abb.10: durchschnittliche uPA-Aktivität [Units/mg Protein] von XF354, SAS, CAL33 und HSC4.

Wie bereits erläutert ist die netto uPA-Ausschüttung für Tumoreigenschaften, wie Invasion und Metastasierung, nur bedingt relevant. Da nur aktiviertes uPA in der Lage ist, Plasminogen zu spalten und somit ECM-Proteine zu degradieren. Mehr Bedeutung erlangt also die **uPA-Aktivität**, gemessen in den Tumorlysaten in [Units/mg Protein]. Abbildung 10 zeigt, dass sich das Verhältnis von hypoxischer zu normoxischer uPA-Aktivität wieder deutlich ins Positive kehrt, wenn auch die statistische Analyse keine Signifikanz der Werte beweisen konnte (Tab.3). Mit einer Steigerung um das 1,2fache wies XF354 den niedrigsten H/N-Quotienten auf. Insgesamt lagen aber die uPA-Aktivitätslevel von XF354 um das 3,3 bis 8,1fache über dem Niveau der anderen Zelllinien. SAS, CAL33 und HSC4 waren recht homogen. CAL33 zeigte die größte Steigerung um den Faktor 1,8, es folgte SAS mit 1,7 und HSC4 mit 1,4.

p-Werte	XF354	SAS	CAL33	HSC4	gepoolt
PE	0,025* [↓]	0,403 [↑]	< 0,001*** [↓]	< 0,001*** [↓]	< 0,001*** [↓]
Protein	0,742 [↓]	0,045* [↓]	0,093 [↓]	0,181 [↓]	0,010* [↓]
pH	0,005** [↓]	0,044* [↓]	0,329 [↓]	0,290 [↓]	0,001** [↓]
VEGF	0,130 [↑]	0,499 [↑]	0,088 [↑]	0,443 [↓]	0,194 [↑]
PAI-1	0,270 [↓]	0,009** [↑]	0,001** [↑]	0,112 [↑]	0,001** [↑]
uPA	< 0,001*** [↓]	< 0,001*** [↓]	0,001** [↓]	< 0,001*** [↓]	< 0,001*** [↓]
uPA-Aktivität	0,713 [↑]	0,130 [↑]	0,443 [↑]	0,617 [↑]	0,545 [↑]

Tab.3: Signifikanzniveau nach Untersuchung der Unterschiede zwischen Norm- und Hypoxie-Proben mit Hilfe des Student-T-Test. Als signifikant gelten $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). [↑] bzw. [↓] zeigen Steigerung bzw. Reduktion in Hypoxie gegenüber Normoxie an. [PE = Plattierungseffizienz; Maß der Klonogenität]

3.3 VEGF, PAI-1, uPA und uPA-Aktivität gepoolt über alle Zelllinien

Die Ergebnisse aller vier Zelllinien wurden gepoolt (Tab.4). Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass die VEGF-Werte die homogensten unter den vier untersuchten Tumorzelllinien waren. Sie erreichten Werte zwischen 23,14 (XF354) bis 11,61 [ng/mg Protein] (SAS). Die PAI-1-Mengen waren extrem heterogen zwischen den Tumorzelllinien und reichten von 37,33 (XF354) bis zu 339,42 [ng/mg Protein] (CAL33). Die durchschnittlichen uPA-Werte waren dagegen etwas homogener und erreichten Werte zwischen 31,18 (CAL33) und 256,67 [ng/mg Protein] (XF354). Die uPA-Aktivitätslevel waren relativ heterogen und reichten von 1,45 (HSC4) bis 17,02 [Units/mg Protein] (XF354). Hypoxie war in der Lage PAI-1-Antigen-Level (1,7fach), uPA-Aktivität (1,3fach) und VEGF (1,1fach) hoch zu regulieren. Allerdings war Hypoxie nicht fähig, die uPA-Antigen-Level in den Überständen aller vier gepoolten Zelllinien zu erhöhen. Im Gegenteil uPA wurde unter Sauerstoffmangel um mehr als die Hälfte (H/N-Ratio: 0,4) nach unten reguliert (Abb.11).

	VEGF	PAI-1	uPA	uPA-Aktivität
Normoxie	16,39	118,23	148,02	5,10
Hypoxie	18,51	203,63	61,19	6,88

Tab.4: gepoolte Normoxie-/Hypoxie-Daten über alle Zellen. (ng bzw. Units/mg Protein)

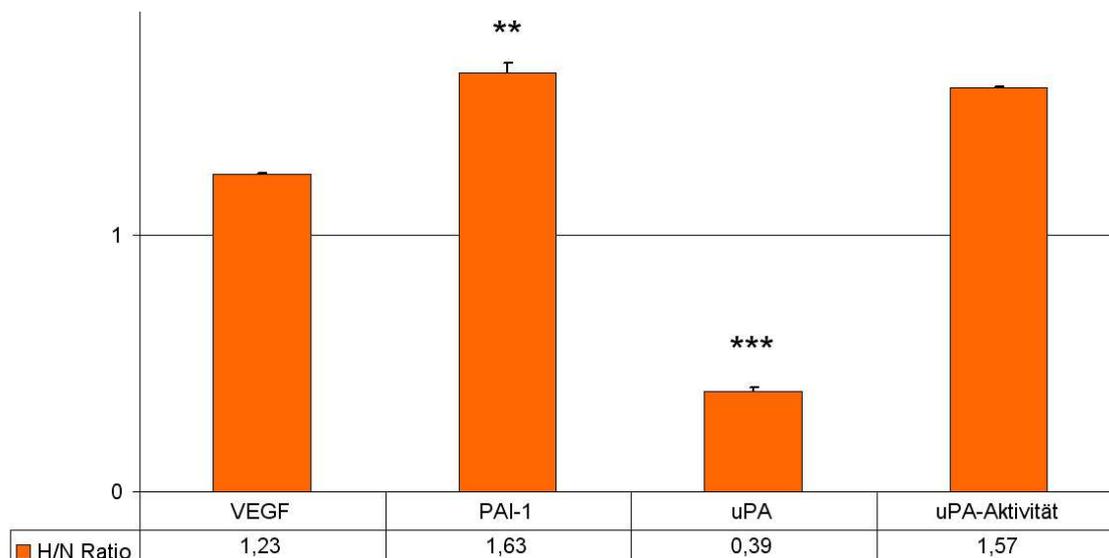


Abb.11: H/N Ratio der gepoolten Daten über alle Zelllinien (siehe auch Tab.4).

3.4 Korrelationsanalysen

Lineare Regressionsanalysen zur Untersuchung signifikanter Korrelationen zwischen VEGF und uPA, zwischen VEGF und PAI-1, zwischen VEGF und uPA-Aktivität, zwischen PAI-1 und uPA, zwischen PAI-1 und uPA-Aktivität sowie zwischen uPA und uPA-Aktivität (Abb.12a-f; Tab.5) zeigen die Zusammenhänge der untersuchten Faktoren für Normoxie und Hypoxie untereinander auf.

VEGF und uPA korrelierten nicht signifikant miteinander (Abb.12a). Das angestrebte Signifikanzniveau wurde auch für die Korrelation zwischen **VEGF und PAI-1** nicht erreicht (Abb.12b). Hingegen korrelierten **VEGF und uPA-Aktivität** deutlich positiv miteinander. Für diese Ergebnisse konnte mit p-Werten von 0,001 (**) in Normoxie und 0,019 (*) in Hypoxie statistische Signifikanz nachgewiesen werden (Abb. 12c). **PAI-1 und uPA** korrelierten ebenfalls untereinander statistisch signifikant (Abb.12d). Die Korrelation zwischen **PAI-1 und uPA-Aktivität** fiel weniger deutlich aus. Eine statistische Signifikanz konnte nicht belegt werden (Abb.12e). Der Vollständigkeit halber sei schließlich noch die Pearsons-Korrelationsanalyse von **uPA und uPA-Aktivität** erwähnt. Die Zellkulturarbeit indirekt bestätigend wiesen sowohl die normoxischen ($r = 0,99$) als auch die hypoxischen ($r = 0,97$) Proben statistisch signifikante Korrelationen auf (Abb.12f). In der statistischen Auswertung nahmen wir zudem die Berechnung der Korrelationen von den oben dargestellten Proteinen untereinander gepoolt über die norm- und hypoxischen Proben vor. Tabelle 5 fasst alle Ergebnisse zusammen. Relevante Abweichungen ergaben sich nicht. Auch hierbei korrelierten VEGF und aktives uPA, Gesamt-uPA und PAI-1 sowie uPA und uPA-Aktivität statistisch signifikant miteinander. Die Beziehungen von VEGF und uPA, VEGF und PAI-1 sowie PAI-1 und uPA-Aktivität hingegen fielen deutlich schwächer aus.

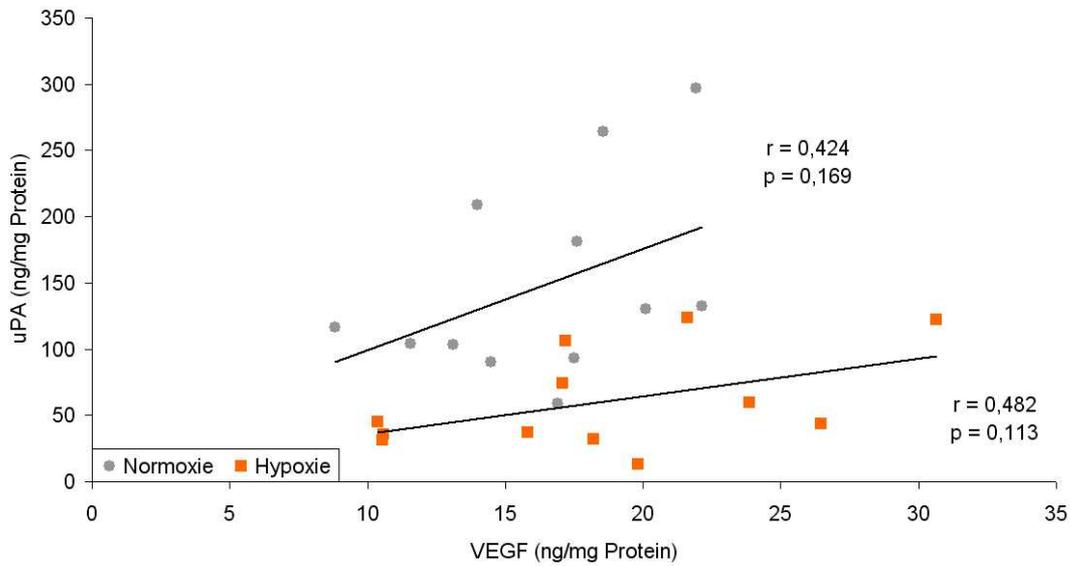


Abb.12a: Korrelation zwischen VEGF und uPA.

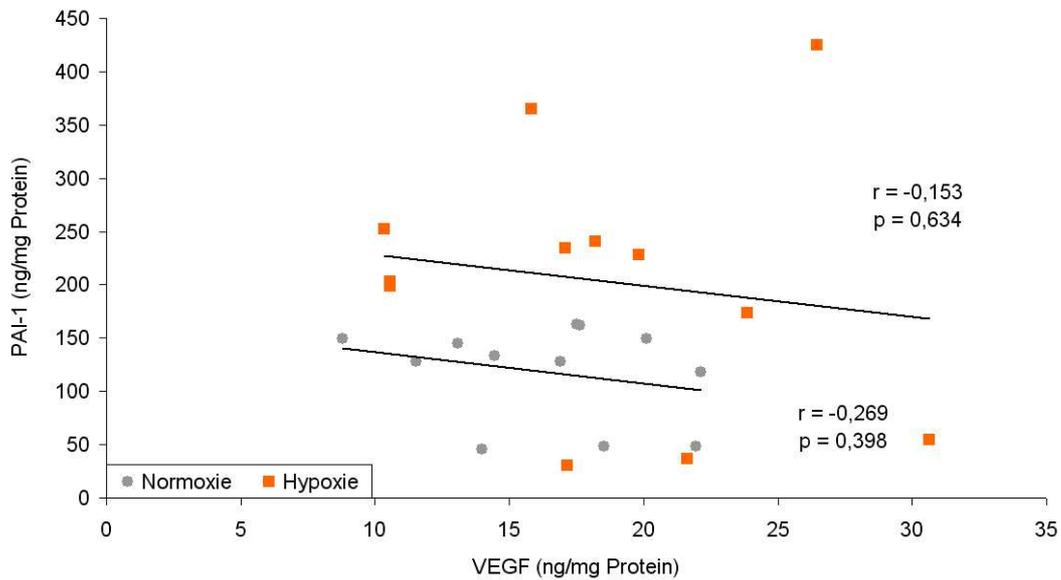


Abb.12b: Korrelation zwischen VEGF und PAI-1.

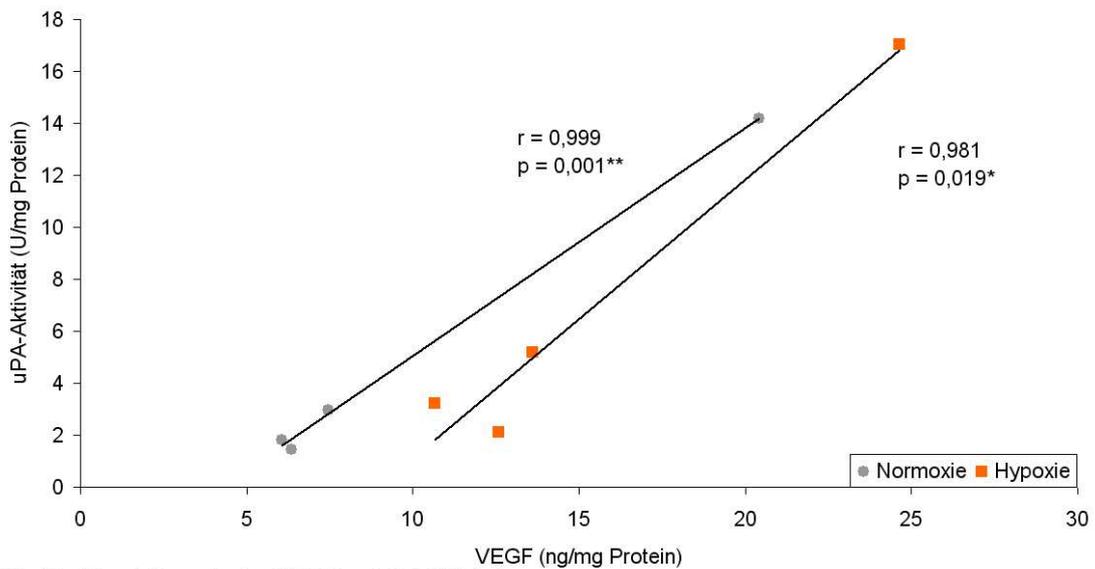


Abb.12c: Korrelation zwischen VEGF und uPA-Aktivität.

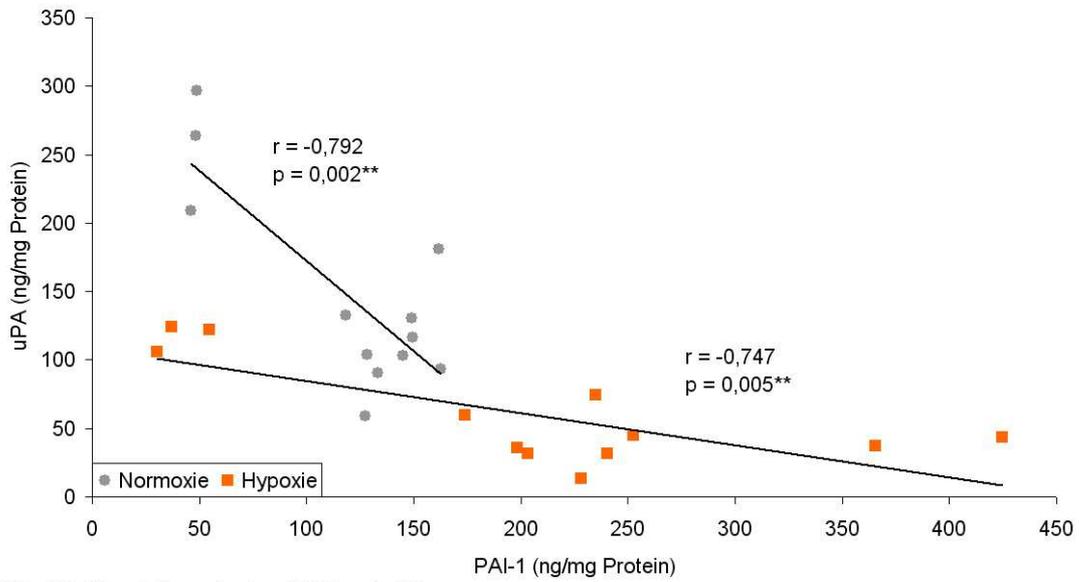


Abb.12d: Korrelation zwischen PAI-1 und uPA.

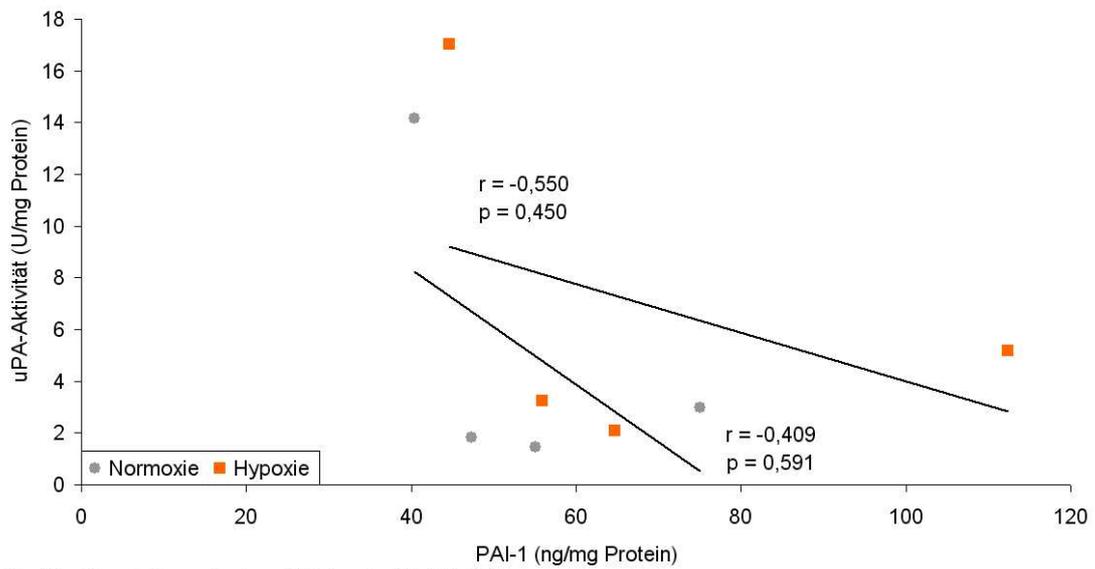


Abb.12e: Korrelation zwischen PAI-1 und uPA-Aktivität.

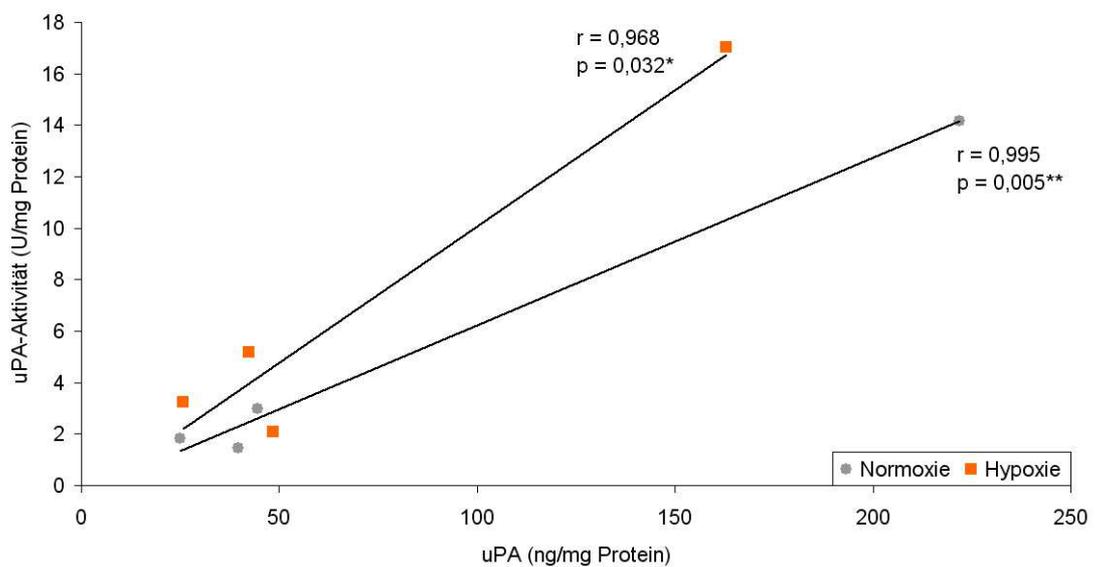


Abb.12f: Korrelation zwischen uPA und uPA-Aktivität.

<u>Parameter: r-Wert (p-Wert)</u>	Normoxie	Hypoxie	gepoolt
VEGF / uPA	0,424 (0,169)	0,482 (0,113)	0,175 (0,413)
VEGF / PAI-1	- 0,269 (0,398)	- 0,153 (0,634)	- 0,062 (0,772)
VEGF / uPA-Aktivität	0,999 (0,001**)	0,981 (0,019*)	0,948 (< 0,001***)
PAI-1 / uPA	- 0,792 (0,002**)	- 0,747 (0,005**)	- 0,669 (< 0,001***)
PAI-1 / uPA-Aktivität	- 0,550 (0,450)	- 0,409 (0,591)	- 0,352 (0,392)
uPA / uPA-Aktivität	0,995 (0,005**)	0,968 (0,032*)	0,922 (0,001**)
<u>Tab.5:</u> Korrelationen [r] mit Signifikanzniveau [p].			

4 Diskussion

In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in unterschiedlichen soliden Tumoren die Bestandteile des Plasminogenaktivierungssystem (PAS) und der Wachstumsfaktor VEGF eine wichtige Rolle für das Invasions- und Metastasierungsverhalten (PAS) sowie für eine gesteigerte Neoangiogenese (VEGF) spielen. Die Tatsache, dass Hypoxie die VEGF-Expression sowie die Ausschüttung der PAS-Komponenten steigern kann, ist zudem ein bekannter Grund für die erhöhte Strahlenresistenz hypoxischer Tumoren [Levy, 1995, S.13338; Liu, 1995, S.641; Maity, 2000, S.5881; Graham, 1998, S.3304; Graham, 1999, S.621; Kietzmann, 1999, S.4182; Weinmann, 2002, S.1360].

Um dies zu belegen haben wir systematisch gleichzeitig die Spiegel von VEGF und die der PAS-Komponenten in vier Tumorzelllinien einer Tumorentität, den SCCHN, unter unterschiedlichen Umweltbedingungen (Normoxie vs. Hypoxie) untersucht, um intertumorale Variabilitäten aufzudecken. Im Folgenden wird die zentrale Rolle von PAS und VEGF während der komplexen Tumorprogressionsprozesse und ihre mögliche prognostische wie therapeutische Bedeutung diskutiert.

4.1 Überleben, Koloniebildungsfähigkeit und Proteinsekretion in Hypoxie

Ein relativ großer Anteil hypoxischer Areale in Tumoren ist ein typisches Merkmal für SCCHN [Adam, 1999, S.150; Nordmark, 2005, S.6]. Diese hypoxischen Lebensbedingungen zeigen naturgemäß aufgrund der eingeschränkten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen auch in den von uns untersuchten Tumorzelllinien einen negativen Einfluss auf das Zellüberleben und die Koloniebildungsfähigkeit. Ein Teil der Zellen jedoch bleibt auch nach Inkubation unter Hypoxie vital und koloniebildungsfähig. Diese Zellen zeigen nach „hypoxischer Selektion“ deutliche Veränderungen in der Expression von VEGF sowie von PAI-1 und uPA, welche maßgeblich zu deren gesteigerter Aggressivität beitragen.

Nimmt man die Gesamtproteinmenge als Maß für die Vitalität einer Zellkultur, so konnte über alle untersuchten Zelllinien ein signifikanter ($p = 0,010^*$) Proteinsekretionsabfall als Ausdruck des erhöhten Zellstress` unter Hypoxie beobachtet werden. Beim Vergleich der vier Tumorzelllinien fällt auf, dass sich die höchsten Proteinkonzentrationen bei den Zellen der Linie HSC4 finden. Die kleinsten gemessenen Konzentrationen fanden sich bei der Zelllinie XF354. Letzterer Tumor ist aus einer Lymphknotenmetastase mit dem klinisch-pathologisch niedrigen Grading G1 generiert und hebt sich damit etwas von den restlichen

Zelllinien, die sämtlich Primärtumoren der Zunge sind (G3), ab. So weisen sie zwar die niedrigste Proteinsynthese und allgemein die niedrigsten PAI-1-Level auf. Die VEGF, uPA und uPA-Aktivitätsergebnisse liegen dagegen auf hohem Niveau.

Als weiteren Marker der Zellgesundheit untersuchten wir Plattierungseffizienzen unter Normoxie und Hypoxie. Bis auf die Zelllinie SAS reagierten alle Proben auf den erhöhten Umgebungsstress mit verringerter Kolonienbildung (PE) bzw. verringertem Zellwachstum (ÜF) ($p < 0,001^{***}$). Dies entspricht den Ergebnissen von Artman *et al.* aus dem Jahr 2010. In dieser Studie wurde die metabolische Aktivität als Referenz für Strahlensensibilität herangezogen. XF354 war dabei die Zelllinie, die am langsamsten, SAS diejenige, die am schnellsten wuchs. SAS war strahlenresistenter als XF354 [Artman, 2010, S.576]. Ebenso wie die Ergebnisse der PE fiel die pH-Wert-Analyse aus. Die über alle Zelllinien gepoolten Daten zeigten als Beleg für die im *in vitro* Modell erzeugten Zellstressbedingungen durch Hypoxie einen signifikanten ($p = 0,001^{**}$) pH-Abfall ins saure Milieu.

4.2 VEGF in Hypoxie

Verschiedene Studien an anderen Zelllinien stützen die Erkenntnis, dass Hypoxie die VEGF-Expression in verschiedenen Tumorentitäten und Endothelzellen deutlich ansteigen lässt. Unter Sauerstoffmangelbedingungen werden die VEGF-messenger-Ribonucleinsäure-Level (mRNA) durch Aktivierung des „hypoxia-inducible-factor-1“ (HIF-1) erhöht. So konnten Carmeliet *et al.* ebenso wie Ryan *et al.* *in vitro* wie *in vivo* Versuchen zeigen, dass in Mäusen bzw. Tumoren mit inaktivierten HIF-1 α Genen die hypoxische Induktion von VEGF und VEGFR reduziert ist. Es resultiert eine unzureichende Angiogenese mit weniger Blutgefäßen und schlechterer Hämodynamik [Levy 1995, S.13335; Liu 1995, S.641; Carmeliet, 1998, S. 486; Ryan, 1998, S.3007; Maity, 2000, S.5879].

Weitere Studien postulierten darüber hinaus, dass eine relativ erhöhte VEGF-Expression und die resultierende erhöhte Gefäßdichte in humanen Kolon-, Magen-, Pankreas-, Mammakarzinomen sowie SCCHN mit deutlicher Tumorprogression, hoher Rezidivgefahr, Metastasierung, schlechterem krankheitsfreiem Überleben und kürzerem Gesamtüberleben, d.h. schlechterem klinischen Outcome assoziiert sind. Smith *et al.* konnten feststellen, dass im Vergleich zu den üblichen klinisch-pathologisch Prognoseparametern, wie der TNM-Klassifikation, dem Tumorgrading, dem Geschlecht, der Rasse oder dem Alter, der VEGF-Status ein besserer Prädiktor bezüglich des Outcome in SCCHN war. Es gibt jedoch im Vergleich zu den anderen Tumorentitäten bis dato nur wenige Studien.

Diese belegen aber sowohl für Lokal- wie Fernrezidive, für Metastasen, als auch für das Gesamtüberleben eine Verschlechterung der Prognose bei erhöhtem VEGF-Level [Kyzas, 2004, S.946; Kyzas, 2005, S.302; Smith, 2000, S.2050; Smith 2001, S.784].

Da VEGF v.a. durch Hypoxie stimuliert wird und hypoxische Tumoren mit gesteigerter Strahlenresistenz assoziiert sind, könnten erhöhte VEGF-Proteinlevel, zusätzlich zum Vorhersagewert bezüglich einer wahrscheinlichen Metastasierung, Tumoren identifizieren, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Strahlentherapie aufweisen. Das Gleiche gilt im Übrigen auch für uPA und PAI-1 [Reinmuth, 2003, S.201; Smith, 2000, S.2050, 2051; Zlobec, 2005, S.2520].

Kondo *et al.* konnten 1994 durch Untersuchung von Blutserumkonzentrationen von VEGF zeigen, dass gesunde Probanden sehr niedrige VEGF-Level im Serum aufwiesen, während alle Proben kranker Patienten vergleichsweise hohe VEGF-Werte hatten. Untersucht wurden ovarial, Cervix- und Lungenkarzinome. Dunst *et al.* beleuchteten in ihrer klinischen Studie von 2001 Kopf-Hals-Tumore, indem sie signifikante Korrelationen der Serum-VEGF-Konzentrationen mit dem hypoxischen Tumolvolumen nachweisen konnten. Rückschlüsse auf eine aussagekräftige Korrelation zwischen den VEGF-Konzentrationen und einer entsprechenden Prognose lassen sich aber aus diesen Studien nicht ableiten [Kondo, 1994, S.213; Dunst, 2001, S.471].

In den von uns *in vitro* untersuchten Zelllinien nahm die ausgeschüttete VEGF-Proteinmenge bei XF354, SAS und CAL33 nach Inkubation unter Hypoxiebedingungen zu. Zwar erreichte die Mehrausschüttung von VEGF bei XF354 und CAL33 knapp 30 % und auch SAS wies eine 10 prozentige Steigerung auf. Statistische Signifikanz erreichten unsere Ergebnisse jedoch nicht. HSC4 fiel aus der Reihe, hier wurde sogar eine Reduktion der VEGF-Menge festgestellt. In der Analyse der gepoolten Daten über alle Zelllinien resultierte insgesamt eine im Vergleich zu den normoxischen Proben um ca. 10 % gesteigerte VEGF-Sekretion in Hypoxie. Die statistische Auswertung konnte keine Signifikanz der Ergebnisse aufdecken.

Der derzeitigen Studienlage Rechnung tragend könnten sich VEGF-Bestimmungen, sowohl im Serum als auch direkt in Tumorparenchym gemessen, bei bestimmten Kopf-Hals-Tumoren als prognostische Marker für das Vorkommen hypoxischer Areale, den Erfolg einer Strahlentherapie, das Auftreten von Metastasen und Rezidiven sowie das Gesamtüberleben eignen. Bei den hier durchgeführten *in vitro* Versuchen erreichte die Steigerung der VEGF-Ausschüttung leider nicht das statistische Signifikanzniveau. Nicht bei allen Tumorentitäten des Kopf-Hals-Bereiches kann daher bei vorliegender Hypoxie auch auf eine gesteigerte VEGF-Sekretion geschlossen werden. Die individuelle VEGF-Menge im Tumor muss also differenziert betrachtet werden und kann nicht generell

als Marker für das Vorliegen von Hypoxie oder gar damit verbundener erhöhter Strahlenresistenz verwendet werden.

4.3 PAS in Hypoxie

Wie in vorangehenden Kapiteln ausführlich dargestellt, benötigt die Tumor- und Metastasenbildung die Regulation adhäsiver, proteolytischer wie auch migratorischer Ereignisse. Hierbei spielt das PAS eine entscheidende Rolle.

In früheren Studien wurde vielfach erkannt, dass in malignen Tumoren die uPA-Spiegel signifikant höher lagen als in korrespondierenden Normalgeweben bzw. in gutartigen Tumoren. Die Erkenntnisse, dass die Spiegel von uPAR, uPA, PAI-1 und PAI-2 innerhalb maligner Tumoren beträchtlich variieren und mit der Prognose korrelieren, scheinen aber bedeutsamer zu sein [Andreasen, 1997, S.10]. In ausführlichen Reviews von Min *et al.* 1996 oder Andreasen *et al.* 1997 wird auf zahlreiche Untersuchungen zurückgegriffen und dargelegt, dass in Mamma-Tumoren hohe uPA-Enzymaktivitäten mit einem kürzeren krankheitsfreiem Überleben (DFI = disease-free interval), ebenso wie hohe uPA-Antigenlevel mit einem schlechteren Gesamtüberleben (OS = overall survival) assoziiert sind. An mehr als 8.000 Brustkrebs Patientinnen konnten Look *et al.* 2002 eindrücklich belegen, dass hohe uPA- und PAI-1-Level ein schlechteres Gesamt- und krankheitsfreies Überleben bedeuten [Andreasen, 1997, S.10; Min, 1996, S.2432; Look, 2002, S.125; Weinmann, 2002, S.1355]. In Ihrer eigenen Studie von 1996 schufen Min *et al.* einen Antagonisten der uPA/uPAR-Bindung und erreichten dadurch zum einen die Hemmung von Angiogenese in einem *in vitro* Modell der Kapillarbildung in fibrinhaltigem Gel. Zum anderen zeigten die Antagonisten in *in vivo* Versuchen an Mäusen mit B16-Melanomen Potential, das Tumorstadium und die Neovaskularisation zu unterdrücken. Zudem konnte belegt werden, dass uPA ebenfalls einen bedeutenden prognostischen Wert bei verschiedenen anderen Malignomen besitzt. In Lungen-, Blasen-, Magen-, kolorektalen, Cervix-, ovarialen, Nieren- und Hirntumoren sowie Weichteilsarkomen wurden entsprechende Assoziationen beschrieben [Min, 1996, S.2432; Andreasen, 1997, S.10; Weinmann, 2002, S.1355; Andreasen, 2000, S.32; Duffy, 2004, S.545].

Es existieren einige wenige Studien, die sich speziell mit der prognostischen Wertigkeit der Komponenten des PAS bezüglich der verschiedenen Karzinomtypen des Kopf- und Halsbereichs beschäftigen. Hier wurde gezeigt, dass erhöhte uPA- und PAI-1-Spiegel sich negativ auf das rezidivfreie Intervall, die lokale Tumorkontrolle und das Gesamtüberleben auswirken. Meo *et al.* (2004) konnten signifikante Korrelationen zwischen einem hohen

PAI-1-Spiegel im Cytosol der Tumorzellen und einer schlechten Prognose aufzeigen. Hohe uPA-Werte deuteten auf eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit hin. Interessanterweise war hier bei hohen VEGF-Spiegeln der Zusammenhang zwischen PAI-1 und der prognostischen Aussagekraft signifikant, bei niedrigen VEGF-Spiegeln hingegen konnte diese Korrelation nicht nachgewiesen werden [Chin, 2005, S.795; Hundsdorfer, 2005, S.195; Meo, 2004, S.286].

Pedersen *et al.* konnten erstmals 1994 in einer retrospektiven Studie zum prognostischen Wert von uPAR, uPA und PAI-1 in LCC (large cell lung carcinoma) und SCC (small cell lung carcinoma) der Lunge aufdecken, dass es eine Assoziation zwischen hohen uPAR-Level und einem kurzen Überleben von Patienten mit SCC der Lunge ($p = 0,038$) gibt. Erhöhte Werte von uPAR in Kombination mit hohen PAI-1-Spiegeln zeigten eine noch deutlichere Assoziation mit kurzem Überleben ($p = 0,008$). Nur die Tumorgröße bewies einen vergleichbaren, unabhängigen prognostischen Wert. In kolorektalen, Brust- und Magenkarzinomen scheinen uPAR-Werte ebenfalls prognostischen Wert zu besitzen [Pedersen, 1994, S.4674; Andreasen, 1997, S.11]. Auch in einer hochmalignen humanen Plattenepithelzelllinie (HEp3) wurde eine solche Bedeutung von uPAR von Kook *et al.* 1994 untersucht. Die „antisense inhibition“ von uPAR führte zu reduzierter Expression dieses Rezeptors auf der Zelloberfläche. Dies wiederum schien direkt eine deutliche Minderung der Invasivität und Steigerung der Tumortalenz von HEp3 zu verursachen [Kook, 1994, S.3989; Graham, 1999, S.617].

Die Bedeutung des PAI-1 wurde in zahlreichen Untersuchungen aufgezeigt. Demnach muss PAI-1 als bedeutsamer prognostischer Marker, vergleichbar mit der Wertigkeit von uPA, für die Aggressivität von Mammakarzinomen angesehen werden. Betrachtet man das Vorkommen von uPA und PAI-1 in Kombination, dann potenziert sich die Aussagekraft. So besitzen N_0 Tumoren mit niedrigen uPA- und PAI-1-Level ein 93 prozentiges DFI. Ganz im Gegensatz zum 55 prozentigen DFI solcher Tumoren mit erhöhten Spiegeln für uPA und PAI-1 [Andreasen, 1997, S.10, Weinmann, 2002, S.1355]. Brückner *et al.* konnten 1992 an verschiedenen humanen Lungenkarzinomzelllinien zeigen, dass PAI-1 und PAI-2 uPA/uPAR-Komplex-abhängig die Invasion von Tumorzellen zumindest teilweise inhibieren. PAI-1 besitzt zudem Potential *in vitro* Metastasierung in humanen amniotischen Membranen zu unterbinden [Andreasen, 1997, S.3; Andreasen, 2000, S.27; Brückner, 1992, S.3046].

Ähnlich wie bei der Zelladhäsion hängt die Hemmung der Zellmigration von der Kapazität von PAI-1 Vitronectin zu binden und nicht von der PAI-1-Inhibition des uPAs ab. Umgekehrt könnte die Interaktion zwischen uPA und PAI-1 die Bindung von PAI-1 mit

Vitronectin stören und Zelladhäsion unterdrücken. Dies würde wiederum Zellmigration ermöglichen [Stefansson, 1996, S.442; Schmitt, 1997, S.310].

Die Erkenntnis eines negativen prognostischen Wertes erhöhter PAI-1-Spiegel kam zunächst überraschend. Widerspruch dies doch der Idee, dass Tumorzellausbreitung durch die katalytische Wirkung von uPA, Plasmin zu bilden, ermöglicht würde und PAI-1 diese Wirkung hemmt. So mussten andere Funktionen von PAI-1 diskutiert und gefunden werden. Bacharach *et al.* demonstrierten diesbezüglich, dass PAI-1 die ECM vor exzessiver Proteolyse durch uPA-aktivierte Plasminaktivität schützen kann. Umgekehrt könnte PAI-1 aber auch die Reimplantation zirkulierender Tumorzellen ins Stroma und damit die Metastasenabsiedlung ermöglichen. In der Tat liegen PAI-1-Level in Metastasen höher als in Primärtumoren [Andreasen, 2000, S.32; Bacharach, 1992, S.10690, Meo, 2004, S.286]. Weitere Autoren haben den Einfluss von PAI-1 auf die Tumorangio-genese beschrieben. Bajou *et al.* konnten im Tierversuch zeigen, dass das Fehlen von PAI-1 Tumorinvasion und Neovaskularisation vorbeugen kann. So scheint die Anwesenheit von PAI-1 in physiologischen Konzentrationen essentiell für Angiogenese zu sein. Das Fehlen oder exzessiv hohe Level von PAI-1 wirken dagegen hemmend auf das invasive Potential von Endothelzellen [Bajou, 2001, S.783; Meo, 2004, S.286].

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass die meisten dieser Studien die Proteinmengen mittels ELISA aus Tumorlysaten bestimmt haben. Die prognostische Wertigkeit der Plasmaspiegel hingegen ist bislang weniger untersucht. Grebenchtchikov *et al.* zeigten 2005 für Mammakarzinome, dass weder uPA noch PAI-1, uPAR oder der Komplex aus uPA/PAI-1 im Plasma eine Korrelation mit den im Tumor gemessenen Mengen aufweisen [Grebenchtchikov, 2005, S.237]. Es gibt aber auch Studien, die einen Zusammenhang zwischen Plasamengen einzelner Komponenten des PAS und der Prognose belegen. Koong *et al.* deckten 2000 z.B. einen deutlichen Zusammenhang zwischen den PAI-1-Serumwerten in Kopf-Hals-Tumoren und dem Ausmaß an Hypoxiearealen in diesen Tumoren. Als Sekretionsprotein kann PAI-1 einfach im Serum gemessen werden [Koong, 2000, S.886]. Zusammenfassend repräsentiert PAI-1 ein hypoxie-reguliertes Sekretionsprotein, das klinisch in Tumordiagnostik, -prognose und -überwachung Bedeutung gewinnen könnte.

Als Reiz für die Aktivierung von PAI-1 fungiert u.a. Hypoxie. Präthrombotische Ereignisse und Thrombenbildung sind hypoxie-assoziiert und es konnte gezeigt werden, dass mRNA von PAI-1 sowie PAI-1-Protein durch milde Hypoxie (8 % O₂) induziert werden können. Der Transkriptionsfaktor „hypoxia-inducible factor-1“ (HIF-1) scheint hierbei ein Schlüsselregulator zu sein. Als Antwort auf hypoxische Umgebungsbedingungen bindet HIF-1 an hypoxie-reaktive Elemente (HRE) hypoxie-induzierbarer Gene, die u.a. für

Erythropoetin, VEGF und glykolytische Enzyme kodieren. Eine Aktivierung von PAI-1 und die entsprechende Mehrsekretion scheinen demnach u.a. HIF-1-abhängig zu sein [Kietzmann, 1999, S.4177; Liu, 1995, S.639].

In zwei unserer vier untersuchten Tumorzelllinien sowie in den gepoolten Daten zeigte sich für die PAI-1-Sekretion eine hoch signifikante Steigerung der Antigenkonzentration nach 24-stündiger Inkubation in Hypoxie. Wie in 4.1 erwähnt, zeigte XF354 als einzige untersuchte Tumorzelllinie stagnierende bzw. leicht regredierende PAI-1-Mengen in Hypoxie. SAS, CAL33 und HSC4 hingegen steigerten ihre PAI-1-Synthese und ihre Sekretion unter hypoxischen Bedingungen deutlich. Letztere Zelllinie verfehlte die Signifikanztestung, schüttete aber immer noch ca. 40 % mehr PAI-1 als in Normoxie aus. Die Sekretionssteigerung in den SAS- und CAL33-Proben waren statistisch hochsignifikant. In der gepoolten Analyse waren die PAI-1-Level um den Faktor 1,7 signifikant erhöht ($p = 0,001^{**}$).

In den zellfreien Überständen nahm die uPA-Antigenkonzentration im Gegensatz zu den oben besprochenen Proteinen ab. Diese Abnahme war für alle untersuchten Zellreihen hoch signifikant ($p < 0,001^{***}$). Obwohl bereits 2000 von Stadler *et al.* für eine 15-köpfige Gruppe von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren gezeigt werden konnte, dass Hypoxie zu signifikant erhöhten uPA-Antigenmengen im Tumor führt, widersprechen unsere *in vitro* Daten diesen und weiteren oben erwähnten Ergebnissen. Die Ursache hierfür liegt wohl an der Tatsache, dass uPA überwiegend zellgebunden vorliegt. Nach einer Studie von Graham *et al.* (1998) wird der über einen GPI-Anker an die Zelloberfläche gebundene uPA-Rezeptor unter hypoxischen Bedingungen stärker exprimiert als in Normoxie. Die Bindung von uPA an uPAR stabilisiert uPA und führt gleichzeitig zu einer Steigerung seiner proteolytischen Aktivität. Zudem wird der größte Teil gelösten uPAs von PAI-1 gebunden. Damit könnten unsere Ergebnisse erklärt werden: Denn dass uPA eigentlich unter Zellstressbedingungen, wie Hypoxie, vermehrt ausgeschüttet bzw. synthetisiert werden müsste, liegt nach dem derzeitigen Kenntnisstand nahe. Graham *et al.* konnten diese Hypothese an Zellen eines metastasierten Brustkarzinoms und eines kleinzelligen Lungenkarzinoms ein Jahr nach ihrer Studie von 1998 bestätigen. Für Tumoren des Kopfes und des Halses müsste ein solcher Sachverhalt in einer weiterführenden Studie genauer untersucht werden [Stadler, 2000, S.235; Graham, 1998, S.3304; Graham 1999, S.620].

Als letzte Komponente des Plasminogenaktivierungssystems untersuchten wir die nach 24-stündiger Hypoxie-Inkubation resultierende uPA-Aktivität. In unseren Untersuchungen war die uPA-Aktivität insgesamt sehr gering und konnte in den Zellüberständen überhaupt erst nach zusätzlicher Konzentrierung messbar gemacht werden. Zurückzuführen ist dies

v.a. auf die geringe Menge an freien uPA. Ein weiterer Aspekt zur Erklärung der geringen uPA-Aktivität könnte die große Menge an ausgeschüttetem PAI-1 sein, welches mit uPA Komplexe bildet und zudem zellgebundenes uPA inaktiviert (s.o.). Zwar konnte über alle Zelllinien gepoolt eine uPA-Aktivitätssteigerung festgestellt werden, das angestrebte Signifikanzniveau wurde aber verfehlt. Die wenn auch geringe, so doch feststellbare Aktivitätssteigerung würde weiter die These stützen, dass uPA unter hypoxischen Bedingungen verstärkt an den uPA-Rezeptor bindet und in seine aktive Form überführt wird.

Kurz herausgestellt sei an dieser Stelle erneut eine Besonderheit bzw. Auffälligkeit der XF354-Zelllinie. Auch die XF354-Proben zeigten eine hoch signifikante uPA-Reduktion sowie eine leichte, nicht signifikante uPA-Aktivitätssteigerung in Hypoxie. Entgegen den anderen Zelllinien war die H/N-Ratio der Aktivitätssteigerung mit 1,2 etwas niedriger, die 0,4-fache uPA-Mengenreduktion aber vergleichbar. Insgesamt lagen die gemessenen Werte aktiven uPAs aber um das 3,3 bzw. 8,1-fache sowie die Menge freien uPAs fast um das Doppelte über dem Niveau der anderen Zelllinien. Die PAI-1-Level hingegen stagnierten, wie oben bereits erwähnt. Die absoluten Mengen lagen um das zwei- bis dreifache unter dem Niveau der anderen Tumoren. Diese Daten stützen zum einen die These, dass XF354 als Tumormetastase unter Primärtumoren eine Sonderstellung einnimmt. Zum anderen belegt es die interagierenden Zusammenhänge der Abhängigkeit von PAI-1, uPA und uPA-Aktivitätsmessungen, wie sie insbesondere von Graham *et al.* postuliert wurden.

4.4 Korrelationen der potentiellen Hypoxie- und Prognosemarker

Zur Objektivierung von signifikanten Abhängigkeiten der untersuchten VEGF-, PAI-1-, uPA-Level und der uPA-Aktivitätsspiegel untereinander führten wir Korrelationsuntersuchungen durch.

Für verschiedene Gewebetypen und Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Komponenten des PAS und des VEGF sowohl untereinander als auch mit verschiedenen anderen Faktoren wie z.B. dem Tumorstadium, der Prognose oder dem Therapieansprechen korrelieren. Meo *et al.* z.B. wiesen Korrelationen zwischen der Expression von uPA und PAI-1 sowie zwischen VEGF und PAI-1 nach. Für sich allein betrachtet hatten hier VEGF und PAI-1 keinen wesentlichen prognostischen Aussagewert. Erhöhte PAI-1-Spiegel sprachen nur dann für eine schlechte Prognose, wenn gleichzeitig auch VEGF vermehrt ausgeschüttet wurde und umgekehrt. Pepper *et al.* konnte eine spezielle Interaktion der Komponenten untereinander zeigen. VEGF z.B. kann

dosisabhängig die uPA- und PAI-1-Expression induzieren. Darüber hinaus löst von Plasminogen produziertes Plasmin an die extrazelluläre Matrix gebundenes VEGF ab und setzt es so vermehrt frei. Weniger deutlich korrelierten VEGF und uPA miteinander. Analysen zeigten, dass die Tumorgröße mit dem Risiko eines Tumorrezidivs assoziiert ist, und uPA- und PAI-1-Mengen hatten prognostische Bedeutung für das krankheitsfreie Überleben [Meo, 2004, S.286; Pepper, 1991, S.904].

In klinischen Studien wurde die Thematik ebenfalls bearbeitet. Terada *et al.* fanden z.B. keine Korrelation zwischen VEGF und uPA in kolorektalen Tumoren, wenn auch eine Beziehung zwischen VEGF und PAI-1, VEGF und uPAR sowie zwischen PAI-1 und uPA aufgedeckt werden konnte [Terada, 2005, S.168]. In Tumorlysaten von Gliom-Patienten korrelierte die VEGF-Expression ebenfalls signifikant mit der PAI-1-Ausschüttung [Hjortland, 2004, S.137]. Augenscheinlich hängt die Variabilität der Korrelation unter den Patienten zwischen VEGF und den PAS-Komponenten von der Tumorentität ab.

Nach unserem Kenntnisstand sind die *in vitro* und *in vivo* Arbeiten unserer Forschungsgruppe die ersten an SCCHN-Tumoren, die direkt VEGF- und PAS-Komponenten untersucht und miteinander korreliert haben. Die Ergebnisse offenbaren keine relevanten Unterschiede zwischen den Interaktionen von VEGF und PAS-Bestandteilen in Normoxie und Hypoxie. In unserer Untersuchung korrelierte VEGF signifikant nur mit der gemessenen uPA-Aktivität. Die Korrelation der gepoolten Daten über Norm- und Hypoxie war mit einem r-Wert von 0,95 und einer Signifikanz von $p < 0,001$ (***) sehr deutlich. Der Schwachpunkt dieser Erkenntnis liegt bei den insgesamt sehr niedrigen uPA-Aktivitätswerten, die zudem sämtlich nicht signifikant waren. Die festgestellte Korrelation zwischen VEGF und uPA-Aktivität könnte die Tatsache widerspiegeln, dass VEGF in der Lage ist uPA-Aktivität wie auch PAI-1 und uPA-mRNA zu induzieren [Mandriotta, 1995, S.9715; Pepper, 1991, S.905].

Interaktionen zwischen VEGF und freiem uPA sowie PAI-1 konnten hingegen nicht aufgedeckt werden. Zahlreiche Arbeitsgruppen hatten zuvor ein bedeutsames Zusammenspiel von uPA, PAI-1 und VEGF untereinander in den Prozessen der Tumorneoangiogenese, Metastasierung aber auch direkt durch Steigerung der VEGF-Synthese z.B. in Gliomzellen belegt. Demnach konnte die Annahme, dass sämtliche Komponenten des PAS mit VEGF enge Verbindungen besitzen nicht bestätigt werden. Dass aber die starke Korrelation zwischen VEGF und aktivem uPA sowie deren gemeinsam gesteigerte Expression Einfluss auf die Prozesse des Tumorwachstums besitzt, dürfte außer Zweifel stehen [Brooks, 2001, S.451; Brooks, 2004, S.43; Devy, 2002, S.152; Bajou, 2001, S.782; Hjortland, 2004, S.137].

Die zweitstärkste Korrelation konnte empirisch für uPA und uPA-Aktivität gezeigt werden. Mit $r = 0,92$ und $p = 0,001$ (**) in den gepoolten Datenreihen wird eine Selbstverständlichkeit statistisch bewiesen. Da unterschiedliche Aktivitätsstufen ein und desselben Faktors ineinander übergehen, müssen die uPA-Mengen mit aktivem uPA positiv korrelieren. Eine weitere statistisch auffällige Korrelation ergab sich zwischen uPA und PAI-1. Zwar war der r-Wert mit $-0,67$ (gepoolte Datenreihe) gegensinnig. Statistische Signifikanz erreichte die negative Korrelation dennoch ($p < 0,001$ ***). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass uPA und PAI-1 an der Zelloberfläche Komplexe bilden und PAI-1 auf diese Weise uPA inaktiviert. Eine solche Korrelation konnte bislang auch für Mammakarzinome gezeigt werden. Die Wechselwirkungen zwischen uPA und PAI-1 sind sehr komplex und bis heute nicht vollständig verstanden, es sei an dieser Stelle auf Kapitel 1.2.2 verwiesen [Minsini, 2007, S.116]. Für uPA und die VEGF-Sekretion konnte zwar eine mäßige Korrelation mit $r = 0,41$ (gepoolte Daten) aufgedeckt werden. Die Signifikanztestung verfehlten unsere Daten aber. In anderen Teilprojekten konnte eine solche Korrelation gezeigt werden, was die These stützen würde, dass VEGF die Sekretion von uPA, v.a. an Endothelzellen, induzieren kann. Außerdem wurde beschrieben, dass VEGF über einen VEGF-Rezeptor die Umwandlung von inaktivem uPA zu aktivem uPA beschleunigen kann [Olofsson, 1998, S.11713; Pepper, 1991, S.904; Prager, 2004, S.1568].

4.5 Therapeutische Bedeutung und Ausblick

Wie einleitend bereits diskutiert bedingt die Behandlung der Kopf-Hals-Malignome ein adäquates Therapiemanagement aus effektiver multidisziplinärer Zusammenarbeit von Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Hierdurch wird das Therapieergebnis ganz entscheidend bestimmt. Im Falle einer frühzeitigen Diagnostizierung können heutige Therapiemodalitäten in Kombination ein 75 prozentiges 5-Jahres-Überleben erreichen [Parkin, 2005, S.78; Baker, 1986, S.440; Strong, 1986, S.449]. Gegenwärtig bedient man sich zur Therapieentscheidung Faktoren wie Alter, Geschlecht, Rasse, TNM-Klassifikation oder Tumorgrading. Auch wenn diese Parameter hilfreich sind, versagen sie regelmäßig bezüglich ihrer Aussagekraft zur Aggressivität und zum Rezidivierungspotential einer Tumorentität. Theoretisch würde ein Parameter, der zuverlässig Patienten mit erhöhtem Rückfallsrisiko identifiziert, das krankheitsfreie Überleben verbessern, indem er Ärzten ermöglicht Hochrisikopatienten für aggressivere Therapieformen rechtzeitig zu erkennen. Zudem würde die Identifizierung eines biologischen Markers der Krankheitsaggressivität Wege und Möglichkeiten eröffnen neue, gezielte Medikamente gegen spezifische molekulare Defekte zu erschaffen [Smith, 2000, S.2046].

Eine Reihe von biologischen Markern mit einem möglichen prognostischen Potential wurden in den vergangenen Jahren bereits identifiziert. Für Kopf-Hals-Tumoren wurden insbesondere p53, Cyclin D1, EGF-R und VEGF untersucht. Alle zeigten eine mögliche Assoziation mit schlechtem Therapieansprechen und kurzem Überleben [Smith, 2000, S.2050]. Gasparini *et al.* und auch Giatromanolaki *et al.* belegten in ihren Studien die Bedeutung der Vaskularisierung und des VEGF von bzw. in Tumoren und dem entsprechenden Therapieansprechen. Die Ergebnisse waren nicht eindeutig. Aebersold *et al.* deckten z.B. auf, dass die VEGF-Expression keinen Vorhersagewert bezüglich einer kompletten Remission nach Strahlentherapie von SCCHN besitzt. Sämtlichen Studien fehlte aber eine Vergleichsgruppe, die keine Strahlentherapie erhielt. So ist ein möglicher prädiktiver Wert von VEGF bezüglich eines Überlebensvorteils nicht sicher ausgeschlossen [Gasparini, 1995, S.1382; Gasparini, 1997, S.146; Giatromanolaki, 1999, S.816; Aebersold, 2000, S.24; Manders, 2003, S.6369].

In Bezug auf die einzelnen Bestandteile des PAS, mit ihrer Bedeutung in den Prozessen der Zellinvasion und der Tumorzellmetastasierung, konnte mehrfach ein prognostisch wie prädiktiver Wert belegt werden. So z.B. in Mammakarzinomen oder Melanomen, hier waren sowohl uPA, PAI-1 als auch uPAR unabhängige prognostische Indikatoren. Nicht zuletzt wurde eine eindeutige Korrelation der uPA und PAI-1-Level mit der vorgefundenen Mikrogefäßdichte und der Tumordinvasion in invasiven Brusttumoren aufgedeckt [Min, 1996, S.2432]. Für andere Proteinasesysteme, insbesondere für die Matrix-Metallo-Proteinase, konnte in zahlreichen Tumorentitäten, wie z.B. in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, in primären Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle oder auch in kleinzelligen Lungenkarzinomen, ebenfalls eine negative prognostische Aussagekraft festgestellt werden [Katayama, 2004, S.638; Yamashita, 2004, S.204].

Allgemein gilt in der Therapie von Kopf-Hals-Malignomen die Kombination von Osteonectin-Positivität (= SPARC¹) und pathologisch gesicherter neuronaler Invasion bislang als sensitivster Prognosemarker. Zweiteres kann aber nur anhand eines postoperativen Präparats festgestellt werden. Chin *et al.* versuchten in ihrer Studie von 2005 deshalb alternative präoperative Marker zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus SPARC-, uPA- und PAI-1-Positivität eine vergleichbare Sensitivität besitzt. So weisen Lymphknoten-negative Tumoren bei gleichzeitigen Vorkommen aller

¹ **SPARC** (= secreted protein that is acidic and rich in cysteine) ist ein Kalzium und Kollagen bindendes Glykoprotein in Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen während Angiogenese, „tissue remodelling“, Zellmigration und Proliferation. SPARC steigert die Produktion von Kollagenasen, Stromelysinen, Gelatinasen, Fibronectin und Laminin in Fibroblasten. Dies verursacht die Degradation sowohl der interstitiellen wie auch der Basalmembranen und steigert die Endothel-permeabilität [Chin, 2005, S.794].

drei Marker (SPARC, uPA, PAI-1) im Vergleich zu Patienten mit Lymphknotenbefall aber Negativität für einen der drei Faktoren eine schlechtere Prognose bezüglich DFI und OS auf. Hundsdorfer *et al.* stellten 2005 fest: „In summary, tumour uPA/PAI-1 content (as determined by ELISA) appears to be a strong independent prognostic factor for relapse-free survival in squamous cell cancer of the oral cavity. These observations might help to select patients with poor prognosis for additional adjuvant therapy in conjunction with complete surgical resection.“ [Hundsdorfer, 2005, S.191]. Beim Therapieentscheid von HNSCC und bei der Beantwortung der Frage, ob eine prophylaktische „neck dissection“ oder eine zusätzliche adjuvante Radiotherapie sinnvoll wären, könnten also uPA, PAI-1 und SPARC hilfreich sein [Chin, 2005, S.795; Weinmann, 2002, S.1355; Hundsdorfer, 2005, S.195; Look, 2002, S.117].

Wie eingehend in 4.2 diskutiert, kann anhand unserer Datenlage weder auf eine besondere Wertigkeit von VEGF als, im weitesten Sinne, Tumormarker, noch auf eine spezielle Bedeutung als prädiktiver bzw. prognostischer Indikator in Kopf-Hals-Tumoren geschlossen werden. Auch wenn bereits eine mögliche uPA-Sekretionsinduktion durch VEGF diskutiert wurde und vielfach die Hochregulierung der VEGF-Ausschüttung durch Hypoxie belegt werden konnte, so kann aus unseren Ergebnissen keine Wertigkeit der VEGF-Bestimmung als Hypoxie-Marker abgeleitet werden. Die *in vitro* Ergebnisse zu den PAS-Komponenten uPA und uPA-Aktivität lassen keine anderen Schlüsse, wie bereits für VEGF ausgeführt, zu. Nur PAI-1 erwies sich letztlich als interessanter und viel versprechender Faktor. Wir zeigten, dass PAI-1-Expression, zumindest in einigen, hypoxischen SCCHN-Tumoren, signifikant höher ist als in weniger hypoxischen Tumoren. VEGF und uPA-Aktivitätsspiegel stiegen dagegen nach hypoxischer Inkubation nur mäßig an. Dies lässt vermuten, dass PAI-1 strenger von Hypoxie reguliert wird als VEGF und uPA.

In unserer Arbeitsgruppe um Bayer *et al.* waren nur die PAI-1-Spiegel mit der TCD₅₀ *in vivo* signifikant in Beziehung zu bringen. Man diskutierte deshalb eine mögliche Vorhersagekraft von PAI-1 zum Outcome der SCCHN-Patienten nach Strahlentherapie, nach Bestimmung prätherapeutischer Tumorgewebsspiegel. In der Tat wurden hohe PAI-1- und uPA-Mengen bereits verwendet um Hochrisiko Lymphknoten-negative Brustkrebspatientinnen, die von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren sollten, zu unterscheiden [Bayer, 2008, S.367; Jänicke, 2001, S.918]. Zusätzlich zeigten Speleman *et al.* in einer univarianten Studie an 46 SCCHN-Patienten, dass PAI-1-Spiegel in Tumorlysaten signifikant assoziiert sind mit einem Erkrankungsrückfall, uPA-Spiegel jedoch nicht [Speleman, 2007, S.347]. Bedeutsamerweise ist ein PAI-1-Inhibitor (Tiplaxitinin, PAI-039) derzeit am Mausmodell in Untersuchung. Dies könnte für Patienten

mit hoher PAI-1-Expression in Kombination mit Radiotherapie eine vielversprechende Anticancer-Therapie bedeuten [Leik, 2006, S.2713].

Unsere *in vivo* und *in vitro* Daten weisen darauf hin, dass PAI-1 als endogener Hypoxie-Marker fungieren könnte. In der Tat hat unsere Arbeitsgruppe jüngst in zwei SCCHN-Zelllinien gezeigt, dass Hypoxie die PAI-1-Expression und -Sekretion in zeitabhängiger Weise induziert. Beginnend nach bereits 4 Stunden kann es bis zu 24 Stunden erhöht bleiben [Schilling, 2007, S.7]. In einer anderen Untersuchung wurde gezeigt, dass *in vitro* PAI-1-Level in drei SCCHN-Zelllinien bis zu 72 Stunden erhöht bleiben können [Sprague, 2006, S.288]. Da PAI-1 ein etablierter negativ prognostischer Marker für viele Tumorentitäten ist, könnte PAI-1 zur Gruppe endogener Hypoxie-Marker gehören, die als molekulares Ziel in Kombination mit Strahlentherapie benutzt werden könnten [Eriksen, 2006, S.120].

Das erhöhte Vorkommen einiger Komponenten von proteolytischen Systemen, insbesondere des Plasminogenaktivierungssystems, steht in enger Verbindung mit einem invasiven und aggressiven Phänotyp von Tumoren. Es wurde gezeigt, dass uPA, uPAR und PAI-1 einen hohen klinischen Prognosewert besitzen. Und auch VEGF als Marker für Tumervaskularisation könnte eine Vorhersage zum Outcome in Kopf-Hals-Tumoren ermöglichen [Smith, 2000, S.2046]. Sie zusammen könnten deshalb zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit von Tumormetastasierung, eines frühen Todes der betroffenen Tumorpatienten oder zum weiteren Therapieentscheid herangezogen werden [Bayer, 2008, S.367].

Unsere Daten lassen den Schluss zu, dass PAI-1 – nicht aber VEGF, uPA oder uPA-Aktivitätsspiegel – mit dem Hypoxiegrad der Tumoren und einem Maß der Strahlenresistenz, der TCD₅₀, in SCCHN korrelieren. Demnach könnten PAI-1-Mengen zukünftig benutzt werden, um bei der Unterscheidung von Patienten mit strahlenresistenteren Tumoren zu helfen.

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von Hypoxie auf die Sekretion von VEGF und Komponenten des Plasminogenaktivierungssystems. Zur Charakterisierung des Hypoxie-Mikromilieus in Tumoren wurden zudem pH-Wert-Analysen und Plattierungseffizienzen durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war zum Einen sezerniertes VEGF, uPA und PAI-1 bezüglich Ihrer Wertigkeit als endogene Marker für Tumorphoxie zu beurteilen. Zum Anderen sollte die Möglichkeit eines individuellen und angepassten Therapieregimes durch prätherapeutische Bestimmung der genannten Faktoren beleuchtet werden.

Zu diesem Zweck wurden die Plattenepithelkarzinomzelllinien XF354, SAS, CAL33 und HSC4 – allesamt Kopf-Hals-Tumoren – in Zellkultur untersucht. Die VEGF-, uPA- und PAI-1-Sekretion wurde mit Hilfe verschiedener ELISA-Tests nach entweder 24 Stunden in normoxischen oder in hypoxischen Umgebungsbedingungen gemessen. Mit einem speziellen Aktivitätsassay wurden die uPA-Aktivitäten analysiert und verglichen. Plattierungseffizienzen und pH-Wert-Analysen zur Untersuchung des Tumormikromilieus bzw. einer Änderung ihres spezifischen Proliferationsverhaltens durch Hypoxie wurden zudem durchgeführt. Sämtliche Ergebnisse wurden auf statistische Signifikanz und Korrelationen untereinander überprüft.

Als Ausdruck des hypoxischem Zellstress` konnte bei Analyse der gepoolten Daten eine signifikante Senkung des pH-Wertes ($p = 0,001^{**}$) sowie eine signifikante Reduktion der Plattierungseffizienz (PE) ($p < 0,001^{***}$) aufgedeckt werden. Im Sinne der Fragestellung wurde eine hoch signifikante PAI-1-Mehrausschüttung ($p = 0,001^{**}$) nach 24 Stunden Hypoxie offenbar. Von allen untersuchten Faktoren wurde nur die PAI-1-Ausschüttung, nicht aber die VEGF-, uPA- oder uPA-Aktivitätsspiegel, signifikant erhöht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass *in vitro* Hypoxie die PAI-1-Ausschüttung in den untersuchten Zelllinien signifikant induziert. Ergebnisse von *in vivo* Studien dieser Arbeitsgruppe belegen, dass PAI-1-Mengen in hypoxischen Tumoren vor Behandlung signifikant höher sind und mit der TCD₅₀ – einem Maß der Strahlenresistenz – korrelieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zukünftig auch *in vivo* PAI-1-Spiegel benutzt werden könnten bei der bedeutsamen prätherapeutischen Differenzierung von Patienten mit strahlenresistenteren Kopf-Hals-Tumoren zu helfen.

Literaturverzeichnis

- Adam M. F., Gabalski E. C., Bloch D. A., Oehlert J. W., Brown J. M., Elsaid A. A., Pinto H. A., Terris D. J.: Tissue oxygen distribution in head and neck cancer patients. *Head Neck*, 1999, S.146-153
- Aebersold D. M., Beer K. T., Laissue J., Hug S., Kollar A., Greiner R. H., Djonov V.: Intratumoral microvessel density predicts local treatment failure of radically irradiated squamous cell cancer of the oropharynx. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2000, 48, S.17-25
- Akagi Y., Wenbiao L., Zebrowski B., Keping X., Ellis L. M.: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-1. *Cancer Res.*, 1998, 58, S.4008-4014
- Andreasen P. A., Egelund R., Petersen H. H.: The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, 57, S.25-40
- Andreasen P. A., Kjøller L., Christensen L., Duffy M. J.: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer*, 1997, 7, S.21-22
- Artman T., Schilling D., Gnann J., Molls M., Multhoff G., Bayer C.: 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.*, 2010, 76/2, S.574-582
- Ayala F. J.: Where is Darwin 200 years later? *J. Genet.*, 2008, 87, S.321-325
- Bacharach E., Itin A., Keshet E.: In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, 89, S.10686-10690
- Bajou K., Masson V., Gerard R. D., Schmitt P. M., Albert V., Praus M., Lund L. R., Frandsen T. L., Brunner N., Danø K., Fusenig N. E., Weidle U., Carmeliet G., Loskutoff D., Collen D., Carmeliet P., Foidart J. M., Noël A.: The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin: implications for antiangiogenic strategies. *J. Cell Biol.*, 2001, 4, S.777-784
- Baker H. W.: 28. Principles of management of cancers of the head and neck - 1. Cancer of the head and neck. Hrsg.: McKenna R. J., Murphy G. P.: *Fundamentals of surgical oncology*. 1. Aufl. New York, Toronto, London; Macmillan Publishing Company, 1986, S.440-446. 0-02-379300-7

- Baserga R.: Introduction to the series. Hrsg.: Farber E.: The cell cycle and cancer. Vol. 1, 1. Aufl. New York, Marcel Dekker Inc., 1971, S.iii. 0-8247-1039-8
- 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., Adam M.: PAI-1 levels predict response to fractionated irradiation in 10 human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Radiother. Oncol.*, 2008, 86, S.361-368
- Binder B. R., Mihaly J., Prager G. W.: uPAR – uPa – PAI-1 interactions and signaling: A vascular biologist's view. *Thromb. Haemost.*, 2007, 97, S.336-342
- Blasi F.: uPA, uPAR, PAI-1, key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol. Today*, 1997, 9, S.415-417
- Brizel D. M., Dodge R. K., Clough R. W., Dewhirst M. W.: Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother. Oncol.*, 1999, 53, S.113-117
- Brooks T. D., Slomp J., Quax P. H. A., De Bart A. C. W., Spencer M. T., Verheijen J. H., Charlton P. A.: Antibodies to PAI-1 alter the invasive and migratory properties of human tumour cells in vitro. *Clin. Exp. Metastasis*, 2001, 18, S.445-453
- Brooks T. D., Wang S. W., Brünner N., Charlton P. A.: XR5967, a novel modulator of plasminogen activator inhibitor-1 activity, suppresses tumor cell invasion and angiogenesis in vitro. *Anticancer Drugs*, 2004, 15(1), S.37-44
- Brückner A., Filderman A. E., Kirchheimer J. C., Binder B. R., Remold H. G.: Endogenous receptor-bound urokinase mediates tissue invasion of the human lung carcinoma cell lines A549 and Calu-1. *Cancer Res.*, 1992, 52, S.3043-3047
- Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.-M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovitch R., Maxwell P., Koch C. J., Ratcliffe P., Moons L., Jain R. K., Collen D., Keshet E.: Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998, 394, S.485-490
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A.: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, 380, S.435-439
- Chaplin D. J., Horsman M. R., Trotter M. J., Siemann D. W.: 13 - Therapeutic significance of microenvironmental factors. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer Verlag, 1998, S.133-143. 3-540-58866-3
- Chen A. Y., Myers J. N.: Cancer of the oral cavity. *Curr. Probl. Surg.*, 2000, 10, S.633-731

- Chin D., Boyle G. M., Williams R. M., Ferguson K., Pandeya N., Pedley J., Campbell C. M., Theile D. R., Parsons P. G., Coman W. B.: Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int. J. Cancer*, 2005, 113, S.789-797
- Ciambrone G. J., McKeown-Longo P. J.: Plasminogen activator inhibitor type 1 stabilizes vitronectin-dependent adhesions in HT-1080 cells. *J. Cell Biol.*, 1990, 111, S.2183-2195
- Connolly D.T., Olander V. J., Heuvelman D., Nelson R., Monsell R., Siegel N., Haymore B. L., Leimgruber R., Feder J.: Human vascular permeability factor isolation from U937 cells. *J. Biol. Chem.*, 1989, 33, S.20017-20024
- Cotran R. S., Kumar V., Collins T.: Chapter 17 - Head and Neck. Hrsg.: Cotran R. S., Kumar V., Collins T.: *Robbins - Pathologic Basis of Disease. Band 2, 6. Aufl.* Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo; W. B. Saunders Company, 1999, S.756-774. 0-7216-7335-X
- Deitcher S. R.: 103. Antiplatelet, anticoagulant, and fibrinolytic therapy. Hrsg.: Kasper D. L., Braunwald E., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J. L.: *Harrison's Principles of Internal Medicine. Band 1, 16. Aufl.* New York, Chicago, San Francisco; McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2005, S.687-694. 0-07-140235-7
- Deng G., Curriden S. A., Wang S., Rosenberg S., Loskutoff D. J.: Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J. Cell Biol.*, 1996, 6, S.1563-1571
- 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., Foidart J.-M.: The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor-1 is dose dependent. *FASEB J.*, 2002, 16, S.147-154
- Duffy M. J., Duggan C.: The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin. Biochem.*, 2004, 37, S.541-548
- Dunst J., Stadler P., Becker A., Kuhnt T., Lautenschläger C., Molls M., Haensgen G.: Tumor hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck cancers. *Strahlenther. Onkol.*, 2001, 177, S.469-473
- El-Husseiny G., Kandil A., Jamshed A., Khafaga Y., Saleem M., Allam A., Al-Rajhi N., Al-Amro A., Rostom A. Y., Abizeid M., Otieshan A., Flores A. D.: Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2000, 38, S.193-199

- Endrich B., Vaupel P.: 3 - The role of the microcirculation in the treatment of malignant tumors: facts and fiction. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998, S.19-39. 3-540-58866-3
- Eriksen J. G., Horsman M. R.: Tumour hypoxia - a characteristic feature with a complex molecular background. *Radiother. Oncol.*, 2006, 81, S.119-121
- Erisen L., Basut O., Tezel I., Onart S., Arat M., Hizalan I., Coskun H.: Regional epidemiological features of lip, oral cavity, and oropharyngeal cancer. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 1996, 15, S.225-229
- Evans S. M., Cameron J. K.: Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett.*, 2003, 195, S.1-16
- Fan S., Wang J.-A., Yuan R.-Q., Rockwell S., Andres J., Zlatapolskiy A., Goldberg I. D., Rosen E. M.: Scatter factor protects epithelial and carcinoma cells against apoptosis induced by DNA-damaging agents. *Oncogene*, 1998, 17, S.131-141
- Feldmann H. J., Molls M., Vaupel P.: 5 - Clinical investigations on blood perfusion in human tumors. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998, S.47-62. 3-540-58866-3
- Folkman J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, 1, S.4-6
- Friedl P., Wolf K.: Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.*, 2009, 28, S.129-135
- Gasparini G., Bevilacqua P., Bonoldi E., Testolin A., Galassi A., Verderio P., Boracchi P., Guglielmi R. B., Pezzella F.: Predictive and prognostic markers in a series of patients with head and neck squamous cell invasive carcinoma treated with concurrent chemoradiation therapy. *Clin. Cancer Res.*, 1995, 1, S.1375-1383
- Gasparini G., Toi M., Gion M., Verderio P., Dittadi R., Hanatani M., Matsubara I., Vinante O., Bonoldi E., Boracchi P., Gatti C., Suzuki H., Tominaga T.: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997, 89/2, S.139-147
- Giatromanolaki A., Koukourakis M. I., Georgoulas V., Gatter K. C., Harris A. L., Fountzilas G.: Angiogenesis vs. response after combined chemoradiotherapy of squamous cell head and neck cancer. *Int. J. Cancer*, 1999, 80, S.810-817

- Giordano A., De Falco G., Rubin E., Rubin R.: 5 - Neoplasia. Hrsg.: Rubin R., Strayer D. S.: Rubin`s Pathology: Clinicopathologic foundations of medicine. 5. Aufl. Baltimore, Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 2008, S.137-176. 0-7817-9516-8
- Goethe, Johann Wolfgang von: Hrsg.: Hesse, B.: Faust I – Faust II. 1. Aufl. Köln; Könenmann Verlagsgesellschaft mbH, 1997, S.75. 3-89508-664-9
- Goretzki L., Schmitt M., Mann K., Calvete J., Chucholowski N., Kramer M., Günzler W. A., Jänicke F., Graeff H.: Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. FEBS Lett., 1992, 297, S.117
- Gottlieb A. I.: 10 - Blood Vessels. Hrsg.: Rubin R., Strayer D. S.: Rubin`s Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. 5. Aufl. Baltimore, Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 2008, S.387-426. 0-7817-9516-8
- Graeber T. G., Osmanian C., Jacks T., Housman D. E., Koch C. J., Lowe S. W., Giaccia A. J.: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. Nature, 1996, 4, S.88-91
- Graham C. H., Fitzpatrick T. E., McCrae K. R.: Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme protein-dependent pathway. Blood, 1998, 9, S.3300-3307
- Graham C. H., Forsdike J., Fitzgerald C. J., MacDonald-Goodfellow S.: Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. Int. J. Cancer, 1999, 80, S.617-623
- Gray L. H., Conger A. D., Ebert M., Hornsey S., Scott O. C.: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. Br. J. Radiol., 1953, 26, S.638-648
- Grau C., Overgaard J.: 10 - Significance of hemoglobin concentration for treatment outcome. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998, S.101-112. 3-540-58866-3
- Grebenchtchikov N., Maguire T. M., Riisbro R., Geurts-Moespot A., O`Donovan N., Schmitt M., McDreal G., McDermott E., O`Higgins N., Brünner N., Sweep C. G. J., Duffy M. J.: Measurement of plasminogen activator system components in plasma and tumor tissue extracts obtained from patients with breast cancer: An EORTC Receptor and Biomarker Group collaboration. Oncol. Rep., 2005, 14, S.235-239

- Hanahan D., Weinberg R. A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100, S.57-70
- Hjortland G. O., Lillehammer T., Somme S., Wang J., Halvorsen T., Juell S., Hirschberg H., Fodstad O., Engebraaten O.: Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp. Cell Res.*, 2004, 294, S.130-139
- Höckel M., Vaupel P.: 7 - The prognostic significance of hypoxia in cervical cancer: a radiobiological or tumorbiological phenomenon. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998 S.73-79. 3-540-58866-3
- Höckel M., Vaupel P.: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001, 4, S.266-276
- Hundsdoerfer B., Zeilhofer H.-F., Bock K. P., Dettmar P., Schmitt M., Kolk A., Pautke C., Horch H.-H.: 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.*, 2005, 33, S.191-196
- Jänicke F., Prechtel A., Thomssen C., Harbeck N., Meisner C., Untch M., Sweep F. C. G. J., Selbmann H.-K., Graeff H., Schmitt M.: Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001, 93/12, S.913-920
- Kanse S. M., Kost C., Wilhelm O. G., Andreasen P. A., Preissner K. T.: The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp. Cell Res.*, 1996, 224, S.344-353
- Katayama A., Bandoh N., Kishibe K., Takahara M., Ogino T., Nonaka S., Harabuchi Y.: Expressions of matrix metalloproteinases in early stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, S.634-640
- Katoh O., Tauchi H., Kawaishi K., Kimura A., Satow Y.: Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.*, 1995, 55, S.5687-5692
- Kietzmann T., Roth U., Jungermann K.: 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*, 1999, 12, S.4177-4185

- Klagsbrun M., D`amore P. A.: Regulators of angiogenesis, *Annu. Rev. Physiol.*, 1991, 53, S.217-239
- Klagsbrun M., Soker S.: VEGF / VPF: the angiogenesis factor found? *Curr. Biol.*, 1993, 10, S.699-702
- Klausner D.: The fabric of cancer cell biology - weaving together the strands. *Cancer Cell*, 2002, 1, S.3-10
- Knudson A. G.: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Rev. Cancer*, 2001, 1, S.157-162
- Koch W. M., Patel H., Brennan J., Boyle J. O., Sidransky D.: Squamous cell carcinoma of the head and neck in the elderly. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995, 121, S.262-265
- Kondo S., Asano M., Matsuo K., Ohmori I., Suzuki H.: Vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor bearing mice and cancer patients. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1221, S.211-214
- Kook Y. H., Adamski J., Zelent A., Ossowski L.: The effect of antisense inhibition of urokinase receptor in human squamous cell carcinoma on malignancy. *EMBO J.*, 1994, 17, S.3983-3991
- Koong A. C., Denko N. C., Hudson K. M., Schindler C., Swiersz L., Koch C., Evans S., Ibrahim H., Le Q. T., Terris D. J., Giaccia A. J.: Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res.*, 2000, 60, S.883-887
- Koukourakis M. I., Giatromanolaki A., Sivridis E., Fezoulidis I.: Cancer vascularization: implications in radiotherapy? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2000, 2, S.545-553
- Kruithof E. K. O., Vassalli J.-D., Schleuning W.-D., Mattaliano R. J., Bachmann F.: Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J. Biol. Chem.*, 1986, 24, S.11207-11213
- Kwaan H. C., Wang J., Svoboda K., Declerck P. J.: Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *Br. J. Cancer*, 2000, 10, S.1702-1708
- Kyzas P. A., Stefanou D., Agnantis N. J.: Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Oral Oncol.*, 2004, 40, S.941-947

- Kyzas P. A., Stefanou D., Batistatou A., Agnantis N. J.: Hypoxia-induced angiogenic pathway in head and neck cancer: an in vivo study. *Cancer Lett.*, 2005, 225, S.297-304
- Laufs S., Schumacher J., Allgayer H.: Urokinase-Receptor (u-PAR): An essential player in multiple games of cancer. A Review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation / dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle*, 2006, 5/16, S.1760-1771
- Leik C. E., Su E. J., Nambi P., Crandall D. L., Lawrence D. A.: Effect of pharmacologic plasminogen activator inhibitor-1 inhibition on cell motility and tumor angiogenesis. *J. Thromb. Haemos.*, 2006, 4, S.2710-2715
- Levy A. P., Levy N. S., Wegner S., Goldberg M. A.: Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 1995, 22, S.13333-13340
- Levy R., Segal K., Hadar T., Shvero J., Abraham A.: Squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 1991, 17, S.330-334
- Liotta L. A., Steeg P. S., Stetler-Stevenson W. G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 1991, 64, S.327-336
- Liu Y., Cox S. R., Morita T., Kourembanas S.: Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.*, 1995, 77, S.638-643
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.: 24. Krebs; Molekulare Zellbiologie. 4. Aufl. Heidelberg, Berlin; Spektrum Akadem. Verlag, 2001, S.1140-1174. 3-827-41077-0
- Look M. P., van Putten W. L. J., Duffy M. J., Harbeck N., Christensen I. J., Thomssen C., Kates R., Spyrtos F., Fernö M., Eppenberger-Castori S., Sweep C. G. J. F., Ulm K., Peyrat J.-P., Martin P.-M., Magdelenat H., Brünner 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., Broët P., Romain S., Daxenbichler G., Windbichler G., Cufer T., Borstnar S., Kueng W., Beex L. V. A. M., Klijn J. G. M., O'Higgins N., Eppenberger U., Jänicke F., Schmitt M., Foekens J. A. : Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, 2, S.116-128
- Lorè J. M. Jr.: 28. Principles of Management of Cancers of the Head and Neck - 3. Cancer of the Larynx. Hrsg.: McKenna R. J., Murphy G. P.: Fundamentals of Surgical

Oncology. 1. Aufl. New York, Toronto, London; Macmillan Publishing Company, 1986, S.467-474. 0-02-379300-7

- Maity A., Pore N., Lee J., Solomon D., O'Rourke D. M.: Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res.*, 2000, 60, S.5879-5886
- Manders P, Sweep F. C. G. J., Tjan-Heijnen V. C. G., Geurts-Moespot A., van Tienoven D. T. H., Foekens J. A., Span P. N., Bussink J., Beex L. V. A. M.: Vascular endothelial growth factor independently predicts the efficiency of postoperative radiotherapy in node-negative breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9, S.6363-6370
- Mandriotta S. J., Seghezzi G., Vassalli J.-D., Ferrara N., Wasi S., Mazziere R., Mignatti P., Pepper M. S.: Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1995, 17, S.9709-9716
- Mengele K., Napieralski R., Magdolen V., Reuning U., Gkazepis A., Sweep F., Brünner N., Foekens J., Harbeck N., Schmitt M.: Characteristics of the level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert Ev. Mol. Diagn.*, 2010, 10(7), S.947-962
- Meo S., Dittadi R., Peloso L., Gion M.: The prognostic value of vascular endothelial growth factor, urokinase plasminogen activator and plasminogen aktivator inhibitor-1 in node-negative breasts cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 2004, 4, S.282-288
- Mignatti P., Robbins E., Rifkin D. B.: Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell*, 1986, 47, S.487-498
- Min H. Y., Doyle L. V., Vitt C. R., Zandonella C. L., Stratton-Thomas J. R., Shuman M. A., Rosenberg S.: Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice. *Cancer Res.*, 1996, 56, S.2428-2433
- Minisini A. M., Fabbro D., Di Loreto C., Pestrin M., Russo S., Cardellino G. G., Andreetta C., Damante G., Puglisi F.: Markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2007, 128, S.112-117
- Minor K. H., Peterson C. B.: Plasminogen activator inhibitor type-1 promotes the self-association of vitronectin into complexes exhibiting altered incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 2002, 12, S.10337-10345
- Molls M., Vaupel P.: 1 - The impact of the microenvironment on experimental and clinical radiation and other therapeutic modalities. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998, S.1-3. 3-540-58866-3

- Murphy H. S.: 2 - Inflammation. Rubin R., Strayer D. S.: Rubin`s Pathology – Clinico-pathologic Foundations of Medicine. 15. Aufl. Baltimore, Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 2008, S.37-70. 0-7817-9516-8
- Nör J. E., Christensen J., Mooney D. J., Polverini P. J.: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am. J. Pathol.*, 1999, 2, S.375-384
- Nordsmark M., Bentzen S. M., Rudat V., Brizel D., Lartigau E., Stadler P., Becker A., Adam M., Molls M., Dunst J., Terris D. J., Overgaard J.: Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumor after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother. Oncol.*, 2005, S.1-7
- Olofsson B., Korpelainen E., Pepper M. S., Mandriota S. J., Aase K., Kumar V., Gunji Y., Jeltsch M. M., Shibuya M., Alitalo K., Eriksson U.: Vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95, S.11709-11714
- Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.: Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 2005, 55, S.74-108
- Pedersen H., Briinner N., Francis D., Østerlind K., Rønne E., Hansen H. H., Danø K., Grøndahl-Hansen J.: Prognostic impact of urokinase, urokinase Receptor, and type-1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res.*, 1994, 54, S.4671-4675
- Pepper M. S., Ferrara N., Orci L., Montesano R.: Vascular endothelial growth factor induces plaminogen activators and plasminogenactivator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1991, 2, S.902-906
- Ploug M., Rønne E., Behrendt N., Jensen A. L., Blasi F., Danø K.: Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266/3, S.1926-1933
- Prager G. W., Breuss J. M., Steurer S., Olcaydu D., Mihaly J., Brunner P. M., Stockinger H., Binder B. R.: Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. *Circ. Res.*, 2004, 94, S.1562-1570
- Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch. 259. Aufl. Berlin, New York; Walter de Gruyter, 2002, S.836, 906, 1017, 1146, 1704. 3-11-016522-8

- Ragno P., Montuori N., Rossi G.: Urokinase-type plasminogen activator / type-2 plasminogen activator inhibitor complexes are not internalized upon binding to the urokinase-type-plasminogen-activator receptor in THP-1 cells - Interaction of urokinase-type-plasminogen activator / type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes with the cell surface. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 233, S.514-519
- Reichard K. W., Joseph K. T., Cohen M., Greager J. A.: Squamous cell carcinoma of the tongue: experience with 86 consecutive cases. *J. Surg. Oncol.*, 1993, 54, S.239-242
- Reinmuth N., Parikh A. A. , Ahmad S. A., Liu W., Stoeltzing O., Fan F., Takeda A., Akagi M., Ellis L. M.: Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc. Res. Tech.*, 2003, 60, S.199-207
- Reynolds T. V., Rockwell S., Glazer P. M.: Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res.*, 1996, 56, S.5754-5757
- Ribatti D., Mangialardi G., Vacca A.: Stephan Paget and the "seed and soil" theory of metastatic dissemination. *Clin. Exp. Med.* 2006, 6, S.145-149
- Roessner A., Müller-Hermelink H. K.: Tumoren. Hrsg.: Roessner A., Pfeifer U., Müller-Hermelink H. K.: *Grundmann, allgemeine Pathologie. 10. Aufl. München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2004, S.189-248. 3-437-21290-7*
- Roldan A. L., Cubellis M. V., Masucci M. T., Behrendt N., Lund L. R., Danø K., Appella E., Blasi F.: Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.*, 1990, 9/2, S.467-474
- Ryan H. E., Lo J., Johnson R. S.: HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularisation. *EMBO J.*, 1998, 11, S.3005-3015
- Schilling D., Bayer C., Geurts-Moespot A., Sweep F. C. G. J., Pruschy M., Mengele K., Sprague L. D., Molls M.: Induction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) by hypoxia and irradiation in human head and neck carcinoma cell lines. *BMC Cancer*, 2007, 7/143, S.1-11
- Schmitt M., Thomssen C., Ulm K., Seiderer A., Harbeck N., Hofler H., Janicke F., Graeff H.: Time-varying prognostic impact of tumour biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*, 1997, 76/3, S.306-311

- Sephel G. C., Woodward S. C.: 3 - Repair, Regeneration and Fibrosis. Hrsg.: Rubin R., Strayer D. S.: Rubin`s Pathology - Clinicopathologic Foundations of Medicine. 15. Aufl. Baltimore, Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 2008, S.71-98. 0-7817-9516-8
- Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E.: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992, 359, S.843-845
- Siemann D. W., Horsman M. R., Chaplin D. J.: 17 - Modification of oxygen supply. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998, S.209-217. 3-540-58866-3
- Smith B. D., Smith G. L., Carter D., DiGiovanna M. P., Kasowitz K. M., Sasaki C. T., Haffty B. G.: Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2001, 127, S.780-785
- Smith B. D., Smith G. L., Carter D., Sasaki C. T., Haffty B. G.: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2000, 10, S.2046-2052
- Song C. W.: 16 - Modification of blood flow. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998, S.193-207. 3-540-58866-3
- Speleman L., Kerrebijn J. D. F., Look M. P., Meeuwis C. A., Foekens J. A., Berns E. M. J. J.: Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2007, 10, S.341-350
- Sprague L. D., Mengele K., Schilling D., Geurts-Moespot A., Sweep F. C. G. J., Stadler P., Schmitt M., Molls M.: Effect of reoxygenation on the hypoxia-induced up-regulation of serine protease inhibitor PAI-1 in head and neck cancer. *Cells Oncol.*, 2006, 71, S.282-291
- Stadler P., Feldmann H. J., Creighton C., Zeilhofer H.-F., Zimmermann V., Schmitt M., Molls M.: Clinical evidence for correlation of insufficient tissue oxygen supply (hypoxia) and tumor-associated proteolysis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int. J. Biol. Markers*, 2000, 15/3, S.235-236
- Stahl A., Mueller B. M.: Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system. *Int. J. Cancer*, 1997, 71, S.116-122
- Stefansson S., Lawrence D. A.: The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha-v beta-3 binding to vitronectin. *Nature*, 1996, 383, S.441-443

- Stoppelli M. P., Corti A., Soffentini A., Cassani G., Blasi F., Assoian R. K.: Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, 82, S.4939-4943
- Stoppelli M. P., Tacchetti C., Cubellis M. V., Corti A., Hearing V. J., Cassani G., Appella E., Blasi F.: Autocrine saturation of pro-urokinase receptors on human A431 cells. *Cell*, 1986, 45, S.675-684
- Strong E. W.: 28. Principles of management of Cancers of the Head and Neck - 2. Cancers of the Oral Cavity and Pharynx. Hrsg.: McKenna R. J., Murphy G. P.: *Fundamentals of Surgical Oncology*. 1. Aufl. New York, Toronto, London; Macmillan Publishing Company, 1986, S.446-467. 0-02-379300-7
- Stubbs M.: 11 - Tumour pH. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: *Blood perfusion and micro-environment of human tumors*. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998, S.113-120. 3-540-58866-3
- Sugiura Y., Ma L., Sun B., Shimada H., Laug W. E., Seeger R. C., DeClerck J. A.: The plasminogen-plasminogen activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA Inhibitor-1 in metastasis. *Cancer Res.*, 1999, 59, S.1327-1336
- Terada H., Urano T., Konno H.: Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer. *Eur. Surg. Res.*, 2005, 37, S.166-172
- Van Roy F., Mareel M.: Tumour invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends Cell Biol.*, 1992, 2, S.163-169
- Vassalli J.-D., Baccino D., Belin D.: A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J. Cell Biol.*, 1985, 100, S.86-92
- Vaupel P.: The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*, 2004, 9, S.10-17
- Vaupel P.: Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat. Oncol.*, 2004, 3, S.198-206
- Vaupel P., Höckel M.: 6. Oxygenation of human tumors. Hrsg.: Molls M., Vaupel P.: *Blood perfusion and microenvironment in human tumors*. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York; Springer-Verlag, 1998, S.63-72. 3-540-58866-3
- Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P.: Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A Review. *Cancer Res.*, 1989, 49, S.6449-6465

- Wagener C., Müller O.: 9. Maligne Progression: molekulare Grundlagen und klinische Bedeutung. Hrsg.: Wagener C., Müller O.: Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte. 3. Aufl. Stuttgart; Georg Thieme Verlag, 2010, S.283-323. 978-3-13-103513-4
- Wagener C., Müller O.: 10. Mechanismen der malignen Progression. Hrsg.: Wagener C., Müller O.: Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte. 3. Aufl. Stuttgart; Georg Thieme Verlag, 2010, S.324-389. 978-3-13-103513-4
- Walenta S., Salameh A., Lyng H., Evensen J. F., Mitze M., Rofstad E. K., Mueller-Klieser W.: Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am. J. Pathol.*, 1997, 2, S.409-415
- Waltz D. A., Chapman H. A.: Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy. *J. Biol. Chem.*, 1994, 20, S.14746-14750
- Weinmann M., Thews O., Schroeder T., Vaupel P.: Expression pattern of the urokinase-plasminogen system in rat DS-sarcoma: Role of oxygenation status and tumour size. *Br. J. Cancer*, 2002, 86, S.1355-1361
- Wenig B. M.: 25. The Head and Neck. Hrsg.: Rubin R., Strayer D. S.: Rubin`s Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. 5. Aufl. Baltimore, Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 2008, S.1057-1082. 0-7817-9516-8
- Wolf B. B., Vasudevan J., Henkin J., Gonias S. L.: Nerve growth factor-gamma activates soluble and receptor-bound single chain urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268/22, S.16327-16331
- Yamashita K., Tanaka Y., Mimori K., Inoue H., Mori M.: Differential expressions of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2004, 110, S.201-207
- Yaromina A., Krause Ma., Thames H. D., Rosner A., Krause Me., Hessel F., Grenman R., Zips D., Baumann M.: Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother. Oncol.*, 2007, 83, S.304-310
- Yaromina A., Zips D., Thames H. D., Eicheler W., Krause M., Rosner A., Haase M., Petersen C., Raleigh J. A., Quennet V., Walenta S., Mueller-Klieser W., Baumann M.: Pimonidazol labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: The need for multivariate approach in biomarker studies. *Radiother. Oncol.*, 2006, 81, S.122-129

Young S. D., Marshall R. S., Hill R. P.: Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, S.9533-9537

Zlobec I., Steele R., Compton C. C.: VEGF as a prognostic marker of rectal tumor response to preoperative radiotherapy. Cancer, 2005, 104/11, S.2517-2521

Anhang

Anleitung zu weiteren Zellkultur Arbeitsschritten:

Zellen splitten

1. Zellen 2x mit PBS-Puffer spülen.
2. Trypsin auf die Zellen pipettieren (für 10 ml Schälchen 1 ml, für T 75 Zellkulturflaschen 1,5 ml).
3. 10 min bei Raumtemperatur oder 5 min bei 37°C inkubieren.
4. Zellen vom Boden der Flasche lösen.
5. In frisches Medium aufnehmen und beliebig splitten.

Zellen zählen

1. Coulter counter mit Isotonlösung Nullwert bestimmen lassen.
2. Zellen trypsinieren (mit 1 ml Trypsin; 8-10 min lang) und in beliebig viel Medium (4 ml) aufnehmen.
3. Sehr gut resuspendieren und mischen (schließlich mit 5 ml Pipette).
4. Aliquot in ein Eppi geben.
5. Ein Schuss Isotonlösung in einen Coulterbecher geben, 50 µl Zellsuspension aus Eppi dazu, sowie einen weiteren Schuss Isotonlösung und messen.
6. Zellsuspension entfernen und Coulter counter Nullwert bestimmen lassen (s.o.).

Zellen einfrieren

1. Einfriermedium herstellen (2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO); 4 ml FCS; 4 ml komplett Medium) alles 2x.
2. 500 µl in Kryotubes pipettieren und im Kühlschrank stehen lassen.
3. Zellen trypsinieren.
4. Zellen zählen (s.o.).
5. ca. 1×10^6 Zellen/Tube in 500 µl auf das Einfriermedium pipettieren.
6. Sofort bei -20°C für genau 1 h (max. 2 h) stehen lassen.
7. Bei -80°C aufbewahren.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. Molls für die Vergabe und Realisierung dieser Arbeit aussprechen.

Dem ganzen Team der experimentellen Radioonkologie, meinen Doktorandenkollegen und Frau Dr. rer. nat. Daniela Schilling danke ich sehr für Ihre kollegiale Zusammenarbeit und stete Unterstützung.

Hervorheben möchte ich **Frau Christine Bayer, PhD**. Ihr gilt mein ganz besonderer Dank für Ihre herausragende Betreuung und Begleitung in all den Jahren dieser Arbeit.