

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik

für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie

des Klinikums rechts der Isar

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

Auswirkungen von Bestrahlung auf die Expression und Lokalisation von uPA, PAI-1 und VEGF in drei Kopf-Hals-Xenografttumoren

Achim Kielow

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin

der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Molls

2. Univ.-Prof. Dr. I. Esposito (schriftliche Beurteilung)

3. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 28.01.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin
am 09.02.2011 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Einleitung.....	5
2.1	Kopf-Hals-Tumoren	5
2.2	Hypoxie und Radiotherapie	6
2.3	Das System der Plasminogenaktivierung, sein Zusammenhang mit Hypoxie und seine prognostische Relevanz.....	9
2.4	Die Rolle von VEGF beim Tumorwachstum, sein Zusammenhang mit Hypoxie und seine prognostische Relevanz.....	12
2.5	Zusammenhang des Plasminogenaktivierungssystems mit VEGF	14
2.6	Fragestellung der Arbeit	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Antikörper.....	16
3.2	Tumormodell	17
3.2.1	Tiere.....	17
3.2.2	Zelllinien.....	17
3.2.3	Transplantationsschema	18
3.2.4	Bestrahlungsschema.....	19
3.2.5	Weiterverarbeitung der bestrahlten Schnitte	20
3.3	Tumorlysate	21
3.3.1	Herstellung der Tumorlysate	21
3.3.2	Proteinbestimmung und Nachweis von uPA, VEGF und PAI-1- Konzentrationen mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	21
3.3.2.1	Proteinbestimmung	22
3.3.2.2	uPA- und PAI-1-ELISA.....	23
3.3.2.3	VEGF-ELISA.....	23
3.4	Tumorschnitte	24
3.4.1	Histologische Aufarbeitung der Tumorschnitte nach der Labeled- Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB)	24
3.4.2	Auswertung der Tumorschnitte	28

3.5	Zusätzliche Materialien.....	29
3.6	Statistik.....	30
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Tumorlysate	31
4.1.1	uPA	32
4.1.2	PAI-1	33
4.1.3	VEGF	34
4.1.4	Weitere Statistik	35
4.2	Tumorschnitte	37
4.2.1	Allgemeines	37
4.2.2	Histologie	38
4.2.2.1	Lokalisation der Färbung	38
4.2.2.2	Intensität der Färbung.....	48
4.2.2.3	Menge der Färbung	51
5	Diskussion.....	56
5.1	Ändert sich während der Bestrahlung die <i>Expression</i> von uPA, PAI-1 und/oder VEGF und lässt sich ein Zusammenhang mit der Strahlenresistenz (TCD ₅₀) erkennen?	56
5.2	Ändert sich während der Bestrahlung die <i>Lokalisation</i> von uPA, PAI-1 und/oder VEGF und lässt sich ein Zusammenhang mit der Strahlenresistenz (TCD ₅₀) erkennen?	60
5.3	Lassen die gewonnenen Daten das Ansprechen einer Strahlentherapie vorhersagen und somit Marker erkennen, die eine anpassbare Therapie erlauben?	62
6	Zusammenfassung.....	65
7	Literaturverzeichnis	66
8	Danksagung.....	79

1 Abkürzungsverzeichnis

^{18}F	Positronenemittierendes Fluor
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Bcl-2	B-cell lymphoma-2-Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
ECM	Extracellular Matrix (Extrazelluläre Matrix)
EF 5	2-(2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)- <i>N</i> -(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl) - acetamid
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HNSCC/SCCHN	Head and Neck Squamos Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom der Kopf-Halsregion)
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin 1
kV	Kilovolt
LDH	Lactatdehydrogenase
mAk	Monoklonaler Antikörper
MISO	Misonodazol
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
NITP	7(-)[4'-(2-nitroimidazol-1-yl)-butyl]-Theophyllin
NMRI	Naval Medical Research Institute
OER	Oxygen Enhancement Ratio (Sauerstoffverstärkungsfaktor)
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1

PAI-2	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 2
pAk	Polyklonaler Antikörper
PAS	Plasminogenaktivierungssystem
PBS	Phosphat-Buffered-Saline (Phosphat-Salzpufferlösung)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
PET	Positronenemissionstomograph
PIGF	Placental Growth Factor (Plazentärer Wachstumsfaktor)
pro-uPA	Vorstufe von uPA
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
TBST	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Buffered Saline Tween (Tris(hydroxymethyl)aminomethan Salzpufferlösung Tween)
TCD ₅₀	Mittlere Bestrahlungsdosis, die in 50% der Fälle zur lokalen Tumorkontrolle ausreicht (Tumor-Kontrolldosis)
TGF-β	Transforming Growth Factor β (Transformierender Wachstumsfaktor beta)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor-Node(Lymphknoten)-Metastase(n)
tPA	Tissue-type Plasminogen Activator (Plasminogenaktivator vom Gewebstyp)
TU	Technische Universität
Ü/N	Über Nacht
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp)
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor (Plasminogenaktivator-Rezeptor vom Urokinasetyp)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VN	Vitronektin

2 Einleitung

2.1 Kopf-Hals-Tumoren

Als Kopf-Hals-Tumoren wird eine Gruppe von Neoplasien bezeichnet, die sich im Mund-, Nasen- und Rachenraum sowie im Hals entwickeln. Hierzu gehören Tumoren der Mundhöhle, der Lippen, des Zahnfleisches, der Zunge, des Gaumens, des Kehlkopfes, des Rachens, der Speicheldrüsen, der Nasen- und Nasennebenhöhlen sowie des Mittelohrs. Die malignen Neoplasien werden dabei in Abhängigkeit von ihrem Ursprungsgewebe in die von der Schleimhaut ausgehenden Karzinome, die vom Stütz- und Bindegewebe ausgehenden Sarkome und die vom lymphatischen Gewebe stammenden Lymphome eingeteilt.

Diese Malignome können zusätzlich histologisch untersucht werden, um eine genauere Differenzierung zu ermöglichen. Mit einem Anteil von circa 90% ist das Plattenepithelkarzinom (Englisch: squamos cell carcinoma of the head and neck = SCCHN) der am häufigsten zu findende maligne Tumor im Kopf- und Halsbereich (Duvvuri and Myers 2009).

Kopf-Hals-Tumoren sind in Deutschland bei Männern die am sechsthäufigsten vorkommenden Tumoren und machen 5% aller Tumorerkrankungen aus. Bei Frauen sind nur 2% aller neuen Krebserkrankungen Kopf-Hals-Tumoren (Statistisches-Bundesamt 2007). Dieser Geschlechterunterschied der Prävalenz wird durch die häufigere Belastung von Männern mit den Risikofaktoren Rauchen und Alkohol erklärt. Weltweit gesehen sind Kopf-Hals-Tumoren der sechsthäufigst vorkommende Tumor (Duvvuri and Myers 2009). Es erkranken vorwiegend ältere Menschen im Alter zwischen 55-65 Jahren (Robert-Koch-Institut 2008). Im Jahr 2006 verstarben in Deutschland 6311 Menschen an Kopf-Hals-Tumoren (Becker and Holzmeier 2006).

Die Entstehung dieser Tumoren ist multifaktoriell bedingt. Als auslösende Faktoren gelten insbesondere Tabak und hochprozentiger Alkohol, außerdem auch virale Infektionen, radioaktive und UV-Strahlen sowie krebsfördernde Chemikalien. Auch ein niedriger sozialer Status erhöht das Erkrankungsrisiko (Conway et al. 2008). Nach einer neueren Studie scheint auch eine Infektion mit

dem humanen Papillomavirus (HPV) Ursache für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zu sein (Chaturvedi et al. 2008).

Die Therapie eines Kopf-Hals-Tumors richtet sich zum einen nach der Lokalisation des Tumors (Mundhöhle, Larynx usw.) zum anderen nach der TNM-Klassifikation. Mit Ausnahme von Nasopharynxkarzinomen wird in der Regel zunächst eine operative Entfernung des Karzinoms angestrebt. Das Ausmaß der Operation ist dabei von der Tumorlokalisation, der damit zusammenhängenden Gefäß- und Lymphversorgung und der Größe des Tumors abhängig. Bis auf einige wenige Ausnahmen besonders kleiner und lokalisiert wachsender Karzinome wird die operative Therapie durch eine Radiotherapie, seltener durch eine Chemotherapie oder beide ergänzt, die sowohl prä- als auch postoperativ durchgeführt werden können. Insbesondere bei Tumoren des Nasopharynx ist die Strahlentherapie, bei fortgeschrittenen Karzinomen des Hypopharynx eine Kombination von Strahlentherapie und Chemotherapie Mittel der Wahl, da in diesen Fällen eine Operation aufgrund der anatomischen Enge nicht durchführbar ist.

2.2 Hypoxie und Radiotherapie

Ein wesentliches Problem bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region mittels Strahlentherapie stellen die hypoxischen Areale im Tumorgewebe dar, die im Durchschnitt 20-25% des Gesamttumorvolumens betragen (Vaupel et al. 2007). Als Hypoxie bezeichnet man den Abfall des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) im Gewebe unter 7 mmHg (Vaupel 2004, 2008). In gesundem physiologisch oxygenierten Gewebe finden sich im Vergleich dazu pO_2 -Werte von 20 - 60 mmHg (Normoxie) (Richter and Feyerabend 2002 S.75). Man unterscheidet zwei grundlegende Arten der Hypoxie: Eine diffusionsbedingte, häufig als "chronisch" bezeichnete und eine perfusionsbedingte, oftmals "akut" genannte (Abb. 2-1). Darüber hinaus wurden auch bereits eine anämisch bedingte Hypoxie und eine durch erhöhten zellulären Sauerstoffverbrauch entstehende Hypoxie beschrieben (Vaupel et al. 2001). Zu einer diffusionsbedingten Hypoxie kommt es, wenn die Entfernung der Tumorzellen vom versorgenden Blutgefäß die kritische Distanz von 70 μm

überschreitet (Vaupel et al. 2001). Ab einer relativ konstanten Entfernung von 100 - 150 μm nimmt der Sauerstoffpartialdruck dann so stark ab, dass die Tumorzellen nekrotisch werden (Horsman 1998). Auf diese diffusionsbedingte Art der Hypoxie wurden Thomlinson und Gray bereits 1955 bei Arbeiten mit histologisch aufgearbeiteten Lungentumoren aufmerksam (Thomlinson and Gray 1955). Im Jahr 1979 beschrieb Brown erstmals die Existenz einer zweiten, akuten Tumorhypoxie, die später durch Chaplin bestätigt wurde (Brown 1979; Chaplin et al. 1987). Ihre Ursache liegt in einer strukturellen und funktionellen Abnormität der versorgenden Blutgefäße, einem vorübergehendem Stopp des Blutflusses durch z.B. Thromben und einem erhöhten Gewebedruck (Chaplin et al. 1987; Vaupel et al. 2001).

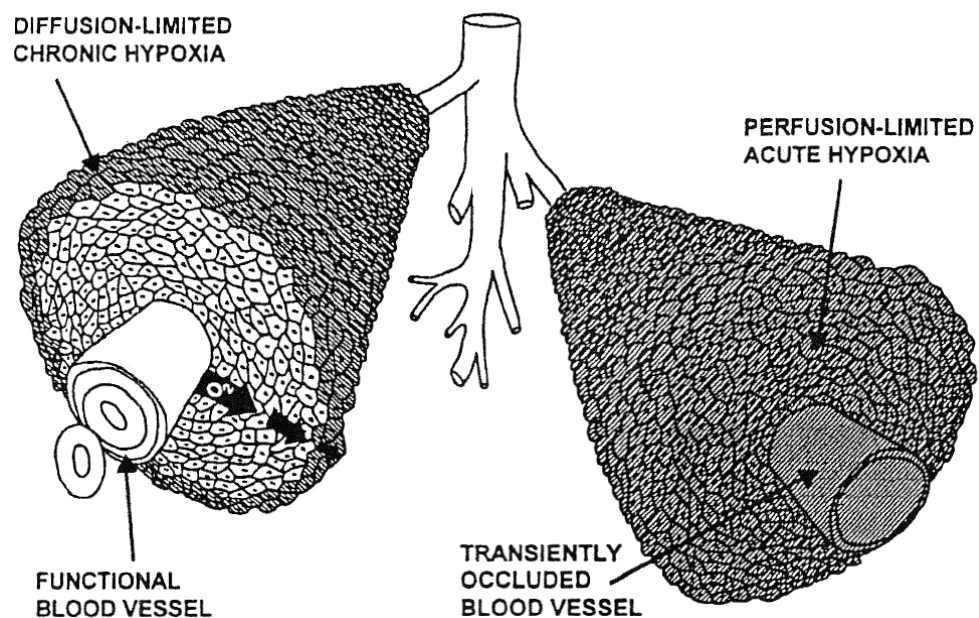


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung von diffusionsbedingter und perfusionsbedingter Hypoxie; dunkel gefärbte Zellen sind hypoxisch, helle Zellen normoxisch (Horsman 1998)

Weitere Faktoren die eine Hypoxie verursachen können sind, wie oben bereits erwähnt, unter anderem eine Anämie mit Hämoglobinspiegeln von unter 10 -12 g/dl sowie der erhöhte Sauerstoffbedarf der sich schnell teilenden Tumorzellen (Vaupel et al. 2001; Vaupel and Harrison 2004).

Das therapeutische Problem der Sauerstoffmangelversorgung ist die dadurch erhöhte Strahlenresistenz dieser Tumoren. Darauf, dass die Oxygenierung eines Gewebes offensichtlich eine Auswirkung auf dessen Strahlensensibilität hat, wurde man international erstmals 1936 aufmerksam. Mottram beobachtete

damals an bestrahlten Tumorschnitten verstärkte Strahlenschäden in der Nähe der Tumorkapillaren, den vermeintlich besser oxygenierten Teilen des Tumors, wohingegen vermeintlich schlechter versorgte, den Kapillaren fern gelegene Areale, geringere Strahlenschäden aufwiesen (Mottram 1936). Dieser beobachtete Effekt ist heute unter dem Begriff Sauerstoffverstärkungsfaktor (Oxygen Enhancement Ratio = OER) bekannt. Er gibt das Verhältnis der Strahlendosis von anoxischen zu aeroben Zellen an, bei dem die gleiche Anzahl an Zellen abgetötet wird. Der Verstärkungsfaktor ist zum einen von der verwendeten Strahlung abhängig, zum anderen variiert er je nach Zellzyklusphase. Bei Gamma- oder Röntgenstrahlung liegt der OER bei 2,5 - 3, bei Neutronen nur noch bei 1,6 und bei Alpha-Teilchen bei 1 (Richter and Feyerabend 2002 S.76). Das bedeutet, dass bei Gamma- oder Röntgenstrahlung unter anoxischen Bedingungen im Gegensatz zu aeroben Verhältnissen eine 2,5 - 3 mal höhere Strahlendosis nötig ist, um die gleiche Anzahl an Zellen abzutöten (Sauer 2006 S.52; Vonkadich 2009 S.66).

Diese erhöhte Strahlenresistenz von hypoxischen Tumorzellen beruht auf direkten wie indirekten Effekten des fehlenden Sauerstoffs. Der direkte Effekt der Hypoxie führt zu einer verminderten Fixierung der durch Bestrahlung entstandenen DNA-Radikale, was eine Verminderung der strahlenbedingten DNA-Schäden zur Folge hat. Indirekte Effekte sind Änderungen der Genexpression, des Genoms und des Proteoms mit den Folgen einer erhöhten Geninstabilität und Entdifferenzierung der Zellen, was wiederum zu einer erhöhten Proliferation von resistenteren Zellen und zu einer Steigerung der Aggressivität des Tumors führt. Dies wird durch die erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) und Proteasen und die Erhöhung der Anzahl der sich in der G₀-Phase befindlichen Tumorzellen bzw. deren Verbleib in der G₁/S-Phase verstärkt (Vaupel and Harrison 2004; Harrison and Blackwell 2004; Molls 2001; Brown 2002). In mehreren Studien wurde bestätigt, dass diese Veränderungen im Tumor mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung und Rezidivneigung sowie einer schlechteren Prognose einhergehen (Brizel et al. 1996; Brizel et al. 1997; Stadler et al. 1999; Nordmark et al. 2005).

Um die hypoxischen Areale eines Tumors zu quantifizieren, hat sich in den letzten Jahren die Verwendung von 2-Nitroimidazolen durchgesetzt, die

irreversibel an Zellen, deren Sauerstoffpartialdruck unter 10 mmHg liegt, binden. Beispiele für derartige 2-Nitroimidazole sind Pimonidazol, Misonidazol, EF5 und NITP. So konnte mittels Gabe von Pimonidazol in (*in vitro*) Studien eine Vorhersage bezüglich des Ansprechens einer Strahlentherapie bei Kopf-Hals-Tumoren gegeben werden (Kaanders et al. 2002). Besondere klinische Bedeutung bei der Erkennung von Hypoxie kommt der Verbindung von Misonidazol mit dem positronenemittierenden ^{18}F ($[^{18}\text{F}]\text{MISO}$) zu. Die abgegebenen Positronen können nach Bindung des Misonidazols an hypoxische Zellen mit Hilfe eines PET gemessen werden ($[^{18}\text{F}]\text{MISO}$ - PET). Mehrere Studien stellten einen Zusammenhang zwischen mittels PET gemessener geringerer Aufnahme von $[^{18}\text{F}]\text{MISO}$ und besserem Ergebnis der Strahlentherapie bei Kopf-Hals-Tumoren fest (Eschmann et al. 2005; Hicks et al. 2005; Thorwarth et al. 2005).

2.3 Das System der Plasminogenaktivierung, sein Zusammenhang mit Hypoxie und seine prognostische Relevanz

Das Plasminogenaktivierungssystem (PAS) ist ein komplex aufgebautes System mit einer Vielzahl von Aufgaben und kann durch unterschiedliche Faktoren aktiviert werden. Im Folgenden sei insbesondere auf das PAS vom Urokinasetyp, seine Bedeutung bei Tumorinvasion und Metastasierung sowie sein Zusammenhang mit Hypoxie eingegangen. Es beinhaltet die Serinproteasen Plasmin, den Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA), die Serpininhibitoren alpha2-anti-Plasmin, die Plasminogenaktivator-Inhibitoren Typ 1 (PAI-1) und Typ 2 (PAI-2) sowie den uPA-Rezeptor uPAR.

Die Aktivierung und Deaktivierung der einzelnen Komponenten des PAS unterliegt einem Kreislauf, der im Folgenden in seinen für die Zellinvasion wichtigsten Funktionen dargestellt wird (Abb. 2-2). Zunächst wird von den Zellen eine Vorstufe von uPA (pro-uPA) gebildet und an der Zelloberfläche sekretiert. Dort bindet es an die in der Zellmembran verankerten uPAR und wird mittels Spaltung einer Peptidbrücke durch Plasmin oder Kathepsin B in uPA

umgewandelt. Der neu entstandene uPA/uPAR-Komplex aktiviert seinerseits die Umwandlung von inaktivem Plasminogen in aktives Plasmin. Dieser uPA/uPAR-Komplex kann anschließend mittels zuvor durch Vitronectin aktivierten PAI-1 inhibiert werden, wodurch seine Plasminkatalysierung gestoppt wird. Der neu gebildete PAI-1/uPA/uPAR-Komplex wird daraufhin in die Zelle internalisiert und recycelt (Cubellis et al. 1990; Andreasen et al. 1997; Stoppelli 2002).

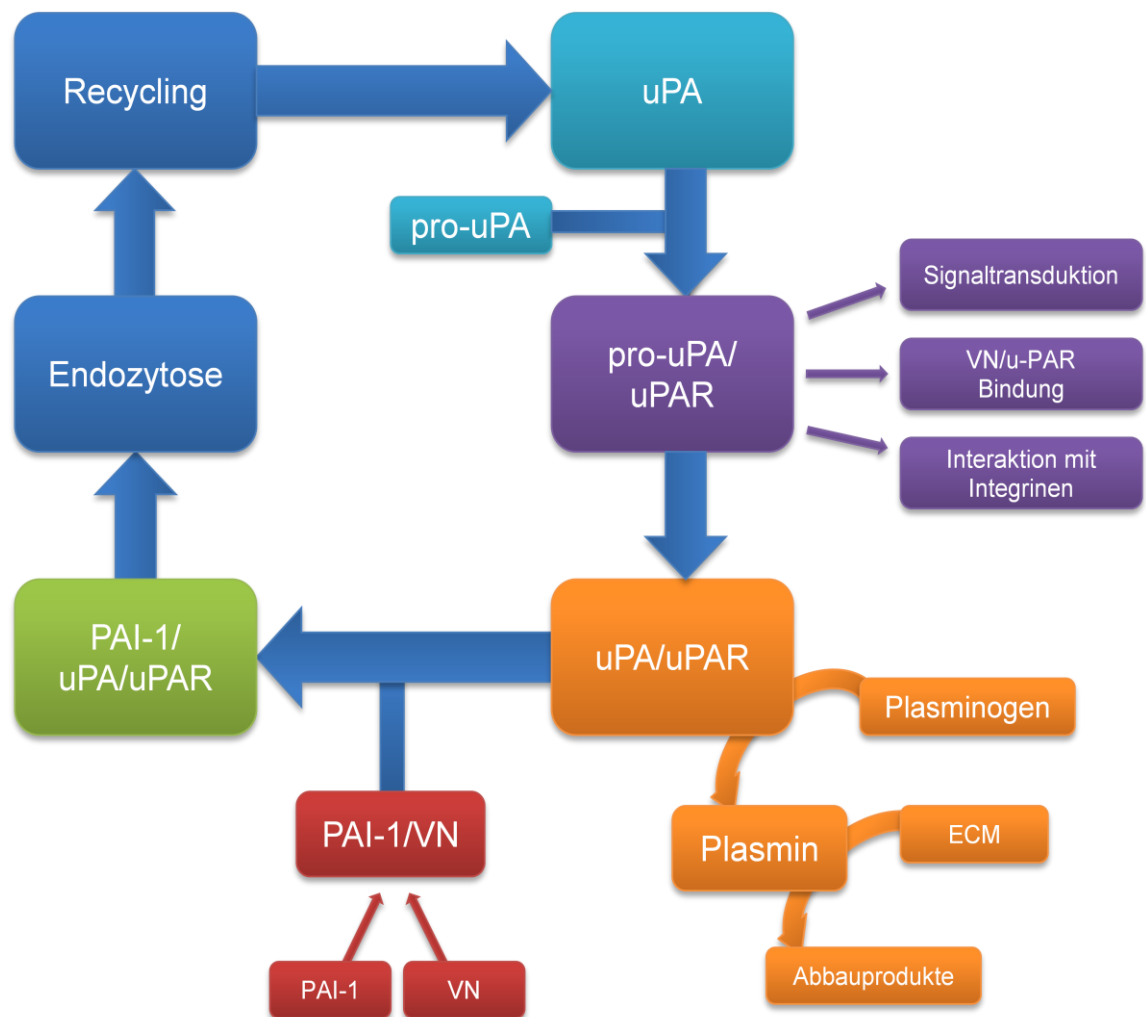


Abbildung 2-2: PAS-Kreislauf, modifiziert von Andreasen et al. (Andreasen et al. 1997);
VN: Vitronectin, ECM: Extrazelluläre Matrix

Für die Zellinvasion von großer Bedeutung ist dabei das produzierte Plasmin, da es zum einen den Abbau von Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Proteoglykanen, zum anderen die Aktivierung von den Kollagenabbau bewirkenden Metalproteasen zur Folge hat (Dano et al. 1985; Mazzieri et al. 1997; Ramos-DeSimone et al. 1999). Somit kommt Plasmin eine entscheidende

Rolle beim Abbau der ECM zu, der sowohl für die Migration von Tumorzellen als Voraussetzung einer Metastasierung, als auch für die lokale Tumorausbreitung von Relevanz ist (Duffy et al. 1999).

Zusätzlich zu dem plasminvermittelten Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) initiiert schon die Bindung des pro-uPAs an den uPAR eine Vielzahl von Mechanismen, z.B. Interaktionen mit Integrinen, die gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren und die Vitronectin-uPAR-Bindung, die ebenfalls einen Degradationseffekt auf die ECM haben (Andreasen et al. 1997). Für das Ausmaß des Tumorwachstums, der lokalen Invasion und der Metastasierung ist jedoch laut mehreren übereinstimmenden Studien die Menge an katalysiertem Plasmin der limitierende Faktor (Andreasen 2007).

Das PAS ist auch an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt. Die wichtigste Funktion hierbei ist sein Mitwirken bei der Blutgerinnung und der Fibrinolyse. Durch Plasmin werden Thromben per Fibrin-spaltung aufgelöst und die dadurch entstandene vorübergehende Hypoxie wieder beseitigt. Die Aktivierung des PAS oder zumindest sein Zusammenhang mit Hypoxie schien daher naheliegend. Aufgrund verschiedener Studien ist inzwischen bekannt, dass Hypoxie unterschiedliche Wirkungen auf das PAS hat. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die Mengen von uPAR und PAI-1, nicht jedoch die uPA-Menge, durch Hypoxie erhöht werden. Für uPA wurden unter Hypoxie entweder konstante oder sogar erniedrigte Spiegel festgestellt (Graham et al. 1999; Kietzmann et al. 1999; Weinmann et al. 2002; Schilling et al. 2007; Sprague et al. 2007; Bayer et al. 2008).

Die klinische Relevanz der Rolle des PAS beim ECM-Abbau, der Metastasierung und der Tumorinvasion konnte zunächst bei Patientinnen mit Brustkrebs gezeigt werden. 1988 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass hohe uPA-Spiegel mit einem kürzeren krankheitsfreiem Intervall und einer geringeren Überlebensrate einhergehen (Duffy et al. 1988; Duffy et al. 1990). Dies wurde in der Folge durch verschiedene ähnliche Studien bestätigt, so dass heute ein hoher uPA-Spiegel als ein wichtiger prognostischer Marker bei Brustkrebs gilt (Foekens et al. 1992; Spyrtos et al. 1992; Ferno et al. 1996). Die klinische Relevanz des uPA-Spiegels wurde inzwischen auch für viele

andere Krebsarten wie z.B. das kolorektale Karzinom oder Magenkrebs erkannt (Duffy et al. 1999). Durch mehrere Studien wurde darüberhinaus nachgewiesen, dass bei vielen Krebsarten neben uPA überraschenderweise auch hohe PAI-1-Werte signifikant mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Nekarda et al. 1994; Harbeck et al. 2000; Duffy and Duggan 2004; Hundsdorfer et al. 2005; Binder and Mihaly 2008). Der Mechanismus, weshalb der uPA-Inhibitor PAI-1 zu einer schlechteren Prognose führt, ist bisher nicht bekannt. Hypothesen dazu sind in den Reviews von Andreasen und Binder zu finden (Andreasen 2007; Binder and Mihaly 2008).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass dem PAS über die vermehrte Bereitstellung unterschiedlicher Komponenten wie z.B. uPAR, uPA, PAI-1, eine wichtige Rolle beim Wachstum, der Invasion und der Metastasierung verschiedenster Tumoren zukommt. Die Erhöhung mancher dieser Komponenten (uPA, PAI-1) kann auf das Vorliegen hypoxischer Areale im Tumor zurückgeführt werden und geht mit einer schlechteren Prognose der davon betroffenen Patienten einher.

2.4 Die Rolle von VEGF beim Tumorwachstum, sein Zusammenhang mit Hypoxie und seine prognostische Relevanz

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), oft auch als VEGF-A bezeichnet, ist ein Glykoprotein der Familie der Blutplättchen-Wachstumsfaktoren (PDGF), zu der auch noch die Wachstumsfaktoren PIGF, VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D gehören (Ferrara and Davis-Smyth 1997). VEGF bindet an zwei VEGF-Rezeptoren (VEGF-Rezeptor 1 + 2), die von Gefäßendothelzellen expremiert werden (Thomas 1996). VEGF ist aus der Reihe der Wachstumsfaktoren das einzige endothelspezifische Mitogen, dem daher bei der Entstehung neuer Blutgefäße die zentrale Rolle zukommt (Nishida et al. 2006). Dieser, als Angiogenese bezeichnete Vorgang, hat eine große Bedeutung in der embryonalen Entwicklung, beim Erwachsenen spielt er

überwiegend eine Rolle bei der Wundheilung und der Fortpflanzung (Folkman and Shing 1992).

Eine der wesentlichsten Voraussetzungen für das Tumorwachstum ist die Versorgung der Zellen mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff. Ab einer Tumorgöße von ca. 2mm kann diese nicht mehr durch umliegende Blutgefäße gewährleistet werden, es kommt zum sogenannten *angiogenic switch* was bedeutet, dass der Tumor fortan eigenständig ihn versorgende Blutgefäße entwickelt (Folkman 1972; Arbiser et al. 2002; Carmeliet 2005). Dieser Prozess wird über eine Hochregulation der VEGF-Genexpression mittels verschiedenster Faktoren, wie z.B. TNF, PDGF, EGF, IL-1, TGF- β , Azidose und vor allem auch Hypoxie, vermittelt (Ferrara 1999). Das dadurch neu gebildete VEGF stimuliert in der Folge die Aussprossung neuer Blutgefäße aus nahegelegenen Kapillaren, die wiederum die ausreichende Versorgung des Tumorgewebes gewährleisten sollten (Bergers and Benjamin 2003). Dass dies jedoch nicht der Fall ist, liegt an strukturellen und funktionellen Unterschieden zwischen normalen physiologischen Blutgefäßen und denen von Tumoren. Es wurde gezeigt, dass Tumoren eine abnorme, gewundene und dilatierte Gefäßarchitektur mit vielen blind endenden Gefäßen und eine erhöhte Gefäßpermeabilität aufweisen. Infolge dessen kommt es erneut zu einer insuffizienten Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff, was über oben genannte Faktoren wiederum zu einer erhöhten VEGF-Genexpression führt (Carmeliet 2005). Neben dieser Neovaskularisation schützt VEGF neu gebildete Blutgefäße mittels Induktion sogenannter Apoptoseinhibitoren wie z.B. Bcl-2 und Survivin und trägt so noch effektiver zum Tumorwachstum bei (Tran et al. 1999; Harmey and Bouchier-Hayes 2002).

In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass Hypoxie eine erhöhte Expression von VEGF und auch seinem Rezeptor nach sich zieht (Shweiki et al. 1992; Rossler et al. 1999; Ziemer et al. 2001). Die hypoxiebedingte Regulation von VEGF erfolgt dabei über HIF-1 α , einem durch Hypoxie induzierbaren Faktor, der eine gesteigerte VEGF-Expression bewirkt (Forsythe et al. 1996). Ob dieser erhöhten Expression eine prognostische Relevanz zukommt, ist derzeit unklar. Diesbezügliche Forschungsergebnisse variieren, auch wenn die Mehrzahl der Ergebnisse einen Zusammenhang vermuten lässt.

So konnten diverse Forschungsgruppen bei speziellen Tumoren eine Korrelation zwischen der VEGF-A-Expression und der Prognose nachweisen, z.B. für SCCHN (O-charoenrat et al. 2001; Kyzas et al. 2005), Lungenkrebs (Niki et al. 2000), kolorektalem Karzinom (Andre et al. 2000; George et al. 2001; Wilson et al. 2007) und mehreren gynäkologischen Krebsarten (Frumovitz and Sood 2007). Andere Forschungsergebnisse wiederum zeigten keinen Zusammenhang mit der Prognose, dem Grading oder etwa dem Erfolg einer Strahlentherapie (Ellis et al. 1998; Decaussin et al. 1999; Aebersold et al. 2000; Nishida et al. 2004).

2.5 Zusammenhang des Plasminogenaktivierungssystems mit VEGF

1990 konnte erstmals durch eine Gruppe um Rifkin festgestellt werden, dass zwischen den Bestandteilen des PAS und VEGF ein Zusammenhang besteht. Deren Experimente zeigten, dass VEGF in der Lage ist, die uPA-Expression zu induzieren (Rifkin et al. 1990). Dass auch PAI-1 mittels VEGF induzierbar ist, wurde später durch eine andere Forschungsgruppe beobachtet (Pepper et al. 1991). Diese Ergebnisse legten erstmals die Vermutung nahe, dass uPA und PAI-1 auch eine Rolle in der Angiogenese spielen könnten. Als es vor wenigen Jahren einer Forschergruppe gelang mittels immunhistochemisch gefärbter Schnitte von Brustkarzinomen nachzuweisen, dass PAI-1 nicht nur allein von Myofibroblasten, sondern auch von Endothelzellen exprimiert wird und dies später auch in Kolonkarzinomen festgestellt werden konnte, hat sich diese Vermutung bestätigt. Zudem lag es nahe anzunehmen, dass die vermutete Rolle von PAI-1 in der Angiogenese bedeutender sei als zunächst erwartet worden war (Offersen et al. 2003; Illemann et al. 2004). Weiter wurde beobachtet, dass in Nacktmäusen, die kein für PAI-1 kodierendes Gen tragen, die Neoangiogenese stark reduziert ist (Bajou et al. 1998; Devy et al. 2002; Maillard et al. 2005). Auch wenn die exakte Rolle des PAI-1 bei der Entstehung neuer Blutgefäße noch ungeklärt ist, werden derzeit zwei Alternativen diskutiert. Zum einen wird vermutet, dass PAI-1 die ECM vor allzu großem Abbau schützt und damit ein für die Endothelzellmigration und den Gefäßaufbau notwendiges

Gerüst aufrecht erhält (Bajou et al. 2001). Andererseits ist auch eine über komplexe Interaktionen gesteuerte Regulation der Adhäsions-, Migrations- und Wachstumseigenschaften der Endothelzellen denkbar (Pepper 2001). Die prognostische Relevanz der gefundenen Korrelationen zwischen Teilen des PAS und VEGF ist bisher kaum untersucht worden. Die wenigen Studien lassen in Fällen kombiniert erhöhter Werte des PAS mit erhöhten VEGF-Werten jedoch eine überwiegende Korrelation mit einer schlechteren Prognose vermuten (Konno et al. 2001; Hjortland et al. 2004; Meo et al. 2004; Terada et al. 2005).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wechselwirkungen des PAS mit VEGF wesentlich zur Neoangiogenese beitragen und Ihre Expression mitunter Auswirkungen auf die Prognose verschiedener Tumoren hat.

2.6 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen von fraktionierter Bestrahlung auf die Expression und Lokalisation von uPA, PAI-1 und VEGF in Plattenepithelkarzinomen von Kopf-Hals-Tumoren. Hierzu wurden drei verschiedene Plattenepithelkarzinomlinien (HNSCC) in Nacktmäuse transplantiert und nach dortigem Tumorwachstum mittels unten beschriebener Methoden untersucht. Folgende Fragen sollten mit Hilfe dieser Experimente geklärt werden:

1. Ändert sich während der Bestrahlung die Expression von uPA, PAI-1 und/oder VEGF und lässt sich ein Zusammenhang mit der Strahlenresistenz (TCD₅₀) erkennen?
2. Ändert sich während der Bestrahlung die Lokalisation von uPA, PAI-1 und/oder VEGF und lässt sich ein Zusammenhang mit der Strahlenresistenz (TCD₅₀) erkennen?
3. Lassen die gewonnenen Daten das Ansprechen einer Strahlentherapie vorhersagen und somit Marker erkennen, die eine anpassbare Therapie erlauben?

3 Material und Methoden

3.1 Antikörper

Die beiden wesentlichen Nachweisverfahren für die uPA, PAI-1 und VEGF-Proteinmengen dieser Arbeit, die Immunhistochemie und der Double-Antibody-Sandwich-ELISA, arbeiten nach einem grundsätzlich identischen Prinzip. In beiden Fällen werden Proteine mit Hilfe einer möglichst spezifischen Antikörper-Antigen-Reaktion gebunden und später mittels Zugabe eines Chromogens sichtbar gemacht.

Antikörper (Immunglobuline) bestehen jeweils aus zwei identischen leichten sowie zwei identischen schweren Ketten (Abb. 3-1). Sowohl leichte als auch schwere Ketten besitzen eine konstante und eine variable Region. Die Immunglobuline sind aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen und biologischen Eigenschaften der konstanten Domänen der schweren Ketten in fünf Hauptklassen eingeteilt (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). Diese können anhand geringer Unterschiede in der Aminosäuresequenz des konstanten Teils weiter in Unterklassen gegliedert werden.

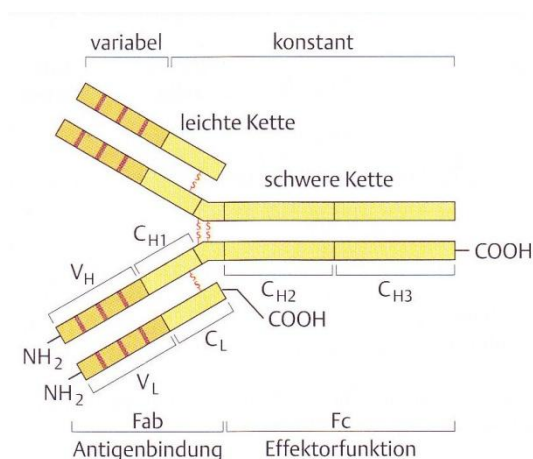


Abbildung 3-1: Struktur des Immunglobulinmoleküls (Duale Reihe, medizinische Mikrobiologie)

Die leichten Ketten bestehen aus jeweils zwei als Lambda oder Kappa bezeichneten Ketten. Schwere und leichte Ketten sind über Disulfidbrücken verbunden, wodurch die Immunglobuline ihre typische Form eines Ypsilon erhalten. Durch Aufspaltung mittels Papain erhält man zwei identische Fab-Fragmente, die für die Antigenbindung verantwortlich sind und ein Fc-Fragment, das für die Effektorfunktion des Immunglobulins zuständig ist. Der amino-

terminale, in seiner Aminosäuresequenz variable Teil des Fab-Fragments trägt hierbei die Antigenbindungsstellen. Man nennt diese Bindungsstellen Paratope. Sie reagieren mit den Epitopen des Antigens gegen das sie gerichtet sind.

Man unterscheidet weiter Antikörper monoklonalen und polyklonalen Ursprungs. Ein monoklonaler Antikörper stammt aus einem einzelnen Klon von Plasmazellen. Er richtet sich nur gegen ein spezifisches Epitop des Antigens, wohingegen ein von mehreren Plasmazellklonen erstellter polyklonaler Antikörper mit verschiedenen Epitopen des Antigens reagieren kann.

Die bei der Immunhistochemie dieser Arbeit verwendeten Kaninchen-Antikörper gegen uPA und PAI-1 waren polyklonalen Ursprungs. Bei den Färbungen gegen VEGF wurde zunächst ein monoklonaler, im weiteren Verlauf der Arbeit ebenfalls ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet.

3.2 Tumormodell

Das Tumormodell wurde im Rahmen einer Kooperationsarbeit von der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden entwickelt (Rosner et al. 2004).

3.2.1 Tiere

Das Tumormaterial stammt von 7-14 Wochen alten, sowohl weiblichen als auch männlichen NMRI (nu/nu) Nacktmäusen (Experimentelles Zentrum, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden). Die Tiere wurden bei einer konstanten Temperatur von 26°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und bei einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Gefüttert wurde eine Diät mit handelsüblichem Futter für Labortiere sowie Wasser nach Belieben.

3.2.2 Zelllinien

Die Xenografttumore wurden aus drei etablierten Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf- und Halsbereichs produziert (Yaromina et al. 2007). UT-SCC-15 und UT-SCC-14 (University Turku Squamous Cell Carcinome 15 und 14) stammen aus dem Labor von Prof. Grénman der Universität Turku,

Finnland. FaDu_{DD} hingegen ist käuflich erwerbbar (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland).

UT-SCC-15 ist ein relativ differenziert wachsender (G1), keratinisierender Primärtumor der Zunge eines 51-jährigen Mannes.

UT-SCC-14 ist ein mäßig differenziert wachsender (G2), nicht keratinisierender Rezidivtumor der Zunge, der nach Operation und Bestrahlung einem 25-jährigen Mann entnommen wurde.

FaDu_{DD} (Sublinie der Zelllinie FaDu ATCC HTB-43 [American Type Culture]) ist ein mäßig differenziert wachsender (G3), nicht keratinisierender Primärtumor des Hypopharynx eines 56-jährigen Mannes.

3.2.3 Transplantationsschema

Um das Immunsystem der Mäuse zusätzlich zu supprimieren und damit eine geringere Abstoßungsreaktion zu erhalten, wurden die Tiere jeweils zwei Tage vor der Tumortransplantation mit 4 Gy ganzkörperbestrahlt (200kV, 1,3 Gy/min, 0,5 mm Cu-Filter). Eine Übersicht über das Schema der Transplantation gibt Abbildung 3-2.

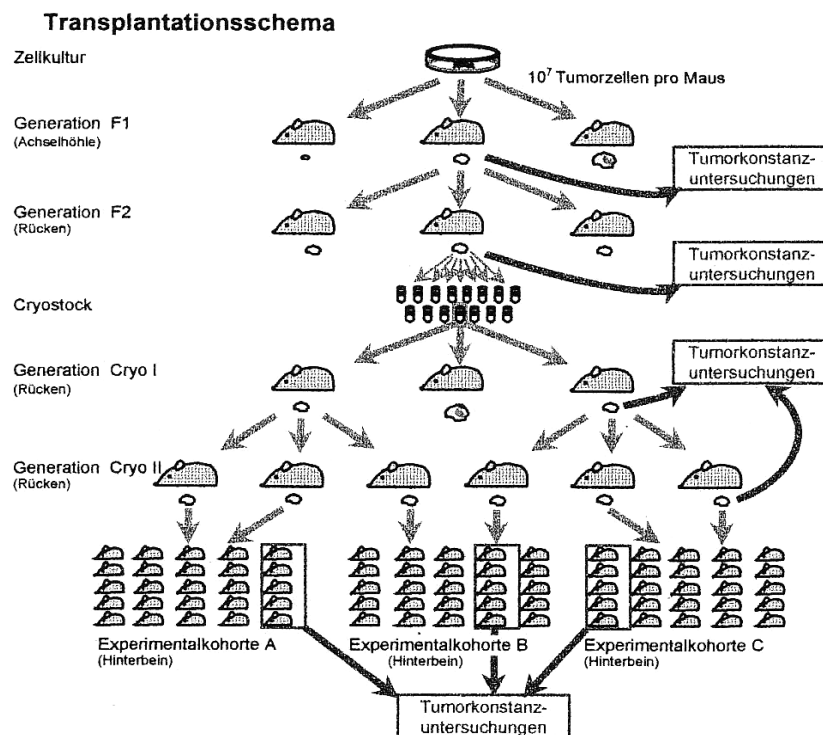


Abbildung 3-2: Tumortransplantationsschema nach Rosner et.al. (Rosner et al. 2004)

Zunächst wurden 10^7 Tumorzellen aus Zellkultur in die rechte Achselhöhle der Tiere transplantiert (Generation F1). Nach ausreichendem Wachstum wurden diese Tumoren dann auf den Rücken verpflanzt (Generation F2). Aus den entstandenen Tumoren wurde ein umfangreicher Cryostock erstellt. Von den Cryostocks ausgehend wurden erneut die Rücken der Tiere mit dem Tumor geimpft (Generation Cryo 1 + 2). Diese wiederum wurden letztlich auf die Hinterbeine der Mäuse transplantiert und dort bis zum Tumorendvolumen (Durchmesser von ca. 7mm) belassen. Während des Transplantationsvorgangs wurden für jede Generation Tumorkonstanzuntersuchungen durchgeführt. Diese beinhalteten die Messungen der Tumorverdoppelungszeit *in vivo*, histologische Untersuchungen, Durchflußzytometrien und die Isoenzymbestimmungen der LDH des Tumorgewebes zum Ausschluss eines Maustumors.

3.2.4 Bestrahlungsschema

Nach Erreichen der erwünschten Größe der Tumore (Durchmesser von 7mm) wurden diese nach dem unten grafisch dargestellten Schema fraktioniert (2 Gy /Bestrahlungssitzung) bestrahlt (Abb. 3-3).

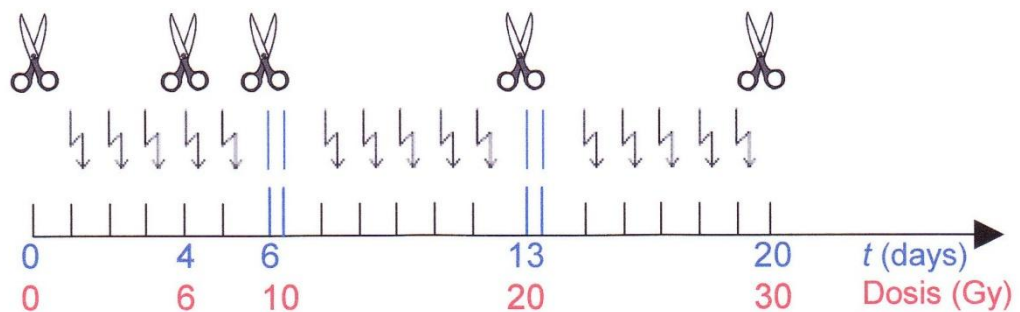


Abbildung 3-3: Bestrahlungsschema der Xenografttumore

Um die Strahlenresistenz eines experimentellen Maustumors zu bestimmen wird üblicherweise die Gesamtdosis in Gray angegeben, bei der in 50% der Fälle mit einer lokalen Tumorkontrolle zu rechnen ist (TCD_{50} = Tumorkontrolldosis) (Yaromina et al. 2007). Diese Dosis variiert von Tumor zu Tumor und korreliert, wie in 10 Plattenepithelkarzinomlinien (inklusive der drei in dieser Studie untersuchten Tumorkonstruktionen) nachgewiesen, mit dem Ausmaß der hypoxischen Areale in diesem (Yaromina et al. 2005; Yaromina et al. 2006).

Eine hohe Gesamtdosis bedeutet, dass es sich um einen strahlenresistenten, eine niedrige Gesamtdosis, dass es sich um einen strahlensensiblen Tumor handelt. Von den in dieser Arbeit verwendeten Tumorklinien besitzt UT-SCC-15 die niedrigste ($TCD_{50} = 35 \text{ Gy}$), UT-SCC-14 eine mittlere ($TCD_{50} = 44 \text{ Gy}$) und FaDu_{DD} die höchste ($TCD_{50} = 62 \text{ Gy}$) Strahlenresistenz.

3.2.5 Weiterverarbeitung der bestrahlten Schnitte

Nach gewünschter, fraktioniert verabreichter Gesamtbestrahlungsdosis (0, 6, 10, 20, 30 Gy) wurden die Tumoren entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und nach dem in der Grafik dargestellten Schema geschnitten (Abb. 3-4). Die Tumoren wurden dabei in einzelne Segmente eingeteilt, aus denen jeweils 16 serielle, 10µm dicke Gefrierschnitte gefertigt wurden. Beim Schneidevorgang wurden die Schnitte durchnummeriert, die erste Zahl der Nummerierung stand dabei für das Segment, die zweite für die Nummer des Schnitts (zum Beispiel stand die Nummer 2/4 für den vierten seriellen Schnitt aus dem zweiten Segment).

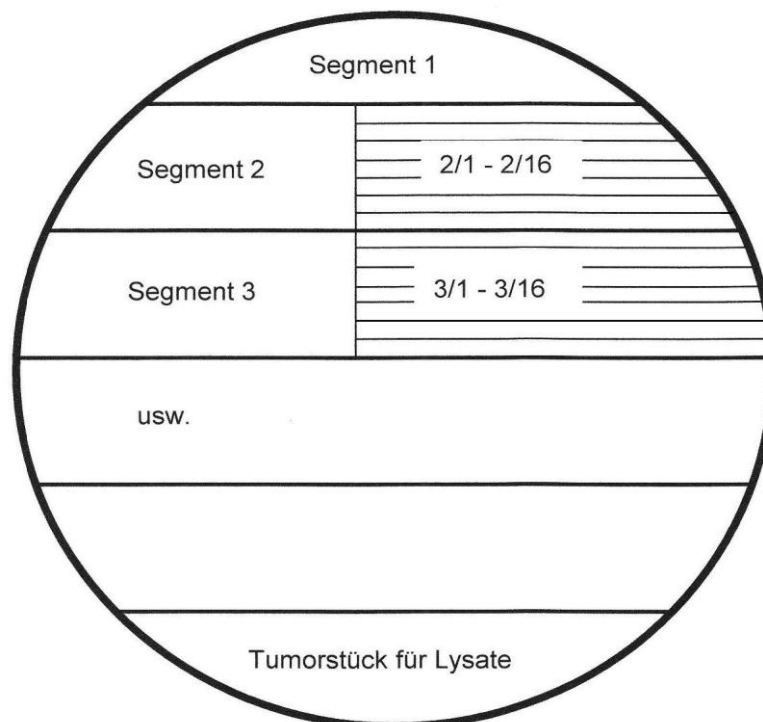


Abbildung 3-4: Schnittmuster für die Weiterverarbeitung der Tumore

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Schnitte der Segmente 2 und 3 zur Färbung verwendet. Schnittnummer /2 wurde jeweils für die PAI-1-, Nummer /3 für die

VEGF- und Nummer /4 für die uPA-Färbung verwendet. Die Schnitte mit der Nummer /5 wurden zumeist als Negativkontrollen verwendet. Der untere Teil des Tumors (siehe Abb. 3-4: Tumorstück für Lysate) wurde zur Herstellung der im folgenden beschriebenen Tumorlysate verwendet.

3.3 Tumorlysate

3.3.1 Herstellung der Tumorlysate

Die Tumorlysate wurden mit Hilfe eines Dismembrators hergestellt, der unter Zuhilfenahme einer Mahlkugel durch hochfrequentes Schütteln ein Zermahlen harter Proben (hier gefrorene Tumorstücke) bewirkt.

Zu Beginn der Herstellung wurde ein Ständer für Cryoröhrchen auf -80°C gekühlt. Anschließend wurden die Cryoröhrchen aus dem -80°C Kühlschrank entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff gelagert. Es folgte das Wiegen der Tumorstücke sowie die Platzierung einer zuvor auf Trockeneis gekühlten rostfreien Mahlkugel aus Stahl in jedem Cryoröhrchen. Jeweils vier Cryoröhrchen wurden dann aus dem flüssigen Stickstoff genommen, in den Cryoröhrchen-Behälter gesteckt und auf dem Dismembrator festgeschraubt. Nach Verschluss des Sicherheitsglases wurde der Behälter im Dismembrator bei 2500Hz für 30s geschüttelt. Den jetzt zerstoßenen Tumorstückchen wurde daraufhin 26,6 μl raumtemperierten TBST/g Tumor zugegeben. Danach wurden die Röhrchen für 16 Stunden bei 4°C rotiert. Am zweiten Tag folgte das Zentrifugieren der Reaktionsgefäße bei 4°C und 14000rpm (ca. 10000 g) für 10 Minuten. Nach dem Sammeln der Lösungen wurden diese auf jeweils drei Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3.2 Proteinbestimmung und Nachweis von uPA, VEGF und PAI-1-Konzentrationen mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Das Prinzip der ELISA-Färbung ist dem der immunhistochemischen Färbung sehr ähnlich (Abb. 3-5). Der wesentliche Unterschied ist lediglich, dass anstatt der AEC-Lösung ein anderes Substrat zur Farbreaktion verwendet wird.

Die bei der Proteinbestimmung und den ELISAs verwendeten Materialien sind in der nachfolgenden Tabelle 3-1 aufgelistet.

Tabelle 3-1: Reagenzien und Materialien Proteinbestimmung und ELISAs

Reagenz bzw. Material	Quelle
IMUBIND® uPA ELISA Kit (Product No. 894)	American Diagnostica inc., Stamford, CT, USA
IMUBIND® Tissue PAI-1 ELISA Kit (Product No. 821)	American Diagnostica inc., Stamford, CT, USA
DuoSet ELISA Development Kit für humanes VEGF (Cat. Nr. DY293B)	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Tween 20 (zu Synthese)	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TBS (Tris Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
96-Well-Mikrotiterplatte: Nunc F96 MicroWell™ Plates Maxisorp	Thermo Fischer Scientific (Nunc GmbH & Co. KG), Langenselbold, Deutschland

3.3.2.1 Proteinbestimmung

Um die Konzentration von uPA, PAI-1 und VEGF in den Tumorproben errechnen zu können war es notwendig, den Proteingehalt der jeweiligen Lysate zu kennen. Das Prinzip der Proteinbestimmung beruht auf zwei voneinander unabhängigen Reaktionen. Im alkalischen Milieu wird Cu^{2+} durch Proteine zu Cu^{1+} reduziert (Biuret-Reaktion). Jeweils ein entstandenes Cu^{1+} -Ion bildet mit zwei hinzugegebenen Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen Chelatkomplex, welcher sich in einer lila Farbe darstellt.

Zu Beginn des Versuchs wurde zunächst der Albumin-Standard mit TBST auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die zu bestimmenden Proben wurden standardmäßig im Verhältnis 1:5 verdünnt. Nach dieser Vorbereitung wurden 50µl Standard oder Probe pro Loch auf die 96-Well-Mikrotiterplatten aufgetragen. Danach wurden zusätzlich pro verwendetem Loch 200µl der frisch hergestellten AB-Lösung (BCA Protein Assay Kit) zugegeben. Die Platten wurden daraufhin bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag

wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Photometers (BioTek EL808, Firma BioTek Instruments GmbH, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurden vom ELISA-Reader automatisch von der Standardreihe ausgehend berechnet.

3.3.2.2 uPA- und PAI-1-ELISA

Am ersten Tag des Versuchs wurden auf die, bereits von american diagnostica mit einem uPA- bzw. PAI-1-Antikörper beschichteten, 96-Well-Mikrotiterplatten pro verwendetem Loch 100µl uPA- bzw. PAI-1-Standard oder verdünntes Tumorslysat aufgetragen. Die Platten wurden dann über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Platten nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer (0,1% Triton X-100 in PBS) mit 100µl/Loch des Nachweis-Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneut viermaliges Waschen mit Waschpuffer. Danach wurde je Loch 100µl des verdünnten Enzymkonjugats zugegeben und neuerlich eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die Zugabe von 100µl Substrat pro verwendetem Loch für eine Inkubationszeit von 20 Minuten. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion mit der Zugabe von 50µl Stopplösung (0,5N H₂SO₄) gestoppt. Die Färbung wurde unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung in einem ELISA-Lesegerät (BioTek EL808, Firma BioTek Instruments GmbH, Kocherwaldstrasse 34, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 450nm gemessen.

3.3.2.3 VEGF-ELISA

Am ersten Tag des Versuchs wurden 100µl/Plattenloch des mittels PBS auf 1,0µg/ml verdünnten Capture-Antikörpers auf die Platte aufgetragen und bei RT über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag folgte zunächst ein dreimaliges Waschen der Platte mittels Waschpuffer (0,05 % Tween[®]20 in PBS). Danach wurden 300µl Reagenzverdünner (1% BSA in PBS, filtriert) zugegeben und bei RT ein bis zwei Stunden inkubiert. Nach neuerlichem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100µl verdünnte Probe bzw. Standard pro Well zugegeben und bei RT zwei Stunden inkubiert. Danach wurde nach nochmaligem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer 100µl des Detektions-Antikörpers pro

Well zugegeben und nochmals für zwei Stunden bei RT inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit dem Waschpuffer sowie die Zugabe von 100µl/Well 1:200 in Reagensverdünner verdünnter Streptavidin-Meerrettichperoxidase. Bei Dunkelheit und RT folgte eine Inkubation von 20 Minuten. Hiernach wurde die Platte dreimalig mit Waschpuffer gewaschen, worauf die Zugabe von 100µl/Well Substratlösung sowie eine Inkubation von 20 Minuten bei RT und Dunkelheit erfolgte. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50µl/Well Stopplösung gestoppt. Die Färbung wurde unmittelbar nach Abstoppen der Reaktion in einem ELISA-Lesegerät (BioTek EL808, Firma BioTek Instruments GmbH, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 450nm gemessen.

3.4 Tumorschnitte

3.4.1 Histologische Aufarbeitung der Tumorschnitte nach der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB)

Die LSAB (Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode) ist die heutzutage am häufigsten eingesetzte immunhistochemische Färbemethode. Ziel ist es, Antigene in der Oberflächenstruktur des Zielgewebes zu identifizieren und darzustellen. Dies ermöglicht in der Pathologie zum Beispiel die Erkennung und Bestimmung von Tumoren in Biopsien von Patienten. Abbildung 3-5 zeigt eine schematische Darstellung der LSAB-Färbemethode.

Das Prinzip dieser Färbemethode beruht auf einer hohen Affinität von Streptavidin gegenüber Biotin (Vitamin H). Ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Enzymkonjugat bindet hierbei an den biotinylierten Sekundärantikörper, der zuvor eine Verbindung mit dem Primärantikörper eingegangen ist. Letztlich wird der Antikörper-Enzymkonjugat-Komplex durch die Zugabe eines in Substrat gelösten Chromogens, hier AEC-Lösung, und der darauffolgenden enzymatischen Reaktion rotbraun gefärbt (Abb.3-5). Um keine zusätzliche Färbung durch endogene Peroxidase zu erhalten, wird diese zuvor mit Hilfe einer 3%igen H₂O₂-Lösung inaktiviert.

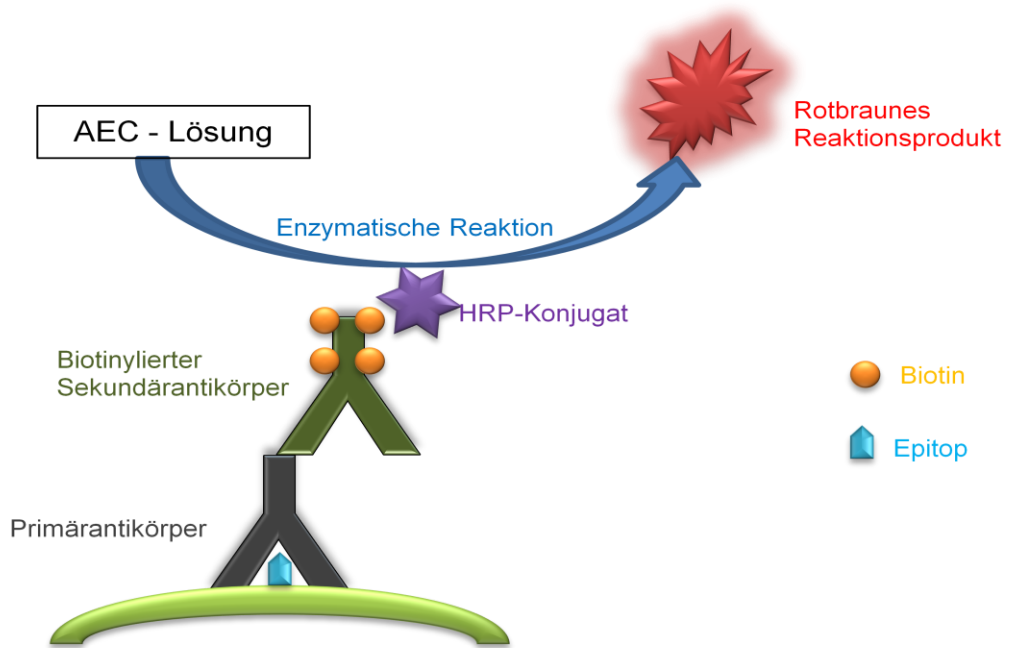


Abbildung 3-5.: Schematische Darstellung der LSAB-Färbemethode

Eine Übersicht der für die LSAB verwendeten Antikörper, Lösungen und Reagenzien findet sich in den nachfolgenden Tabellen 3-2, 3-3 und 3-4.

Tabelle 3-2: 1.Antikörper

1.Antikörper	Quelle	Wirtstier	Verdünnung + Medium	Inkubationsdauer + Temp.
uPA-IgG (pAk)	Nijmegen Laboratory, 6500 HB Nijmegen, Niederlande	Kaninchen	1:900 Ziegenserum	1 h, RT
PAI-1-IgG (pAk)	Nijmegen Laboratory, 6500 HB Nijmegen, Niederlande	Kaninchen	1:150 Ziegenserum	1 h, RT
VEGF-IgG (m/pAk)	LabVision, 47790 Fremont, CA 94539, USA	Kaninchen	1:100 (m) 1:400 (p) Ziegenserum	Ü/N, 4°C

Tabelle 3-3: 2.Antikörper

2.Antikörper	Quelle	Wirtstier	Verdünnung + Medium	Inkubationsdauer + Temp.
Biotinylated anti-Rabbit AK	Vector Laboratories Burlingame, CA 94010 USA	Ziege	1:200 BSA	30 min, RT

Die Antikörper wurden durchgehend bei entweder 4°C (VEGF-IgG-AK, Biotinylierter anti-Kaninchen Antikörper) oder bei -20°C (uPA-IgG-AK, PAI-1-IgG-AK) gelagert.

Tabelle 3-4: Reagenzien und Material

Reagenz bzw. Material	Quelle
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS tablets (Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Peroxid Block	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Blocking Solution (SuperBlock)	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
ZytoChemPlus (HRP) Anti-Rabbit Kit	ZytomedSystems, Berlin, Deutschland
BSA (Immunohistochemical Grade)	Vector, Burlingame, CA, USA
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) Substrate Kit	ZytomedSystems, Berlin, Deutschland
Mayers Hämlaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aqueous Mount (Mounting Medium)	ZytomedSystems, Berlin, Deutschland
Deckgläser 22x22 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger 76x26 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Färbegestell für Objektträger	ZytomedSystems, Berlin, Deutschland

Im folgenden sind die Reaktionsschritte der LSAB-Färbemethode einzeln beschrieben.

LSAB-Reaktionsschritte:

- Auftauen und Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur für 10 min
- Fixierung in 4°C kaltem Aceton für 10 min
Durch die Fixierung wird mittels Koagulation und Quervernetzung von Proteinen eine Konservierung der Antigene erreicht.
- Trocknung bei Raumtemperatur für 5 min
- Rehydrierung in PBS für 10 min
- Inkubation mit jeweils 2 Tropfen Peroxidase-Block pro Schnitt
Dieser Schritt bewirkt eine Blockierung der im Schnitt vorhandenen endogenen Peroxidase. Somit ist sichergestellt, dass es später bei Zugabe des HRP-Konjugats nicht zu einer zusätzlichen Umsetzung des Chromogens (durch die endogene Peroxidase) und somit einer verstärkten Farbreaktion kommt.
- Waschen der Schnitte in PBS für 2 x 10 min
- Inkubation mit jeweils 2 Tropfen Blocking Solution (SuperBlock) pro Schnitt
Durch die Zugabe dieser Blockierungslösung wurde mittels eines enthaltenen Proteins die unspezifische Bindung der Antikörper und somit letztlich eine Hintergrundfärbung verhindert.
- Inkubation mit dem ersten Antikörper und der jeweils in Tabelle 3-2 angegebenen Verdünnung und Dauer
Für die spätere Auswertung der Schnitte war es wichtig eine möglichst gut zu unterscheidende Abstufung der Farbreaktion zu erzielen. Um dies zu erreichen wurde in zuvor durchgeführten Probefärbungen für jeden Antikörper die optimale Verdünnung ermittelt. Da sowohl die Mengen der vorhandenen Proteine als auch die Bindeeigenschaften der Antikörper selbst stark variierten, kam für jeden Antikörper eine eigene Verdünnung zum Einsatz.
- Waschen der Schnitte in PBS für 2 x 10 min
- Platzierung der Objekträger im speziellen Färbegestell für Objekträger
- Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 30 min

- Waschen der Schnitte in PBS für 2 x 5 min
- Inkubation der Schnitte mit jeweils 3 Tropfen der HRP-Konjugatlösung für 20 min
- Waschen der Schnitte in PBS für 2 x 5 min
- Inkubation der Schnitte mit AEC-Lösung für 5 min
- Waschen der Schnitte in PBS für 2 x 5 min
- Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin (Mayers Hämalaunlösung) für 1 s
- Waschen der Schnitte mit fließendem Leitungswasser
- Eindecken der Schnitte mit Aqueous Mount
- Abdecken der Schnitte jeweils mit einem Deckglas
- Trocknung der Schnitte bei Raumtemperatur über Nacht

3.4.2 Auswertung der Tumorschnitte

Die Intensität und die prozentuale Menge der gefärbten Zellen in den immunhistochemisch gefärbten Schnitten wurde mittels eines zuvor festgelegten Punkteschemas ausgewertet. Primär angefarbte Strukturen sowie die Lokalisation der gefärbten Zellen im Schnitt wurden ebenfalls über ein zuvor festgelegtes Schema ermittelt. Zur Auswertung wurde ein Lichtmikroskop Axioskop 2 plus mit den Objektiven Plan-Neofluar 10x/0,30 und 20x/0,50 der Firma Zeiss verwendet. Die Fotos wurden mit Hilfe der Kamera AxioCam MRc5 sowie dem Computerprogramm Axiovision AxioVs40 V4.6.3.0 erstellt (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, 81379 München).

Der Auswertung von Intensität und Menge der Färbung lag folgendes in Tabelle 3-5 dargestelltes Schema zu Grunde:

Tabelle 3-5: Auswertungsschema Intensität und Menge

Intensität der Färbung		Menge der gefärbten Zellen im vitalen Tumorgebiet	
0	keine	0	0%
1	sehr schwach	1	<10%
2	schwach	2	10-25%
3	mittel	3	25-50%
4	stark	4	50-80%
5	sehr stark	5	80-100%

Zur Auswertung der primär gefärbten Strukturen sowie der Lokalisation gefärbter Zellen wurden folgende Abkürzungen verwendet (Tabelle 3-6):

Tabelle 3-6: Auswertungsschema Färbung und Lokalisation

Färbung = primär angefarbte Strukturen		Lokalisation der gefärbten Zellen im Tumorschnitt	
T	Tumorzellen (Zytoplasma)	P	Peripherie
S	Stroma	S	Stroma umgebend
EZR	Extrazellularraum	T	Tumorzellverbund
E	Endothelzellen	Tn	um Nekrose
		Tk	in keratinisierenden Tumornestern

Zusätzlich wurde noch auf eventuelle Hintergrundfärbung der Schnitte geachtet und diese entweder mit stark, mittel oder gering bis keine beurteilt.

3.5 Zusätzliche Materialien

Alle zusätzlich verwendeten Materialien werden in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Zusätzliche Materialien

Eppendorf Research Pipette 1µl, 2,5µl, 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf Zentrale, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf Zentrale, Hamburg, Deutschland
Biohit Proline 50 Mehrkanalpipette 300µl	Biohit Deutschland GmbH, Rosbach v. d. Höhe, Deutschland
Eppendorf epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen 0,5-20µl, 20-300µl, 50-1000µl	Eppendorf Zentrale, Hamburg, Deutschland
Sarstedt Pipettenspitzen 200µl gelb	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Combitips plus 0,1ml, 1ml, 10ml	Eppendorf Zentrale, Hamburg, Deutschland
Falcon Glaspipette Serological Pipet 1ml, 2ml, 5ml, 20ml, 50ml	Becton Dickinson France S.A.S BD, Le Pont-de-Claix, Frankreich
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 / 2 ml	Eppendorf Zentrale, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Standard Reaktionsgefäß 3810X 1,5 ml	Eppendorf Zentrale, Hamburg, Deutschland
Nalgene Cryoware Cryogenic Vials	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark

TPP Zentrifugenröhrchen 15ml konisch	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Falcon BlueMax 50ml conical tube	Becton Dickinson France S.A.S BD, Le Pont-de-Claix, Frankreich
B.Braun Omnifix 50ml Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
TPP Spritzen- / Syringe-Filter 0,22 µm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Schüttelapparat mit Kreisbewegungen GFL-3017	hilab.de, E. Baghini, Düsseldorf, Deutschland
Ohaus AS60 Analytical Standard Waage	Ohaus, Pine Brook, NJ, USA
Sempercare Edition Handschuhe	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H., Wien, Österreich

3.6 Statistik

Die Datenbank für diese Arbeit wurde mit Hilfe des PC-Programms Microsoft Excel 97 und 2007[®] (Microsoft Corporation) erstellt. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 10.0[®] (SPSS Software Inc.). Zum Vergleich der jeweiligen Werte unter Bestrahlung mit den Ausgangswerten wurde ein T-Test verwendet, um Korrelationen zwischen zwei variablen Werten aufzuzeigen verwendeten wir den Korrelationskoeffizient nach Pearson. Als generelles Signifikanzniveau wurden folgende Werte definiert: Ein Wert von $p \leq 0,05$ wird als signifikant angenommen, Werte von $p > 0,05$ hingegen als nicht signifikant. In den folgenden Abbildungen sind die im T-Test gefundenen signifikanten Änderungen in Konzentration, Intensität und Menge der Antigene ($p \leq 0,05$) mit einem Stern (*) gekennzeichnet, besonders signifikante ($p \leq 0,01$) mit zwei Sternen (**) und höchst signifikante ($p \leq 0,001$) mit drei Sternen (***). Die Sterne tragen hierbei die Farbe ihrer zugehörigen Tumورlinie. Die Abbildungen und Tabellen wurden mittels Word 2007[®], Excel 2007[®] und PowerPoint 2007[®] (Microsoft Corporation) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Tumorlysate

Insgesamt standen 163 Tumorstücke zur Verfügung, die allesamt lysiert wurden. Hiervon entfielen jeweils 54 Proben auf die Tumorklinie UT-SCC-15, 56 auf UT-SCC-14 und 53 Tumorstücke stammten von der FaDu_{DD}-Linie.

In die Ergebnisse und die statistische Auswertung wurden nur Tumorproben aufgenommen für die jeweils alle drei (uPA, PAI-1, VEGF) Antigenkonzentrationen ermittelt werden konnten. Dies gelang leider nicht immer, da besonders bei hochbestrahlten Tumorstücken die Menge an gewonnenem Tumorlysat aufgrund von großen nekrotischen Arealen wiederholt nicht ausreichte, um im ELISA-Test eine geeignete Probenkonzentration wählen zu können.

In die endgültige Auswertung gingen 145 Tumorproben ein. Tabelle 4-1 zeigt ihre Verteilung nach Tumorklinien sowie der jeweiligen Bestrahlungsdosis.

Tabelle 4-4-1: Verteilung der in die Auswertung eingehenden Tumorlysate nach Bestrahlung und Zelllinie

	Gesamt- anzahl n	Anzahl pro Bestrahlungsdosis in Gy				
		0	6	10	20	30
UT-SCC-15	49	13	12	10	8	6
UT-SCC-14	48	9	10	13	11	5
FaDu_{DD}	48	11	13	8	10	6
Gesamt	145	33	35	31	29	17

Mittels ELISA-Test wurden die Antigenkonzentrationen im Tumorlysat der drei Zelllinien, inklusive der Mittelwerte und Standardabweichungen bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen ermittelt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse für uPA (Abb. 4-1), PAI-1 (Abb. 4-2) und VEGF (Abb. 4-3) aller drei Tumorklinien bei jeweils 0, 6, 10, 20 und 30 Gy. Es wird die dazugehörige Trendlinie (Korrelationskoeffizient nach Pearson) in der der Tumorklinie entsprechenden Farbe dargestellt (gestrichelte Linie). Im T-Test

ermittelte signifikante Konzentrationsänderungen unter steigenden Bestrahlungsdosen werden als Sterne in der jeweiligen Tumorfarbe dargestellt (zur Erklärung siehe auch 3.6).

4.1.1 uPA

Der folgenden Abbildung kann man für jede Tumورlinie die uPA-Konzentration (Mittelwert +/- SEM) bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen entnehmen (Abb. 4-1). Ebenso wird die Korrelation zwischen uPA-Werten und steigenden Bestrahlungswerten dargestellt.

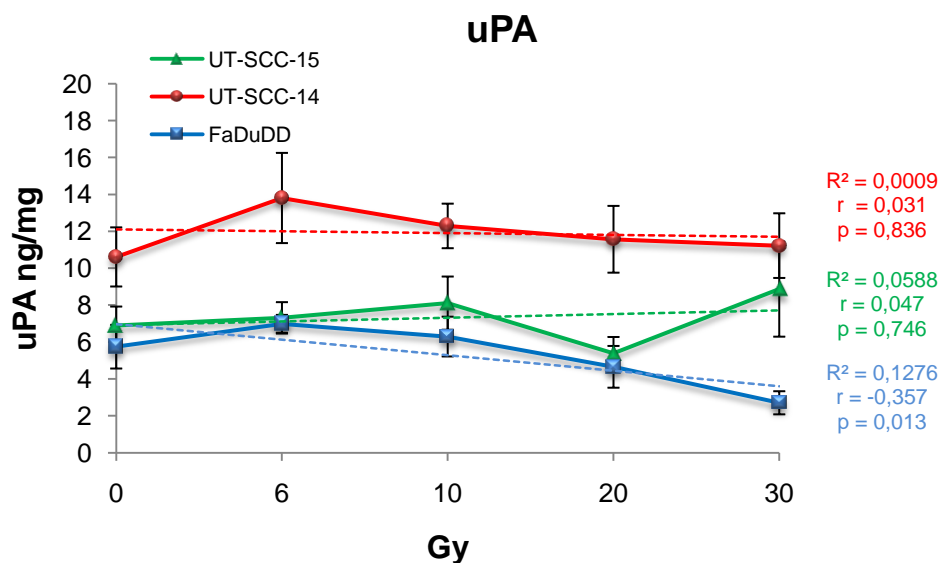


Abbildung 4-1: Korrelation zwischen den mittleren uPA-Konzentrationen der drei Tumورlinien und der Bestrahlungsdosis; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Zunächst untersuchten wir ob zwischen den Bestrahlungsdosen der Tumورlinien und den uPA-Werten eine Korrelation besteht. Bei den Proben der Tumورlinie FaDu_{DD} konnte eine signifikante ($p = 0,013$), jedoch schwache Korrelation der uPA-Konzentration mit den jeweiligen Strahlendosen nachgewiesen werden. Höhere Bestrahlungsdosen korrelierten hierbei mit niedrigeren uPA-Werten. Die Tumورlinien UT-SCC-14 und UT-SCC-15 zeigten keinerlei signifikante Korrelation zwischen Bestrahlungsdosen und uPA-Werten.

Bei der weiteren statistischen Auswertung der erhobenen uPA-Werte konnte mittels T-Test bei keiner der drei Tumورlinien eine signifikante Veränderung

beim Vergleich von bestrahlten und unbestrahlten Proben gefunden werden (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: T-Test der uPA-Konzentration der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,761	0,489	0,324	0,40
UT-SCC-14	0,301	0,404	0,704	0,812
FaDu _{DD}	0,349	0,745	0,515	0,092

4.1.2 PAI-1

Der folgenden Abbildung kann man für jede Tumorzelllinie die mittlere PAI-1-Konzentration (Mittelwert +/- SEM) bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen entnehmen (Abb. 4-2). Ebenso wird die Korrelation zwischen den PAI-1-Werten und steigenden Bestrahlungswerten dargestellt.

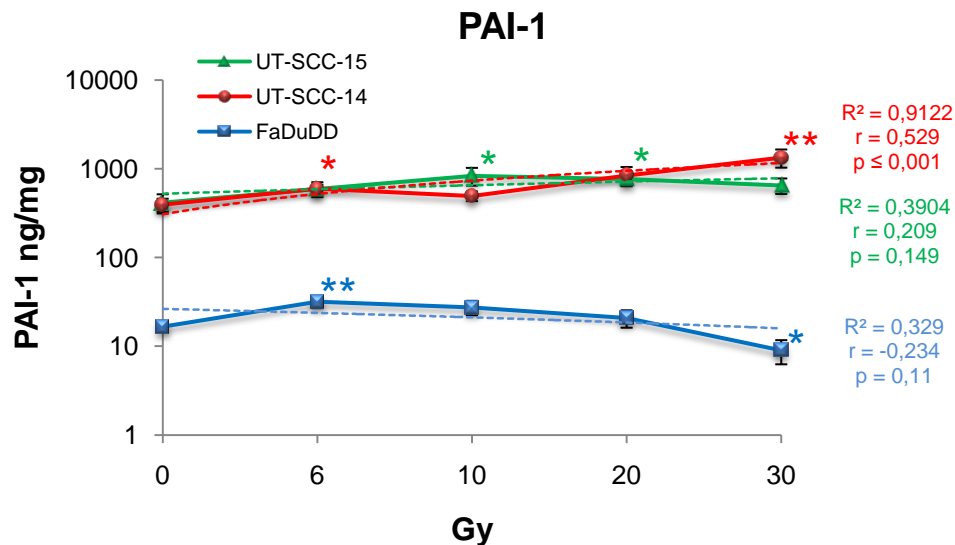


Abbildung 4-2: Korrelation zwischen den mittleren PAI-1-Konzentrationen der drei Tumorzelllinien und der Bestrahlungsdosis; Logarithmische Darstellung; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Bei den Proben der Tumorzelllinie UT-SCC-14 konnte eine signifikante ($p \leq 0,001$) Korrelation der PAI-1-Konzentration mit den jeweiligen Strahlendosen nachgewiesen werden (Abb. 4-2). Bei hohen Bestrahlungsdosen stieg hier die ermittelte PAI-1-Menge stark an. Die Tumorzelllinien FaDu_{DD} sowie UT-SCC-15

zeigten keinerlei signifikante Korrelation zwischen PAI-1-Konzentrationen und Bestrahlungsdosen. Bei der weiteren statistischen Auswertung der erhobenen PAI-1-Daten ergaben sich beim T-Test signifikante Veränderungen ($p \leq 0,05$) zwischen unbestrahlten und bestrahlten Tumoren für UT-SCC-15, UT-SCC-14 und FaDu_{DD} (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: T-Test der PAI-1-Konzentration der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,253	0,05	0,042	0,193
UT-SCC-14	0,039	0,291	0,074	0,002
FaDu _{DD}	0,01	0,079	0,423	0,034

4.1.3 VEGF

Der folgenden Abbildung kann man für jede Tumorlinie die VEGF-Konzentration (Mittelwert +/- SEM) bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen entnehmen (Abb. 4-3). Ebenso wird die Korrelation zwischen den VEGF-Werten und steigenden Bestrahlungswerten dargestellt.

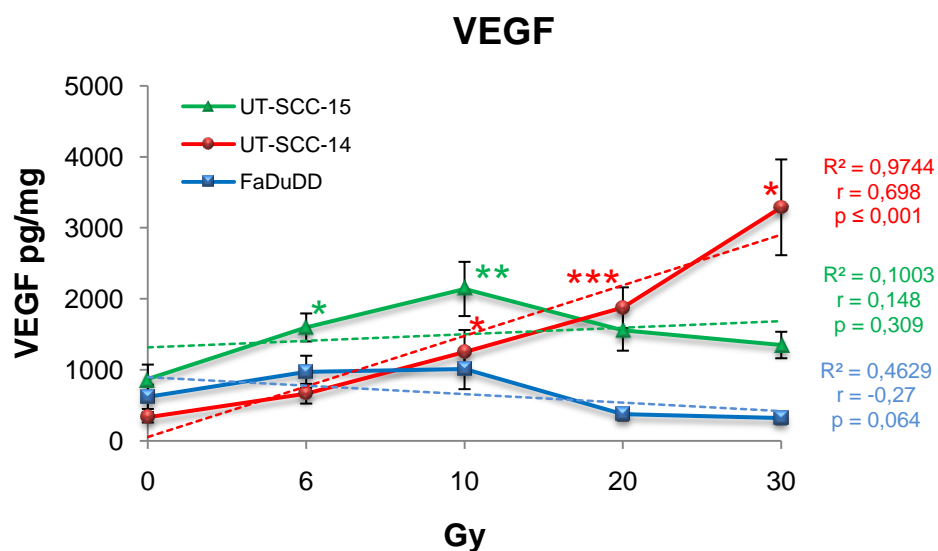


Abbildung 4-3: Korrelation zwischen den mittleren VEGF-Konzentrationen der drei Tumorlinien und der Bestrahlungsdosis; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Bei den Proben der Tumorklinie UT-SCC-14 konnte eine signifikante ($p \leq 0,001$) Korrelation der VEGF-Konzentration mit den jeweiligen Strahlendosen nachgewiesen werden (Abb. 4-3). Hohe Bestrahlungsdosen gehen bei dieser Tumorklinie mit erhöhten VEGF-Werten einher. Die Tumorklinien UT-SCC-15 und FaDu_{DD} zeigten keinerlei signifikante Korrelation zwischen VEGF-Konzentrationen und Bestrahlungsdosen.

Die weitere statistische Auswertung der VEGF-Daten ergab signifikante Veränderungen zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben für die Tumorklinien UT-SCC-15 und UT-SCC-14 ($p \leq 0,05$). FaDu_{DD} zeigte keinerlei signifikante Veränderungen (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: T-Test der VEGF-Konzentration der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,018	0,005	0,06	0,162
UT-SCC-14	0,057	0,013	0,000	0,011
FaDu_{DD}	0,24	0,227	0,221	0,143

4.1.4 Weitere Statistik

Im weiteren Verlauf der statistischen Auswertung wurde nach Korrelationen der Antigene untereinander gesucht. Im Rahmen dieser Auswertung konnte statistisch nachgewiesen werden, dass bei allen drei Tumorklinien die Konzentrationen von VEGF mit denen von PAI-1 signifikant korrelierten (UT-SCC-15 $p \leq 0,001$; UT-SCC-14 $p \leq 0,001$; FaDu_{DD} $p = 0,002$) (Abb. 4-4). Dargestellt sind alle erhobenen Einzelwerte der jeweiligen Tumorklinie sowie deren Trendlinien, die sich aufgrund der logarithmischen Skalen als leicht gebogen zeigen.

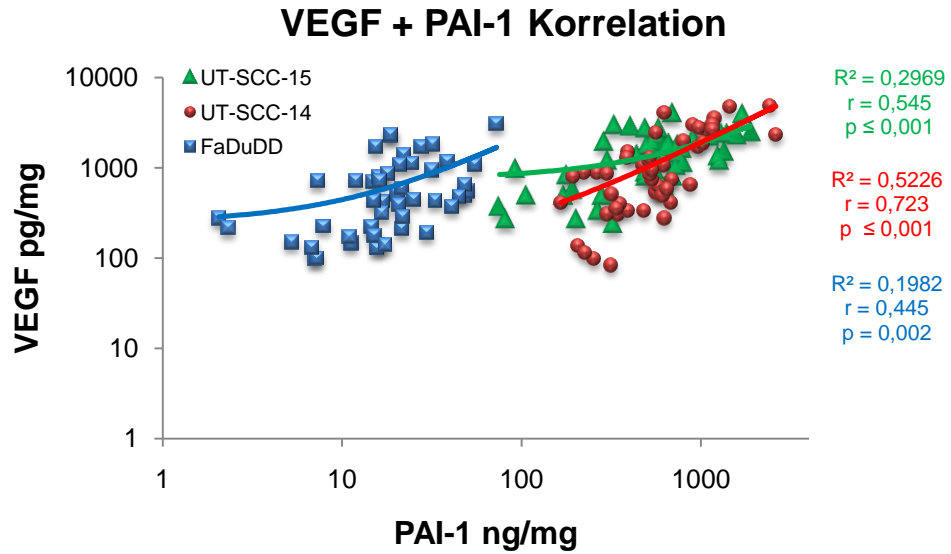


Abbildung 4-4: Korrelation der VEGF- und der PAI-1-Konzentrationen; Einzelwerte und Trendlinien dargestellt; logarithmische Darstellung

Weitere signifikante Korrelationen zwischen uPA und PAI-1 sowie uPA und VEGF konnten nur für FaDu_{DD} nachgewiesen werden ($p \leq 0,001$) (Abb. 4-5, 4-6).

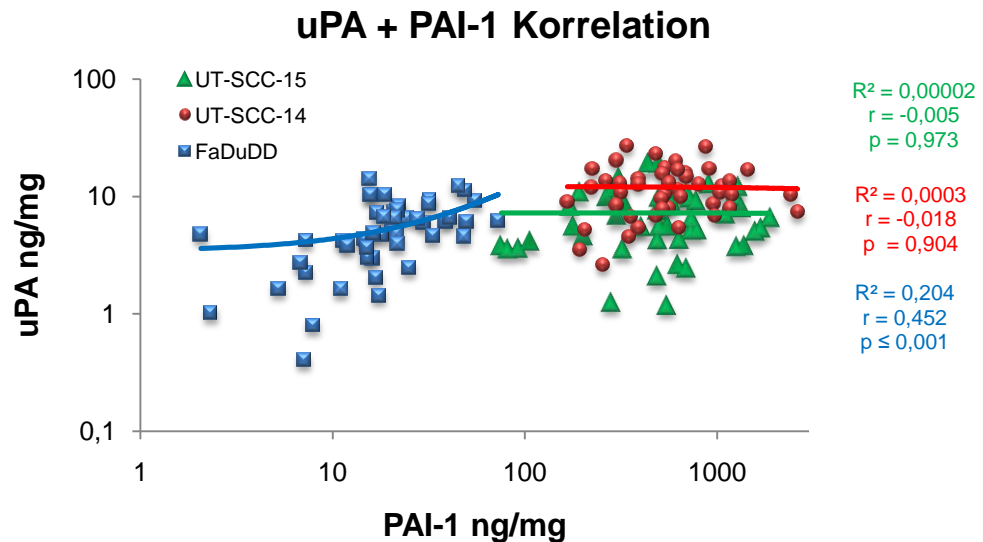


Abbildung 4-5: Korrelation der uPA- und PAI-1-Konzentrationen; Einzelwerte und Trendlinien dargestellt; logarithmische Darstellung

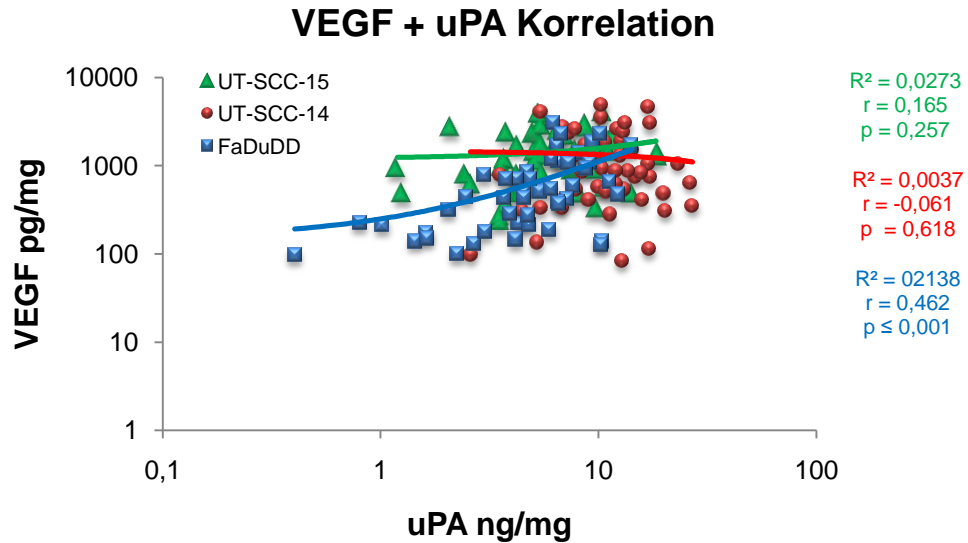


Abbildung 4-6: : Korrelation der VEGF- und uPA-Konzentrationen; Einzelwerte und Trendlinien dargestellt; logarithmische Darstellung

4.2 Tumorschnitte

4.2.1 Allgemeines

Insgesamt wurden circa 1200 histologische Schnitte gefärbt, die allesamt mikroskopisch untersucht wurden. In die endgültige Auswertung flossen 803 Schnitte ein (n = 803), deren Verteilung auf die jeweilige Tumorklinie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist (Tabelle 4-5). Die Herstellung und die Verarbeitung der Tumorschnitte wurde unter Punkt 3.4 ausgiebig dargestellt.

Tabelle 4-5: Verteilung der in die Auswertung eingehenden Tumorschnitte nach Bestrahlung und Zelllinie

	Gesamt- anzahl n	Anzahl pro Bestrahlungsdosis in Gy				
		0	6	10	20	30
UT-SCC-15	272	78	72	61	44	17
UT-SCC-14	277	65	78	75	40	19
FaDu_{DD}	254	69	78	45	46	16
Gesamt	803	212	228	181	130	52

Alle drei Tumorklinien zeigten wiederholt Schnitte die deutlich blässer als der Durchschnitt erschienen. Zugrunde lag eine generell geringere Farbaufnahme dieser Schnitte während des Färbeprozesses. Dies trat vor allem bei Schnitten der FaDu_{DD}-Zelllinie auf, seltener bei UT-SCC-14 und UT-SCC-15. Eine Ursache hierfür konnte nicht gefunden werden, so dass dieses Phänomen wohl am ehesten durch äußere Einflüsse während des stör anfälligen Schneideprozesses zu erklären ist.

Zudem fanden sich in allen drei Tumorklinien zum Teil Schnitte die trotz geringer bzw. gar keiner Vorbestrahlung große nekrotische Areale zeigten und daher aufgrund der wenigen vitalen Zellen schwierig zu beurteilen waren. In diesen Schnitten sowie zusätzlich bei den hochbestrahlten (20 bzw. 30 Gy) Tumorschnitten flossen daher häufig nur sehr wenige Tumorzellen in die Bewertung ein.

4.2.2 Histologie

4.2.2.1 Lokalisation der Färbung

Es sei zunächst darauf hingewiesen, dass sich der Terminus "Lokalisation" in dieser Arbeit stets auf die örtliche Anordnung der gefärbten Strukturen im Tumorschnitt bezieht.

Die folgenden Abbildungen zeigen Färbungen der Proteine uPA (Abb. 4-7), PAI-1 (Abb. 4-8) und VEGF (Abb. 4-9) unter verschiedenen Bestrahlungsdosen. Es wurde bei jeder Tumorklinie darauf geachtet bei den unterschiedlichen Färbungen den jeweils gleichen Bereich des Tumorschnitts zu fotografieren, um einen bestmöglichen Vergleich der Färbungen zu ermöglichen.

Auf die Darstellung der mit 30 Gy Gesamtdosis bestrahlten Schnitte wurde verzichtet, da diese allesamt große nekrotische Areale zeigten und somit ein aussagekräftiger Vergleich nicht möglich war.

uPA

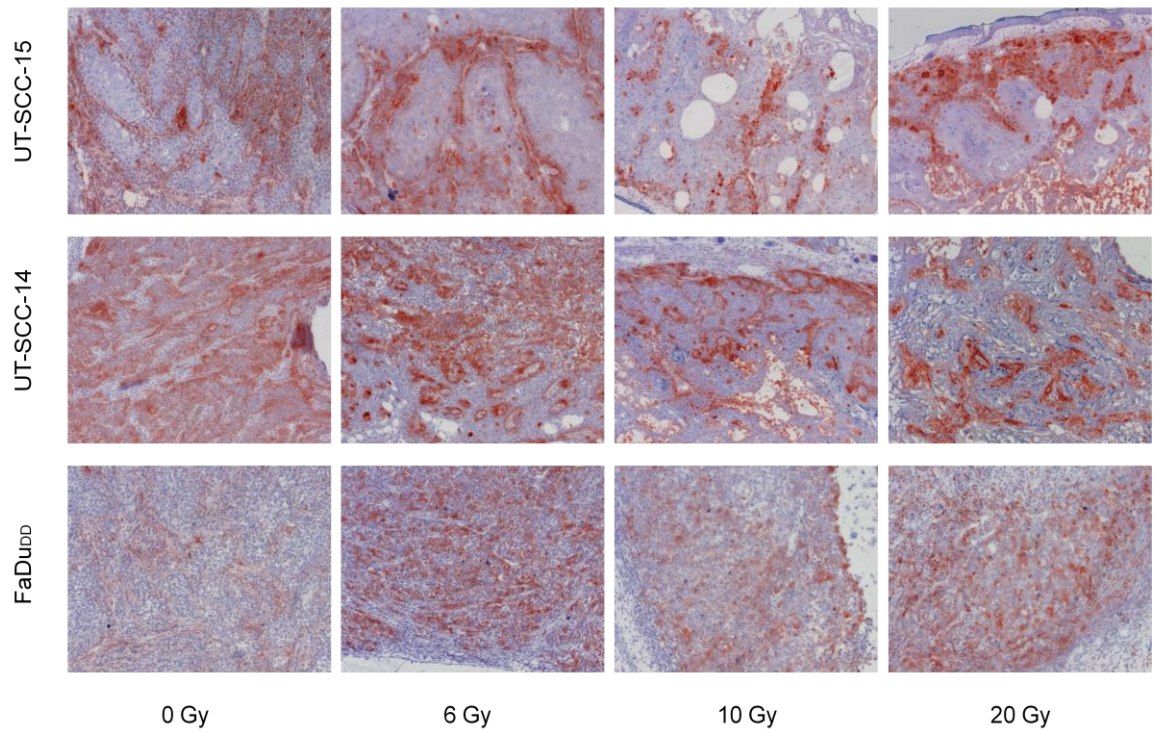


Abbildung 4-7: Histologische Darstellung der uPA-Färbung der drei Tumorlinien unter verschiedenen Bestrahlungsdosen; 63-fache Vergrößerung

PAI-1

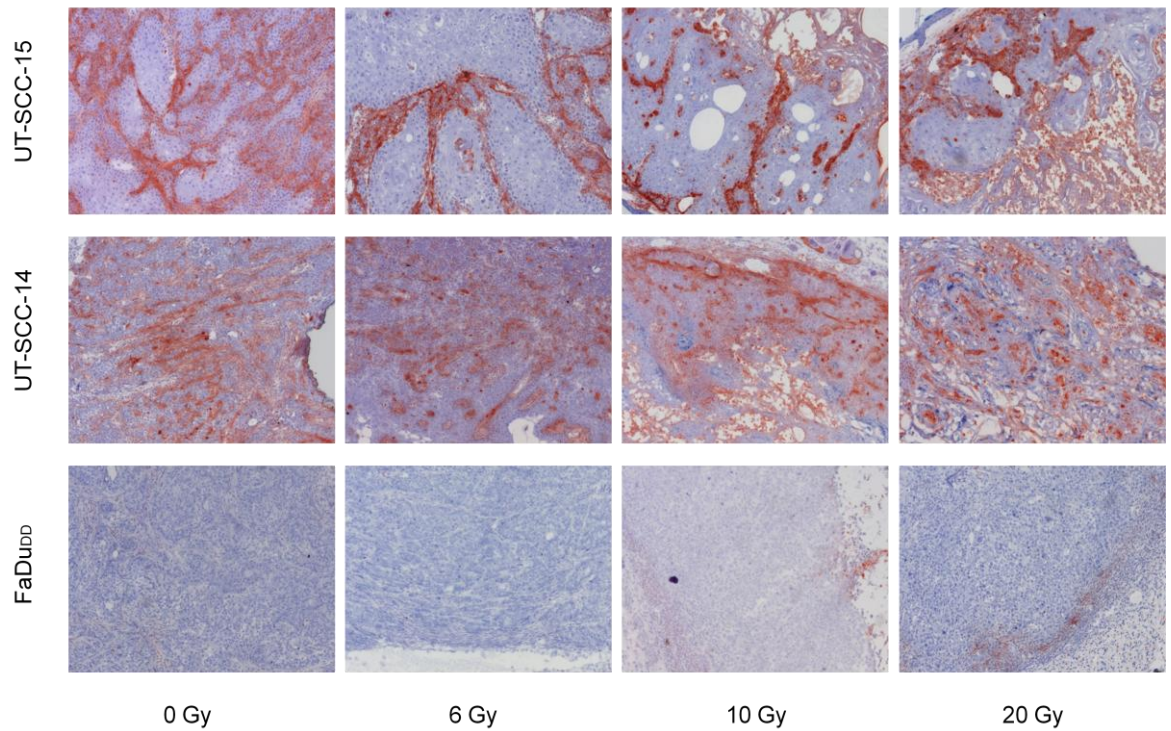


Abbildung 4-8: Histologische Darstellung der PAI-1-Färbung der drei Tumorlinien unter verschiedenen Bestrahlungsdosen; 63-fache Vergrößerung

VEGF

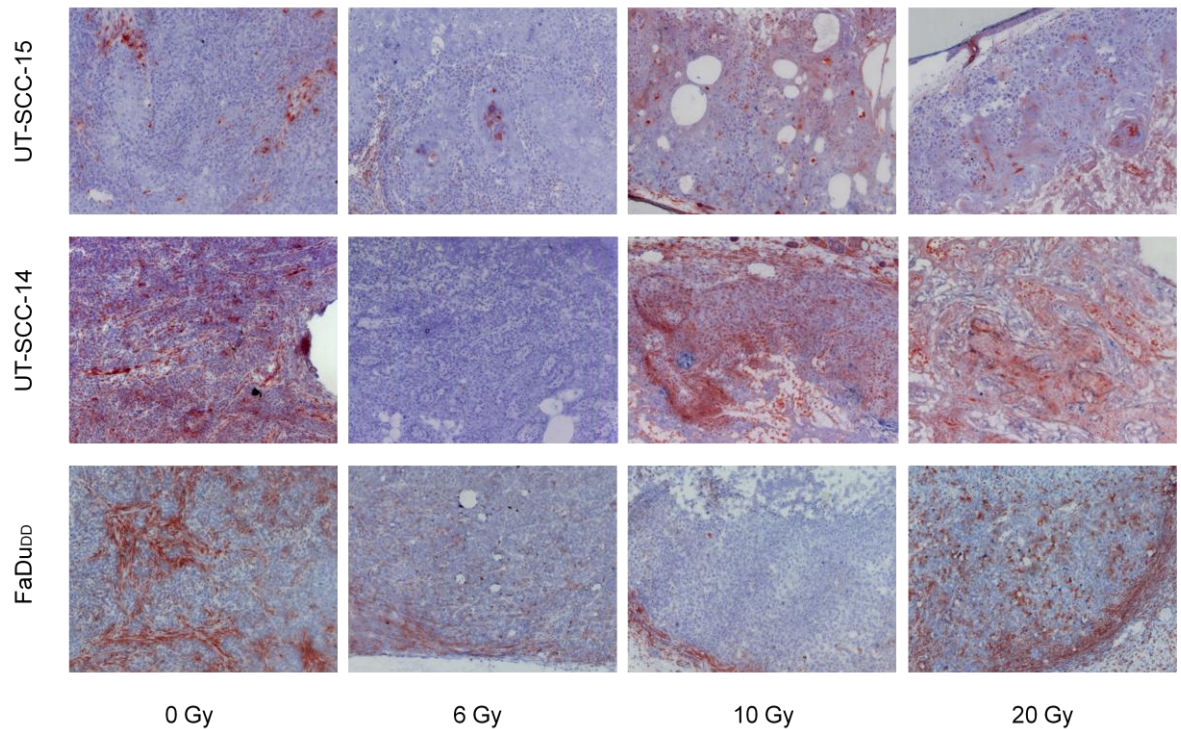


Abbildung 4-9: Histologische Darstellung der VEGF-Färbung der drei Tumorlinien unter verschiedenen Bestrahlungsdosen; 63-fache Vergrößerung

In den Tabellen und Abbildungen dieses Abschnitts wurden die unterschiedlichen Lokalisationen der gefärbten Strukturen und Kombinationen aus ihnen wie folgt abgekürzt: Tumorzellverbund (T), Peripherie (P), Stroma (S), um nekrotisierte Areale gelegen (T_n), um/in Keratinnestern (T_k).

uPA

Bei Betrachtung der uPA-Färbungen zeigte sich ein deutliches Färbemuster, im Sinne einer gut abgrenzbaren Anfärbung des Zytoplasmas von Tumorzellen, die in allen drei untersuchten Tumorlinien deutlich zu erkennen war. Bei UT-SCC-15 und FaDu_{DD} kam es vereinzelt zusätzlich zur Anfärbung einiger weniger stromaler Zellen.

Die Lokalisation der uPA-Färbung betreffend zeigten sich bei allen drei Tumorlinien deutliche Unterschiede:

UT-SCC-15 zeigte eine vorwiegend in der Peripherie der Tumoren lokalisierte sowie bei geringen Bestrahlungsdosen (0 - 10 Gy) teils auch eine das Stroma

(S) als Randsaum umgebende Färbung. Zusätzlich fanden sich mit Regelmäßigkeit auch gefärbte Strukturen im Tumorzellverbund sowie in manchen Schnitten eine sowohl in der Peripherie als auch im Tumorzellverbund auftretende Färbung. In der folgenden Abbildung wird die prozentuale Verteilung der Lokalisationen bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen der Tumorklinie UT-SCC-15 deutlich gemacht (Abb. 4-10).

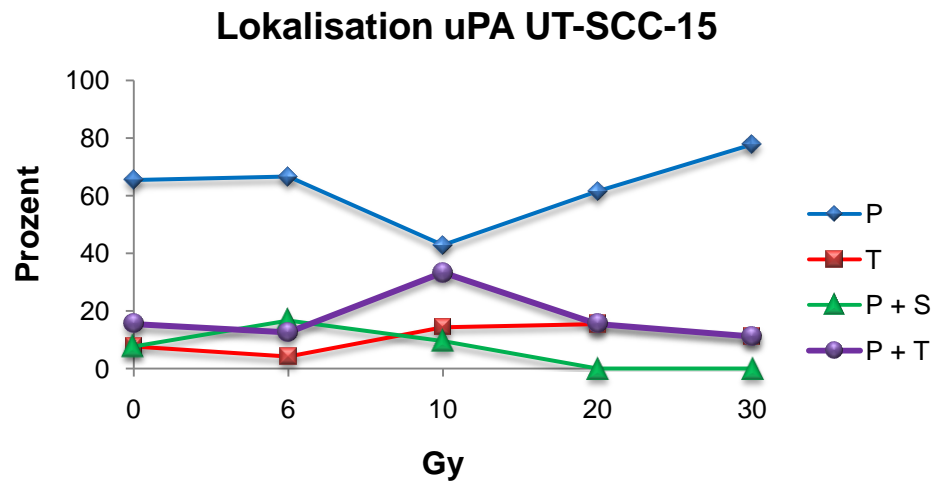


Abbildung 4-10: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von uPA-gefärbten Zellen der UT-SCC-15-Zelllinie; P = Peripherie, T = Tumorzellverbund, S = Stroma

Bei **UT-SCC-14** fanden sich, unabhängig von der Strahlendosis, gefärbte Strukturen vor allem in den vom Tumorzentrum aus gesehen peripher gelegenen Bereichen der Schnitte. Bei Tumoren die mit 0 bis 10 Gy bestrahlt wurden färbten sich zudem um das Stroma gelegene Strukturen und bildeten häufig einen Randsaum um das Stützgewebe. In der folgenden Abbildung ist die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Lokalisationen bei zunehmender Bestrahlungsdosis in der Tumorklinie UT-SCC-14 erkennbar (Abb. 4-11).

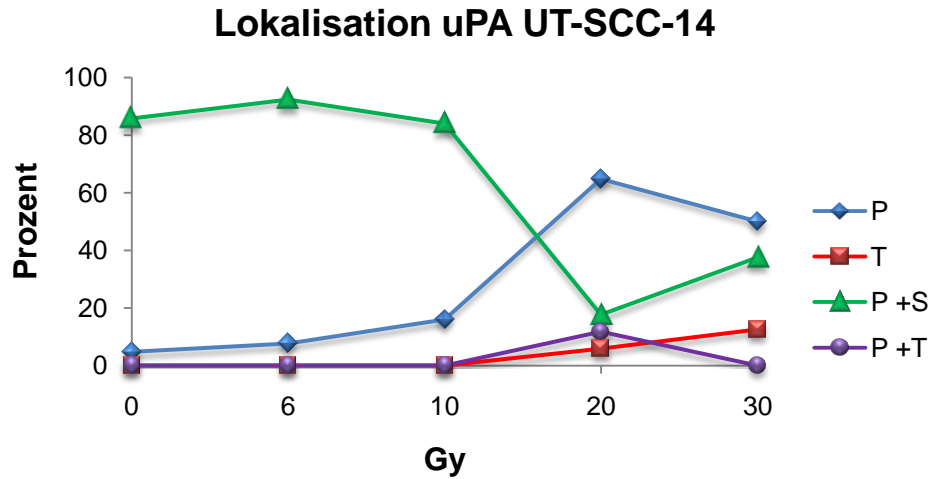


Abbildung 4-11: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von uPA-gefärbten Zellen der UT-SCC-14-Zelllinie; P = Peripherie, T = Tumorzellverbund, S = Stroma

FaDu_{DD} zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Tumorklinen eine beinahe ausschließlich im Tumorzellverbund gelegene Lokalisation der Färbung. Die bei UT-SCC-14 gefundene auffällige Färbung um die stromalen Strukturen fand sich hier in keinem Schnitt. In der Abbildung wird die prozentuale Verteilung der Lokalisationen bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen der Tumorklinie FaDu_{DD} deutlich gemacht (Abb. 4-12).

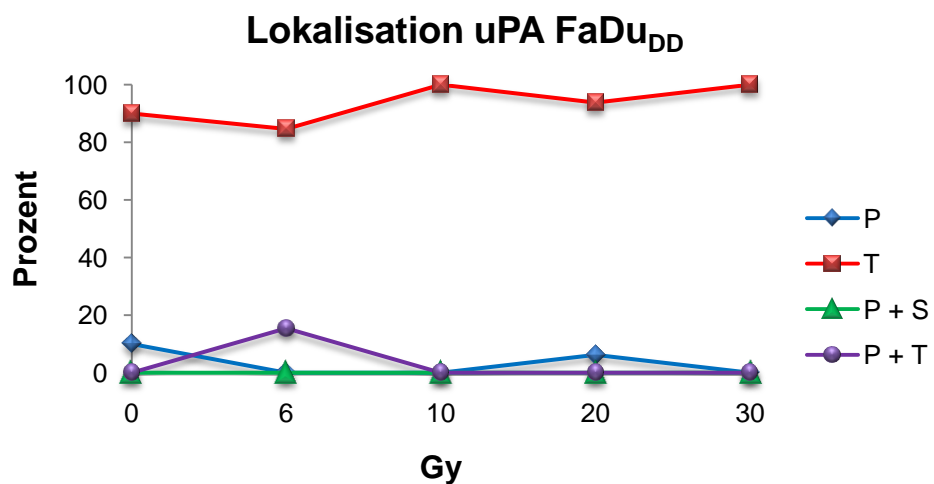


Abbildung 4-12: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von uPA-gefärbten Zellen der FaDu_{DD}-Zelllinie; P = Peripherie, T = Tumorzellverbund, S = Stroma

PAI-1

PAI-1 färbte bei den drei Tumorklinen vorwiegend die fibroblastären Zellen des Tumorstromas sowie die extrazelluläre Matrix des Tumors. Selten fanden sich bei UT-SCC-15 und UT-SCC-14 auch einige wenige angefärbte Tumorzellen.

Die angefärbten Zellen lagen bei den gegen PAI-1 gefärbten Schnitten ausschließlich im Tumorverbund, der Peripherie des Tumors oder einer Kombination aus beidem.

UT-SCC-15 zeigte bei unbestrahlten Tumoren ein ausgeglichenes Maß zwischen singularer Färbung der Peripherie und einer Kombination aus Färbung von Peripherie und Tumorverbund. Bei höheren Strahlendosen fand sich eine deutliche Zunahme der Kombination aus Peripherie- und Tumorverbundfärbung im Vergleich zur alleinigen peripheren Färbung. Die folgende Abbildung verdeutlicht dies, indem die prozentuale Verteilung der Lokalisationen der PAI-1-Färbung bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen der Tumorklinie UT-SCC-15 dargestellt wird (Abb. 4-13).

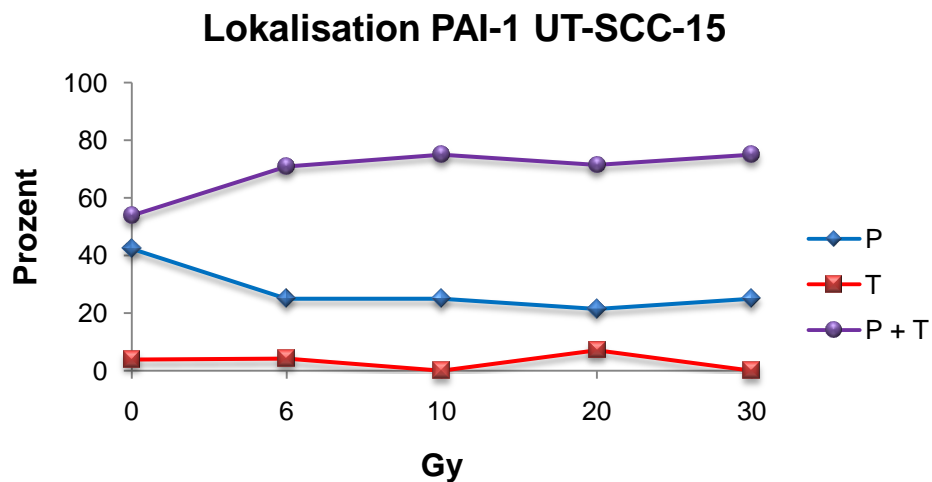


Abbildung 4-13: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von PAI-1-gefärbten Zellen der UT-SCC-15-Zelllinie; P = Peripherie, T = Tumorverbund

Bei **UT-SCC-14** zeigte sich bei unbestrahlten Schnitten vorwiegend PAI-1-Färbung im Tumorverbund und in der Peripherie. Bei höheren Strahlendosen verschob sich die Lokalisation der Färbung zunehmend Richtung Peripherie, bis

bei hochbestrahlten Schnitten (30 Gy) ausnahmslos eine Anfärbung in der Peripherie des Tumors zu finden war. In der folgenden Abbildung ist die prozentuale Aufteilung der Lokalisation der PAI-1-Färbung bei zunehmender Bestrahlungsdosis in der Tumorklinie UT-SCC-14 erkennbar (Abb. 4-14).

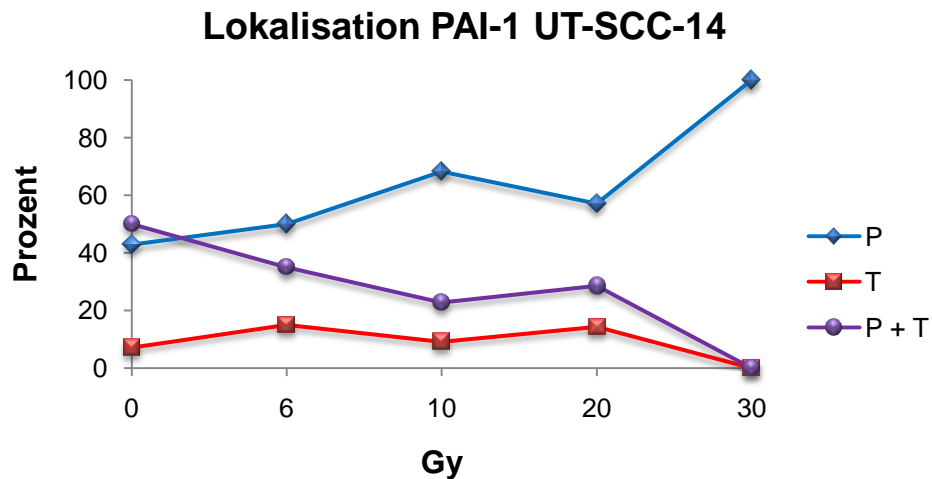


Abbildung 4-14: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von PAI-1-gefärbten Zellen der UT-SCC-14-Zelllinie; P = Peripherie, T = Tumorzellverbund

FaDu_{DD} zeigte bereits bei unbestrahlten und leicht bestrahlten Tumoren eine vorwiegende Färbung in der Peripherie des Tumors, bei hochbestrahlten (20 und 30Gy) fand sie sich ausschließlich dort. In der folgenden Abbildung wird die prozentuale Verteilung der Lokalisationen der PAI-1-Färbung bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen der Tumorklinie FaDu_{DD} veranschaulicht (Abb. 4-15).

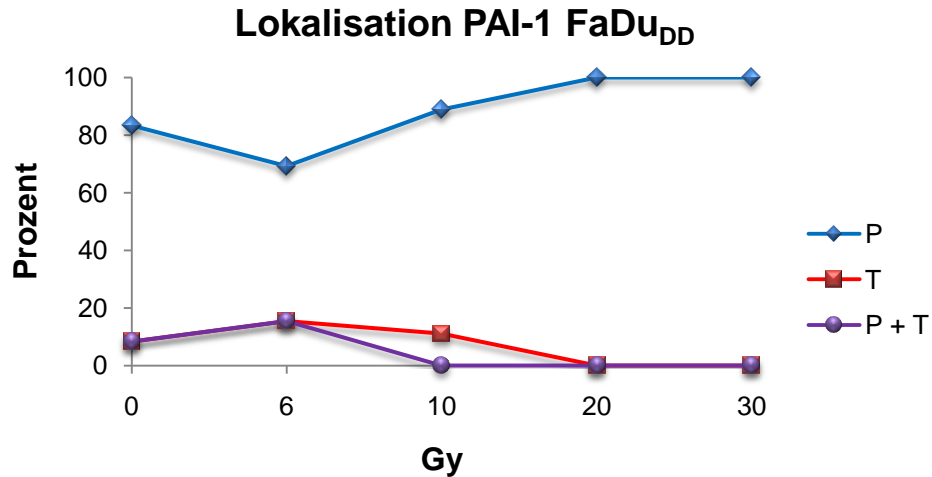


Abbildung 4-15: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von PAI-1-gefärbten Zellen der FaDu_{DD}-Zelllinie; P = Peripherie, T = Tumorzellverbund

Die PAI-1-Anfärbung von ausschließlich im Tumorverbund gelegener Strukturen ohne zusätzliche Färbung in der Peripherie nahm bei allen drei Zelllinien eine untergeordnete Rolle ein.

VEGF

Bei der Färbung der Schnitte auf VEGF wurde festgestellt, dass der Antikörper neben dem humanen VEGF auch Strukturen des Wirtstiers anfärbte. Mittels einer Färbung mit gegen Mausgewebe gerichteten Antikörpern konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich bei den gefärbten Strukturen nicht um Mausgewebe handelt, sondern um mausspezifisches VEGF.

Die VEGF-Färbung zeigte bei 63-facher Vergrößerung ein über den Tumorzellverbund verteiltes, gepunktetes Muster. Bei 126-facher Vergrößerung konnte man unter dem Mikroskop häufig fingerartige Ausziehungen dieser punktförmigen Färbung erkennen. Als vorwiegend gefärbte Strukturen zeigten sich bei den drei Zelllinien die Tumorzellen (Zytosol), Anteile der extrazellulären Matrix und gelegentlich Endothelzellen bzw. die im Stroma gelegenen fibroblastären Zellen.

Bei **UT-SCC-15** fand sich überwiegend eine Lokalisation der VEGF-Färbung im Tumorverbund. Unter geringen Bestrahlungswerten von 0 und 6 Gray sowie auch bei 30 Gray fiel zusätzlich eine Färbung in keratinisierenden Tumorzellbereichen auf. Häufig fand sich die intensivste Färbung dieser Schnitte in

diesen Keratinnestern. Da es sich jedoch um zumeist fraglich vitale Tumorzellbereiche handelte, mussten diese Bereiche nicht selten von der Bewertung ausgeschlossen werden. In der folgenden Abbildung wird die prozentuale Verteilung der Lokalisationen der VEGF-Färbung bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen der Tumorzelllinie UT-SCC-15 gezeigt (Abb. 4-16).

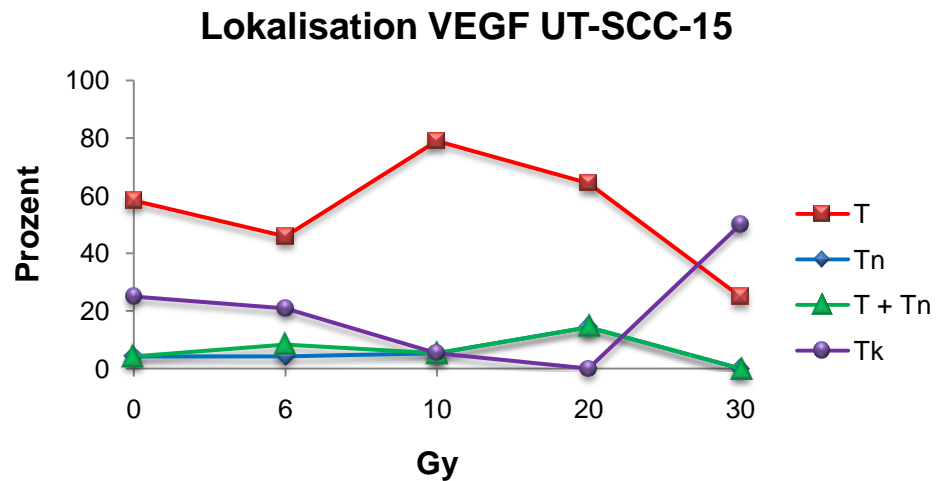


Abbildung 4-16: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von VEGF-gefärbten Zellen der UT-SCC-15-Zelllinie; T = Tumorzellverbund, T_n = um Nekrose gelegen, T_k = in keratinisierten Tumornestern gelegen

UT-SCC-14 zeigte zwar ebenfalls eine Färbung im Tumorzellverbund, jedoch war diese im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien geringer. Die hauptsächliche Färbung fand sich hier in Bereichen in denen vitale Tumorzellen von bereits nekrotischen Arealen umgeben waren. Zusätzlich erschien diese Färbung im Vergleich zur sich im Tumorverbund findenden gepunkteten Färbung eher gleichmäßig und flächiger, wenn auch scharf begrenzt. Dies fiel nur bei geringen Bestrahlungswerten von 0 bis 10 Gy auf. Die prozentuale Verteilung der Lokalisation der VEGF-Färbung für UT-SCC-14 ist der folgenden Abbildung zu entnehmen (Abb. 4-17).

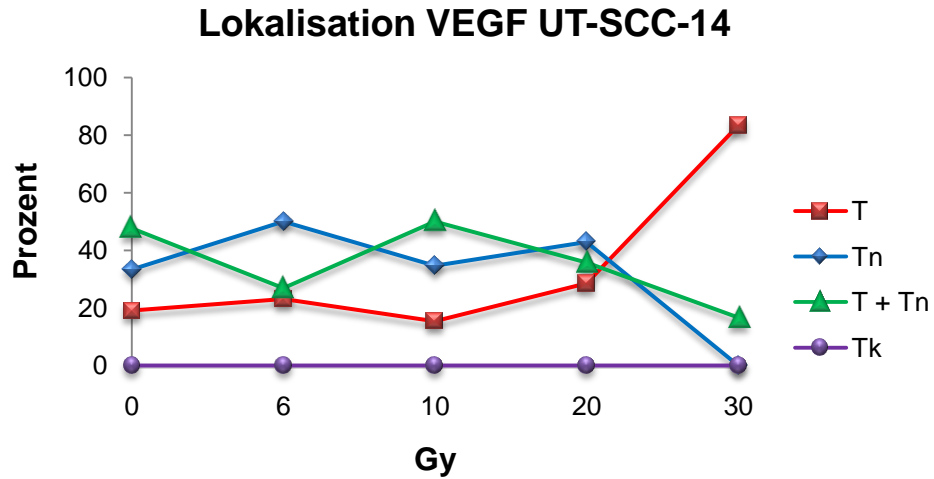


Abbildung 4-17: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von VEGF-gefärbten Zellen der UT-SCC-14-Zelllinie; T = Tumorzellverbund, T_n = um Nekrose gelegen, T_k = in keratinisierten Tumornestern gelegen

Bei **FaDu_{DD}** zeigte sich die Lokalisation der VEGF-Färbung beinahe ausschließlich im Tumorverbund. In der folgenden Abbildung ist die prozentuale Verteilung der Lokalisationen der VEGF-Färbung bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen der Tumorklinie FaDu_{DD} dargestellt (Abb. 4-18).

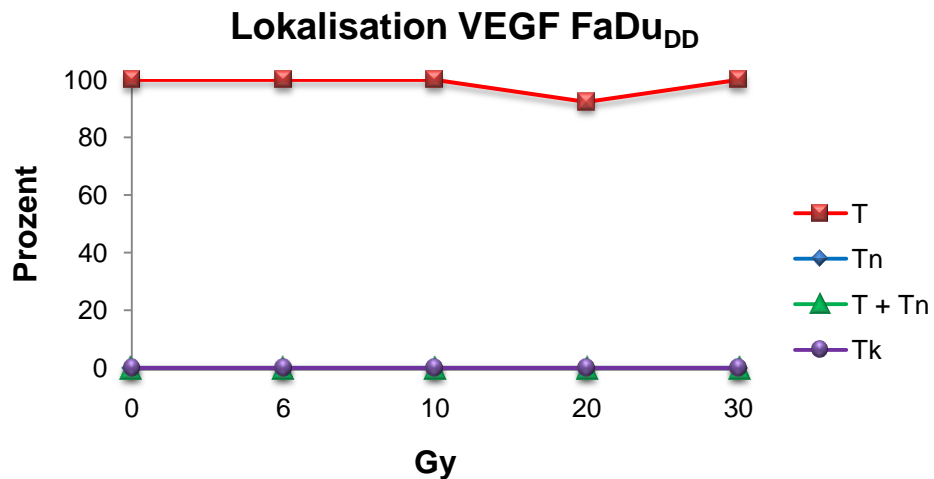


Abbildung 4-18: Prozentuale Verteilung der Lokalisation von VEGF-gefärbten Zellen der FaDu_{DD}-Zelllinie; T = Tumorzellverbund, T_n = um Nekrose gelegen, T_k = in keratinisierten Tumornestern gelegen

4.2.2.2 Intensität der Färbung

Als Intensität wurde die Stärke der Farbwiedergabe im histologischen Schnitt bezeichnet. Je stärker sich diese über den Schnitt gemittelt darstellte, umso höher wurde die Intensität bewertet. Eine Darstellung des Bewertungsschemas findet sich unter Punkt 3.4.2.

uPA

In der Intensität der uPA-Färbung ließ sich bei allen drei Tumorklinen mit zunehmender Bestrahlungsdosis ein Anstieg erkennen (Abb. 4-19). Steigende Bestrahlungsdosen korrelierten hierbei signifikant ($p \leq 0,001$) mit einer Intensitätszunahme der uPA-Färbung. Die Mittelwerte von UT-SCC-14 lagen hierbei geringfügig höher als die von UT-SCC-15. FaDu_{DD} zeigte im Vergleich mit UT-SCC-15 und UT-SCC-14 die geringste Intensität der Färbung.

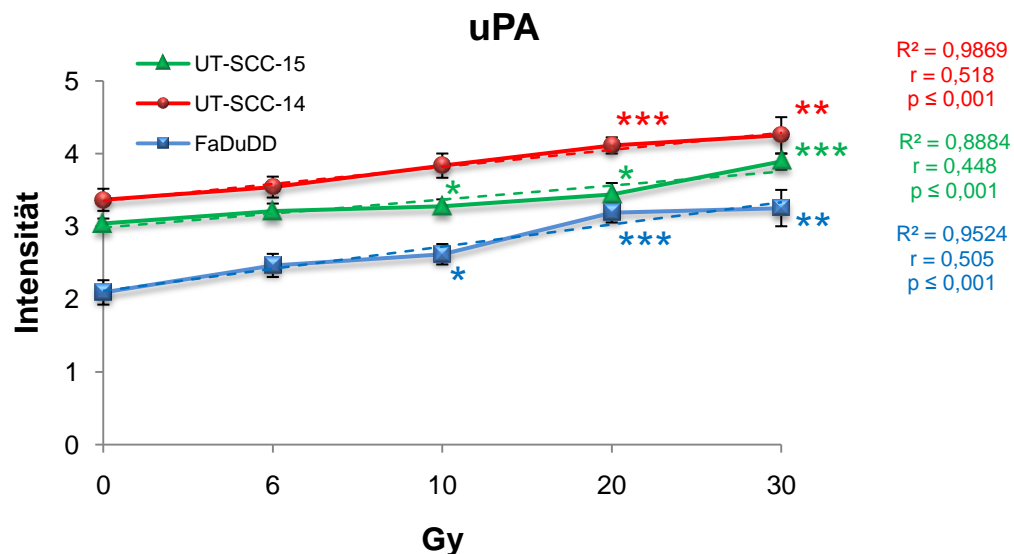


Abbildung 4-19: Vergleich der Intensität der uPA-Färbung der drei Zelllinien; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Bei der weiteren statistischen Auswertung der erhobenen Werte (T-Test) zeigte sich bei FaDu_{DD} und UT-SCC-15 bereits beim Vergleich von unbestrahlten mit 10Gy-bestrahlten Schnitten ein signifikanter Anstieg der Intensität ($p \leq 0,05$). Vergleicht man die unbestrahlten mit den 20 bzw. 30 Gy bestrahlten Schnitten,

findet sich bei allen drei Zelllinien ein signifikanter Anstieg der Intensität ($p \leq 0,05$) (Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: T-Test der Intensität der uPA-Färbung der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,17	0,049	0,011	0,000
UT-SCC-14	0,414	0,051	0,001	0,01
FaDu_{DD}	0,11	0,033	0,000	0,007

PAI-1

In der Intensität der PAI-1-Färbung fiel auf, dass die Werte der FaDu_{DD}-Zelllinie deutlich unter denen der beiden anderen Zelllinien lagen. Häufig kam es hier zu überhaupt keiner oder aber nur sehr schwachen Anfärbung von Strukturen. Dies steht in Kongruenz zu den aus den Tumorlysaten gewonnenen Daten (siehe 4.1.2).

Die Werte der Linien UT-SCC-15 und UT-SCC-14 lagen im Durchschnitt bei einer mittelstarken Anfärbung, wobei UT-SCC-15 im Vergleich leicht intensivere gefärbte Strukturen zeigte. Eine signifikante Korrelation zwischen zunehmender Bestrahlungsdosis und der Intensität konnte hier nicht gezeigt werden (Abb. 4-20).

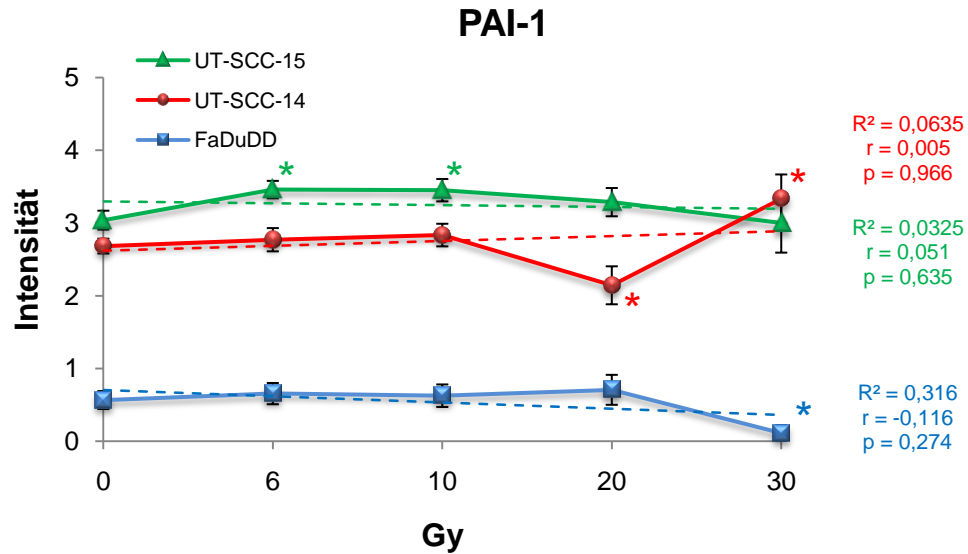


Abbildung 4-20: Vergleich der Intensität der PAI-1-Färbung der drei Zelllinien; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Bei der weiteren statistischen Auswertung der erhobenen Werte (T-Test) zeigte sich in UT-SCC-14 ein signifikanter Abfall der Intensität beim Vergleich unbestrahlter mit 20Gy-bestrahlten Schnitten ($p \leq 0,05$). FaDu_{DD} zeigte keinerlei signifikanten Anstiege oder Abfälle in der Intensität der Schnitte, wohingegen UT-SCC-15 beim Vergleich unbestrahlter mit 10 und 20 Gy bestrahlten Schnitten einen signifikanten Anstieg ($p \leq 0,05$) zeigte (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: T-Test der Intensität der PAI-1-Färbung der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,022	0,046	0,283	0,933
UT-SCC-14	0,66	0,428	0,027	0,04
FaDu _{DD}	0,649	0,764	0,54	0,039

VEGF

In der Intensität der Färbung zeigte sich für VEGF eine durchwegs schwache bis mittelstarke Anfärbung über alle drei Zelllinien (Abb. 4-21). Die Werte von UT-SCC-15 lagen hierbei leicht über denen von FaDu_{DD} und UT-SCC-14. Eine signifikante Korrelation ($p = 0,003$) zwischen steigender Bestrahlungsdosis und der Intensität der VEGF-Färbung konnte für FaDu_{DD} nachgewiesen werden.

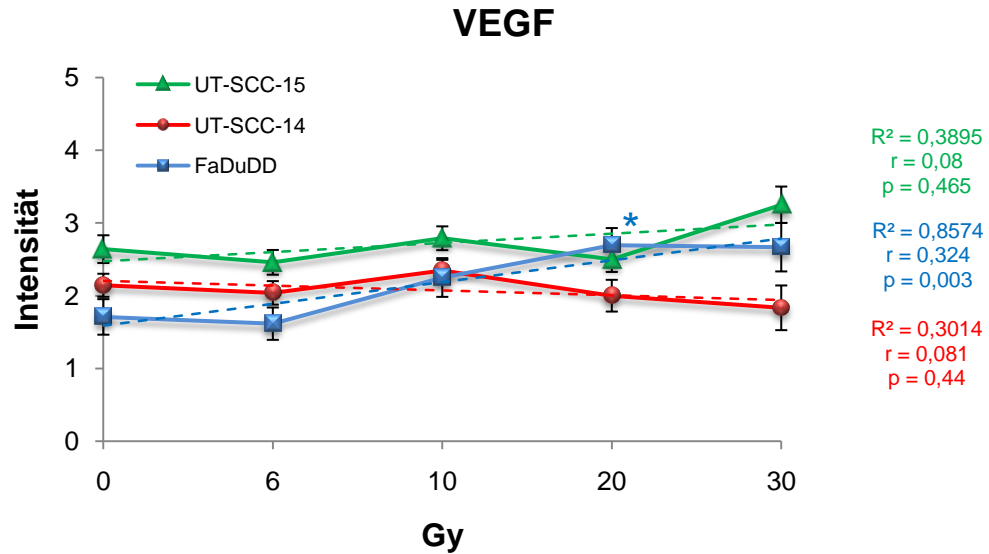


Abbildung 4-21: Vergleich der Intensität der VEGF-Färbung der drei Zelllinien; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Bei der weiteren statistischen Auswertung der erhobenen Werte (T-Test) zeigten sich bei keiner der drei Zelllinien signifikante Anstiege oder Abfälle in der Intensität der Färbung (Tabelle 4-8).

Tabelle 4-8: T-Test der Intensität der VEGF-Färbung der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,481	0,57	0,682	0,225
UT-SCC-14	0,651	0,352	0,601	0,397
FaDu _{DD}	0,78	0,151	0,013	0,189

4.2.2.3 Menge der Färbung

Um die Menge der Färbung zu ermitteln, wurde der prozentuale Anteil angefärbter Tumorzellen an allen vorhandenen vitalen Tumorzellen im Schnitt bestimmt. Der geschätzte Prozentwert wurde dann mittels dem in 3.4.2 dargestellten Schema bewertet.

uPA

Wie schon die Intensität, so nahm auch die Menge der mittels uPA gefärbten Strukturen bei allen drei Zelllinien mit höherer Bestrahlung zu. Ebenso fand sich

eine signifikante Korrelation ($p \leq 0,001$) zwischen steigenden Bestrahlungsdosen und der Menge an uPA-Färbung. FaDu_{DD} zeigte im Vergleich zu UT-SCC-14 und UT-SCC-15 hierbei, äquivalent zur Intensität, eine etwas geringere Menge an gefärbten Strukturen (Abb. 4-22).

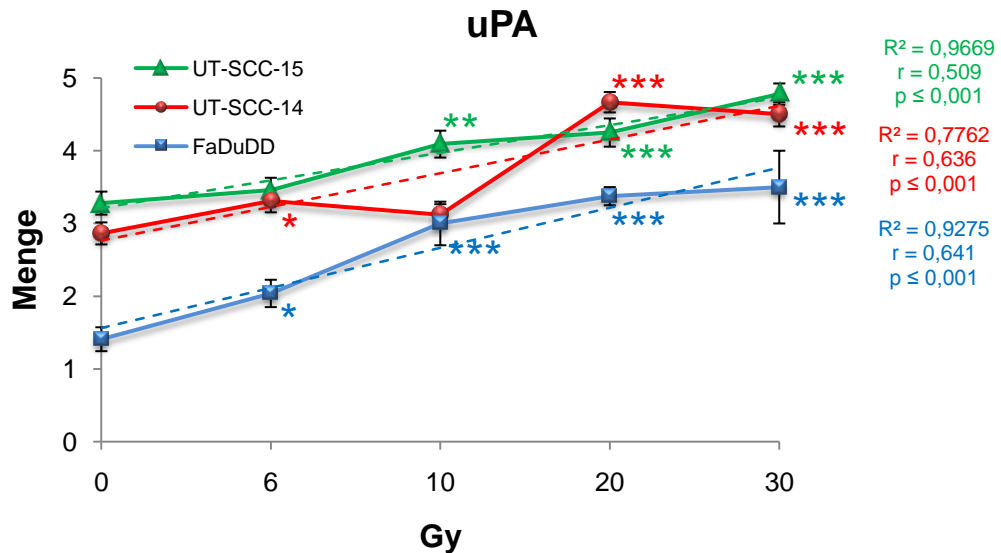


Abbildung 4-22: Vergleich der Menge der uPA-gefärbten Zellen der drei Zelllinien; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Bei der weiteren statistischen Auswertung der erhobenen Werte (T-Test) zeigte sich beim Vergleich der unbestrahlten mit den 20 bzw. 30 Gy bestrahlten Schnitten in allen drei Zelllinien ein signifikanter Anstieg der Menge der Färbung ($p \leq 0,05$). Bei UT-SCC-15 zeigte sich zudem ein signifikanter Anstieg beim Vergleich der unbestrahlten mit den 10 Gy bestrahlten Schnitten ($p \leq 0,05$). In FaDu_{DD} fand sich zusätzlich ein signifikanter Anstieg beim Vergleich von unbestrahlten mit 6 Gy bestrahlten und von unbestrahlten mit 10Gy-bestrahlten Schnitten ($p \leq 0,05$) (Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: T-Test der Menge der uPA-Färbung der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,447	0,002	0,000	0,000
UT-SCC-14	0,048	0,229	0,000	0,000
FaDu _{DD}	0,015	0,000	0,000	0,000

PAI-1

Es zeigte sich bei FaDu_{DD} eine im Vergleich mit UT-SCC-14 und UT-SCC-15 deutlich geringere Menge an gefärbten Zellen. Dies war bei durchwegs allen Strahlendosen zu erkennen. UT-SCC-14 und UT-SCC-15 verhielten sich nahezu identisch, wobei die Werte für UT-SCC-14 konstant circa einen halben Punkt unter denen von UT-SCC-15 lagen. Eine signifikante Korrelation zwischen zunehmender Bestrahlungsdosis und einer steigenden Menge der PAI-1-Färbung konnte für UT-SCC-15 ($p \leq 0,001$) und UT-SCC-14 ($p \leq 0,01$) nachgewiesen werden (Abb. 4-23).

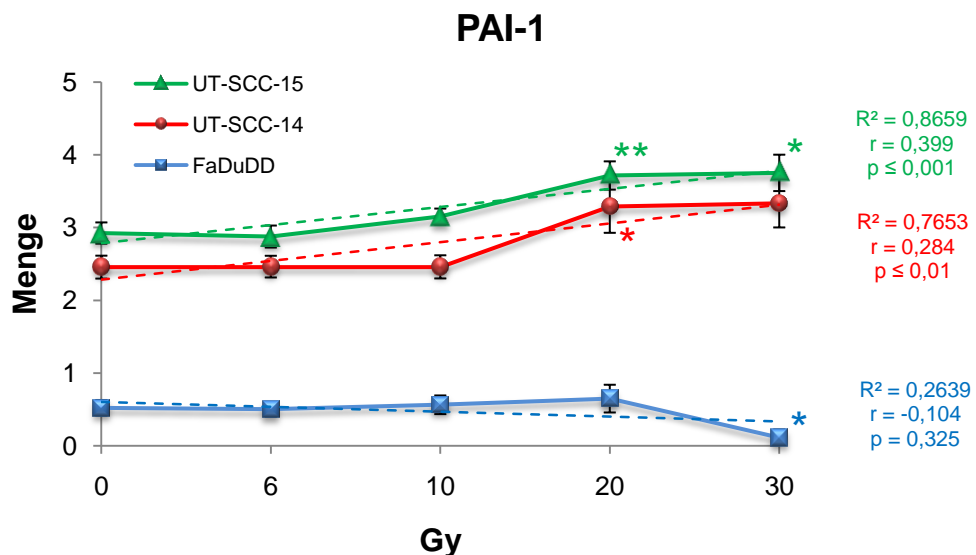


Abbildung 4-23: Vergleich der Menge der PAI-1-Färbung der drei Zelllinien; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Bei der weiteren statistischen Auswertung der erhobenen Werte (T-Test) zeigte sich bei UT-SCC-15 und UT-SCC-14 ein signifikanter Anstieg der Menge gefärbter Zellen beim Vergleich von unbestrahlten mit 20 bzw. 30 Gy bestrahlten Schnitten ($p \leq 0,05$) (Tabelle 4-10). FaDu_{DD} zeigte bei höchstbestrahlten Tumoren (30 Gy) einen signifikanten Abfall in der Menge von PAI-1 ($p \leq 0,05$).

Tabelle 4-10: T-Test der Menge der PAI-1-Färbung der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,82	0,244	0,003	0,042
UT-SCC-14	0,974	0,987	0,022	0,061
FaDu _{DD}	0,882	0,808	0,545	0,034

VEGF

Die Menge der gefärbten Strukturen lag im Mittel bei einer Anfärbung von knapp unter 10%. Mit zunehmender Bestrahlung zeigte sich bei allen drei Zelllinien keine signifikante Zunahme an gefärbten Zellen. Es zeigten sich bei FaDu_{DD} und UT-SCC-14 beinahe identische prozentuale Mengen angefärbter Zellen, wohingegen UT-SCC-15 etwas geringere Mengen zeigte. Eine signifikante Korrelation zwischen steigenden Bestrahlungsdosen und der Menge an VEGF konnte für FaDu_{DD} nachgewiesen werden ($p \leq 0,001$) (Abb. 4-24).

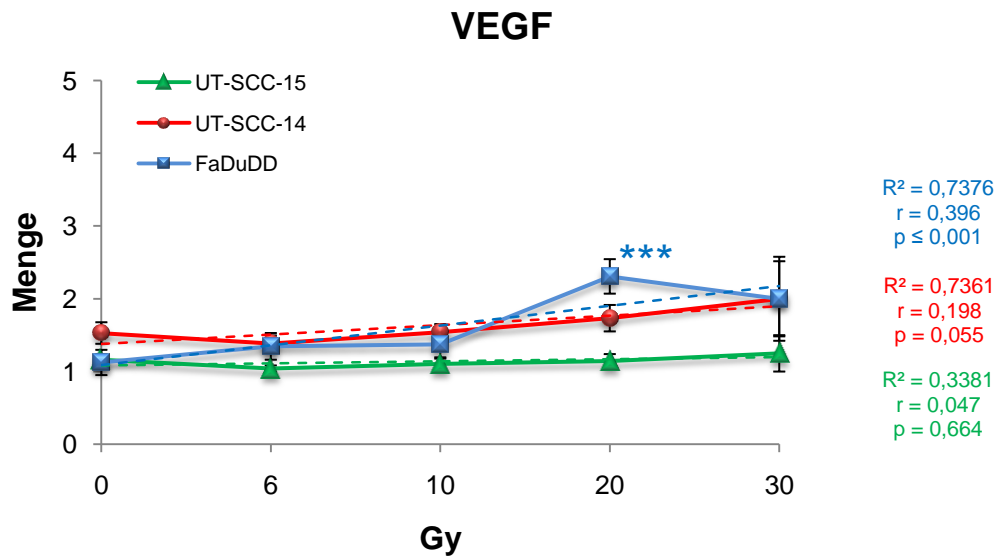


Abbildung 4-24: Vergleich der Menge der VEGF-Färbung der drei Zelllinien; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Bei der weiteren statistischen Auswertung der erhobenen Werte (T-Test) zeigten sich bei UT-SCC-14 und UT-SCC-15 keine signifikanten Anstiege oder Abfälle in der Menge der gefärbten Strukturen. Bei FaDu_{DD} zeigte sich im

Vergleich von unbestrahlten, mit 20 Gy bestrahlten Schnitten ein signifikanter Anstieg der Menge an gefärbten Strukturen ($p \leq 0,05$) (Tabelle 4-11).

Tabelle 4-11: : T-Test der Menge der VEGF-Färbung der drei Zelllinien

p-Werte (T-Test)	0 vs. 6 Gy	0 vs. 10 Gy	0 vs. 20 Gy	0 vs. 30 Gy
UT-SCC-15	0,178	0,61	0,89	0,672
UT-SCC-14	0,449	0,937	0,379	0,227
FaDu_{DD}	0,387	0,34	0,000	0,265

5 Diskussion

Kopf-Hals-Tumoren stellen mit 6% einen großen Anteil aller Tumorentitäten dar (Duvvuri and Myers 2009). Ihre Behandlung mittels Radiotherapie gestaltet sich aufgrund großer hypoxischer Areale indes oft schwierig. Durch die Hypoxie werden unter anderem Faktoren des Plasminogenaktivierungssystems (uPA, PAI-1) (Kietzmann et al. 1999; Weinmann et al. 2002; Schilling et al. 2007; Sprague et al. 2007) und der Angiogenese (VEGF) (Shweiki et al. 1992; Rossler et al. 1999; Ziemer et al. 2001) erhöht. Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie sich die Expression dieser Antigene im Verlauf einer Strahlentherapie verhält. Um dies genauer zu untersuchen, haben wir die Konzentrationen und Lokalisationen von uPA, PAI-1 und VEGF in drei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen während einer fraktionierten Bestrahlung verfolgt.

5.1 Ändert sich während der Bestrahlung die *Expression* von uPA, PAI-1 und/oder VEGF und lässt sich ein Zusammenhang mit der Strahlenresistenz (TCD₅₀) erkennen?

Zur Klärung dieser Frage haben wir die Expression der drei Antigene nach jeweils 0, 6, 10, 20 und 30 Gy Bestrahlung mittels immunhistochemischer Färbung der Tumorschnitte und mittels ELISA-Test der Tumorlysate gemessen. Um festzustellen ob ein Zusammenhang der Antigenexpression mit der Strahlenresistenz der Tumore besteht, verglichen wir die gewonnen Expressionsdaten mit den von der AG Prof. Baumann gemessenen TCD₅₀-Daten. TCD₅₀ beschreibt die Bestrahlungsdosis, bei der in 50% aller Fälle mit einer lokalen Tumorkontrolle zu rechnen ist (siehe auch 3.2.4). Für die drei Tumorkliniken ermittelte die AG Prof. Baumann folgende TCD₅₀-Daten: UT-SCC-15 = 35 Gy, UT-SCC-14 = 44 Gy, FaDu_{DD} = 62 Gy (bisher unveröffentlichte Daten). Danach handelt es sich bei UT-SCC-15 um den strahlensensibelsten, bei UT-SCC-14 um einen vergleichsweise strahlenresistenteren und bei FaDu_{DD} um den deutlich strahlenresistentesten Tumor dieser Arbeit.

Die aus den Tumorlysaten ermittelten Daten zeigten in den drei Tumorlinien ein heterogenes Muster der uPA-Expression. Im Vergleich zu den bei unbestrahlten Proben gemessenen Basalwerten wurden unter Bestrahlung deutliche Veränderungen der Expression von uPA festgestellt. Auffällig war, dass für die Tumorlinie mit dem mittleren TCD₅₀-Wert (UT-SCC-14) durchwegs die höchste uPA-Expression und für die Tumorlinie mit dem höchsten TCD₅₀-Wert (FaDu_{DD}) die niedrigste uPA-Expression gemessen wurde. Weiter fiel auf, dass UT-SCC-15 und UT-SCC-14 eine über die Bestrahlung leicht ansteigende bzw. gleichbleibende uPA-Konzentration zeigten, wohingegen die Konzentration von uPA in FaDu_{DD} nach zunächst leichtem Anstieg deutlich unter den unbestrahlten Anfangswert (Basalwert) abfiel. Als Maß für die Expression der Antigene kann, neben den per ELISA gewonnenen Daten aus den Lysaten, auch die Menge und die Intensität der Färbung der bearbeiteten Tumorschnitte herangezogen werden. Da beide Faktoren zur Gesamtmenge des jeweiligen Proteins beitragen war es wichtig, stets beide einzeln zu bewerten und in Addition zu interpretieren. Für uPA zeigte sich hierbei eine über alle drei Tumorlinien steigende Expression bei höheren Bestrahlungswerten. Die schon in den Lysaten gefundene Ordnung in Bezug auf die TCD₅₀-Werte der Tumorlinien wurde bestätigt: UT-SCC-14 hatte die höchsten, FaDu_{DD} die durchwegs niedrigsten Werte an uPA. Die in den Tumorlysaten überwiegend und in den Tumorschnitten durchwegs gefundene Expressionssteigerung wurde auch in zahlreichen anderen Studien nachgewiesen (Sawaya et al. 1994; Jadhav and Mohanam 2006; Kargiotis et al. 2008; Angenete et al. 2009). Im Gegensatz dazu wurde allerdings eine mittels Tumorlysaten festgestellte Abnahme der uPA-Expression in der FaDu_{DD}-Tumorlinie vorbeschrieben (Richter et al. 1998).

Für PAI-1 wurde anhand der Tumorlysate in UT-SCC-15 eine bis 10 Gy steigende, bei höherer Bestrahlung jedoch wieder leicht abfallende Expression gemessen. In UT-SCC-14 haben wir unter Bestrahlung eine steigende und in FaDu_{DD} eine zunächst ebenfalls steigende, im Rahmen weiterer Bestrahlung dann aber auf den Ausgangswert oder darunter fallende PAI-1-Expression ermittelt. Die Auswertung der Tumorschnitte zeigte im Bestrahlungsverlauf eine Steigerung der PAI-1-Expression für die Tumorlinien UT-SCC-15 und

UT-SCC-14. Mehrere Studien weisen nach, dass fraktionierte Bestrahlung eine Erhöhung von PAI-1 nach sich ziehen kann (Zhao et al. 2001; Schilling et al. 2007; Bayer et al. 2008; Angenete et al. 2009; Scharpfenecker et al. 2009). Interessanterweise fanden sich in FaDu_{DD} sowohl in den Tumorlysaten als auch in den Tumorschnitten durchwegs sehr geringe PAI-1-Werte. Die Expression nahm hier im Rahmen hoher Bestrahlung (30 Gy) ab. Vorbeschrieben ist in der Literatur eine unter Bestrahlung zunehmende Menge an PAI-1 (Schilling et al. 2007; Milliat et al. 2008; Scharpfenecker et al. 2009; Artman et al. in press). Eine mögliche Erklärung für die hier abnehmende Expression könnte die fortschreitende Reoxygenierung des an sich weniger hypoxischen FaDu_{DD}-Tumors sein. Das durch die Reoxygenierung zusätzliche Sauerstoffangebot wirkt einer erhöhten PAI-1-Expression entgegen und hebt so die bestrahlungsinduzierte Erhöhung auf (Schilling et al. 2007). Wir konnten mit Hilfe der statistischen Auswertung für FaDu_{DD} die zuvor bereits gefundene Korrelation zwischen den Basalwerten von uPA und PAI-1 nachweisen (Reilly et al. 1992) und nach unserem Wissensstand erstmals so detailliert aufzeigen, dass diese auch über die gesamte Dauer einer Bestrahlung Bestand hat.

Die VEGF-Expression zeigte in den Tumorlysaten unter Bestrahlung eine deutliche Steigerung in den Tumorklinen UT-SCC-15 und UT-SCC-14, wobei sie in UT-SCC-15 unter sehr hoher Bestrahlung (20 und 30 Gy) wieder abfiel, in UT-SCC-14 jedoch stetig anstieg. In FaDu_{DD} konnte anhand der Tumorschnitte ebenfalls eine deutliche Steigerung der VEGF-Expression während Bestrahlung nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich durchwegs unterschiedliche Angaben zum Expressionsverhalten von VEGF unter Bestrahlung. So stellten einige Studien einen Anstieg der Expression fest (Hovinga et al. 2005; Brieger et al. 2007), während andere keine Veränderung (Gisterek et al. 2007) oder aber eine Abnahme der Expression aufzeigten (Loven et al. 2008; Ria et al. 2008). Auch die VEGF-Werte aller drei Tumorklinen unserer Studie korrelieren wie schon vorbeschrieben mit den PAI-1-Werten (Pepper et al. 1991). Außerdem stellten wir für FaDu_{DD} eine Korrelation zwischen der VEGF- und der uPA-Expression fest. Dies untermauert die Vermutung, dass dem PAS im Allgemeinen - und PAI-1 im Speziellen - auch eine wesentliche Rolle bei der Angiogenese zukommt. Einen Zusammenhang zwischen der jeweiligen VEGF-

Expression und den TCD₅₀-Werten der Tumorklinien haben wir im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt.

Vergleicht man die ermittelten Expressionsmengen der Tumorklysate und der Tumorkschnitte mit der Strahlenresistenz (TCD₅₀) der einzelnen Tumorklinien so fällt am deutlichsten auf, dass die strahlenresistenteste Tumorklinie FaDu_{DD} in den Messungen der uPA- und insbesondere der PAI-1-Expression gegenüber den beiden anderen Tumorklinien deutlich zurück lag. Einer unlängst erschienenen Publikation unserer Arbeitsgruppe kann allerdings entnommen werden, dass FaDu_{DD} bei hohem TCD₅₀-Wert im Vergleich mit anderen Tumorklinien überraschend wenig PAI-1 exprimiert (Bayer et al. 2008). Beim Vergleich der beiden verbleibenden Tumorklinien miteinander zeigte sich eine geringfügig höhere PAI-1-Expression bei dem strahlensensibleren UT-SCC-15. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass bei FaDu_{DD} unter hoher Bestrahlung insbesondere die mittels ELISA gemessenen Konzentrationen aller drei Antigene zurückgingen, wohingegen UT-SCC-15 und UT-SCC-14 eine im Vergleich zum Ausgangswert gleichbleibende oder ansteigende Expression zeigten. Zusammenfassend betrachtet waren bei allen drei Antigenen unter Bestrahlung deutliche Veränderungen in Ihrer Expression festzustellen, die allerdings je nach Tumorklinie unterschiedlich ausfielen. Bezüglich der Strahlenresistenz konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Tumorklinien beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der vermutlichen Sonderstellung von FaDu_{DD} zeigte sich bei hohen Bestrahlungswerten jedoch eine mögliche Beziehung zwischen hohen Expressionswerten und hoher TCD₅₀. Dieser eventuelle Zusammenhang wird von uns derzeit mit Hilfe weiterer Tumorkzelllinien genauer untersucht.

5.2 Ändert sich während der Bestrahlung die *Lokalisation* von uPA, PAI-1 und/oder VEGF und lässt sich ein Zusammenhang mit der Strahlenresistenz (TCD₅₀) erkennen?

Um festzustellen ob sich während einer Strahlentherapie die örtliche Lokalisation von gefärbten Strukturen im Tumor verändert, haben wir die einzelnen Antigene nach jeweils 0, 6, 10, 20 und 30 Gy Bestrahlung immunhistochemisch gefärbt und daraufhin untersucht.

Bei den uPA-Färbungen zeigte sich, wie in mehreren Studien vorbeschrieben, als primär gefärbte Struktur aller drei Tumorlinien das Zytoplasma der Tumorzellen (Andreasen et al. 1997; Yasuda et al. 1997; Harvey et al. 1999; Hurd et al. 2007) im Sinne einer granulären, teils auch flächig wirkenden Färbung. Im Gegensatz dazu stellte sich die Lokalisation dieser Färbung im Tumorschnitt jeweils unterschiedlich dar. UT-SCC-15 zeigte die Färbung überwiegend in der Peripherie des Tumors, seltener im Tumorzellverbund. Vereinzelt fanden sich bei geringen Strahlungs Dosen auch das Stroma umgebende gefärbte Zellen. Bei UT-SCC-14 zeigte sich bei geringen Strahlungs Dosen neben einer peripheren, ebenfalls eine das Stroma umgebende Färbung, wohingegen bei höheren Dosen die Färbung in der Peripherie dominierte. Bei FaDu_{DD} fiel eine im Vergleich zu den beiden anderen Tumorlinien deutlich zu unterscheidende Lokalisation der uPA-Färbung auf, die sich beinahe ausschließlich im Tumorzellverbund darstellte. In Bezug auf die Strahlenresistenz (TCD₅₀) kann daraus geschlossen werden, dass sich die nach uPA gefärbten Strukturen bei strahlensensibleren Tumoren (UT-SCC-15) bevorzugt in der Peripherie, bei strahlenresistenteren (FaDu_{DD}) vermehrt im Tumorzellverbund, d.h. zentral gelegen, befinden.

Gefärbte Strukturen für PAI-1 fanden sich, wie in anderen Studien auch, zum Großteil in der ECM und in im Tumorstroma gelegenen Fibroblasten (Andreasen et al. 1997; Yasuda et al. 1997). Diese Färbung war bei UT-SCC-15 sowohl im Tumorverbund als auch in der Kombination von Tumorverbund und Peripherie zu beobachten. Bei UT-SCC-14 und FaDu_{DD} fand sich eine unter Bestrahlung zunehmende Lokalisation in der Peripherie des Tumors,

einhergehend mit einer Abnahme der Färbung in der Kombination von Tumorverbund und Peripherie. Mit steigender TCD_{50} der Tumorklinien zeigte sich die PAI-1-Färbung somit zunehmend in der Peripherie des Tumors. Dies wurde umso ausgeprägter je höher die Gesamtbestrahlungsdosis wurde.

Die VEGF-positiven Strukturen waren, wie erwartet und zuvor in anderen Studien beschrieben (Ogata et al. 1996; Eisma et al. 1997), am vielfältigsten und reichten vom gefärbten Zytoplasma der Tumorzellen, über Endothelzellen, bis hin zu Zellen in der ECM, wie z.B. Makrophagen. Die Lokalisation der gefärbten Strukturen war über die drei Tumorklinien unterschiedlich verteilt. UT-SCC-15 zeigte sie überwiegend im Tumorverbund und teils auch in den vom Tumor gebildeten Keratinnestern, insbesondere bei den höchstbestrahlten Tumoren. Bei UT-SCC-14 fielen neben der Lokalisation im Tumorverbund insbesondere auch Färbungen neben nekrotisierten Arealen auf. In FaDu_{DD} war die Färbung ausschließlich im Tumorverbund zu finden. Eine Anfärbung in der Peripherie, dem expandierenden Teil des Tumors, war in keiner der Tumorklinien zu beobachten. Aufgrund dieses überwiegend gleichen VEGF-Lokalisationsmusters aller drei Tumorklinien konnte kein Zusammenhang mit den TCD_{50} -Werten gefunden werden.

Fasst man diese Beobachtungen zusammen so fällt auf, dass sich uPA sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie finden lässt, wohingegen PAI-1 vermehrt in der Peripherie auftritt. Dies gilt insbesondere für Tumore mit einer höheren TCD_{50} wie z.B. FaDu_{DD}, den strahlenresistentesten Tumor mit der dementsprechend höchsten TCD_{50} . Das in Lewis-Lungenkarzinomen von Skriver et al. und Kristensen et al. (Skriver et al. 1984; Kristensen et al. 1990) vorbeschriebene Muster von uPA-Lokalisation in invasiven (peripheren) und PAI-1-Lokalisation in nichtinvasiven (zentralen) Regionen konnte durch diese Studie daher nicht bestätigt werden. In einer jüngeren Studie wurde jedoch bereits nachgewiesen, dass das Lokalisationsmuster in Tumoren unterschiedlicher Herkunft deutlich variieren kann (Andreasen et al. 1997). Eine Erklärung für das in unserer Arbeit gefundene Muster der Lokalisation könnte die Tatsache sein, dass PAI-1, neben seiner Fähigkeit uPA zu inaktivieren, auch über eine Reihe anderer tumorbiologischer Funktionen, z.B. in der Angiogenese, verfügt. Um alle Funktionen ausführen zu können und damit ein

bestmögliches Tumorwachstum zu gewährleisten, könnte es erforderlich sein, eine Balance zwischen einer zu geringen und einer zu hohen PAI-1-Expression zu finden. Unterstützt wird diese Vermutung durch die bereits oben beschriebene Korrelation zwischen der per ELISA gemessenen uPA- und PAI-1-Expression in FaDu_{DD} (Abb. 4-5). Insgesamt gesehen veränderten alle drei Antigene ihre Lokalisation während der Bestrahlung jedoch nur geringfügig. Allerdings wurden die zu Beginn überwiegend gefundenen Lokalisationen unter Bestrahlung verstärkt, wohingegen die seltener auftretenden Lokalisationen unter Bestrahlung zumeist gleich blieben oder weiter abnahmen. Ein eventueller Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der TCD₅₀ der Tumorklinien konnte nur für uPA und PAI-1, nicht jedoch für VEGF festgestellt werden. So ging zum einen eine vermehrte Färbung im Tumorverbund (uPA), zum anderen eine vermehrte Färbung in der Peripherie (PAI-1) mit einer erhöhten Strahlenresistenz einher.

5.3 Lassen die gewonnenen Daten das Ansprechen einer Strahlentherapie vorhersagen und somit Marker erkennen, die eine anpassbare Therapie erlauben?

Für die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren wäre es von Vorteil vor Beginn oder aber im Laufe der Therapie zu wissen, ob es sich bei dem zu bestrahlenden Tumor um einen strahlenresistenteren oder strahlensensibleren Typ handelt. Dann könnten individuelle Therapien erarbeitet werden, um Patienten mit sensibleren Tumoren belastende Bestrahlungssitzungen und Zusatztherapien wie z.B. adjuvante Chemotherapie zu ersparen bzw. bei Patienten mit resistenteren Tumoren eine entsprechend aggressivere Therapie anzuwenden. Als klinische Marker haben sich diesbezüglich bisher PAI-1 und in geringerem Ausmaß auch VEGF etabliert.

Der inzwischen für viele Tumorentitäten als prognostischer Marker angewendete PAI-1 zeigte in dieser Studie bei unbestrahlten Tumoren zunächst ein Muster, das von dem in der Literatur vorbeschriebenen leicht abweicht. Die beiden strahlensensibleren Tumorklinien UT-SCC-15 und UT-SCC-14 zeigten

deutlich höhere Werte als die strahlenresistentere FaDu_{DD}-Tumorlinie, wobei UT-SCC-15 als strahlensensibelste Tumorlinie mit den höchsten PAI-1-Werten überraschte. Bei hochbestrahlten Tumoren zeigten sich deutliche Veränderungen, insbesondere bezüglich UT-SCC-14 und UT-SCC-15, die das nach vorangegangenen Studien zu erwartende Bild einer höheren PAI-1-Expression bei der strahlenresistenteren UT-SCC-14-Tumorlinie bestätigten. FaDu_{DD} fiel bei starker Bestrahlung in seiner PAI-1-Expression noch weiter ab und lag im Vergleich mit den beiden anderen Tumorlinien deutlich am niedrigsten. Diese durchwegs niedrigen PAI-1-Werte der Tumorlinie FaDu_{DD} sind mit Vorsicht zu bewerten da bekannt ist, dass diese Tumorlinie trotz hoher TCD₅₀ nur sehr wenig PAI-1 exprimiert. Es könnte also sein, dass die bisher nur bei unbestrahlten Tumoren bekannte Korrelation zwischen der TCD₅₀ eines Tumors und den exprimierten PAI-1-Werten unter Umständen erst bei hochbestrahlten Tumoren auftritt. Um dies genauer zu ermitteln und PAI-1 gegebenenfalls als Marker während der Radiotherapie einzusetzen ist es notwendig, weitere Tumorlinien und deren PAI-1-Expression unter fraktionierter Bestrahlung zu untersuchen. Bis dies durch bereits laufende Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe geklärt ist, können weiterhin nur die PAI-1-Werte bei unbestrahlten Tumoren als Prognosemarker für das Ansprechen einer Strahlentherapie verwendet werden.

VEGF betreffend konnte in dieser Arbeit mittels ELISA nachgewiesen werden, dass während einer Bestrahlung die strahlensensibleren Tumorlinien (UT-SCC-15 und UT-SCC-14) im Gegensatz zum strahlenresistenten FaDu_{DD} signifikante Expressionssteigerungen zeigten. Der zugrundeliegende Pathomechanismus könnte über die vermehrte Neubildung von Gefäßen durch die höheren VEGF-Konzentrationen vermittelt sein. Mehr Gefäße führen theoretisch zu einer geringeren Tumorphoxie und somit wiederum zu einer erhöhten Strahlensensibilität. Diese Annahme steht im Widerspruch zu den im Vergleich mit physiologischen Gefäßen bereits beschriebenen strukturellen und funktionellen Defiziten der neugebildeten Gefäße. Dennoch lassen die hier gewonnenen Daten die Möglichkeit offen, dass VEGF, insbesondere bei bereits begonnener Strahlentherapie, ein Marker zur Beurteilung der Effektivität der Strahlentherapie sein könnte.

Unseren Wissens zeigt diese Studie erstmals in dieser Genauigkeit untersuchte Veränderungen des Expressionsmusters und der Lokalisation sowohl für uPA, PAI-1 als auch für VEGF während fraktionierter Bestrahlung. Die Interpretation der gefundenen Veränderungen ist aufgrund der zu diesem Zeitpunkt relativ wenigen untersuchten Tumorklinien nur bedingt aussagekräftig. Ein gesicherte Aussage wird demnächst möglich, wenn in unserer Arbeitsgruppe die Arbeit an drei weiteren Tumorklinien abgeschlossen sein wird.

Aufgrund des sowohl in den Tumorklysaten als auch in den Tumorkschnitten erkennbaren "untypischen" Verhaltens der Tumorklinie FaDu_{DD}, sei hier auf diese nochmals gesondert eingegangen. Auffallend sind zum einen die in Bezug zur TCD₅₀ durchwegs unverhältnismäßig niedrigen PAI-1-Werte zum anderen der unter hoher Bestrahlung zu beobachtende mittels ELISA gemessene Mengenabfall aller drei Antigene unter Ihren Basalwert. Für PAI-1 konnte auch in den Tumorkschnitten ein Abfall an Intensität und Menge der gefärbten Strukturen unter Basalniveau beobachtet werden. Die Tatsache, dass in FaDu_{DD} die mittels ELISA gemessenen PAI-1-Werte signifikant mit denen von uPA und VEGF korrelieren erhärtet, wie schon weiter oben beschrieben, die Vermutung nach einer zentralen Rolle von PAI-1 in der Tumorkbiologie auch während einer Strahlentherapie. Daher ist es durchaus denkbar, dass FaDu_{DD} gerade aufgrund seiner schon zu Beginn äußerst niedrigen PAI-1-Basalwerte, ein unter Bestrahlung deutlich abgrenzbares Muster in der Antigenexpression zeigt. Um genauere Aussagen treffen zu können wäre es wünschenswert, das Expressionsverhalten von uPA, PAI-1 und VEGF bei einem anderen Tumor mit ähnlich niedrigen Basalwerten an PAI-1 zu untersuchen. Ergäbe sich dabei ein ähnliches Muster, könnte man eventuell auch bei derartigen Tumoren eine Aussage über ihr Verhalten im Laufe einer Strahlentherapie treffen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Radiotherapie auf die Expression und Lokalisation von uPA, PAI-1 und VEGF in drei unterschiedlichen Tumorklinen untersucht. Dies beinhaltete die immunhistochemische Färbung angefertigter Tumorschnitte und deren mikroskopische Auswertung sowie ELISA-Tests von Tumorslysaten. Zielsetzung war, etwaige Veränderungen der Antigenkonzentrationen und Lokalisationen und deren Korrelation zur unterschiedlichen Strahlenresistenz der verwendeten Tumore festzustellen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die ermittelten Daten einen Marker erkennen lassen, der das Ansprechen einer Strahlentherapie vorhersagen kann und somit eine anpassbare Therapie ermöglicht. Insbesondere für PAI-1 und VEGF zeigten sich unter hoher Bestrahlung in zwei von drei Tumorklinen deutliche Steigerungen ihrer Expression und die Ausbildung eines Lokalisationsmusters, wie man es von unbestrahlten Tumoren kennt. So konnten wir nachweisen, dass der strahlensensibelste Tumor zwar die zunächst höchste PAI-1 und VEGF-Expression aufzeigte, bei hoher Bestrahlung jedoch im Vergleich zum strahlenresistenteren Tumor in seiner Expression abfiel. Insbesondere in hochbestrahlten Tumorschnitten fand sich ein so nicht vorbeschriebenes Muster der Lokalisation von uPA und PAI-1. uPA wurde sowohl in invasiven als auch nichtinvasiven Regionen vorgefunden, wohingegen PAI-1 eher in invasiven Arealen, also in der Peripherie der Tumoren, beobachtet wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich sowohl das Muster der Expression von PAI-1 und VEGF als auch die Lokalisation von uPA und PAI-1 im Laufe einer Strahlentherapie deutlich verändern. Sollten die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse durch die bereits laufende Untersuchung von drei weiteren Tumorklinen bestätigt werden dürfte es möglich sein, auch nach einer bereits begonnenen Strahlentherapie diese an den jeweiligen Tumortyp anzupassen.

7 Literaturverzeichnis

Aebersold, D. M., K. T. Beer, J. Laissue, S. Hug, A. Kollar, R. H. Greiner, and V. Djonov. 2000. Intratumoral microvessel density predicts local treatment failure of radically irradiated squamous cell cancer of the oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48 (1):17-25.

Andre, T., L. Kotelevets, J. C. Vaillant, A. M. Coudray, L. Weber, S. Prevot, R. Parc, C. Gespach, and E. Chastre. 2000. Vegf, Vegf-B, Vegf-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa. *Int J Cancer* 86 (2):174-181.

Andreasen, P. A., L. Kjoller, L. Christensen, and M. J. Duffy. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72 (1):1-22.

Andreasen, P. A. 2007. PAI-1 - a potential therapeutic target in cancer. *Curr Drug Targets* 8 (9):1030-1041.

Angenete, E., M. Langenskiold, I. Palmgren, P. Falk, T. Oresland, and M. L. Ivarsson. 2009. uPA and PAI-1 in rectal cancer--relationship to radiotherapy and clinical outcome. *J Surg Res* 153 (1):46-53.

Arbiser, J. L., J. Petros, R. Klaffer, B. Govindajaran, E. R. McLaughlin, L. F. Brown, C. Cohen, M. Moses, S. Kilroy, R. S. Arnold, and J. D. Lambeth. 2002. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2):715-720.

Artman, T., D. Schilling, J. Gnann, M. Molls, G. Muthoff, and C. Bayer. in press. Irradiation-induced regulation of PAI-1 and VEGF in 6 Human Squamous Cell Carcinoma Lines of the Head and Neck. *Noch nicht veröffentlicht, akzeptiert bei Int J Radiat Oncol Biol Phys.*

Bajou, K., A. Noel, R. D. Gerard, V. Masson, N. Brunner, C. Holst-Hansen, M. Skobe, N. E. Fusenig, P. Carmeliet, D. Collen, and J. M. Foidart. 1998. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 4 (8):923-928.

Bajou, K., V. Masson, R. D. Gerard, P. M. Schmitt, V. Albert, M. Praus, L. R. Lund, T. L. Frandsen, N. Brunner, K. Dano, N. E. Fusenig, U. Weidle, G. Carmeliet, D. Loskutoff, D. Collen, P. Carmeliet, J. M. Foidart, and A. Noel. 2001. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol* 152 (4):777-784.

Bayer, C., D. Schilling, J. Hoetzel, H. P. Egermann, D. Zips, A. Yaromina, A. Geurts-Moespot, L. D. Sprague, F. Sweep, M. Baumann, M. Molls, and M. Adam. 2008. PAI-1 levels predict response to fractionated irradiation in 10 human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Radiother Oncol* 86 (3):361-368.

Becker, N., and S. Holzmeier. 2006. *Krebstodesursachen 2006*. Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg. Retrieved 04.04.2009. Available from <http://www.dkfz.de/de/index.html>.

Bergers, G., and L. E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3 (6):401-410.

Binder, B. R., and J. Mihaly. 2008. The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer. *Immunol Lett* 118 (2):116-124.

Brieger, J., J. Kattwinkel, M. Berres, J. Gosepath, and W. J. Mann. 2007. Impact of vascular endothelial growth factor release on radiation resistance. *Oncol Rep* 18 (6):1597-1601.

Brizel, D. M., S. P. Scully, J. M. Harrelson, L. J. Layfield, J. M. Bean, L. R. Prosnitz, and M. W. Dewhirst. 1996. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56 (5):941-943.

Brizel, D. M., G. S. Sibley, L. R. Prosnitz, R. L. Scher, and M. W. Dewhirst. 1997. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38 (2):285-289.

Brown, J. M. 1979. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol* 52 (620):650-656.

Brown, J. M. 2002. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther* 1 (5):453-458.

Carmeliet, P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3:4-10.

Chaplin, D. J., P. L. Olive, and R. E. Durand. 1987. Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res* 47 (2):597-601.

Chaturvedi, A. K., E. A. Engels, W. F. Anderson, and M. L. Gillison. 2008. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 26 (4):612-619.

Conway, D. I., M. Petticrew, H. Marlborough, J. Berthiller, M. Hashibe, and L. M. Macpherson. 2008. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer* 122 (12):2811-2819.

Cubellis, M. V., T. C. Wun, and F. Blasi. 1990. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J* 9 (4):1079-1085.

Dano, K., P. A. Andreasen, J. Grondahl-Hansen, P. Kristensen, L. S. Nielsen, and L. Skriver. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44:139-266.

Decaussin, M., H. Sartelet, C. Robert, D. Moro, C. Claraz, C. Brambilla, and E. Brambilla. 1999. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 188 (4):369-377.

Devy, L., S. Blacher, C. Grignet-Debrus, K. Bajou, V. Masson, R. D. Gerard, A. Gils, G. Carmeliet, P. Carmeliet, P. J. Declerck, A. Noel, and J. M. Foidart. 2002. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J* 16 (2):147-154.

Duffy, M. J., P. O'Grady, D. Devaney, L. O'Siorain, J. J. Fennelly, and H. J. Lijnen. 1988. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 62 (3):531-533.

Duffy, M. J., D. Reilly, C. O'Sullivan, N. O'Higgins, J. J. Fennelly, and P. Andreasen. 1990. Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 50 (21):6827-6829.

Duffy, M. J., T. M. Maguire, E. W. McDermott, and N. O'Higgins. 1999. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol* 71 (2):130-135.

Duffy, M. J., and C. Duggan. 2004. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* 37 (7):541-548.

Duvvuri, U., and J. N. Myers. 2009. Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide. *Curr Probl Surg* 46 (2):114-117.

Eisma, R. J., J. D. Spiro, and D. L. Kreutzer. 1997. Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg* 174 (5):513-517.

Ellis, L. M., Y. Takahashi, C. J. Fenoglio, K. R. Cleary, C. D. Bucana, and D. B. Evans. 1998. Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 34 (3):337-340.

Eschmann, S. M., F. Paulsen, M. Reimold, H. Dittmann, S. Welz, G. Reischl, H. J. Machulla, and R. Bares. 2005. Prognostic impact of hypoxia imaging with ¹⁸F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. *J Nucl Med* 46 (2):253-260.

Ferno, M., P. O. Bendahl, A. Borg, J. Brundell, L. Hirschberg, H. Olsson, and D. Killander. 1996. Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay. *Eur J Cancer* 32A (5):793-801.

Ferrara, N., and T. Davis-Smyth. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18 (1):4-25.

Ferrara, N. 1999. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56 (3):794-814.

Foekens, J. A., M. Schmitt, W. L. van Putten, H. A. Peters, M. Bontenbal, F. Janicke, and J. G. Klijn. 1992. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res* 52 (21):6101-6105.

Folkman, J. 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175 (3):409-416.

Folkman, J., and Y. Shing. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267 (16):10931-10934.

Forsythe, J. A., B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, and G. L. Semenza. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16 (9):4604-4613.

Frumovitz, M., and A. K. Sood. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway as a therapeutic target in gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol* 104 (3):768-778.

George, M. L., M. G. Tutton, F. Janssen, A. Arnaout, A. M. Abulafi, S. A. Eccles, and R. I. Swift. 2001. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 3 (5):420-427.

Gisterek, I., P. Sedlaczek, J. Kornafel, A. Harlozinska-Szmyrka, and A. Lacko. 2007. Serum vascular endothelial growth factor in patients with pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Am J Otolaryngol* 28 (2):73-77.

Graham, C. H., J. Forsdike, C. J. Fitzgerald, and S. Macdonald-Goodfellow. 1999. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer* 80 (4):617-623.

Harbeck, N., U. Alt, U. Berger, R. Kates, A. Kruger, C. Thomssen, F. Janicke, H. Graeff, and M. Schmitt. 2000. Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 15 (1):79-83.

Harmey, J. H., and D. Bouchier-Hayes. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays* 24 (3):280-283.

Harrison, L., and K. Blackwell. 2004. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* 9 Suppl 5:31-40.

Harvey, S. R., S. N. Sait, Y. Xu, J. L. Bailey, R. M. Penetrante, and G. Markus. 1999. Demonstration of urokinase expression in cancer cells of colon adenocarcinomas by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am J Pathol* 155 (4):1115-1120.

Hicks, R. J., D. Rischin, R. Fisher, D. Binns, A. M. Scott, and L. J. Peters. 2005. Utility of FMISO PET in advanced head and neck cancer treated with chemoradiation incorporating a hypoxia-targeting chemotherapy agent. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 (12):1384-1391.

Hjortland, G. O., T. Lillehammer, S. Somme, J. Wang, T. Halvorsen, S. Juell, H. Hirschberg, O. Fodstad, and O. Engebraaten. 2004. Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp Cell Res* 294 (1):130-139.

Horsman, M. R. 1998. Measurement of tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (4):701-704.

Hovinga, K. E., L. J. Stalpers, C. van Bree, M. Donker, J. J. Verhoeff, H. M. Rodermond, D. A. Bosch, and W. R. van Furth. 2005. Radiation-enhanced vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in glioblastoma multiforme cell lines--a clue to radioresistance? *J Neurooncol* 74 (2):99-103.

Hundsdoerfer, B., H. F. Zeilhofer, K. P. Bock, P. Dettmar, M. Schmitt, A. Kolk, C. Pautke, and H. H. Horch. 2005. Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value. *J Craniomaxillofac Surg* 33 (3):191-196.

Hurd, T. C., S. Sait, S. Kohga, J. Winston, M. Martinick, R. Saxena, H. Lankes, G. Markus, S. Harvey, and J. F. Gibbs. 2007. Plasminogen activator system localization in 60 cases of ductal carcinoma in situ. *Ann Surg Oncol* 14 (11):3117-3124.

Illemann, M., U. Hansen, H. J. Nielsen, P. A. Andreasen, G. Hoyer-Hansen, L. R. Lund, K. Dano, and B. S. Nielsen. 2004. Leading-edge myofibroblasts in human colon cancer express plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Clin Pathol* 122 (2):256-265.

Jadhav, U., and S. Mohanam. 2006. Response of neuroblastoma cells to ionizing radiation: modulation of in vitro invasiveness and angiogenesis of human microvascular endothelial cells. *Int J Oncol* 29 (6):1525-1531.

Kaanders, J. H., K. I. Wijffels, H. A. Marres, A. S. Ljungkvist, L. A. Pop, F. J. van den Hoogen, P. C. de Wilde, J. Bussink, J. A. Raleigh, and A. J. van der Kogel. 2002. Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. *Cancer Res* 62 (23):7066-7074.

Kargiotis, O., C. Chetty, V. Gogineni, C. S. Gondi, S. M. Pulukuri, A. P. Kyritsis, M. Gujrati, J. D. Klopfenstein, D. H. Dinh, and J. S. Rao. 2008. uPA/uPAR downregulation inhibits radiation-induced migration, invasion and angiogenesis in IOMM-Lee meningioma cells and decreases tumor growth in vivo. *Int J Oncol* 33 (5):937-947.

Kietzmann, T., U. Roth, and K. Jungermann. 1999. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 94 (12):4177-4185.

Konno, H., J. Abe, T. Kaneko, M. Baba, A. Shoji, K. Sunayama, K. Kamiya, T. Tanaka, S. Suzuki, S. Nakamura, and T. Urano. 2001. Urokinase receptor and vascular endothelial growth factor are synergistically associated with the liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res* 92 (5):516-523.

Kristensen, P., C. Pyke, L. R. Lund, P. A. Andreasen, and K. Dano. 1990. Plasminogen activator inhibitor-type 1 in Lewis lung carcinoma. *Histochemistry* 93 (6):559-566.

Kyzas, P. A., D. Stefanou, A. Batistatou, and N. J. Agnantis. 2005. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 131 (9):624-630.

Loven, D., E. Be'ery, R. Yerushalmi, C. Koren, A. Sulkes, I. Lavi, Y. Shaked, and E. Fenig. 2008. Daily low-dose/continuous capecitabine combined with neo-adjuvant irradiation reduces VEGF and PDGF-BB levels in rectal carcinoma patients. *Acta Oncol* 47 (1):104-109.

Maillard, C., M. Jost, M. U. Romer, N. Brunner, X. Houard, A. Lejeune, C. Munaut, K. Bajou, L. Melen, K. Dano, P. Carmeliet, N. E. Fusenig, J. M. Foidart, and A. Noel. 2005. Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia* 7 (1):57-66.

Mazzieri, R., L. Masiero, L. Zanetta, S. Monea, M. Onisto, S. Garbisa, and P. Mignatti. 1997. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J* 16 (9):2319-2332.

Meo, S., R. Dittadi, L. Peloso, and M. Gion. 2004. The prognostic value of vascular endothelial growth factor, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in node-negative breast cancer. *Int J Biol Markers* 19 (4):282-288.

Milliat, F., J. C. Sabourin, G. Tarlet, V. Holler, E. Deutsch, V. Buard, R. Tamarat, A. Atfi, M. Benderitter, and A. Francois. 2008. Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am J Pathol* 172 (3):691-701.

Molls, M. 2001. Tumor Oxygenation and Treatment Outcome. In: *Anaemia in Cancer*. Edited by C. Bokemeyer and H. Ludwig. 2.ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Mottram, J. C. 1936. A Factor of Importance in the Radio Sensitivity of Tumours. *The British Journal of Radiology* 9:606-614.

Nekarda, H., M. Schmitt, K. Ulm, A. Wenninger, H. Vogelsang, K. Becker, J. D. Roder, U. Fink, and J. R. Siewert. 1994. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 54 (11):2900-2907.

Niki, T., S. Iba, M. Tokunou, T. Yamada, Y. Matsuno, and S. Hirohashi. 2000. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 6 (6):2431-2439.

Nishida, N., H. Yano, K. Komai, T. Nishida, T. Kamura, and M. Kojiro. 2004. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 101 (6):1364-1374.

Nishida, N., H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, and M. Kojiro. 2006. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2 (3):213-219.

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

O-charoenrat, P., P. Rhys-Evans, and S. A. Eccles. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 92 (3):556-568.

Offersen, B. V., B. S. Nielsen, G. Hoyer-Hansen, F. Rank, S. Hamilton-Dutoit, J. Overgaard, and P. A. Andreasen. 2003. The myofibroblast is the predominant plasminogen activator inhibitor-1-expressing cell type in human breast carcinomas. *Am J Pathol* 163 (5):1887-1899.

Ogata, Y., Y. Harada, T. Fujii, H. Yamana, H. Fujita, and K. Shirouzu. 1996. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *Kurume Med J* 43 (2):157-163.

Pepper, M. S., N. Ferrara, L. Orci, and R. Montesano. 1991. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181 (2):902-906.

Pepper, M. S. 2001. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 86 (1):346-355.

Ramos-DeSimone, N., E. Hahn-Dantona, J. Siple, H. Nagase, D. L. French, and J. P. Quigley. 1999. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274 (19):13066-13076.

Reilly, D., L. Christensen, M. Duch, N. Nolan, M. J. Duffy, and P. A. Andreasen. 1992. Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 50 (2):208-214.

Ria, R., T. Cirulli, T. Giannini, S. Bambace, G. Serio, M. Portaluri, D. Ribatti, A. Vacca, and F. Dammacco. 2008. Serum levels of angiogenic cytokines decrease after radiotherapy in non-Hodgkin lymphomas. *Clin Exp Med* 8 (3):141-145.

Richter, E., and T. Feyerabend. 2002. Strahlenwirkung auf zellulärer Ebene. In: *Grundlagen der Strahlentherapie*. Edited by E. Richter and T. Feyerabend. 2. ed. Heidelberg: Springer Verlag.

Richter, K. K., L. M. Fink, B. M. Hughes, H. M. Shmaysani, C. C. Sung, and M. Hauer-Jensen. 1998. Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum. *Am J Surg* 176 (6):642-647.

Rifkin, D. B., D. Moscatelli, J. Bizik, N. Quarto, F. Blei, P. Dennis, R. Flaumenhaft, and P. Mignatti. 1990. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ Dev* 32 (3):313-318.

Robert-Koch-Institut. 2008. *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch Institut. Retrieved 04.04.2009. Available from http://www.rki.de/cln_179/nn_196910/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2008.html?__nnn=true

Rosner, A., D. Pfitzmann, A. Dörfler, D. Zips, A. Yaromina, W. Eicheler, J. Kulmala, M. Krause, F. Hessel, C. Petersen, R. Grénman, and M. Baumann. 2004. Etablierung und Charakterisierung von Xenograft-Plattenepithelkarzinomen für Tumorphoxiestudien. *13. Symposium für experimentelle Strahlentherapie und klinische Radiobiologie, Dresden.*

Rosler, J., S. Breit, W. Havers, and L. Schweigerer. 1999. Vascular endothelial growth factor expression in human neuroblastoma: up-regulation by hypoxia. *Int J Cancer* 81 (1):113-117.

Sauer, R. 2006. Strahlenbiochemie. In: *Radiologie*. Edited by G. W. Kauffmann, E. Moser and R. Sauer. 3.ed. München: Urban & Fischer.

Sawaya, R., A. Rayford, S. Kono, K. K. Ang, Y. Feng, L. C. Stephens, and J. S. Rao. 1994. Elevated levels of plasminogen activators in the pathogenesis of delayed radiation damage in rat cervical spinal cord in vivo. *Radiat Res* 138 (3):386-391.

Scharpfenecker, M., J. J. Kruse, D. Sprong, N. S. Russell, P. Ten Dijke, and F. A. Stewart. 2009. Ionizing radiation shifts the PAI-1/ID-1 balance and activates notch signaling in endothelial cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 73 (2):506-513.

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

Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359 (6398):843-845.

Skriver, L., L. I. Larsson, V. Kielberg, L. S. Nielsen, P. B. Andresen, P. Kristensen, and K. Dano. 1984. Immunocytochemical localization of urokinase-type plasminogen activator in Lewis lung carcinoma. *J Cell Biol* 99 (2):753-757.

Sprague, L. D., H. Tomaso, K. Mengele, D. Schilling, C. Bayer, P. Stadler, M. Schmitt, and M. Molls. 2007. Effects of hypoxia and reoxygenation on the expression levels of the urokinase-type plasminogen activator, its inhibitor plasminogen activator inhibitor type-1 and the urokinase-type plasminogen activator receptor in human head and neck tumour cells. *Oncol Rep* 17 (5):1259-1268.

Spyratos, F., P. M. Martin, K. Hacene, S. Romain, C. Andrieu, M. Ferrero-Pous, S. Deytieux, V. Le Doussal, M. Tubiana-Hulin, and M. Brunet. 1992. Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 84 (16):1266-1272.

Stadler, P., A. Becker, H. J. Feldmann, G. Hansgen, J. Dunst, F. Wurschmidt, and M. Molls. 1999. Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44 (4):749-754.

Statistisches-Bundesamt. 2007. *An bösartigen Neubildungen erkrankte Personen der Bevölkerung, Inzidenzrate 2006*. Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Retrieved 16.01.2009. Available from <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/>.

Stoppelli, M. P. 2002. The Plasminogen Activation System in Cell Invasion: Madame Curie Bioscience Database, NCBI. Retrieved 14.04.2009. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A18671>

Terada, H., T. Urano, and H. Konno. 2005. Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer. *Eur Surg Res* 37 (3):166-172.

Thomas, K. A. 1996. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 271 (2):603-606.

Thomlinson, R. H., and L. H. Gray. 1955. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9 (4):539-549.

Thorwarth, D., S. M. Eschmann, J. Scheiderbauer, F. Paulsen, and M. Alber. 2005. Kinetic analysis of dynamic 18F-fluoromisonidazole PET correlates with radiation treatment outcome in head-and-neck cancer. *BMC Cancer* 5:152.

Tran, J., J. Rak, C. Sheehan, S. D. Saibil, E. LaCasse, R. G. Korneluk, and R. S. Kerbel. 1999. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264 (3):781-788.

Vaupel, P., D. K. Kelleher, and M. Hockel. 2001. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28 (2 Suppl 8):29-35.

Vaupel, P. 2004. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 9 Suppl 5:10-17.

Vaupel, P., and L. Harrison. 2004. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 9 Suppl 5:4-9.

Vaupel, P., M. Hockel, and A. Mayer. 2007. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal* 9 (8):1221-1235.

Vaupel, P.. 2008. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* 13 Suppl 3:21-26.

Vonkadich, A. C. 2009. Overview of Radiobiology. In: *Principles and Practise of Radiation Therapy*. Edited by C. M. Washington and D. T. Leaver. 3.ed. Oxford: Elsevier LTD.

Weinmann, M., O. Thews, T. Schroeder, and P. Vaupel. 2002. Expression pattern of the urokinase-plasminogen activator system in rat DS-sarcoma: role of oxygenation status and tumour size. *Br J Cancer* 86 (8):1355-1361.

Wilson, P. M., R. D. Ladner, and H. J. Lenz. 2007. Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 1 (6):237-246.

Yaromina, A., T. Holscher, W. Eicheler, A. Rosner, M. Krause, F. Hessel, C. Petersen, H. D. Thames, M. Baumann, and D. Zips. 2005. Does heterogeneity of pimonidazole labelling correspond to the heterogeneity of radiation-response of FaDu human squamous cell carcinoma? *Radiother Oncol* 76 (2):206-212.

Yaromina, A., D. Zips, H. D. Thames, W. Eicheler, M. Krause, A. Rosner, M. Haase, C. Petersen, J. A. Raleigh, V. Quennet, S. Walenta, W. Mueller-Klieser, and M. Baumann. 2006. Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. *Radiother Oncol* 81 (2):122-129.

Yaromina, A., M. Krause, H. Thames, A. Rosner, F. Hessel, R. Grenman, D. Zips, and M. Baumann. 2007. Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 83 (3):304-310.

Yasuda, T., Y. Sakata, K. Kitamura, M. Morita, and T. Ishida. 1997. Localization of plasminogen activators and their inhibitor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck* 19 (7):611-616.

Zhao, W., D. R. Spitz, L. W. Oberley, and M. E. Robbins. 2001. Redox modulation of the pro-fibrogenic mediator plasminogen activator inhibitor-1 following ionizing radiation. *Cancer Res* 61 (14):5537-5543.

Ziemer, L. S., C. J. Koch, A. Maity, D. P. Magarelli, A. M. Horan, and S. M. Evans. 2001. Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors. *Neoplasia* 3 (6):500-508.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. M. Molls für die freundliche Überlassung des Themas und die gewährte Möglichkeit diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Frau Prof. Dr. rer. nat. G. Multhoff für Ihre fachkundige Begleitung und Betreuung.

Frau Dr. rer. nat. C. Bayer für Ihre fachliche und persönliche Unterstützung während der gesamten Durchführung der Dissertation.

Frau Dr. rer. nat. D. Schilling und dem gesamten Team des strahlenbiologischen Forschungslabors für Ihre hilfsbereite und kompetente Begleitung.

Meinen Eltern und meiner Freundin Nadja für die Unterstützung während des gesamten Studiums und dieser Arbeit.