

**Untersuchung der zellulären Antwort von Tumor
und Endothelium auf radioaktive Bestrahlung**
in vitro und *in vivo*

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Diplom-Biologin
Petra Christiane Schröder
geboren am 03.09.1970
in Mainz

Mainz, im August 2005

Inhaltsverzeichnis

Seite

Inhaltsverzeichnis	I
Vorveröffentlichungen der Dissertation	IV
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Plattenepithelkarzinome	3
1.2 Bestrahlungstherapie der Plattenepithelkarzinome	5
1.3 Die Strahlenresistenz von Tumoren	7
1.4 Angiogenese	9
1.4.1 Tumorinduzierte Angiogenese	11
1.4.2 Regulation der Angiogenese.....	14
1.4.2.1 VEGF.....	16
1.4.2.2 FGF	22
1.4.2.3 Interleukin-8	24
1.5 Die Cyclooxygenasen	25
1.5.1 Prostaglandin E₂	28
1.5.2 Cyclooxygenase-Inhibitoren	29
1.5.2.1 Acetylsalicylsäure	31
1.5.2.2 Flurbiprofen.....	32
1.5.2.3 Meloxicam	33
1.5.2.4 NS-398	33
1.5.2.5 Lumiracoxib	34
2. Ziele	35
3. Materialien und Methoden	36
3.1 Material	36
3.1.1 Biologisches Material	36
3.1.1.1 Tumorzelllinien.....	36
3.1.1.2 Endothelzellen	36
3.1.1.3 Mäuse.....	37
3.1.2 Chemikalien	37
3.1.3 Zellkulturmedien	37
3.1.4 Wachstumsfaktoren und Antikörper für die Zellkultur	37
3.1.5 Antikörper für die Immunhistochemie	38
3.1.6 Cyclooxygenase-Inhibitoren	38

3.1.7	Geräte	38
3.1.8	Software	39
3.1.9	Sonstige Materialien und Kits	40
3.1.10	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	41
3.1.10.1	Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie	41
3.1.10.2	Puffer und Lösungen für ELISA.....	42
3.1.10.3	Zellkulturmedien.....	43
3.1.10.4	Sonstige Lösungen und Puffer	43
3.2	Methoden	44
3.2.1	Kultur humaner Tumorzelllinien	44
3.2.2	Isolierung und Kultur humaner Endothelzellen	44
3.2.2.1	Gelatinebeschichtung von Zellkulturgefäßen.....	45
3.2.3	Ermittlung der Zellzahl	45
3.2.4	Methode zur Bestimmung der Bestrahlungssensitivität	45
3.2.5	Lyse von Tumorzellen zur Quantifizierung des intrazellulären FGF-2 und VEGF Gehaltes	46
3.2.6	Methode zur Bestimmung des Einflusses von Cox-Inhibitoren auf die bestrahlungsvermittelte VEGF und FGF-2 Induktion	46
3.2.7	Quantifizierung von IL-8, PGE₂, FGF-2 und VEGF aus Zellysaten und Kulturüberständen	47
3.2.8	Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und Bestrahlung	47
3.2.8	Lyse von Zellen und Proteinbestimmung zur Quantifizierung des VEGFR-2	47
3.2.10	Quantifizierung von phosphorylierten VEGFR-2	48
3.2.11	Generieren konditionierter Tumorüberstände	48
3.2.12	Kultivierung von Zellen für immunhistochemische Analysen	49
3.2.13	Immunhistochemische Analysen von Tumorzelllinien und HUVEC	49
3.2.14	Proliferationsassay mit VEGF-Subtypen und Bestrahlung	49
3.2.15	Koloniebildungsassay	50
3.2.15.1	Koloniebildungsassay mit VEGF-Subtypen und Bestrahlung	50
3.2.15.2	Koloniebildungsassay mit Cox-Inhibitoren.....	51
3.2.15.3	Koloniebildungsassay mit konditionierten Tumorüberständen.....	51
3.2.16	Migrationsassay	51
3.2.16.1	Migrationsassay mit Cox-Inhibitoren	52
3.2.16.2	Migrationsassay mit CM.....	52
3.2.16.3	Auswertung des Migrationsassays	53

3.2.17	Methoden zur Bestimmung der Apoptose bei HUVEC nach Bestrahlung	53
3.2.17.1	Das Prinzip des Apoptose Assays	53
3.2.17.2	Evaluation des protektiven Potentials von CM aus bestrahlten Tumorzellen auf den bestrahlungsinduzierten Zelltod bei HUVEC	54
3.2.17.3	Evaluierung des protektiven Potentials von CM aus fraktionierter Bestrahlung auf den bestrahlungsinduzierten Zelltod bei HUVEC	55
3.2.17.4	Durchflusszytometrie	55
3.2.18	Transplantation von Tumorzellen und Therapierung der Mäuse	56
3.2.19	Untersuchung der Tumorzelllinien auf Mycoplasmen-Kontamination	56
3.2.20	Statistische Auswertung der Ergebnisse	57
4.	Ergebnisse	58
	Synthese und Sezernierung von VEGF und FGF-2 bei Tumorzelllinien	58
4.2	Die Wirkungen radioaktiver Strahlung auf Tumorzellen und HUVEC	59
4.2.1	Die Wirkung radioaktiver Strahlung auf die Zellzahl	59
4.2.2	VEGF und FGF-2 werden durch Bestrahlung induziert	61
4.2.3	Fraktionierte Bestrahlung induziert VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen	65
4.3	Wirkungen konditionierter Kulturüberstände auf HUVEC und Tumorzellen	66
4.3.1	Konditionierte Kulturüberstände erhöhen das Überleben von Tumorzellen	66
4.3.2	Tumorzellen zeigen erhöhte Strahlenresistenz durch die bestrahlungsinduzierte Freisetzung von VEGF und FGF-2	68
4.3.3	Tumorzellen protegieren HUVEC vor dem bestrahlungsinduzierten Zelltod	68
4.3.4	Konditionierte Kulturmedien fördern die Migration von HUVEC	71
	Die Wirkung von VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ auf Überleben und Proliferation von Tumorlinien und HUVEC	74
4.4.1	Die VEGF-Subtypen erhöhen das Überleben von Tumorlinien und HUVEC nach Bestrahlung	74
4.4.2	Die Wirkung der VEGF-Subtypen auf die Proliferation von Tumorlinien und HUVEC nach Bestrahlung	77

4.5	Immunhistochemischer Nachweis der VEGF-Rezeptoren bei HNSCC-Linien und HUVEC.....	78
	VEGF ₁₂₁ und VEGF ₁₆₅ bewirken eine subtypspezifische Aktivierung des VEGFR-2.....	81
4.7	Die Wirkung von Bestrahlung auf den Aktivierungszustand des VEGFR-2...	83
4.8	Untersuchungen zur Wirksamkeit der Cyclooxygenase-Inhibitoren	84
4.8.1	Cox-Inhibitoren verringern das Überleben von Tumorzellen	84
4.8.2	Flurbiprofen reduziert die bestrahlungsinduzierte PGE ₂ -Freisetzung	86
4.8.3	Die Wirkung von Flurbiprofen auf die bestrahlungsinduzierte Sezernierung von Interleukin-8, VEGF und FGF-2.....	88
4.8.4	Die Wirkung von Lumiracoxib auf die Bestrahlungsinduktion von VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen	91
4.8.5	Die Wirkung von Meloxicam auf die Bestrahlungsinduktion von VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen	94
4.8.6	NS-398 erhöht <i>in vivo</i> nicht die Radioresponse	96
4.8.7	Migrationsassay mit Cox-Inhibitoren	97
5.	Diskussion	102
5.1	Bestrahlung induziert angiogene Wachstumsfaktoren	102
5.2	Bestrahlungsinduzierte Faktoren wirken auf Tumorzellen und Endothelzellen protektiv.....	107
5.3	Die VEGF-subtypspezifische Protektion von Tumor- und Endothelzellen vor dem strahleninduzierten Zelltod	110
5.4	Die Bedeutung des VEGFR-2 bei der VEGF- und bestrahlungsvermittelten Zellantwort.....	112
5.5	Die Effekte der Cox-Inhibitoren	118
5.6	Ausblick	123
6.	Literaturverzeichnis	125
7.	Anhang	146
I.	Abkürzungsverzeichnis	146
II.	Abbildungsverzeichnis Seite.....	147
III.	Tabellenverzeichnis Seite.....	148

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht.

Originalarbeiten:

1. Brieger J, **Schroeder P**, Gosepath J, Mann WJ. The cyclooxygenase inhibitor flurbiprofen reduces radiation-induced angiogenic growth factor secretion of squamous cell carcinoma cell lines. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1030:37-42.
2. Brieger J, **Schroeder P**, Gosepath J, Mann WJ. VEGF-subtype specific protection of SCC and HUVECs from radiation induced cell death. *Int J Mol Med.* 2005;15(1):145-51.
3. Brieger J, **Schroeder P**, Gosepath J, Mann WJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are released by squamous cell carcinoma cells after irradiation and increase resistance to subsequent irradiation. *Int J Mol Med* 2005;16(1):159-64.

Zusammenfassung

Tumore des Kopf-Hals Bereiches sprechen aufgrund schneller Resistenzbildung häufig schlecht auf die derzeit praktizierten Bestrahlungstherapien an. Der Erfolg dieser Behandlung wird dabei maßgeblich durch die Strahlenresistenz des malignen Gewebes limitiert. Das Verständnis der zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen ist diesbezüglich unvollständig. Die Resistenzzunahme während der klinischen Behandlung könnte durch die Selektion strahlenresistenter Einzelzellen verursacht werden oder durch die Aktivierung von Resistenzmechanismen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bestrahlungsvermittelte Freisetzung möglicherweise protektiv wirkender Faktoren durch Tumorzelllinien des Kopf-Hals Bereiches untersucht. Durch Bestrahlung erfolgte eine Induktion von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*), IL-8 (Interleukin-8) und PGE₂ (Prostaglandin E₂). Die Untersuchung von VEGF und FGF-2 zeigte weiterhin ein zytoprotektives Potential dieser Faktoren, d.h. die Tumorzellen schützten sich autolog. Die bestrahlungsinduzierten Faktoren schützten auch Endothelzellen vor dem strahleninduzierten Zelltod und förderten deren Migration. Die Protektion der Tumorzelllinien und Endothelzellen durch induziertes VEGF wurde mit rekombinantem VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ bestätigt, wobei sich eine deutliche Subtypspezifität zeigte: Tumorzelllinien wurden deutlicher durch VEGF₁₂₁ geschützt, und Endothelzellen durch VEGF₁₆₅. Die verwendeten Tumorzelllinien und Endothelzellen waren immunhistochemisch positiv für die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und Neuropilin-1.

Die Aktivierbarkeit und Subtypspezifität des VEGFR-2 (VEGF-Rezeptor 2) wurde bei Endothelzellen durch die Inkubation mit den rekombinanten VEGF-Subtypen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ gezeigt. Die Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF₁₆₅ setzte früher ein, hielt über einen längeren Zeitraum an und war stärker als mit VEGF₁₂₁, wodurch die protektiven und proliferationsfördernden subtypspezifischen Effekte des VEGF erklärbar werden. Bei der untersuchten Tumorzelllinie konnten aufgrund der niedrigen detektierten Rezeptorkonzentrationen keine verlässlichen Aussagen über dessen Aktivierbarkeit durch VEGF getroffen werden. Bestrahlung mit der therapeutischen Dosis von 2 Gy (Gray) bewirkte keine Aktivierung des VEGFR-2 bei Endothelzellen, wohingegen bei Tumorzellen eine tendenzielle, allerdings sehr schwache Aktivierung erkennbar war.

Um die bestrahlungsinduzierten Mechanismen und die Beteiligung von Cox-1 und Cox-2 (Cyclooxygenasen) an der Bestrahlungsinduktion von VEGF, FGF-2, IL-8 und PGE₂ zu untersuchen, wurden Tumorzellen mit Cox-Inhibitoren kultiviert und

anschließend bestrahlt. Die Induktion von PGE₂ war deutlich schwächer als ohne Inhibierung und FGF-2 wurde tendenziell schwächer induziert. VEGF und IL-8 wurden durch die Substanzen nicht beeinflusst. Daneben bewirkten die Cox-Inhibitoren eine Verringerung der Überlebensrate von Tumorzellen. Die Heilung von Endothelzellen wurde durch Cox-Inhibitoren leicht verzögert.

Diese Daten zeigen, dass die bestrahlungsbedingte Freisetzung protektiv wirkender Faktoren durch Cox-Inhibitoren modifiziert werden kann, wodurch die Effizienz der Strahlentherapie potentiell gesteigert werden könnte.

1. Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome

Tumorerkrankungen sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (STATISTIK DER TODESURSACHEN 2002, STATISTISCHES BUNDESAMT). Derartige Erkrankungen des Kopf-Hals Bereiches stellen mit etwa einer halben Million neuer Fälle jährlich weltweit ein gesundheitliches Problem dar (PANDE 2002). In 95% der Fälle handelt es sich dabei um Plattenepithelkarzinome (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*), wobei von dieser Erkrankung zweimal mehr Männer als Frauen betroffen sind.

Die Entstehung dieser Tumore ist nach dem heutigen Stand der Wissenschaft ein multifaktorielles Geschehen, welches exogenen sowie endogenen Ursprungs sein kann. Als exogene Kanzerogene sind u.a. ionisierende Strahlen, UV-Licht, chemische Substanzen, Asbeststaub sowie Infektionen mit onkogenen Viren wie dem Eppstein-Barr-Virus, Pappilomaviren und den Hepatitis Viren B und C zu nennen (BAEZ 2004, JEON 2004, MUTSCHLER 2001). Tabakrauch und Alkoholkonsum stellen jedoch die beiden wichtigsten Induktoren maligner Transformationen exogenen Ursprungs dar, wobei insbesondere der regelmäßige und kombinierte Genuss zu einem sich multiplizierenden Risiko der Entstehung dieser Tumorentität führt. Als weitere exogene Faktoren, die zu einem gesteigerten Risiko beitragen, sind unzureichende Mundhygiene und Mangelernährung zu nennen (HAAGEDOORN 1996). Als endogene Ursachen der Karzinogenese wurden die genetische Disposition, eine gestörte Immunfunktion sowie ein gestörter Hormonhaushalt beschrieben. Die Plastizität des Genoms ist als weitere wichtige endogene Ursache zu nennen, da durch fehlerhafte Transkription und Reparatur von DNS-Schäden ein erhöhtes Risiko der Entartung besteht.

HNSCC sind maligne transformierte Epithelzellen, die von der Basalschicht des Plattenepithels ausgehen. Die Karzinome sind durchwachsen von Stroma und Blutgefäßen, deren Zellen durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren untereinander in Wechselwirkung treten und sich gegenseitig beeinflussen. Die Entstehung eines massiven Tumors ist ein vielschichtiger Vorgang, der von der normalen Zelle über mehrere Zwischenstufen zum invasiven, d.h. metastasierenden Tumor führt (Abb. 1). In den meisten Fällen handelt es sich um eine Ansammlung genetisch heterogener Zellen. Zur Etablierung eines invasiven Tumors sind vermutlich 4-7 relevante Mutationen notwendig (LOFT 1996, RENAN 1993). Jede Zwischenstufe ist gekennzeichnet von

wachsender genetischer Instabilität und Alteration des Proteoms, wodurch die Tumorprogression und –manifestation stark begünstigt wird (VAUPEL 2004). Durch stufenweise Veränderungen verschaffen sich die mutierten Zellen nach und nach Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren und zytostatischen Faktoren, was in unbegrenzter Zellteilung und reduzierter Apoptoserate resultiert.

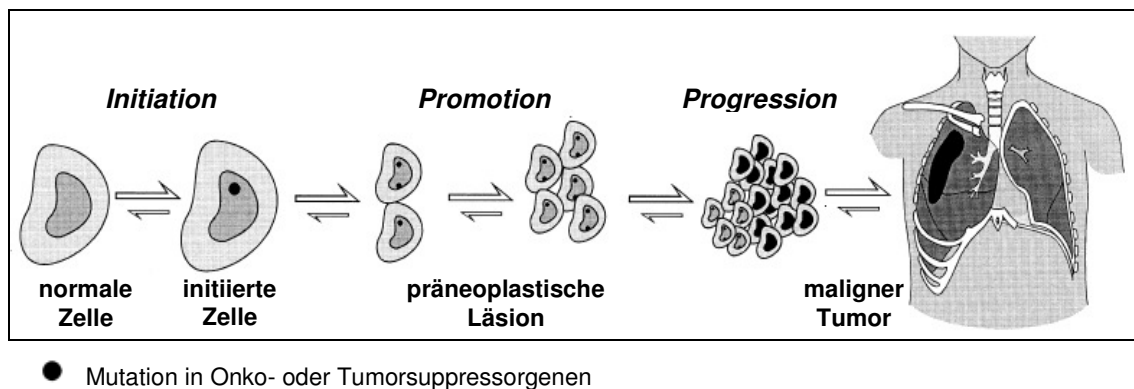


Abb. 1: Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese (verändert nach LOFT 1996).

Die mildeste morphologische Veränderung des Epithels ist die Hyperplasie, bei welcher es zu einer Verdickung der Epithelschicht kommt und lediglich der Anteil der Mitosen in der Basalmembran erhöht ist. Hyperplasien kommen auch physiologisch vor, z.B. im Herzmuskel. Die nächste Stufe atypischer Zellveränderungen wird als Dysplasie bezeichnet. In diesem Stadium sind Mitosen auch in Epithelschichten oberhalb der basalen Zellschicht zu finden. Die Zellen zeigen sich morphologisch verändert und polymorph. Dysplasien gelten als reversibel und gehen der Entwicklung eines Tumors meist um Jahre voraus. Jedoch geben derartige lokale Gewebsveränderungen bereits klinisch einen Hinweis auf ein erhöhtes Tumorrisiko und werden bereits den Präkanzerosen zugeordnet. Das *Carcinoma in situ* (präinvasives Karzinom) weist die zytologischen Merkmale der Malignität auf, wie Zellpolymorphismus, verschobene Kern-Plasma-Relation und Aneuploidie. Jedoch zeigt sich im Gegensatz zum Karzinom noch eine intakte Basalmembran, die diesen Bereich vom gefäßführenden Stroma abgrenzt und daher nicht zur Metastasierung befähigt. Der Übergang vom normalen Plattenepithel zum *Carcinoma in situ* ist somit durch eine zunehmende Entdifferenzierung gekennzeichnet, die sich u.a. in einem zunehmenden Polymorphismus der Zellpopulation, einer gestörten Position der Zellen zueinander und dem zunehmenden Verlust der Gewebsstruktur äußert. Wesentliches Definitionskriterium maligner Tumore ist das

Durchdringen der Basalmembran und damit das invasive Wachstum in subepitheliale Bindegewebsschichten. Durch proteolytische Aktivität und den Abbau des Bindegewebes wandern die Tumorzellen in Lymphspalten und Gefäßen weiter. Dieser als destruktiv bezeichnete Vorgang ist spezifisch für maligne Tumore, welche sich damit von den benignen Neoplasien abgrenzen, die durch verdrängendes Wachstum gekennzeichnet sind.

1.2 Bestrahlungstherapie der Plattenepithelkarzinome

Die aktuell beim Patienten etablierten Tumorthérapien sind seit Jahren konserviert. Die Triade der konventionellen Therapie - operative Entfernung des Tumors samt Peripherie, Chemo- und Bestrahlungstherapie (RT, *radiation therapy*) – werden einzeln oder kombiniert angewendet. Allerdings konnten die Prognosen der Patienten bisher nicht wesentlich verbessert werden: Die 5-Jahresüberlebensrate mit der Bildung von Lokalrezidiven liegt im Durchschnitt bei nur 30-50% (Tab. 1) (SCHLESINGER-RAAB 2003).

	5-Jahresüberleben	Lokale Tumorkontrolle	Rezidivrate
RT plus Chemo.	51%	66%	58%
RT	31%	42%	80%

Tab. 1: Behandlungserfolg bei kombinierter Radio-Chemotherapie und RT (*radiation therapy*, Bestrahlungstherapie) allein (aus www.patient.cancerconsultants.com).

Gerade bei Tumoren der Kopf-Hals Region spielt die RT eine herausragende Rolle. Dabei wird neoplastisches Gewebe mit ionisierender Strahlung, d.h. Röntgen- oder Gammastrahlen, behandelt. Im biologischen Material entfaltet die Strahlenenergie ihre Wirkung, indem sie auf Atome oder Moleküle in den Zellen übertragen wird. Zellen neoplastischen Gewebes sollen durch die Bestrahlung ihre Fähigkeit zur unlimitierten Teilung und Koloniebildung verlieren. Ziel dieser Behandlung ist, alle lebenden Zellen eines Tumors zu töten, wobei der Zelltod durch Bestrahlung direkt induziert wird (Interphasetod), oder erst im Laufe der nächsten Zellzyklen eintritt (reproduktiver Tod). Der Interphasetod tritt vor der ersten Mitose ein, wohingegen der reproduktive Tod während oder erst nach den folgenden Zellzyklen stattfindet (BEDFORD 1991, RADFORD 1986, SHINOMIYA 2001, YAMADA 1988).

Die applizierte Energie kann zur Dislokation von Elektronen der äußeren Hüllen und damit zur Ionisierung und der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS, *reactive oxygen species*) führen, was zelluläre Schäden und / oder den Zelltod zur Folge hat. Die freigesetzten Elektronen wirken sich in hohem Maße schädigend auf die DNS (Desoxyribonukleinsäure) aus und bewirken deren Fragmentation (SHINOMIYA 2001). Durch die entstehenden ROS werden Schäden an der Zytoplasmamembran und an Enzymen hervorgerufen, welche wiederum eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen. Entsprechend wurde beschrieben, dass SAPK / JNK (*stress-activated protein kinase / c-JUN N-terminal kinases*) aktiviert werden und in Folge darauf die Phosphorylierung von c-Jun stattfindet (VERHEIJ 1996, WESTWICK 1995). Auch kann die Bestrahlung von Zellen zu Veränderungen im Zellzyklus führen und einen Wachstumsstillstand verursachen. Je nach Bestrahlungsintensität tritt der prä-mitotische oder der post-mitotische Zelltod ein. Intensitäten ab 20 Gy induzieren die Vorgänge der prä-mitotischen Apoptose (SHINOMIYA 2001).

Bei der RT wird die angestrebte Gesamtdosis fraktioniert, d.h. in Einzeldosen mit niedriger Intensität, verabreicht. Allerdings kann es während der Bestrahlungspausen zur Induktion von Reparaturmechanismen kommen, die den letalen Effekt der Bestrahlung kompensieren, was maßgeblich zur Ausbildung von Resistenzen im Tumor beitragen kann. Nach dem konventionellen Plan für die fraktionierte Bestrahlung von HNSCC wird die Therapie mit 1,8 - 2 Gy an fünf Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 6 bis 8 Wochen durchgeführt, was einer Gesamtdosis von etwa 60 bis 70 Gy entspricht. Bei schnell proliferierenden Geweben, wie z.B. Tumore des Nasopharynx, wird die Einzeldosis hyperfraktioniert, d.h. zwei Behandlungen täglich, verabreicht, da diese Tumore mit der konventionellen Fraktionierung kaum kontrolliert werden können (COTRAN 1989, HUSSEY 1993, LARAMORE 1993, PETERS 1987, RASSEKH 1997, WANG 1981).

Ein wichtiger unerwünschter Nebeneffekt der RT im Kopf-Hals-Bereich ist die Entwicklung eines Zweitmalignoms. Da neben entartetem auch gesundes Gewebe durch Bestrahlung geschädigt wird, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Neoplasien. Bei der Entwicklung eines therapieinduzierten Tumors spielt das Alter zum Zeitpunkt der RT eine Rolle: Bestrahlungen unter dem 5. – 10. Lebensjahr besitzen ein deutlich höheres Risiko im Vergleich zu Bestrahlungen jenseits des 40. Lebensjahres (KUBALL 1998). Für den Kopf-Hals-Bereich wurde das Risiko, innerhalb der folgenden 10 Jahre nach Beendigung der Therapie an einem Zweitmalignom zu erkranken, je nach Lokalisation auf 11 – 16% beziffert (SCHLESINGER-RAAB 2003). Bei Studien zum Hodgkin Lymphom wurde deutlich, dass sich solide Zweitkarzinome auch erst nach über 10 Jahren entwickeln können (TUCKER 1993, SWERDLOW 2000). Beobachtet wurde dies bei Frauen, die im Alter von unter 20 Jahren am Hodgkin Lymphom erkrankten und mit Bestrahlung

therapiert wurden. Daraufhin erkrankten 70% dieser Fälle etwa 30jährig an Brustkrebs (BHATIA 1996, HANCOCK 1993, SANKILA 1996, TRAVIS 2003).

1.3 Die Strahlenresistenz von Tumoren

Die Untersuchung der Radioresistenzentstehung bei Tumoren wurde in den letzten Jahren zu einem zentralen Thema der medizinischen Forschung. Die lokale Tumorkontrolle infolge der RT basiert auf dem erfolgreichen Abtöten aller malignen Zellen, da ein Rezidiv durch das Überleben einer einzelnen Zelle verursacht werden kann. Die überlebenden Zellen zeichnen sich häufig durch eine erhöhte Regenerations- und Repopulationsfähigkeit aus (WITHERS 1988). Den Erfolg der RT beeinflussen Resistenzfaktoren, die auf zellulärer Ebene wirken. Dazu zählen die intrinsische, also selbst verursachte zelluläre Radiosensitivität, wozu das Potential zur Reparatur der strahleninduzierten DNS-Schäden zählt und Wechselwirkungen des Tumors mit dessen Umgebung. Letzteres beinhaltet die im Tumorgewebe herrschende Hypoxie (Sauerstoffmangel) und dessen Reoxigenierung (Abb. 2) (SCHMIDT-ULLRICH 1999, STEEL 1979). Hypoxie tritt dann auf, wenn der Tumor über dessen vorhandenes Gefäßsystem hinaus wächst, aber auch durch Abschnüren der eigenen Gefäßversorgung. Im Vergleich zum hypoxischen Gewebe reduziert die Oxigenierung die zum Abtöten von Zellen nötige Bestrahlungsdosis um das 2,5 bis 3fache.

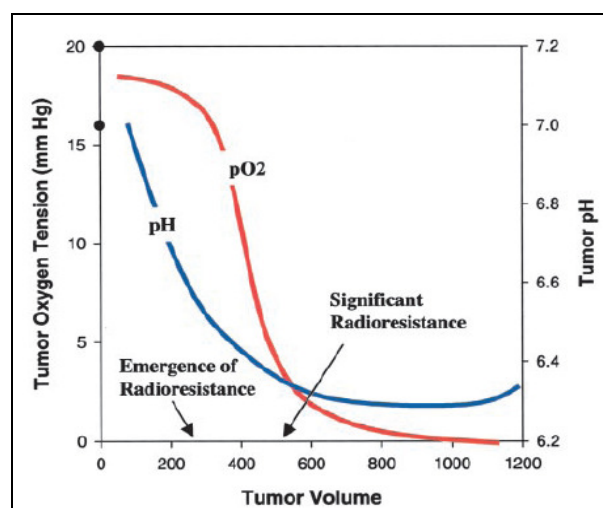


Abb. 2: Modell des Tumorexigenierungszustandes und der Radioresistenz in Abhängigkeit von der Tumorgröße. Der O₂-Bedarf eines Tumors steigt mit dessen Wachstum. Wird der Tumor durch fortwährendes Wachstum hypoxisch, wird der Energiebedarf durch erhöhte Glycolyse angepasst, wodurch der pH-Wert sinkt. Hypoxie und niedriger pH-Wert machen den Tumor gegenüber Bestrahlung resistent. Abkürzung: pO₂, Sauerstoffpartialdruck (nach WACHSBERGER 2001).

Bestrahlung induziert den Zelltod der Tumorzellen. Mittlerweile ist die Beteiligung der tumorassoziierten Gefäße am Erfolg der RT anerkannt, da es während der Bestrahlung auch zu einer Zerstörung der Tumorgefäße kommt. PIRHONEN *et al.* fanden eine Korrelation der Abnahme der Vaskularisation mit der Tumorrückbildung unter RT beim Cervixkarzinom (PIRHONEN 1995). Die reduzierte Gefäßzahl ging der klinischen Rückbildung des Tumors um einige Zeit voraus. Da Tumorzellen stark abhängig von den versorgenden Gefäßen sind, kann bereits ein kleiner Gefäßverlust in der großflächigen Zerstörung malignen Gewebes resultieren (DENEKAMP 1993, FOLKMAN 1992B und 2002). Dementsprechend wurde gefunden, dass der Rückgang des Tumolvolumens transplantierte Mäuse nach Bestrahlung durch die Induktion der Apoptose des Gefäßendothels verursacht wurde (GARCIA-BARROS 2003, PARIS 2001). Die Radioresistenz eines Tumors hängt demzufolge in großem Maße von der Radiosensitivität der Gefäße ab (CAMPHAUSEN 2002).

GORSKI *et al.* zeigten eine RT-induzierte Hochregulation des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) bei verschiedenen Tumorzelllinien. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass dieser Faktor die Radioresistenz von Endothelzellen steigerte (Abb. 3) (GORSKI 1999). Neben VEGF kommt es in Tumorzellen zur bestrahlungsvermittelten Induktion weiterer Faktoren, die angiogene und zytoprotektive Wirkungen besitzen. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass auch die Expression von FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*), Interleukin-8 (IL-8) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) durch Bestrahlung massiv erhöht wird. Die Ergebnisse hierzu werden in Abschn. 3 dieser Arbeit dargestellt (BRIEGER 2004, 2005A und B).

Eine der frühesten Antworten auf Bestrahlung ist die Aktivierung von Signalkaskaden, welche die Genexpression und den Zellzyklus regulieren (BRISTOW 1998, COLEMAN 2002, HANAHAN 2000B). Entsprechend werden drei Gruppen von *mitogen activated protein kinases* (MAP-Kinasen) durch DNS-Schäden aktiviert: ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK und p38, welche wiederum für Transkriptionsfaktoren kodierende Gene aktivieren und die spezifische Transkription einer Reihe von Genen initiieren (IP 1998, KYRIAKIS 1996, MARSHALL 1995). Zudem wird der durch Hypoxie aktivierte Transkriptionsfaktor Hif-1 (*hypoxia inducible factor 1*) auch durch Bestrahlung reguliert, wodurch wiederum die Produktion verschiedener angiogener Faktoren wie VEGF und IL-8 initiiert wird (Abb. 3) (FUKUDA 2003, MOELLER 2004, JEONG 2003). Erhöhte Konzentrationen dieser Faktoren wirken proangiogen und radioprotektiv (ALTORKI 2004, GORSKI 1999, GUPTA 2002) und korrelieren zudem mit schlechter Prognose und entsprechendem Krankheitsverlauf (CHOY 2003, GUPTA 2002, LEE 1995).

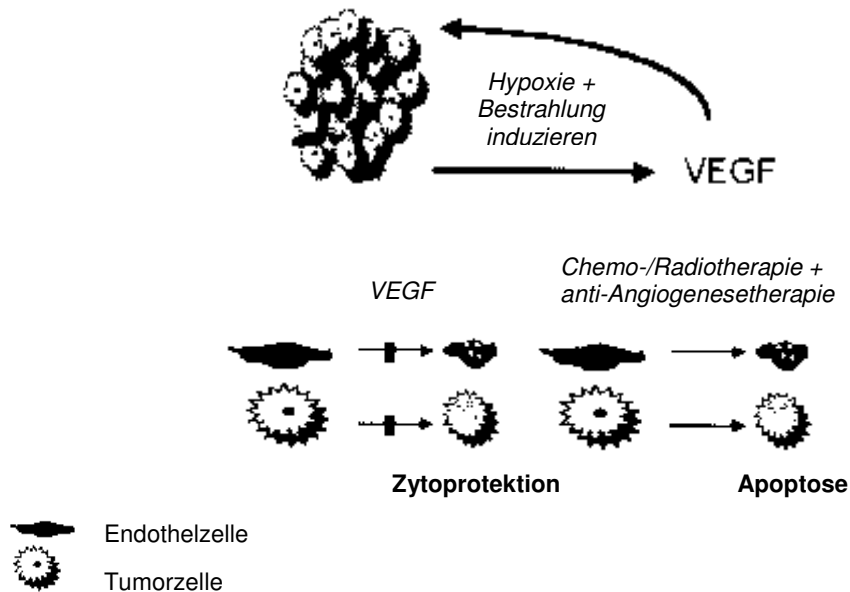


Abb. 3: Hypoxie und Bestrahlung induzieren angiogene Faktoren wie VEGF, wodurch die Resistenz gegenüber apoptoseinduzierenden Therapien erhöht wird. Die Anti-Angiogenesetherapie verhindert die Resistenzbildung und erhöht die Effektivität der Radiotherapie (verändert nach HARMEY 2002).

1.4 Angiogenese

Angiogenese ist ein entscheidender Schritt bei der Progression und Metastasierung von Tumoren. Als Angiogenese wird der Prozess bezeichnet, der zur Bildung neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen führt (RISAU 1997). Hierbei werden zwei Mechanismen unterschieden: Angiogenese kann durch Sprossung von Endothelzellen erfolgen oder durch Teilung eines vorhandenen Gefäßlumens, was als Intussuszeption bezeichnet wird (PATAN 2000). Physiologisch findet dieser Vorgang im adulten Organismus nur selten statt: Er ist zeitlich begrenzt bei der Ovulation, der Wundheilung und der Embryogenese zu beobachten (LOCKHART 2003, SMITH 2001, TAMANINI 2004). Angiogenese ist ein Prozess, bei dem viele Wirkmechanismen ineinander greifen und gegenseitig interagieren. Eine gestörte Angiogenese resultiert in gesteigertem oder ungenügendem Kapillarwachstum (pathologische Angiogenese) und führt zu einer Vielzahl von Erkrankungen (Abb. 4). Pathologisch ist die gesteigerte Angiogenese u.a. bei soliden Tumoren, Psoriasis, rheumatoider Arthritis und Retinopathie (CANETE 2004, GUPTA 2003, KORNBERG 2004, PLUDA 1997, RIBATTI 2004, SZEKANECZ 1998). Ungenügende Kapillarbildung kann u.a. in Infertilität, verzögerter Wundheilung und Herz-Kreislaufkrankungen resultieren (GEVA 2000, HELISCH 2000).

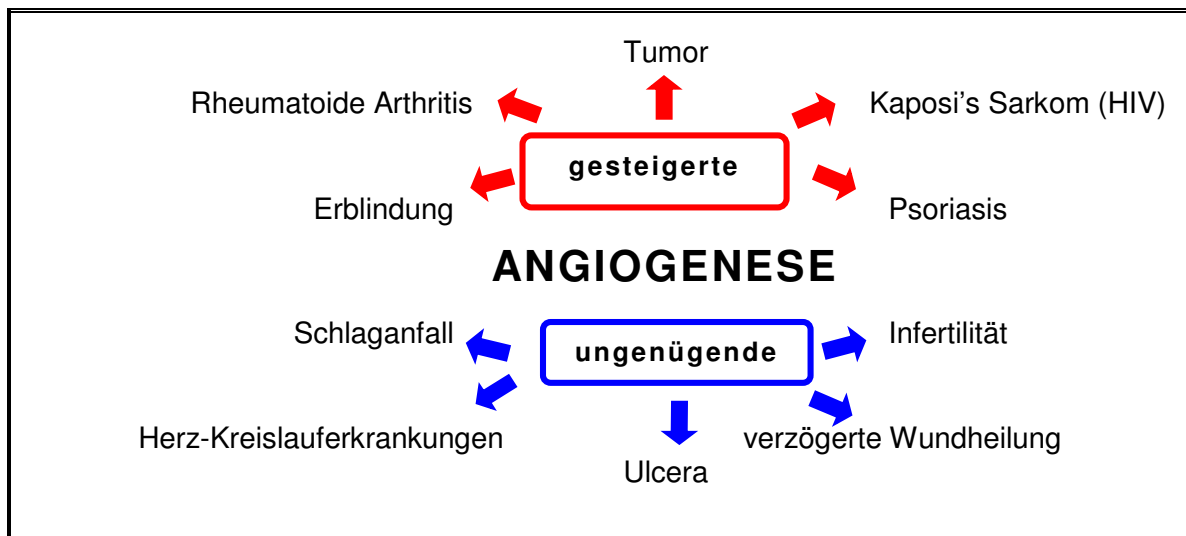


Abb. 4: Angiogeneseabhängige Erkrankungen (verändert nach www.med.unibs.it/~airc/).

Das gesamte Blutgefäßsystem wird von Endothelzellen ausgekleidet. Endothelzellen tragen an ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für verschiedene Moleküle, wie Wachstumsfaktoren, *low density lipoprotein*, Metabolite (NO, Serotonin) und Hormone (RIBATTI 2002).

Bei der Angiogenese wird die Sprossung von Endothelzellen als Antwort auf mehrere angiogene Stimuli initiiert (Abb. 5). Es kommt zur Aktivierung der Zellen, zur Produktion und Freisetzung proteolytischer Enzyme (Matrixmetalloproteasen, MMP), die zur lokalen Degradation der Basalmembran führen. Die Endothelzellen bilden Pseudopodien aus, welche die Migration in die Extrazellulärmatrix ermöglichen (AUSPRUNK 1977, KALKA 2000). Die Zellen migrieren dem auslösenden angiogenen Stimulus folgend in das umliegende Gewebe und bilden den Endothelsproß (FOLKMAN 1984). Die Verlängerung des Sprosses erfolgt durch die Proliferation der Endothelzellen an der Basis. Abschließend wird die Basalmembran entlang des neuen Sprosses durch die Endothelzellen gebildet (AUSPRUNK 1977).

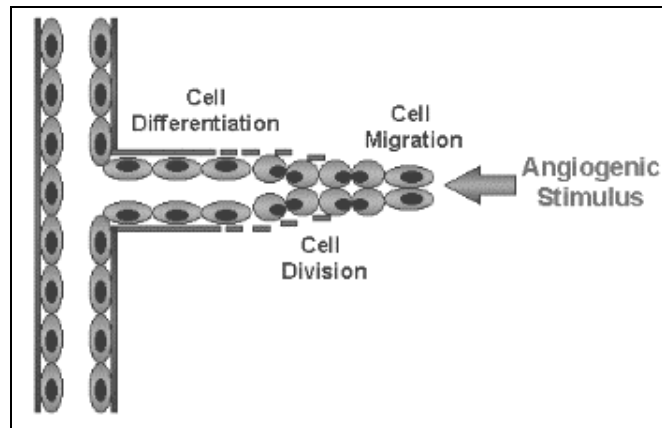


Abb. 5: Initiation der Angiogenese. Der Angiogeneseprozess beginnt mit der Degradation der Basalmembran durch von Endothelzellen sezernierten MMP, wodurch sich die Zellen die Möglichkeit zur Migration und Proliferation schaffen. Sie bilden solide endotheliale Sprosse in das Stroma hinein, aus welchen sich vaskuläre Schlaufen bilden. Intakte Gefäße entwickeln sich nach der Ausbildung von *tight junctions* und einer neuen Basalmembran (aus www.med.unibs.it/~airc/).

Neuere Forschungsarbeiten geben Grund zu der Annahme, dass Tumorzellen sogar selbst an der Gefäßbildung beteiligt sein können (CONWAY 2001, HENDRIX 2003, MANIOTIS 1999): CHANG *et al.* fanden Hinweise, dass die Lumenauskleidung der tumorassoziierten Blutgefäße aus einem Mosaik endothelialer und Tumorzellen bestehen kann (CHANG 2000, FOLKMAN 2001). Diese Gefäße sind funktionell und an die Blutversorgung angeschlossen (FOLBERG 2000).

1.4.1 Tumorinduzierte Angiogenese

Eine intakte und expandierende Gefäßversorgung ist für das Überleben und die Progression solider Tumore unverzichtbar, da die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet sein muss. Die Bedeutung der Angiogenese während des Tumorwachstums und der Metastasierung fand FOLKMAN bereits vor etwa 30 Jahren heraus (FOLKMAN 1971 und 1976). Solide Tumore entwickeln sich aus kleinen Ansammlungen transformierter Zellen heraus, deren Wachstum durch ein Gleichgewicht von Proliferation und Apoptose stagniert (HOLMGREN 1995). Im frühen Stadium liegen die Tumore noch avaskular, d.h. noch nicht an das Gefäßsystem angeschlossen, vor. Erreicht die Zellkolonie einen Durchmesser von etwa 2 mm, ist die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten durch Diffusion allein nicht mehr möglich. Weiteres Wachstum ist nur durch den Anschluss an das Blutgefäßsystem, d.h. Vaskularisierung des Tumors, möglich (FOLKMAN 1971). Mit der Vaskularisierung wird

dann auch die Metastasierung, d.h. Abwanderung einzelner Zellen aus dem Tumorverband heraus über das Blutgefäß, begünstigt.

Da für die Tumorprogression die Angiogenese den limitierenden Faktor darstellt, werden Therapieansätze gesucht, diese zu inhibieren. Das therapeutische Ziel der Zytostatika und RT der bisherigen Behandlungsstrategien ist die Tumorzelle direkt (Abb. 6A). Die Kombination zweier bekannter Therapiemodi gehört mittlerweile zur Standardbehandlung (FORASTIERE 2001, RYAN 2000). Während sich die Anti-Angiogenesetherapie allein gegen das tumorassoziierte und daher proliferierende Gefäßendothel richtet (Abb. 6B), erfolgt beim multimodalen Konzept die dreifache Kombination der Therapieformen (Abb. 6C) (BISCHOF 2004).

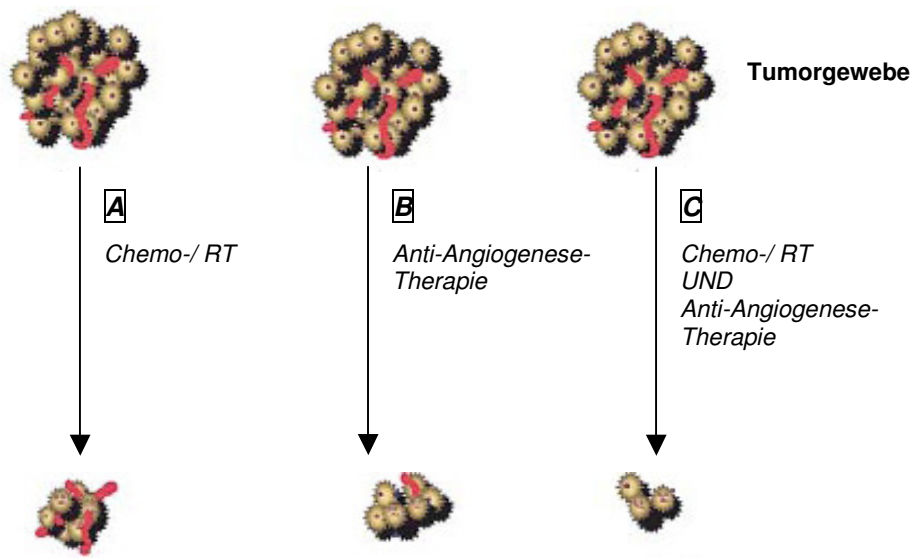


Abb. 6: Schematische Darstellung der Wirkungen der Tumorthérapien. RT und viele chemotherapeutische Substanzen induzieren Apoptose bei Tumorzellen, A. Die Anti-Angiogenesetherapie verursacht einen Rückgang der Gefäßdichte durch Apoptoseinduktion bei Endothelzellen und die damit verbundene Schrumpfung des Tumors, B. Die multimodale Therapie resultiert in einem mehr als additiven Effekt des Tumorrückgangs, C, (verändert nach HARMEY 2002).

Mit den bisher untersuchten antiangiogen wirksamen Substanzen wurde Wachstumsverzögerung und Reoxygenierung des Gewebes beobachtet, wodurch der Erfolg der Bestrahlung erhöht werden konnte (TEICHER 1995). Bei den endogenen Angiogeneseinhibitoren werden drei große Wirkstoffgruppen unterschieden, die sich in verschiedenen Phasen klinischer Studien befinden oder als Arzneimittel zugelassen wurden:

I. Inhibitoren eines angiogenen Proteins

Mit spezifischen Antikörpern gegen VEGF konnten KIM *et al.* im Mausmodell die Progression xenotransplanteder Tumore hemmen (KIM 1993). Mit Avastin wurde ein spezifischer Antikörper gegen humanes VEGF entwickelt (PRESTA 1997). Mit Trastuzumab wurde ein Antikörper gegen den humanen epidermalen Rezeptor Her2 entwickelt. Her2 bildet mit dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) Heterodimere und liegt bei vielen Mammakarzinomen überexprimiert vor (MENARD 2004). Weitere spezifische Substanzen sind die EGFR-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib. Eine Korrelation des Rezeptors mit Kopf-Halstumoren wurde beschrieben, weshalb die Inhibition dieser Thyrosinkinase ein interessantes therapeutisches Ziel darstellt und bereits klinische Anwendung findet (ALBANELL 2005, POMERANTZ 2003).

II. Inhibitoren von zwei bis drei angiogenen Proteinen

Iressa blockiert bei Tumorzellen die Produktion von VEGF, FGF-2 und *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) und verhindert die Aktivierung des EGFR (CIARDIELLO 2001). Sugen 11248 reduziert die Expression des VEGF-Rezeptor 2 und des *placenta derived growth factor*-Rezeptor (PDGF) (MENDEL 2003).

III. Inhibitoren eines breiten Spektrums angiogener Regulatoren

Mit TNP-470 wurden die vielfältigsten Anti-Tumoreffekte der Angiogeneseinhibitoren in über 400 Studien beobachtet (CARMELIET 2000, FOLKMAN 2004). Endostatin konkurriert mit VEGF um dessen VEGF-Rezeptoren 1 und 2 und blockiert so dessen intrazelluläre Signalvermittlung (KIM 2002). Bei proliferierenden Endothelzellen erhöht Endostatin die Apoptoserate und reduziert die Proliferation dieser Zellen (CAO 1999, O'REILLY 1994 und 1997).

Neben deutlich reduzierten Nebenwirkungen der Antiangiogenesetherapien ist sicherlich auch das Ausbleiben der Resistenzbildung von Vorteil. Bei herkömmlichen Chemotherapien kommt es aufgrund der hohen genetischen Instabilität der Tumorzellen leichter zur Ausbildung von Resistenzen, was bei „normalen“ Endothelzellen durch deren genetische Stabilität nicht zu erwarten ist (KERBEL 1991 und 1997).

1.4.2 Regulation der Angiogenese

Die Angiogenese wird durch verschiedene Faktoren reguliert, die inhibierend oder stimulierend auf das Gefäßendothel wirken (PEPPER 1992, PLENDL 2002). Die Faktoren können autokrinen oder parakrinen Ursprungs sein und proangiogen oder angiostatisch wirken. Einige dieser Faktoren werden in Tab. 2 aufgezählt. Angiostatisch wirkende Faktoren hemmen entweder direkt die angiogene Antwort der Endothelzellen oder sie wirken indirekt über die Hemmung proangiogen wirkender Substanzen (FOLKMAN 1992A). Unter physiologischen Bedingungen stehen die Faktoren in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander. Beim *angiogenic switch* verschiebt sich das Gleichgewicht, entweder durch eine erhöhte Produktion an angiogenen oder einfach durch vermindertes Angebot von angiostatischen Regulatoren. Dies kann von Tumorzellen (Abb. 7), Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen oder aktivierten Makrophagen ausgehen. Angiogene Faktoren können auch durch die Degranulation von Thrombozyten oder proteolytischen Abbau extrazellulärer Matrix freigesetzt werden (GINGIS-VELITSKI 2004, KANEMATSU 2004).

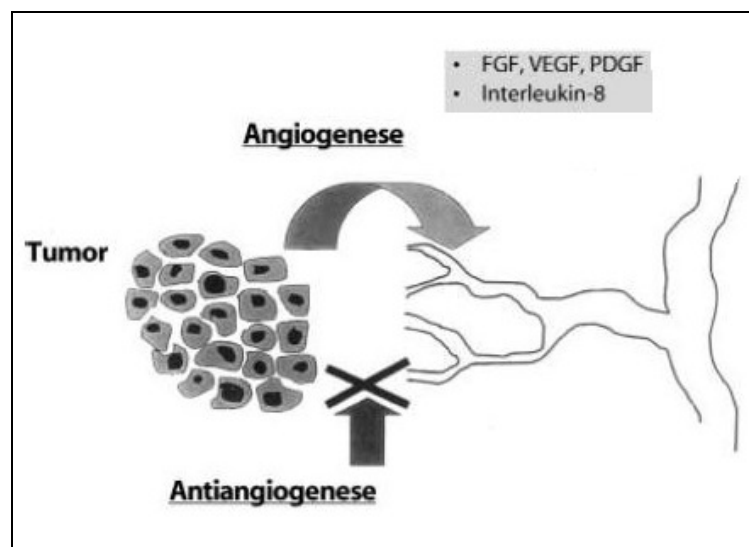


Abb. 7: Schematische Darstellung der Tumorangiogenese und Antiangiogenese. Wechselwirkung zwischen Pro- und Antiangiogenesefaktoren (verändert nach KUNZ 2002).

ANGIOGENE FAKTOREN	ANGIOSTATISCHE FAKTOREN
<p><u>Wachstumsfaktoren</u> FGF-1, -2 EGF G-CSF GM-CSF IGF-1 HGF/SF Pleiotropin Erythropoietin</p>	<p><u>Wachstumsfaktoren</u> TGF-β (hohe Konz.) TNF-α (hohe Konz.)</p>
<p><u>Zytokine</u> IL-1 IL-3</p>	<p><u>Zytokine</u> Interferon-α Platelet factor-4 IL-12 IP-10</p>
<p><u>Matrixmetalloproteinasen (MMPs)</u> Elastase Gelatinase</p>	<p><u>Tissue inhibitors of metalloproteinasen (TIMPs)</u></p>
<p><u>Serinproteasen</u> Plasmin Urokinase</p>	<p><u>Serinproteasen</u> Plasminogenaktivatorinhibitor</p>
<p><u>Prostaglandine</u> PGE₁, PGE₂</p>	<p>Angiostatin (Spaltprodukt des Plasminogen)</p>
<p><u>Integrine</u> Integrine αVβ3 Ang-1 14 kD Plasmaprotein mit angiogener und ribonukleolytischer Aktivität Angiogenin PAF NO</p>	<p>Endostatin (Spaltprodukt des Kollagen XVIII)</p> <p>Ang-2 16 kD Prolaktinfragment</p> <p><i>placental proliferin related protein</i> Vasostatin Thrombospondin-1 NO Antithrombin III-Fragment</p>

Tab. 2: Angiogene und angiostatische Faktoren. Abkürzungen: Ang=Angiopoietin, G-CSF=*granulocyte colony stimulating factor*, GM-CSF=*granulocyte macrophage colony stimulating factor*, HGF/SF=*hepatocyte growth factor/scatter factor*, HIV-tat=*human immunodeficiency virus-transcriptional activator*, IGF=*insulin like growth factor*, IL=Interleukin, IP=*inducible protein*, NO=Stickstoffmonoxid, PAF=*platelet activating factor*, PGE₂=Prostaglandin E₂, PIGF=*placenta growth factor*, TGF=*transforming growth factor*, t- bzw. u-PA=*tissue-type bzw. urokinase-type plasminogen activator* (nach BUSSOLINO 1996, CHIN 1997, LI 2003A, PAPER 1998, PIKE 1998, RIBATTI 1999, SUHARDJA 2003, TSURUMI 1997).

Als proangiogen werden Faktoren bezeichnet, welche die Angiogenese fördern. Die Neutralisation dieser Substanzen sollte eine Hemmung der Angiogenese zur Folge haben. Beim Kolonkarzinom wird dieser Mechanismus mit Avastin therapeutisch genutzt. Da VEGF von etwa 60% aller humanen Tumore produziert wird, stellt die Inhibition dieses Faktors ein wichtiges Therapieziel dar (FOLKMAN 2004, RISAU 1996).

Auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten angiogenen Faktoren VEGF, FGF-2 und IL-8 wird im Folgenden näher eingegangen.

1.4.2.1 VEGF

Zur VEGF-Genfamilie werden aufgrund der Sequenzhomologie fünf Proteine gezählt: VEGF-A, -B, -C, -D, -E und der *placenta growth factor* (PlGF) (BUSSOLINO 1997, JOUKOV 1996, LITTLE 1994, ORLANDINI 1997, SUHARDJA 2003). VEGF-A stellt das am besten untersuchte Polypeptid der VEGF-Familie dar und ist maßgeblich an der Angiogenese beteiligt. VEGF-A besteht aus einer Cystein-Knoten-Struktur mit acht konservierten Cysteinenresten, die der Disulfidbrückenbindung dienen und so die einzelnen Monomere stabilisieren (MULLER 1997, SIEMEISTER 1998). Durch alternatives Spleißen des Primärtranskriptes entstehen fünf unterschiedliche Isoformen. Sie werden nach der Anzahl ihrer Aminosäuren benannt: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ (CHARNOCK-JONES 1993, ENOMOTO 2003, FERRARA 1991B, HOUCK 1991). Die Spleißvarianten der VEGF-Subtypen sind im N- und C-terminalen Ende konserviert, d.h. es werden immer die Exons 1 bis 5 für den N-terminalen und Exon 8 für den C-terminalen Bereich exprimiert. Die molekularen Massen der Produkte des VEGF-A-Gens betragen zwischen 18 und 24 kD (FERRARA 1989, GOSPODAROWICZ 1989). Alle Isoformen tragen ein 26 Aminosäuren (AS) langes Signalpeptid. Die kürzeren Proteine werden sezerniert, wobei die 189 und 206 AS langen Derivate an der Zelloberfläche oder der extrazellulären Matrix gebunden vorliegen. Verursacht wird dies durch die alternativ gespleißten Exons 6 und 7, welche die Bindung an Heparin und die Zellassoziation vermitteln (HOUCK 1992).

Die Wirkung von VEGF-A äußert sich in gesteigerter Angiogenese und erhöhter Gefäßpermeabilität (SENGER 1986). Bei heterozygoten *knock-out* Mäusen führt die Inaktivierung des *vegf*-Gens an Tag 10 bis 11 der Embryonalentwicklung zum Tod. Die Embryonen sind wachstumsverzögert und zeigen Entwicklungsanomalien wie z.B. eine unvollständige Blutinselbildung auf (FERRARA 1996A).

In vielen Zelltypen und Geweben konnte eine physiologische VEGF-Expression gezeigt werden. Dazu gehören u.a. Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Osteoblasten, Keratinozyten und Gewebe wie Epidermis, Lunge, Hypophyse und Gehirn während der Embryonalentwicklung (BERSE 1992, FERRARA 1989 und 1991A, FREEMAN 1995, JOSKO 2000, VIAC 1997). Eine pathologische VEGF-Expression ist in vielen Tumoren zu finden. So wurde in Tumorzellen und -geweben eine Korrelation von detektiertem VEGF und der Tumormanifestation, -progression und Metastasierung beobachtet (VLACHTSIS 2002). Die Überexpression von VEGF und der Korrelation mit einer schlechten Prognose und der Tumorprogression wurde aber auch bei vielen anderen Entitäten, wie u.a. dem Kolon-, dem Mamma- und dem Lungenkarzinom beschrieben (BERNS 2003, FONTANINI 1997, LEE 2000, MANDERS 2002).

1.4.2.1.1 Regulation der VEGF-Expression

Die Regulation der Expression von VEGF findet auf vielfältige Weise statt. Im Folgenden sind einige, insbesondere für diese Arbeit relevante Modulatoren dargestellt.

Hypoxie und HIF

Die zelluläre Antwort auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen wird auf transkriptioneller Ebene durch HIF reguliert. HIF sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus je einer der drei HIF α -Untereinheiten (HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α) und der HIF1 β -Untereinheit bestehen. Die HIF1 β -Untereinheit wird ubiquitär exprimiert und nicht durch Hypoxie reguliert (BRAHIMI-HORN 2001, KEWLEY 2004). HIF-1 α reguliert die zelluläre Antwort auf die physiologische und pathologische Hypoxie (WANG 1995). Bei Normoxie wird das im Zytoplasma vorkommende HIF-1 α durch Hydroxylierung schnell degradiert, so dass es nur noch schwach nachweisbar ist (Abb. 8, rechtsseitig). Bei Hypoxie akkumuliert Hif-1 α durch Stabilisierung (JIANG 1996), dimerisiert mit HIF1 β , dem nukleären Translokator, und wandert in den Nukleus, wo es Gene durch Bindung an deren *hypoxia regulatory elements* (HRE) aktiviert (WANG 1995) (Abb. 8, linksseitig).

Mittlerweile wurden mehr als 40 durch Hif-1 regulierte Gene beschrieben, wie z.B. VEGF und der VEGF-Rezeptor 2 (BROGI 1996, PUGH 2003, SEMENZA 2002). Die Deletion des Hif-1 α Gens oder die Unterbrechung der Hif-1 α Transkription, resultiert im Verlust der VEGF-Sekretion durch Tumorzellen, in der Angiogenese-Suppression und einer deutlichen Verzögerung des Wachstums solider Tumore (CARMELIET 1998, FERRARA 2003, ILIOPOULOS 1996, KUNG 2000). Eine der eindrucksvollsten Beispiele für die Rolle des HIF in der Angiogenese und der Tumorprogression ist der Funktionsverlust des von Hippel-Lindau Proteins (pVHL) (Abb. 8). VHL ist ein Tumorsuppressorgen, welches in vielen Tumoren mutiert vorliegt (IVAN 2001). Fehlt pVHL, wird HIF-1 α nicht mehr degradiert, akkumuliert intrazellulär und verursacht eine erhöhte VEGF-Transkription (BRAHIMI-HORN 2001, MAXWELL 1999 und 2002). Eine hohe Vaskularisierung ist daher für Tumore mit VHL-Mutationen ein typisches Bild.

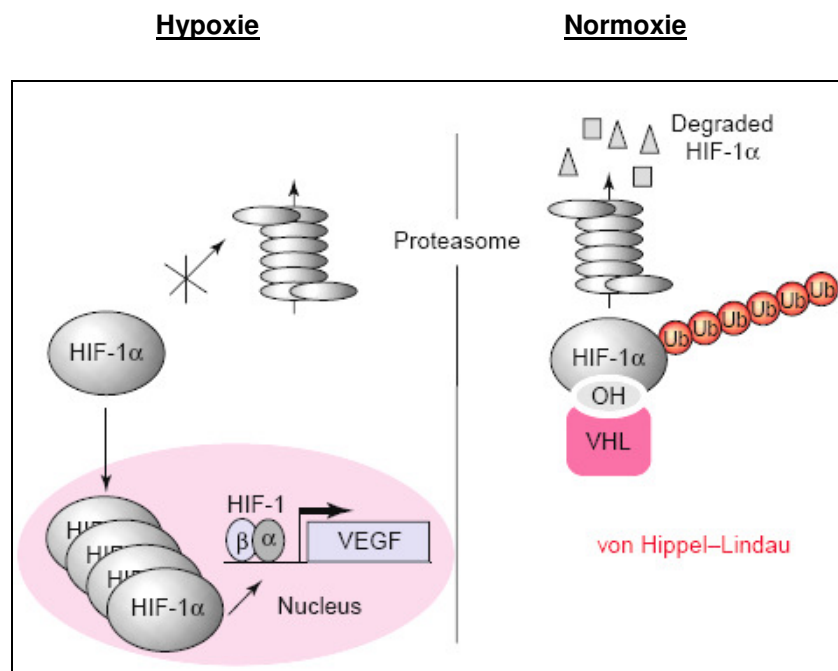


Abb. 8: Regulation der Degradation und Stabilität von HIF-1 α unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen. Bei Hypoxie wird HIF-1 α nicht hydroxyliert und daher nicht von pVHL erkannt und akkumuliert in der Zelle. HIF-1 α wandert in den Nucleus und dimerisiert mit der konstitutiv exprimierten β -Untereinheit. Das Dimer bindet nun an HRE der Zielgene, z.B. VEGF und fördert so deren Transkription. Abkürzung: Ub=Ubiquitin (verändert nach BRAHIMI-HORN 2001).

Ionisierende Strahlung

Die Bestrahlung von Tumorzellen verursacht eine Hochregulation von VEGF bei verschiedenen Tumorzelllinien (GORSKI 1999). Diese Beobachtung wurde an den in unserer Arbeitsgruppe etablierten HNSCC-Linien bestätigt (BRIEGER 2004 und 2005B). Die Mechanismen sind nach wie vor unklar. Allerdings wurde durch die DNA-schädigende Wirkung ionisierender Strahlung die Aktivierung einer Reihe von intrazellulären Transduktionskaskaden festgestellt. JNK und ERK werden durch Bestrahlung aktiviert und sind an der Regulation der VEGF-Expression beteiligt.

Epidermal growth factor receptor und Her-2/neu

Die Bedeutung des EGFR (ErbB1) und Her-2/neu (ErbB2) bei der VEGF-Regulation und der Angiogenese wurde u.a. beim Kolonkarzinom, beim Mamakarzinom, dem Nierenzellkarzinom und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom gezeigt (BRUNS 2000, CIARDIELLO 2000, KEDAR 2002, KUMAR 2001, YANG 2002). AKAGI *et al.* zeigten die Induzierbarkeit von VEGF durch den *epidermal growth factor* (EGF) (AKAGI 2003).

Cyclooxygenase-2

Die Regulationen von VEGF und der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) scheinen eng miteinander verbunden zu sein: Es wurde eine Korrelation der Expression von Cox-2 mit der Karzinogenese und Angiogenese beschrieben (AOKI 2002, CALLEJAS 2001, COSTA 2002, JOO 2003, LANGENBACH 1999, TSUJII 1998, WILLIAMS 1999). LIM *et al.* stellten die Überexpression von Cox-2 bei HNSCC im Zusammenhang mit der VEGF-Expression dar (LIM 2003). Auch wurde die Hochregulation von VEGF infolge der Induktion von Cox-2 beim Prostatakarzinom *in vitro* gezeigt (LIU 1999). Die proangiogene Wirkung von Cox-2 ist auf dessen katalytische Produkte, die Prostaglandine, zurückzuführen. Die Korrelation der Prostaglandine mit der Hochregulation von VEGF wurde im Zusammenhang der Tumorangiogenese ausführlich beschrieben (BEN-AV 1995, GATELY 2000, FOSSLIE 2001, GOODWIN 1983). Auf die Cyclooxygenasen und die Prostaglandine wird in Abschn. 1.5 ausführlicher eingegangen.

1.4.2.1.2 VEGF-Rezeptoren und Signaltransduktion

Die angiogene Wirkung des VEGF verläuft über VEGF-Rezeptoren (Abb. 9), die das extrazelluläre Signal in die Zielzelle hinein vermitteln. Es wurden verschiedene Rezeptoren für VEGF beschrieben:

- VEGF-Rezeptoren 1 und 2

Die VEGF-Rezeptoren 1 (VEGFR-1; Flt-1, *fms-like Tyrosine kinase*) und 2 (VEGFR-2; KDR, *kinase insert domain containing receptor*) sind Rezeptoren des Thyrosinkinase-Typs, an welche die hoch affine Bindung des Liganden – VEGF – erfolgt (Abb. 9) (ZACHARY 2003, TERMAN 1991). Die Dissoziationskonstante (K_D) für die Bindung von VEGF-A an den VEGFR-1 beträgt 10-30 pM, wohingegen die Bindungsaffinität des VEGF-A an den VEGFR-2 mit K_D von 75 – 760 pM niedriger ist (CROSS 2003, DEVRIES 1992, WALTENBERGER 1994). Die Affinitäten der Rezeptoren für die VEGF-Subtypen 121 und 165 wurden unterschiedlich beschrieben. Zwar bindet VEGF₁₆₅ mit höherer Affinität an den VEGFR-1, verursacht jedoch eine stärkere Phosphorylierung, d.h. Aktivierung des VEGFR-2 (PARK 1994, SEETHARAM 1995, WALTENBERGER 1994). Zudem scheint der VEGFR-2 eine höhere Affinität für VEGF₁₂₁ zu besitzen (SOKER 1998). VEGF-Rezeptoren befinden sich vor allem auf der Oberfläche vaskulärer Endothelzellen. LALLA *et al.* wiesen diese Rezeptoren jedoch auch auf HNSCC nach, was durch unsere Laborergebnisse bestätigt wurde (BRIEGER 2005A, LALLA 2003). Rezeptoren des Thyrosinkinase-Typs korrelieren mit Vorgängen des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Morphogenese, wobei dies im Falle

der VEGF-Rezeptoren durch den VEGFR-2 vermittelt wird (WALTENBERGER 1994). Für beide Rezeptoren wurden unterschiedliche Affinitäten gegenüber den Mitgliedern der VEGF-Familie beschrieben. Der VEGFR-1 bindet alle VEGF-A Subtypen, den PlGF und VEGF-B (FERRARA 1996B, OLOFSSON 1998, SAWANO 1996). VEGFR-2 bindet neben VEGF-A auch bestimmte Formen von VEGF-D und -E (ACHEN 1998, MEYER 1999) (Abb. 9).

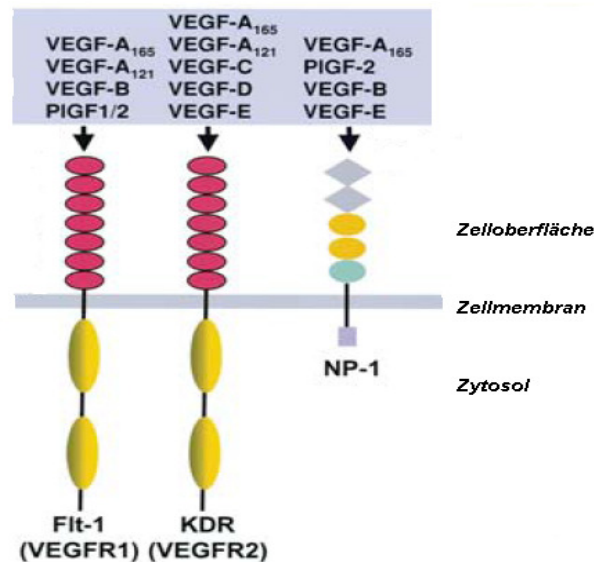


Abb. 9: Übersicht der VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und NP-1 sowie deren unterschiedlichen Ligandenaffinitäten. Die VEGF-Rezeptoren 1 (Fit-1) und 2 (KDR) bestehen aus einer extrazellulären Domäne (rot), einem transmembranen Bereich und der Kinase Region (gelb). Die Liganden weisen mit Pfeilen auf die Rezeptoren, an die sie binden können (verändert nach ZACHARY 2003).

- Neuropiline

Weiterhin besitzen Neuropiline (Neuropilin-1, NP-1 und Neuropilin-2, NP-2), die zu den Semaphorin/Collapsin-Rezeptoren zählen, eine Affinität für VEGF (SOKER 1998). Die Neuropilin-Rezeptoren wurden initial auf Neuronen gezeigt und später auch auf Prostata- und Plattenepithelkarzinomen gefunden (Abb. 9) (BRIEGER 2005A, NAKAMURA 2000, MIAO 2000). Im Gegensatz zu den VEGF-Rezeptoren binden die Neuropiline jedoch nicht alle VEGF-Isoformen. So wurde NP-1 als hoch affin gegenüber VEGF₁₆₅ beschrieben, wohingegen VEGF₁₂₁ Neuropilin nicht aktiviert (GITAY-GOREN 1996, SOKER 1996 und 1998). Die Neuropiline wurden auch als Co-Rezeptoren für VEGF beschrieben, wodurch ihnen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese beigemessen wird (SOKER 1996 und 1998).

Nach Bindung des Liganden – VEGF – an den VEGF-Rezeptor dimerisieren zwei Rezeptoren, wodurch die Autophosphorylierung stattfindet. Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion werden mindestens elf weitere Proteine phosphoryliert (GUO 1995). Beim VEGFR-1 wurden sechs Phosphorylierungsstellen identifiziert (ITO 1998, SAWANO 1997)

und beim VEGFR-2 vier (DOUGHER-VERMAZEN 1994). Unlängst wurde gezeigt, dass die Aktivierung des VEGFR-1 durch PIGF eine Transphosphorylierung des VEGFR-2 bei Endothelzellen verursacht (AUTIERO 2003). In Abb. 10 ist die Signaltransduktionskaskade am Beispiel des VEGFR-2 (KDR) und dessen Liganden VEGF₁₆₅ dargestellt.

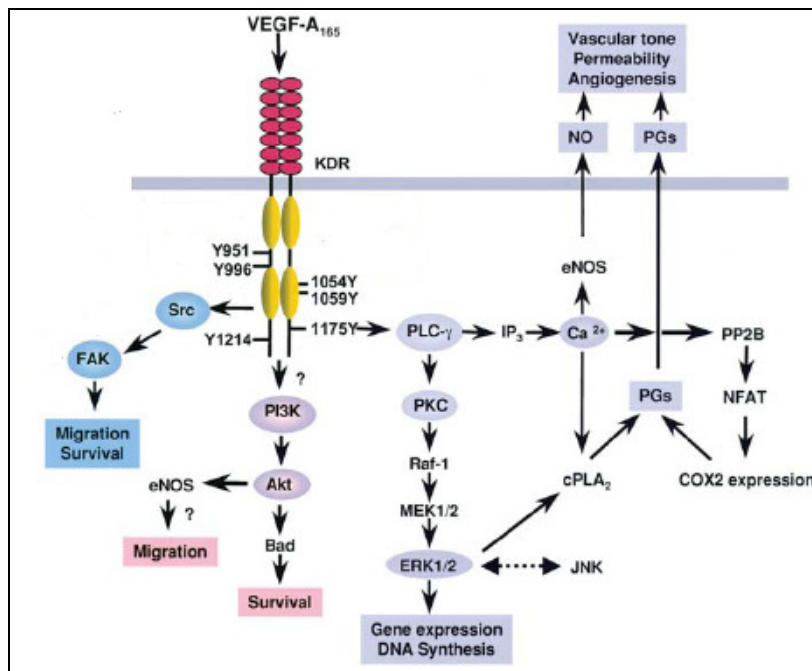


Abb. 10: Signaltransduktionskaskade von VEGF. VEGF₁₆₅ bindet an den VEGFR-2 (KDR), der daraufhin dimerisiert und an verschiedenen Thyrosinresten an der intrazellulären Domäne (gelb) autophosphoryliert. Weitere Abkürzungen: PP2B (*protein serine/threonine phosphatase 2B*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) (verändert nach ZACHARY 2003).

Die Signalkaskade zum Überleben von Endothelzellen verläuft über PI3-K (Phosphatidylinositol 3-kinase), über Akt (Proteinkinase) und Bad (*Bcl-2 associated death promoter*) (Abb. 10). Akt verursacht zudem auch die Hochregulation von eNOS (*endothelial constitutive nitric oxide synthase*), wodurch sich die NO-Konzentration erhöht. NO bewirkt die Initiierung einer Reihe von Genen wie VEGF (SONVEAUX 2003).

Die durch Src (Proto-Onkogen Thyrosin-Proteinkinase) vermittelte Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* ist ebenfalls wichtig für das Überleben und die Migration von Endothelzellen. Eine der bedeutendsten Signalkaskaden des VEGF verläuft über den Pfad der Phospholipase C-γ (PLC-γ), wobei Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) generiert wird, was in der Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und der Mobilisierung von Ca²⁺ (Calcium-Ionen) resultiert. PKC vermittelt die Aktivierung der ERKs 1/2 über Raf (Proto-Onkogen Serin/Threonin-Proteinkinase) und der *mitogen-activated protein kinase/ERK*

kinase (MEK). Dies stellt wiederum den Hauptweg für die Mitogenese und die Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) dar, was in erhöhter Cox-abhängiger Prostaglandin-Konzentration resultiert (PGs). Die Ca²⁺-Mobilisierung bewirkt, wie die von Akt auch, die Aktivierung von eNOS und fördert so die NO-Produktion. Die funktionellen Signalkaskaden konvergieren und kreuzen an verschiedenen Punkten, was die Linearität der Signale und deren netzartige Verknüpfungen verdeutlicht (ABEDI 1997, VEIKKOLA 2000, ZACHARY 2003).

1.4.2.2 FGF

Die Mitglieder der FGF-Familie sind die ersten beschriebenen Angiogenesefaktoren. Mittlerweile wurden 23 verschiedene FGFs beschrieben, die durch alternatives Spleißen eines Gens entstehen (LUTSENKO 2003, WILKIE 2002). Die Mitglieder der FGF-Familie gehören zu den Heparin-bindenden Molekülen und liegen im Extrazellularraum an Heparansulfate gebunden vor, von welchen das FGF enzymatisch gespalten werden kann. Nicht alle FGFs wirken proangiogen. Besondere Bedeutung hinsichtlich der Angiogeneseförderung kommen FGF-1 (aFGF, *acidic* FGF) und FGF-2 (bFGF, *basic* FGF) zu (NICOSIA 1999). FGF-1 wird hauptsächlich in neuronalen Geweben exprimiert, wohingegen FGF-2 weiter verbreitet ist. Es konnte neben neuronalen Geweben auch in Perizyten, glatten Muskelzellen, Knorpelgewebe, Knochen, Niere, der Plazenta und vor allem in Tumorzellen nachgewiesen werden (BANDOH 2004, DAVIES 2002, FERNIG 1994, FUKATA 2005, JEE 2004, REUSS 2003, REYNOLDS 2001, WRIGHT 1996). FGF-2 kommt in vielen Tumorzelllinien vor, wird auch von Endothelzellen exprimiert und besitzt eine höhere angiogene Aktivität als FGF-1 (ABRAHAM 1986, JANET 1995, LUTSENKO 2003, ZUCK 1992).

FGF-1 und FGF-2 wirken über FGF-Rezeptoren mitogen und chemotaktisch auf Endothelzellen, wodurch die Mechanismen der Tubulusformation und damit die Angiogenese initiiert werden (GERWINS 2000). FGF-2 stimuliert zusätzlich die Produktion und Sezernierung von Plasminogen-Aktivatoren und Kollagenasen in Endothelzellen, wodurch deren Migration induziert wird (PRESTA 1986). Die Bedeutung des FGF-2 bei der tumorassoziierten Angiogenese wird durch die Daten von JONCA *et al.* untermauert, welcher zeigen konnte, dass VEGF FGF-2 induzieren kann (JONCA 1997). Über VEGF kann im hypoxischen Tumor zusätzlich eine Hochregulation von FGF-2 erfolgen, obwohl FGF-2 nicht Hypoxie-reguliert ist.

HOUCHEN *et al.* zeigten bei Mäusen eine Induktion von FGF-2 auf mRNA- (*messenger ribonucleic acid*) und Proteinebene nach Bestrahlung und dass FGF-2 vor strahleninduzierten Schäden schützt, wenn es vor der Bestrahlung verabreicht wurde

(HOUCHEN 1999). In unserer Arbeitsgruppe konnten wir beim humanen HNSCC die Induzierbarkeit, die Freisetzung und eine zytoprotektive Aktivität von FGF-2 nach radioaktiver Bestrahlung zeigen (BRIEGER 2004, 2005 A und B).

1.4.2.2.1 FGF-Rezeptoren und Signaltransduktion

Die Rezeptoren für FGF sind, wie die VEGF-Rezeptoren, Thyrosinkinase. Bisher wurden vier FGF-Rezeptoren beschrieben: FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 und FGFR-4 (NASIKI 1998). Der FGF-Rezeptor 1 (FGFR-1) wurde auf glatten Muskelzellen, Nierenzellen und Endothelzellen gefunden (FLOEGE 1999, KANDA 1997). Der K_D -Wert für die Ligandenaffinität des FGF-2 Rezeptors wurde mit 0,35 nM angegeben (BLANCKAERT 1998).

Die Aktivierung der FGF-Rezeptoren erfolgt durch Autophosphorylierung infolge von Heparansulfat-abhängiger Ligandenbindung und Rezeptor-Dimerisierung (ORNITZ 2000). In Abb. 11 ist die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade des FGF-Rezeptors schematisch dargestellt. Nach Phosphorylierung fungieren die Thyrosine als Bindungsstellen für zytosolische Proteine, wie Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*), das SOS (*son of sevenless protein*) gebunden hat und das durch die Bindung an die RTK aktiviert wird. SOS aktiviert Ras (eine GTPase), Ras wiederum verursacht eine Kaskade von Proteinphosphorylierungen, inkl. Raf (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), MEK (*mitogen activated ERK activating kinase*) und ERK. Die ERKs phosphorylieren infolgedessen zytoplasmatische Substrate und wandern zudem in den Nukleus, wo sie die Genexpression durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren stimulieren.

Die intrazelluläre Wirkung des FGF-2 verläuft nicht nur über Ras. Auch interagieren die PKC und PI3K mit den autophosphorylierten Thyrosinresten des Rezeptors und induzieren im Verlauf die Phosphorylierung weiterer Proteine, die ihrerseits die Genexpression beeinflussen (HEFTI 1997).

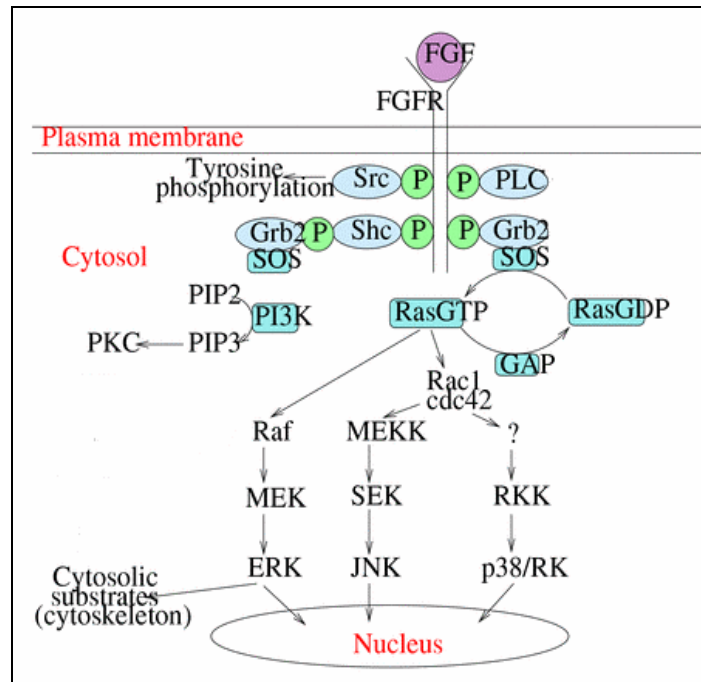


Abb. 11: Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden von FGF-2. Abkürzungen: Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*), Raf (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) RKK (*RK-kinase*) SEK (*SAPK/ERK kinase 1*), SOS (*son of sevenless protein*), (aus HEFTI 1997).

1.4.2.3 Interleukin-8

IL-8 gehört zur Familie der CXC-Chemokine und besitzt eine wichtige Rolle als pro-inflammatorisches Zytokin. Es gibt zwei große Chemokinfamilien: die CC und die CXC Chemokine. Die Bezeichnung richtet sich nach zwei konservierten Cysteinen, die bei CC Chemokinen in der Sequenz direkt benachbart liegen, während bei CXC Chemokinen noch eine Aminosäure dazwischen liegt. Chemokine bilden in ihrer aktiven Form Homodimere.

IL-8 wurde initial als Neutrophilen-chemotaktischer Faktor beschrieben (SCHRÖDER 1986) und wird von einer Vielzahl von Zelltypen sezerniert, wie u.a. Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten. Auch neoplastische Zellen, wie Melanomzellen, sezernieren IL-8. In Mausmodellen wurde eine Korrelation der IL-8 Produktion und der Metastasierung beobachtet (SINGH 1994), was diesem Faktor eine wichtige Funktion bei der Tumorprogression und Metastasierung zuschreibt (STRIETER 1995 A und B). Zudem wurde die Induktion von MMP durch IL-8 und dessen Bedeutung als autokriner Wachstumsfaktor bei Angiogenese beschrieben (SCHADENDORF 1994, STRIETER 1995A).

Interleukin-1 β und TNF- α sind die beiden stärksten Induktoren von IL-8. Aber auch Hypoxie im Tumor kann eine IL-8 Induktion verursachen, welche über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-kappaB (*nuclear factor-kappa B*) und AP-1 erfolgt (DESBAILLETS 1997 und 1999, XU 2004). Beim Oralkarzinom wurde die IL-8 Induktion durch Bestrahlung *in vitro* beschrieben (TAMATANI 2004).

1.5 Die Cyclooxygenasen

In den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden zwei Isoformen der Cyclooxygenasen beschrieben, welche die Schlüsselenzyme der Prostaglandin-synthese darstellen. Neben der konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase-1 (Cox-1) wurde die induzierbare Cyclooxygenase-2 (Cox-2) gefunden (DEWITT 1988, HLA 1992, JONES 1993, MERLIE 1988, O'BANION 1991, YOKOYAMA 1988). Das humane Gen für Cox-1 befindet sich auf Chromosom 9 (9q32 – 9q33,3), enthält 11 Exons und ist 40 kb groß. Das Transkriptionsprodukt beträgt etwa 2,8 kb (O'BANION 1992). Das für Cox-2 codierende Gen ist auf Chromosom 1 (1q25,2 – 1q25,3) lokalisiert, enthält 10 Exons und umfasst 7,5 kb. Die mRNA für Cox-2 ist 4,5 kb groß (TAY 1994). Trotz der großen Unterschiede auf genomischer Ebene bestehen beide Enzyme aus 600 Aminosäuren und haben nach posttranskriptionellen Modifikationen ein Molekulargewicht von 75-80 kD (OTTO 1993). Beide Enzyme teilen sich das gleiche Substrat, die Arachidonsäure (eine vierfach ungesättigte C₂₀-Fettsäure), die unter der Einwirkung der Phospholipase A₂ (PLA₂) aus der Zellmembran freigesetzt wird und u.a. über die Cyclooxygenasen verstoffwechselt wird (Abb. 12). Diese bilden durch die gleichen katalytischen Mechanismen das gleiche Produkt: Das zyklische Endoperoxid PGH₂ (Prostaglandin H₂). PGH₂ kann nun von nachgeschalteten Sythasen zell- bzw. gewebsspezifisch zu den Prostaglandinen PGE₂, PGI₂ (Prostacyclin), TXA₂ (Thromboxan A₂), PGF₂ und PGD₂ umgewandelt werden (SAMUELSSON 1975).

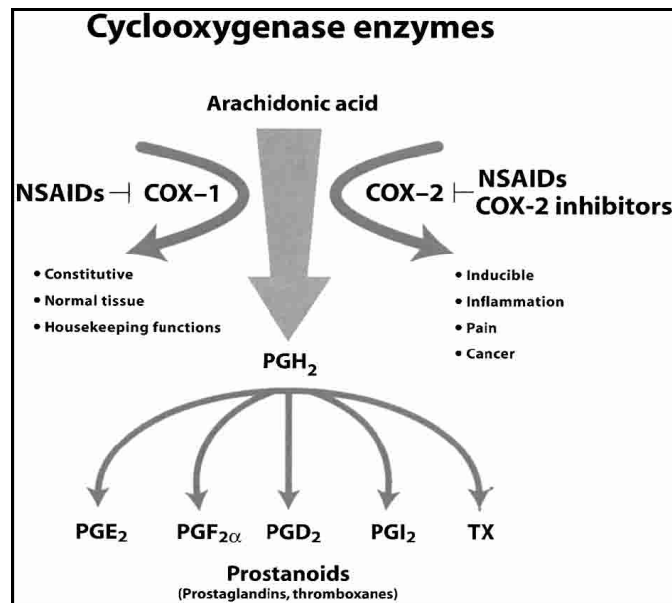


Abb. 12: Prostaglandinproduktion durch die Cyclooxygenasen und deren Inhibition. Abkürzungen: NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*), TX (Thromboxan) (verändert nach CHOY 2003).

Der wohl bedeutendste Unterschied beider Enzyme liegt im katalytischen Zentrum: Die Aminosäure Isoleucin 590 bei Cox-1 ist bei Cox-2 durch Valin ersetzt, wodurch Cox-2 eine größere Bindungsregion erhält und damit ein breiteres Bindungsspektrum besitzt (KURUMBAIL 1996, LUONG 1996, PICOT 1994). Dementsprechend besitzen die Cyclooxygenasen auch unterschiedliche Bindungsaffinitäten zum Substrat. Die K_D von Arachidonsäure gegenüber Cox-2 ist mit 2,9 mM etwa 4000fach niedriger als bei Cox-1 (11,2 μ M), was einer höheren Substrataffinität von Cox-2 entspricht (SWINNEY 1997).

Ursprünglich wurde vermutet, dass Cox-1 in nahezu allen Geweben konstitutiv und bei gleich bleibendem Niveau exprimiert würde. Allerdings wurde dann eine Induzierbarkeit von Cox-1 durch Phorbol ester oder Dexamethazon in einigen Zelltypen festgestellt (GILROY 2000). In den Nieren, sowie dem gesamten Urogenitalsystem ist die Cox-1 Expression ebenfalls induzierbar (CHARLIER 2003). Bei Zellen des Darmepithels wurde die Induzierbarkeit von Cox-1 durch Bestrahlung gefunden (COHN 1997, HOUCHEM 2000). Cox-1 und -2 liegen intrazellulär an das Endoplasmatische Reticulum gebunden vor, wobei Cox-2 auch im Nukleus zu finden ist (REIGER 1993).

Die induzierbare Cox-Isoform – Cox-2 - entdeckte man Anfang der 90er-Jahre. Cox-2 ist in normalem Gewebe nicht oder nur sehr schwach nachweisbar. Dessen Produktion wird durch Zellstress wie pro-inflammatorische und mitogene Reize, sowie durch Bestrahlung ausgelöst (AMANO 2003, LI 2002, MITCHELL 1999). Bei 40 – 80% der Malignitäten der Lunge, des Darmes, des Kopf-Halses, der Prostata, des Gehirnes sowie des Pankreas liegt Cox-2 überexprimiert vor (CHAN 1999, JOKI 2000, KIRSCHENBAUM 2001, KOKI

2002, MILAS 2001, ZWEIFEL 2002). Das Enzym kann bei Endothelzellen durch VEGF induziert werden (HERNANDEZ 2001). Allerdings wurden auch konstitutiv Cox-2 exprimierende Gewebe gefunden, wie das Gehirn, das Knochenmark und der Urogenitaltrakt (ADEGBOYEGA 2004, ARIKAWA 2004, GHILARDI 2004, MATSUOKA 1999). In Tab. 3 sind einige Cox-2 induzierende bzw. inhibierende Faktoren aufgezählt.

<i>Cox-2 Induktoren</i>	<i>Cox-2 Inhibitoren</i>
Pro-inflammatorische Zytokine: IL-1 β , IL-2, TNF- α	Anti-inflammatorische Zytokine: IL-13, IL-10, IL-4, Corticosteroide
Wachstumsfaktoren: VEGF, EGF, <i>platelet derived growth factor</i> (PDGF), FGF-2	
Tumorpromotoren: Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Tumorsuppressor: p53
Lipopolysaccharide	

Tab. 3: Induktoren und natürliche Inhibitoren von Cox-2 (AKARASEREENONT 2002, CHEN 2001, FONG 2000, GOERIG 1987, HEMPEL 1994, HERNANDEZ 2001, LAPORTE 2000, NIIRO 1998, PEPPELENBOSCH 1993, RISTIMAKI 2002, SUBBARAMAIAH 1999, TESSNER 2003).

Erste Zusammenhänge zwischen der Expression von Cox-2 und der Entstehung von Karzinomen fand man in den 90ern des letzten Jahrhunderts (OSHIMA 1996). Auch wurden dem Cox-Produkt PGE₂ prokanzerogene Eigenschaften zugeschrieben, nachdem es neben den eigenen, spezifischen Rezeptoren auch den EGF-Rezeptor aktiviert (PAI 2002). Zudem wird eine erhöhte Cox-2 Expression auch in neoplastischen Geweben und verschiedenen Tumoren, u.a. auch in SCC beschrieben (ALTORKI 2004, CHAN 1999, PETKOVA 2004). Die Überexpression von Cox-2 scheint mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und schlechter Prognose zu korrelieren.

Für Cox-2 werden verschiedene Mechanismen diskutiert, durch welche die Expression des Enzyms mit der malignen Transformation in Zusammenhang gebracht wird. Als eines der Schlüsselenzyme der Prostaglandinsynthese wirkt Cox-2 als proangiogen und immunsuppressiv. Cox-2 exprimierende Tumoren weisen ein erhöhtes Wachstum auf und generieren im Vergleich zu Cox-2 negativen Tumoren mehr angiogene Wachstumsfaktoren. Auch die Inhibition des Tumorsuppressorproteins p53 durch Cox-2 unter hypoxischen Bedingungen könnte zur Tumorprogression beitragen (LIU 2005).

Wie in Abschn. 1.2 erwähnt, finden durch Bestrahlung intrazellulär mannigfaltige Schäden statt. Unter anderem wird Arachidonsäure aus membrangebundenen Phospholipiden freigesetzt, die durch die Cyclooxygenasen in Prostaglandin

verstoffwechselt werden. Dieser Vorgang resultiert in gesteigerter Prostaglandinsynthese, was wiederum die Balance der verschiedenen sezernierten Prostaglandine verschiebt (CHARLIER 2003, MITCHELL 1999, ZWEIFEL 2002). Hohe Prostaglandin-Konzentrationen wurden als zytoprotektiv vor radioaktiver Bestrahlung beschrieben (ALTORKI 2004, CRYER 1998, MITCHELL 1999).

1.5.1 Prostaglandin E₂

Prostaglandine gehören zur Gruppe der Eikosanoide und werden aus Arachidonsäure gebildet. PGE₂ wird physiologisch von vielen Körperzellen sezerniert, einschließlich Fibroblasten und Makrophagen (HARRIS 2002). Es bindet an den G-Proteingekoppelten Rezeptor EP, von dem vier Subtypen beschrieben wurden, die an unterschiedliche *second messenger* gekoppelt sind: EP-1, EP-2, EP-3 und EP-4 (HARRIS 2002, NARUMIYA 1999).

Bei HNSCC wurden im Vergleich zum Normalgewebe neben erhöhter Cox-2 Konzentration auch vermehrt PGE₂ gefunden. WATANABE *et al.* zeigten, dass dieser Faktor die DNS-Synthese in Tumorzellen über einen kalziumabhängigen intrazellulären Signaltransduktionsweg stimuliert (WATANABE 1998). Außerdem regulieren Prostaglandine und deren Metabolite zelluläre Prozesse wie Mitose, Proliferation und Adhäsion (DANNENBERG 2001). Von PGE₂ wurde gezeigt, dass es die Proliferationsraten von Zellen des Kolonkarzinoms erhöht und deren Apoptoserate senkt (SHENG 1998). Auch wurde in dieser Enität der Zusammenhang der Prostaglandine mit der Inhibition des Tumorsuppressorgens p53 dargestellt (MOOS 2000).

PGE₂ wird als ein wichtiger das Tumorzellwachstum und –überleben fördernde Faktor angesehen. Es scheint auch bei verschiedenen Stufen der Angiogenese eine Rolle zu spielen, da in der Interstitialflüssigkeit von Tumoren PGE₂ gefunden wurde (CHIARUGI 1998, UEFUJI 2000).

Im *in vivo* Tumormodel konnten die immunsupprimierenden Eigenschaften des PGE₂ gezeigt werden, indem die Reaktionen des Wirtstieres gegen die transplantierten Zellen unterdrückt wurden. Der Faktor inhibiert u.a. die T-Zellaktivierung, die Lymphozytenmitogenese, die Makrophagenaktivierung, die Antikörperproduktion, die Zytokinproduktion durch Immunzellen und die Aktivierung der Natürlichen Killerzellen (BAXEVANIS 1993, CROSS 1997, FISCHER 1997, GIOVANNUCCI 1995, SANO 1995, SPISNI 1997). In vielen Geweben ist die Strahlenexposition mit einer erhöhten Eicosanoid-Produktion, u.a. PGE₂,

assoziiert, die innerhalb weniger Stunden auftritt und über mehrere Tage oder Wochen anhalten kann (BILLINGS 1994, STEINAUER 2000).

1.5.2 Cyclooxygenase-Inhibitoren

Die Isoleucin / Valin-Substitution im katalytischen Zentrum der Cyclooxygenasen ist die strukturelle Basis für selektive Cox-2 Inhibitoren. Das kleinere Valin erzeugt eine größere Bindungsregion für Inhibitoren bei Cox-2. Bei Cox-1 hingegen ist diese Region durch Isoleucin verkleinert, wodurch die Bindung einiger Inhibitoren erschwert oder unmöglich wird (KURUMBAIL 1996, LUONG 1996).

Unselektive oder Cox-1 spezifische Inhibitoren verursachen als unerwünschten Nebeneffekt die Hemmung der physiologischen Prostaglandinsynthese in Magen und Niere. Dies kann zu gastrointestinalen Läsionen führen und den Tod verursachen (CRYER 1998, FOSSLIE 2000, MITCHELL 1999). Diese Nebenwirkungen führten zu der Entwicklung von selektiven Cox-2 Inhibitoren, die eine geringere gastrointestinale Toxizität aufweisen. Cox-Inhibitoren werden in der Gruppe der *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) zusammengefasst. Die dosisabhängige zytostatische Wirkung von Cox-2 Inhibitoren bei verschiedenen Tumoren konnte in vielen Experimenten *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (DING 2000, JOKI 2000, LIU 2000, ROZIC 2001, SOUZA 2000, TSUBOUCHI 2000, WILLIAMS 2001, WONG 2004).

Epidemiologische, experimentelle und klinische Studien weisen darauf hin, dass NSAIDs das Vorkommen von Karzinomen des Kolorektums, des Ösophagus, der Lunge und der Blase verringerten (CASTELAO 2000, DUPERRON 1997, FARROW 1998, FUNKHOUSER 1995, GREENBERG 1993, GRUBBS 1993 und 2000, KAWAMORI 1998, RIOUX 1998, SCHREINEMACHERS 1994, STEINBACH 2000, THUN 1991 und 1993). Die Mechanismen sind noch unklar, allerdings scheinen die Effekte der NSAIDs hauptsächlich über die Inhibition der Prostaglandinsynthese vermittelt zu werden (Abb. 12) (TAKETO 1998 A UND B).

Bei der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) verursachen Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC* bereits in der zweiten Lebensdekade die Entwicklung zahlreicher Kolonpolypen, aus denen sich regelmäßig Kolonkarzinome entwickeln. Zur Behandlung dieser Krankheit wurden Studien mit den selektiven Cox-2 Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib initiiert (REDDY 2000, STEINBACH 2000). Diese Studien werden aber trotz anfänglich aussichtsreicher Ergebnisse eingestellt, da im Verlauf ein bis zu dreifach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse beobachtet wurde. Bei Tumorerkrankungen der Brust und zu deren Prävention wurden mit Celecoxib klinische Studien initiiert (ARUN 2004, BRESALIER 2005). Der Inhibitor findet auch in verschiedenen

Studien beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom Anwendung und wird teilweise auch mit der Chemoradiotherapie kombiniert (SANDLER 2004).

Die Kombination von unselektiven anti-inflammatorischen Substanzen oder spezifischen Cox-2 Inhibitoren mit Medikamenten, die in onkogene Transduktionswege in der Zelle eingreifen, scheint ebenfalls der Tumorprogression entgegenzuwirken. Es wurden bereits Erfolge mit dem kombinierten Einsatz von Cox-2 Inhibitoren und antiangiogen wirksamen Substanzen erzielt. So wurde bei Mäusen die Kolonkarzinombildung durch die kombinierte Inhibition von Cox-2 und den EGFR verhindert (TORRANCE 2000). Auch konnte bei Mäusen die Progression von Karzinomen der gleichen Enität mit der simultanen Inhibition von Cox-2 und Her-2/neu unterbunden werden (MANN 2001).

In Anbetracht dieser und weiterer positiver Erkenntnisse wurden klinische Studien initiiert, bei welchen die Inhibition der Cyclooxygenasen als therapeutisches Ziel in die Tumorbehandlung einfließt. So überlebten bei einer Gruppe von 135 Patienten mit verschiedenen metastasierenden soliden Tumoren, die mit dem Cox-Inhibitor Indomethazin, einer chemotherapeutischen Substanz oder Placebo behandelt wurden, deutlich mehr Menschen der Indomethazin-Gruppe (LUNDHOLM 1994). Bei Studien an glioblastomkranken Patienten zeigte die Kombination einer niedrig dosierten Chemotherapie mit dem Cox-2 Inhibitor Rofecoxib lebensverlängernde Wirkungen (TNETTENBERG 2005).

Diese Studien werden auch mit dem Ziel durchgeführt, Substanzen zu finden, die in der Radiotherapie mit der Applikation von antiangiogenen Substanzen kombiniert werden können um als *radiosensetizer* die Effektivität der Bestrahlung zu erhöhen. So wurde bereits für den Cox-2 selektiven Inhibitor SC-236 gezeigt, dass durch dessen Applikation die Strahlensensitivität beim murinen Sarkom deutlich erhöht werden konnte (MILAS 1999). Bei Endothelzellen konnten die antiangiogenen Effekte des Cox-2 Inhibitors Rofecoxib durch Bestrahlung additiv verstärkt werden (DICKER 2001). Der Cox-2 Inhibitor SC-236 induzierte bei Glioblastomzelllinien und Xenotransplantaten die Apoptose und erhöhte die Radiosensitivität der überlebenden Zellen (PETERSEN 2000). In Anbetracht dieser viel versprechenden Beobachtungen könnte die Kombination von Cox-2 Inhibitoren mit RT eine ergänzende Strategie in der Anti-Angiogenese- und der Tumorthherapie bei gleich bleibender Lebensqualität darstellen.

Die Mechanismen der Verstärkung der Tumorantwort auf Bestrahlung durch Cox-Inhibitoren sind unklar und es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So sollen die Substanzen durch die Herabsenkung der im Tumor gefundenen hohen Prostaglandinkonzentrationen die Radiosensitivität steigern, da den Prostaglandinen zytoprotektive Eigenschaften gegenüber Bestrahlung zugeschrieben werden (FURUTA 1988, HANSON 1988, MILAS 2001). Weitere mögliche Mechanismen sind die Erhöhung der strahleninduzierten

Apoptosen aufgrund der allgemeinen Herunterregulierung protektiv wirkender Faktoren (MILAS 1999, PYO 2001) und die Blockierung der Tumorneoangiogenese (KISHI 2000).

Die bei Tumoren beobachteten Effekte durch NSAIDs scheinen teilweise auch Cox-unabhängig zu sein. Dafür sprechen zwei Argumente: Selektive Cox-2 Inhibitoren wirken auch in Zellen, die kein Cox-2 exprimieren und die verwendete Dosis der Substanzen war deutlich höher als zur Inhibition der Cox-2 Aktivität nötig (GROSCH 2001, HANIF 1996, MARX 2001, TEGEDER 2001B, ZHANG 1999). Einige Substanzen bewirken die Inhibition von NF-kappaB und AP-1 (TEGEDER 2001A), wobei allerdings die AP-1 Inhibition vermutlich nicht direkt erfolgte, sondern vielmehr über vorgeschaltete MAP-Kinasen, wie Erk-1 und 2 oder JNK vermittelt (JONES 1999, PILLINGER 1998, SCHWENGER 1997).

Die in dieser Arbeit untersuchten selektiven und unselektiven Cox-Inhibitoren Acetylsalicylsäure (ASA), Flurbiprofen, Meloxicam, NS-398 und Lumiracoxib werden im Folgenden beschrieben.

1.5.2.1 Acetylsalicylsäure

Die Acetylsalicylsäure (ASA), Handelsname Aspirin, ist ein Acetylsäurederivat und wird als unspezifischer Cox-Inhibitor deklariert (Abb. 13). Die Substanz wurde 1899 als antipyretisches Mittel klinisch eingeführt. Die Anwendung der Acetylsalicylsäure erfolgt in erster Linie bei leichten bis mäßig starken Schmerzen, beispielsweise bei Kopfschmerzen, und zur Fiebersenkung. ASA inhibiert Cox-1 durch die Acetylierung von Serin 530 im aktiven Zentrum von Cox-1 irreversibel. Cox-2 hingegen wird an AS 516 acetyliert und katalysiert daraufhin die Synthese von 15-Hydroxyeicosatetraensäure anstelle der Prostaglandine (ALLEN 1995, LOLL 1995).

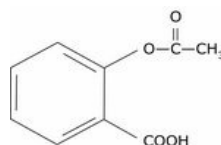


Abb. 13: Strukturformel der Acetylsalicylsäure.

ASA inhibiert iNOS (induzierbare NO-Synthase), die an der Regulation des Gefäßtonus, von Entzündungsreaktionen und der Zellregulation beteiligt ist (BAYER: WWW.ASPIRIN.DE). ASA hemmt auch indirekt die Freisetzung von NF-kappaB und verhindert damit im weiteren Verlauf durch die unterbundene Expression von Immunmediatoren

auch die Ausprägung einer Entzündungsreaktion (YIN 1998). Bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose kann ASA durch die Steigerung der Ferritinsynthese – ein Protein mit zytoprotektiven und antioxidativen Eigenschaften für das Gefäßendothel – schützen (OBERLE 1998). Neueste Untersuchungen zeigen eine synergistische Unterdrückung der Cox-2 Expression bei Entzündungen durch die gleichzeitige Gabe von Vitamin E (ABATE 2000). Auch wurden Erkenntnisse über die antiangiogene Wirkung von ASA in *in vitro* Studien gewonnen. So soll der Inhibitor die Makrophagen-induzierte IL-8-Sekretion bei Lungenkrebs verhindern (YAO 2005). Außerdem wurde eine Inhibition der Kolonkarzinom-induzierten Angiogenese über die Suppression von Cox-2 durch ASA beschrieben (SHTIVELBAND 2003).

1.5.2.2 Flurbiprofen

Flurbiprofen, Handelsname Ansaid, gehört zu der Gruppe der Acetylessig- und propionsäuren (Abb. 14). Die Substanz wird als Cox-unspezifischer Inhibitor angesehen, obwohl eine IC_{50} für die Hemmung von Cox-1 ($0,04 \mu\text{M}$) und Cox-2 ($0,51 \mu\text{M}$) beschrieben wurde, was einer 10fachen Selektivität für Cox-1 entspricht (BARNETT 1994, CARABAZA 1996, CRYER 1998). Der Inhibitor induziert die Apoptose beim Kolonkarzinom und die Expression des Tumorsuppressors p75NTR (GROSCH 2005, KHWAJA 2004). Weiterhin wirkt sich Flurbiprofen modulierend auf den Zellzyklus aus, indem es einen G1-Zell-Zyklus-Arrest über JNK verursacht und das Tumorwachstum beim Kolon- und Prostatakarzinommodell reduziert (GROSCH 2003, KING 2001, WECHTER 1997 und 2000).

Wir konnten zeigen, dass die Bestrahlungsinduktion von VEGF, noch stärker aber die von FGF-2, durch Flurbiprofen reduziert werden konnte (BRIEGER 2004). Die Ergebnisse dazu werden in dieser Arbeit vorgestellt.

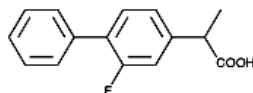


Abb. 14: Strukturformel von Flurbiprofen.

1.5.2.3 Meloxicam

Meloxicam gehört zu der Gruppe der Oxicamen und wurde als unspezifischer Inhibitor mit Präferenz für Cox-2 beschrieben (FLEISCHMANN 2002) (Abb. 15). In der Literatur wurden unterschiedliche IC_{50} -Werte für die Cox-Isoformen angegeben: Für Cox-1 wurden IC_{50} -Werte zwischen 5,7 und 3,27 μ M angegeben, für Cox-2 0,25 und 2,1 μ M (PAIRET 1998, SAWDY 2003). Die Anwendung von Meloxicam erfolgt in der Schmerztherapie bei entzündlichen Erkrankungen des Bewegungsapparates wie der Osteoarthritis, der chronischen Polyarthritis und Morbus Bechterew. In Xenotransplantat-Studien verringerte der Inhibitor das Tumolvolumen und die Anzahl der tumorassoziierten Gefäße (FENTON 2001).

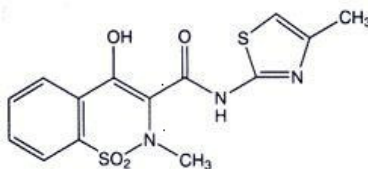


Abb. 15: Strukturformel von Meloxicam.

1.5.2.4 NS-398

NS-398 gehört zu der Gruppe der Diaryl- oder Aryl-Heteroaryl-Ether und Thioether (Abb. 16). Der Inhibitor stammt aus der Anfangszeit der selektiven Cox-2 Inhibitoren (FUTAKI 1994). NS-398 wird als hochselektiver Cox-Inhibitor beschrieben mit IC_{50} -Werten von 75 μ M für Cox-1 und 1,77 μ M für Cox-2, was einer < 40fachen Cox-2 Selektivität entspricht (BARNETT 1994). Obwohl die Substanz positive anti-inflammatorische Wirkung und gute Verträglichkeit zeigte, wurde sie bisher nicht in den Markt eingeführt.

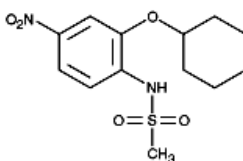


Abb. 16: Strukturformel von NS-398.

In *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bzgl. Tumor- und Anti-Angiogenesetherapie wurden mit NS-398 viel versprechende Ergebnisse erzielt. So wurde der Inhibitor als *radiosensetizer* in Cox-2 exprimierenden Tumorzellen beschrieben (AMIRGHAHARI 2003, PYO 2001). Außerdem soll NS-398 das Zytokin-Expressionsmuster und die Proliferation von Lungen- und Leberkarzinomzellen verändern (NAKATA 2003). Beim Karzinom des Ösophagus reduzierte die Substanz die Lebensfähigkeit der Zellen und induzierte die Apoptose über Cytochrom c (LI 2001). Die im Tumor herrschende Hypoxie induziert infolge der Akkumulation von HIF-1 α die Expression von VEGF und VEGFR-1. Nach JONES *et al.* inhibiert NS-398 diese Kaskade, indem es die VHL-Expression induziert, was zur Degradation von HIF-1 α führt (JONES 2002).

1.5.2.5 Lumiracoxib

Lumiracoxib, Handelsname Prexige, ist der erste und bislang einzige Vertreter der Wirkstoffklasse hoch-selektiver Cox-2 Inhibitoren, der in Europa bisher nur in Großbritannien als Medikament zugelassen wurde (Abb. 17). Für Cox-1 beträgt der IC₅₀-Wert 70 μ M, für Cox-2 0,1 μ M, was einer etwa 700fachen Cox-2-Selektivität entspricht. Die Substanz verfügt über eine hohe Verweildauer im Zielgewebe und findet aufgrund ihrer schmerzstillenden und entzündungshemmenden Eigenschaften Anwendung in der Schmerztherapie bei Symptomen der Osteoarthritis, rheumatischen Arthritis und verschiedenen Tumorerkrankungen, wie z.B. des Knochens (BERENBAUM 2005, FOX 2004, GEUSENS 2004, WARNER 2004).

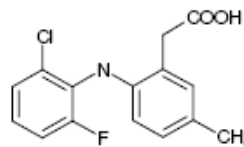


Abb. 17: Strukturformel von Lumiracoxib (2-[2-(Chloro-6-fluorophenylamino)-5-methylphenyl]-essigsäure, C₁₅H₁₃ClFNO₂).

2. Ziele

Die bei Tumorzellen durch Bestrahlung induzierten Mechanismen und die Resistenzbildung sind ebenso unvollständig verstanden wie die Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Endothelzellen nach Bestrahlung. In dieser Arbeit soll daher die Wirkung der Bestrahlung auf Tumorzellen des Kopf-Hals Bereiches hinsichtlich des Überlebens, der Proliferation und der Freisetzung der in dieser Thematik relevanten angiogenen Faktoren VEGF und FGF-2 evaluiert werden. Auch wird untersucht, ob durch die Bestrahlung der Tumorzellen Faktoren induziert werden, die sich schützend auf die Tumorzellen selbst und auf Endothelzellen auswirken. Schließlich wird geprüft, ob die Applikation von Cox-Inhibitoren die induzierenden Effekte auf die Sezernierung angiogener Faktoren modulieren können, ob durch deren Applikation die Progression xenotransplanteder Tumore verzögert werden kann und welchen Einfluss diese Substanzen auf die Migration von Endothelzellen ausüben. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die folgenden Fragen bearbeitet:

- Sezernieren HNSCC-Linien VEGF und FGF-2?
- Welchen Einfluss übt Bestrahlung auf die Teilungsrate der Tumorzellen und Endothelzellen aus?
- Inwieweit moduliert Bestrahlung die Expression und Freisetzung von VEGF und FGF-2?
- Zeigen die bestrahlungsinduzierten Faktoren der Tumorzellen autokrine und parakrine Effekte indem sie Tumorzellen und Endothelzellen vor dem bestrahlungsinduzierten Zelltod schützen?
- Gibt es subtypspezifische Effekte der VEGF-vermittelten Protektion und Proliferation?
- Welche Rolle spielen dabei die VEGF-Rezeptoren?
- Beeinflussen Cox-Inhibitoren das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen?
- Zeigen Cox-Inhibitoren hinsichtlich der Bestrahlungsinduktion angiogener Faktoren bei Tumorzellen ein modulierendes Potential?
- Verzögern Cox-Inhibitoren die Progression xenotransplanteder Tumore?
- Beeinflussen Cox-Inhibitoren die Migrationsfähigkeit von Endothelzellen?

3. Materialien und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Biologisches Material

3.1.1.1 Tumorzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithelkarzinomellinien (HNSCC-Linien, *head and neck squamous cell carcinoma*) wurden außer der Linie A549 (nicht-kleinzelliges Lungenadenokarzinom) aus Operationsmaterial des Kopf-Hals-Bereiches etabliert. Die einzelnen Linien und deren Herkunft sind in Tab. 4 dargestellt.

<i>Tumorzelllinie</i>	<i>Lokalität und Tumorart</i>
Dept	Vallecula, Primärtumor
Hun	Zungengrund, Primärtumor
Lau	<i>sinus piriformis</i> , Metastase
A549	Lungenadenokarzinom, nicht-kleinzellig

Tab. 4: SCC-Linien und deren Herkunft.

3.1.1.2 Endothelzellen

Humane Endothelzellen (HUVEC, *human umbilical vein cells*) wurden aus der *vena umbilicalis* frischer Nabelschnüre isoliert (Abschn. 2.2.2). Die HUVEC wurden zwischen Passage 2 und 7 verwendet. Zur Verifizierung des Zelltyps wurde immunhistochemisch der Endothelzellmarker CD31 nachgewiesen.

3.1.1.3 Mäuse

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden männliche SCID-Mäuse des Stammes CB-17 im Alter von 6 Wochen verwendet. Diese Tiere sind nicht immunkompetent und tolerieren Xenotransplantate. Sie entstammten der Zucht des Tierstalls der Zentralen Versuchstiereinrichtung des Hochhauses am Augustusplatz, Mainz, und wurden bei einem circadianen Rhythmus von 12 Stunden gehalten.

3.1.2 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien und Feinchemikalien von folgenden Herstellern in pA-Qualität erworben: Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), VWR International (Darmstadt) und Serva Electrophoresis (Heidelberg).

3.1.3 Zellkulturmedien

Die Medien für die Zellkultur, PBS, Antibiotika, fötales Rinderserum, Accutase, Trypsin/EDTA sowie Endothelmedium Supplement wurden von PAA *Laboratories* (Cölbe), das Endothelsupplement von der Firma Promocell (Heidelberg) bezogen.

3.1.4 Wachstumsfaktoren und Antikörper für die Zellkultur

Rekombinantes humanes VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ wurden von Biomol (Hamburg) und rekombinantes humanes EGF von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Antikörper gegen humanes VEGF und FGF-2 wurden von der Firma R&D Systems (Wiesbaden) erworben.

3.1.5 Antikörper für die Immunhistochemie

Die verwendeten Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen der Zellen sowie deren Verdünnungen sind in Tab. 5 dargestellt.

1. Antikörper	Hersteller	Positiv-Kontrolle	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
Neuropilin-1 (monoklonal Ziege anti-human)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	Niere	1:100	biotinyliert, Kaninchen anti-Ziege	1:250
VEGFR-1 (monoklonal Kaninchen anti-human)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	Niere	1:100	biotinyliert, Ziege anti-Kaninchen	1:250
VEGFR-2 (monoklonal Maus anti-human)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	Niere	1:50	biotinyliert, Ziege anti-Maus	1: 250
Pan-Cytoceratin (monoklonal Maus anti-human)	Dako, Hamburg	SCC	1:100	biotinyliert, Ziege anti-Maus	1: 250
CD 31 (monoklonal Maus anti-human)	Dako, Hamburg	Angiofibrom	1:100	biotinyliert, Ziege anti-Maus	1: 250

Tab. 5: Hersteller und verwendete Verdünnungen der Antikörper.

3.1.6 Cyclooxygenase-Inhibitoren

Flurbiprofen und NS-398 wurden von der Firma Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA), Acetylsalicylsäure von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben. Meloxicam und Lumiracoxib wurden freundlicherweise von der Firma Boehringer Ingelheim (Ingelheim) zur Verfügung gestellt.

3.1.7 Geräte

Bestrahlungsquelle Cs ¹³⁷	Gammacell 2000, Mølgaard Medical, Risø, Dänemark
Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
CCD-1300B Digitalkamera	VDS Vosskühler, Prophysics, Nürnberg
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg

Fluoroskan Ascent	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Hera Freeze -80°C	Kendro Laboratory Products, Hanau
Hereaus HeraCell	Kendro Laboratory Products, Hanau
Hereaus HeraSafe	Kendro Laboratory Products, Hanau
Kühlschrank Cooler	Bosch, Wien, Österreich
Mikroskope	Leitz Orthoplan, Leitz, Wetzlar
	Nikon TSM, Nikon, Düsseldorf
	Invertiertes Fluoreszenzmikroskop, Eclipse
	TE2000-U, Nikon, Düsseldorf
	Zeiss Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen
Minizentrifuge Fisherbrand	Fisher Scientific, Schwerte
Multiskan Ascent	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Pipetten	Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Stickstofftank	CRYO-4000, Chart Ind., Burnsville, Minnesota, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Universal 16R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Vortex Top-Mix Fisherbrand	Fisher Scientific, Schwerte
Wage Precision Advanced	OHAUS, Gießen
<i>Orbital Shaker</i>	Edmund Bühler, Hechingen
Wasserbad mit Schüttler HT	Infans AG, Bottmingen, Schweiz
Zählkammer Neubauer	Roth, Karlsruhe

3.1.8 Software

Für die Auswertung der FACS-Analysen wurde die Software CellQuest Pro, Version 4.0.2 der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, verwendet. Die Fluoreszenz-Photos und die Migration wurden mit der Lucia Imaging System Software, Version 4.6.2, der Firma Nikon, Düsseldorf, ausgewertet. Die Messungen mit dem Fluoroskan Ascent und dem Multiskan Ascent wurden mit der Ascent Software, Version 2.6, der Firma Thermo Electron Corporation, Dreieich, ausgewertet.

3.1.9 Sonstige Materialien und Kits

AlamarBlue™		BIOZOL, Eching
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit		Oncogene, Merck, Darmstadt
Antibody Diluent with Background Reducing Components		DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
Ciprobay		Bayer, Leverkusen
Complete™ Mini (Protease Inhibitor Cocktail Tabletten)		Roche, Mannheim
DAB Substrat Chromogen Solution		DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
D _c Protein Assay		Bio-Rad, Californien, USA
Immunoassay: PGE ₂		R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA-Kits: FGF-2		
IL-8		
VEGF		R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet IC ELISA-Kits: Phospho-VEGF R2		
Total VEGF R2		R&D Systems, Wiesbaden
Horseradishperoxidase-Streptavidin		DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
Kollagenase H		Roche Diagnostics, Mannheim
Mycoplasmen-PCR Detection Kit		VenorGeM, Minerva Biolabs, Berlin
Protease Inhibitor Cocktail		Sigma, Deisenhofen
Substrat-Lösung für ELISA		Substrat Reagent Pack, R&D Systems, Wiesbaden
FACS-Röhrchen	5 ml	Falcon Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturschalen	175 cm ²	
	75 cm ²	Cellstar, Greiner, Frickenhausen
	25 cm ²	
Zellkulturschalen	ø 40 mm	
	ø 94 mm	Nunclon Surface, Nunc, Roskilde, Dänemark
		Cellstar, Greiner, Frickenhausen
Zellkultureinsätze	25 mm	
Porengröße	ø 0,4 µm	Nunc, Roskilde, Dänemark
Multiwell-Zellkulturschalen		Nunc, Roskilde, Dänemark
Lab-Tek <i>Chamber Slides</i>		Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber		Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	50 ml	
	15 ml	Greiner, Frickenhausen
	2 ml	
	1,5 ml	
	0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)		Costar Stripette, Corning Incorporated, New York, USA

Glaspasteurpipetten		Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	0,5-20 µl	G. Kisker, Steinfurt
	200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
	300 µl	Finntip 300, Thermo LabSystems, Vantaa, Finnland
	1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Braunüle Vasofix	1,3 x 45 mm	B. Braun, Melsungen
3-Wegehahn Connecta Plus	3	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen	20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Skalpelle Feather		PFM, Köln
96 well EIA / RIA Platten		Costar Corning Incorporated, New York, USA
Ketanest		Parke-Davis, Berlin
Rompun		Bayer, Leverkusen
Eindeckmedium		DAKO Glycergel, Mounting Medium, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA

3.1.10 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

3.1.10.1 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

- 10x Tris Buffered Saline (TBS) 625 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan
1,84 M NaCl
pH 7,6
- 5x Tween-20 1:20 in H₂O_{dest.}
- Waschpuffer für die Immunhistochemie 1:10 10x TBS
1:100 5x Tween-20
pH 7,6
- Blockpuffer für die Immunhistochemie 2,5% v/v 30%-iges H₂O₂ in Methanol
- Verdünnungspuffer für den 2. Antikörper 1% w/v BSA, Fraktion V
0,1% w/v NaN₃
in PBS lösen, pH 7,2
- Färbelösung für Zellkerne Meyer's Hämalaun 1:5 in PBS verdünnt

3.1.10.2 Puffer und Lösungen für ELISA

- 10x Phosphate Buffered Saline (PBS) 1,5 NaCl
70 mM Na₂HPO₄
30 mM NaH₂PO₄
pH-Wert 7,2 (mit NaOH-Plätzchen)
- 10x Waschpuffer 0,05% v/v Tween 20 in 10x PBS, pH 7,2 -7,4
- 1x Waschpuffer 10x Waschpuffer 1:10 verdünnt mit H₂O_{dest.}
- Blockpuffer 1% w/v BSA in PBS mit 0,05% w/v NaN₃
- Reagent Diluent für VEGF, FGF-2 1% w/v BSA in PBS, pH 7,2 - 7,4
- Reagent Diluent für IL-8 0,1% w/v BSA
0,05% v/v Tween 20 in TBS
(20 nM Trisma Base, 150 mM NaCl)
pH 7,2 – 7,4, 0,2 µm sterilfiltriert
- Diluent #12 für VEGFR-2 1% v/v NP-40
20 mM Tris (pH 8,0)
137 mM NaCl
10% v/v Glycerol
2 mM EDTA
1mM Na-Orthovanadat
- Diluent #14 für VEGFR-2 20 mM Tris
137 mM NaCl
0,05% v/v Tween 20
0,1% w/v BSA
pH 7,2 – 7,4
- Lysispuffer #9 für VEGFR-2 Diluent #12
1:10 v/v Protease Inhibitor Cocktail
- Stopplösung 2 N H₂SO₄

3.1.10.3 Zellkulturmedien

- DMEM-Komplettmedium
DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin
5% v/v FCS
2% v/v Penicillin / Streptomycin
- Serumfreies DMEM
DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin
2% v/v Penicillin / Streptomycin
- EBM-Komplettmedium
10% v/v Endothelmedium Supplement
10% v/v FCS
10 ng/ml EGF
2% v/v Penicillin / Streptomycin
10 µg/ml Ciprobay
- Serumreduziertes EBM
1,5% v/v FCS
2% v/v Penicillin / Streptomycin
- Supplementreduziertes EBM
10% v/v FCS
2% v/v Endothelsupplement
2% v/v Penicillin / Streptomycin

3.1.10.4 Sonstige Lösungen und Puffer

- Kollagenase H
0,02% w/v in RPMI-1640
1h bei 37°C gelöst und 0,2 µm sterilfiltriert
- Giemsa-Lösung
10% Giemsa v/v in H₂O_{dest.}
- Gelatine
0,1% w/v in H₂O_{dest.}, autoklaviert
- 7x Lysispuffer
1 Tabl. Complete™ Mini in 1,5 ml H₂O_{dest.}
lösen
- 1x Lysispuffer
7x Lysispuffer 1:7 mit PBS verdünnen

3.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Im dreimonatigen Rhythmus wurden die Kulturüberstände der Tumorzelllinien mittels PCR auf Mycoplasmen-Kontamination hin untersucht (Abschn. 3.2.18).

3.2.1 Kultur humaner Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in DMEM-Komplettmedium in 75cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Passagierung erfolgte bei 80%-iger Konfluenz mittels Trypsin/EDTA-Verdau. Aliquots der Zellen wurden in DMEM-Komplettmedium supplementiert mit 10% DMSO bei -80°C eingefroren und zur weiteren Lagerung am folgenden Tag in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

3.2.2 Isolierung und Kultur humaner Endothelzellen

HUVEC wurden aus der *vena umbilicalis* frischer Nabelschnüre (max. 48 h nach der Geburt) mittels enzymatischem Verdau des Kollagens durch Collagenase H gewonnen. Die Nabelschnur wurde äußerlich auf Verletzungen hin untersucht. Eine Braunüle wurde in die Vene eingeführt und mittels sterilen Bindfadens fixiert. Nach zweimaligem Spülen der Vene mit PBS wurde der 3-Wegehahn aufgesetzt und das entgegengesetzte Ende der Nabelschnur mit sterilem Bindfaden verschlossen. Die auf 37°C vorgewärmte, 0,02%ige Kollagenase-Lösung in serumfreiem RPMI-1640 wurde über den 3-Wegehahn in die Vene gefüllt. Nach 10-15 min. Inkubation der Nabelschnur bei 37°C in vorgewärmtem PBS wurde die Kollagenase mittels PBS herausgespült. Der Efflux wurde anschließend 10 min. bei 250 xg und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das aus HUVEC und Erythrozyten bestehende Pellet wurde in 4 ml Endothelkomplettmedium resuspendiert und in einer mit 120 µg Gelatine pro cm² Fläche beschichteten Kulturschale ausgesät. Nach spätestens 24h erfolgte ein Mediumwechsel,

wobei die nun adhärenen HUVEC zum Entfernen der Erythrozyten 1x mit PBS gewaschen wurden.

Aliquots der Zellen wurden in EBM-Komplettmedium, supplementiert mit 10% DMSO, bei -80°C eingefroren und zur weiteren Lagerung am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Für die Experimente wurden HUVEC zwischen Passage 2 bis einschließlich Passage 6 verwendet. Die Passagierung erfolgte bei 90%iger Konfluenz mittels Accutaseverdau.

3.2.2.1 Gelatinebeschichtung von Zellkulturgefäßen

Die Kulturflaschen und -schalen für die HUVEC-Kultivierung wurden mit 120 µg Gelatine pro cm² in H₂O beschichtet. Die Schalen und Flaschen wurden 20 min. bei 37°C inkubiert. Der Überschuss wurde vollständig entfernt und die Zellen in Kulturmedium unverzüglich ausgesät, um ein Antrocknen der Gelatine zu verhindern.

3.2.3 Ermittlung der Zellzahl

Abgelöste Zellen wurden mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung verdünnt und auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Das Auszählen der vitalen Zellen erfolgte lichtmikroskopisch. Die Zellzahl wurde mit nachfolgender Gleichung errechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Großquadrat}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10000$$

Gleichung 1: Gleichung zur Bestimmung der Zellzahl.

3.2.4 Methode zur Bestimmung der Bestrahlungssensitivität

Zellen der Tumorlinie Dept sowie HUVEC wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml im entsprechenden Komplettmedium in ø4 cm-Kulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde 1h vor der Bestrahlung das Kulturmedium erneuert und die Zellen wurden einmalig mit einer Dosis von jeweils 0, 2, 8, 30 bzw. 50 Gray (Gy) bestrahlt. Alle 24h wurde das Kulturmedium gesammelt, die Zellen gezählt und anschließend lysiert

(Abschn. 3.2.5). Das Experiment wurde 96h nach der Bestrahlung beendet. Die Kulturüberstände sowie die Zellysate wurden bis zur späteren Analyse mittels ELISA bei -80°C gelagert.

3.2.5 Lyse von Tumorzellen zur Quantifizierung des intrazellulären FGF-2 und VEGF Gehaltes

Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Tumorzellen bei $1000 \times g$ 4 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in $200 \mu\text{l}$ 1x Lysispuffer aufgenommen und mittels Ultraschall-Elektrode etwa 1 min. auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden 2 min. bei $13000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

3.2.6 Methode zur Bestimmung des Einflusses von Cox-Inhibitoren auf die bestrahlungsvermittelte VEGF und FGF-2 Induktion

Die Tumorzelllinien Dept, Hun, Lau und A549 wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml in Kompletmedium in $\varnothing 4$ cm-Kulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde 1h vor der Bestrahlung mit 30 Gy das mit Cox-Inhibitoren supplementierte Kulturmedium erneuert. Die unbestrahlten Zellen, sowie die Lösungsmittelkontrollen wurden mitgeführt. Der Inhibitor wurde täglich erneuert. Nach 72h wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt. Bis zur Analyse mittels ELISA wurden die Kulturüberstände bei -30°C aufbewahrt. Die verwendeten Inhibitoren sowie deren Konzentrationen sind in Tab. 6 gezeigt.

<i>Inhibitor</i>	Flurbiprofen	Meloxicam	Lumiracoxib
<i>Konzentration</i>	0,04; 0,4; 2; 4; 200 μM	0,5; 2; 4; 6; 10; 100 μM	0,002; 0,2; 2; 20; 100 μM

Tab. 6: Konzentrationen der untersuchten Cox-Inhibitoren.

3.2.7 Quantifizierung von IL-8, PGE₂, FGF-2 und VEGF aus Zelllysaten und Kulturüberständen

Aus den Kulturüberständen wurden die Konzentrationen von IL-8, VEGF und FGF-2, und aus Zelllysaten der Gehalt an VEGF und FGF-2 mittels spezifischem DuoSet ELISA der Firma R&D Systems (Wiesbaden) ermittelt. PGE₂ wurde mittels Immunoassay desselben Herstellers aus den Kulturüberständen quantifiziert. Die quantifizierten Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf die Zellzahl bezogen. Die Durchführung der Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2.8 Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und Bestrahlung

Für die Untersuchung des Aktivierungszustandes des VEGFR-2 wurden HUVEC und Tumorzellen in ø4 cm Kulturschalen kultiviert. HUVEC wurden bei 90%-iger Konfluenz 24h vor Versuchsbeginn in serumreduziertem EBM kultiviert. Zellen der Tumortalie Dept wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ /ml ausgesät und am folgenden Tag weitere 24h vor Versuchsbeginn in serumfreiem DMEM kultiviert. Die Stimulierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von jeweils 20 ng/ml beider VEGF-Subtypen in das Kulturmedium bzw. durch Bestrahlung mit einer 2 Gy-Dosis. Direkt vor der Behandlung und nach 1, 5, 10 bzw. 30 min. wurde der Kulturüberstand entfernt und die Zellen lysiert (Abschn. 2.2.9). Zu jedem Zeitpunkt erfolgte die Untersuchung der unstimulierten bzw. unbestrahlten Kontrolle.

3.2.9 Lyse von Zellen und Proteinbestimmung zur Quantifizierung des VEGFR-2

Zellen der Tumortalie Dept, sowie HUVEC, wurden zur Lyse in der Kulturschale mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte nach den Arbeitsangaben des Total-VEGFR-2 ELISAs der Firma R&D Systems (Wiesbaden). Aus den Zelllysaten wurde mittels D_c Protein Assay der Firma Bio Rad, Kalifornien, USA, der Gesamtproteingehalt im 96-well Format ermittelt. Als Standardprotein wurde BSA (bovines Serum Albumin) verwendet.

3.2.10 Quantifizierung von phosphorylierten VEGFR-2

Zelllysate von HUVEC wurden im Total-VEGFR-2, sowie im Phospho-VEGFR-2 ELISA der Firma R&D Systems (Wiesbaden) im 96-well Format untersucht, wobei die Assay-Prozedur nach den Angaben des Herstellers erfolgte. Der quantifizierte Total-VEGFR-2 wurde auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe bezogen. Zur Ermittlung des phosphorylierten Rezeptoranteils wurden die Werte des Phospho-VEGFR-2 zu den Werten des Total-VEGFR-2 normalisiert.

3.2.11 Generieren konditionierter Tumorüberstände

Zellen der Tumorlinien Dept, Hun und A549 wurden in ø4 cm Kulturschalen in einer Dichte von 50.000 Zellen/ml ausgesät und 1h vor Bestrahlung in serumreduziertem EBM kultiviert. Die unbestrahlte Kontrolle wurde mitgeführt. Das Kulturmedium wurde täglich gewechselt, bzw. wurden täglich die konditionierten Kulturmedien (CM, *conditioned media*) abgenommen und für die spätere Verwendung bei -20°C gelagert. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Zellzahlen der bestrahlten und unbestrahlten Kulturen ermittelt.

Beim Generieren der CM für den Koloniebildungsassay von Tumorlinien mit eigenen CM wurden die Zellen einmalig mit einer Dosis von 30 Gy bestrahlt. Die Kulturüberstände wurden bei täglichem Kulturmediumwechsel nach 72h gesammelt.

Die CM für den Migrationsassay und den Apoptose-Assay mit HUVEC wurden aus fraktionierter Bestrahlung der Tumorzellen generiert. Dazu wurden Zellen der HNSCC-Linie Dept fraktioniert bis zu der kumulativen Dosis von 8 Gy bestrahlt. Vor jeder Dosis wurden die CM gesammelt und bei -20°C gelagert. Die fraktionierte Bestrahlung erfolgte nach dem in Tab 7 dargestellten Schema.

	<i>0h</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>	<i>96h</i>
<i>0 Gy</i>	1x	1x	1x	1x	-
<i>2 Gy</i>	1x	1x	1x	1x	-
<i>Probennahme</i>	-	+	+	+	+

Tab. 7: Schema der fraktionierten Bestrahlung und Probennahme.

3.2.12 Kultivierung von Zellen für immunhistochemische Analysen

Tumorlinien und HUVEC wurden auf in Kammern unterteilte Objektträger (*chamber slides*) ausgesät und bis etwa 80% Konfluenz im entsprechenden Komplettmedium kultiviert. Das Kulturmedium wurde dekantiert und der Kammeraufsatz entfernt. Nach 10 min. Aceton-Fixierung bei -20°C wurden die Objektträger in Alufolie eingeschlagen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.13 Immunhistochemische Analysen von Tumorzelllinien und HUVEC

Die Aceton-fixierten und getrockneten *chamber slides* wurden 5 min. in Waschpuffer gestellt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Objektträger 20 min. in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der 1. Antikörper in *Antibody Diluent* 2h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Objektträger wurden mit dem biotinylierten 2. Antikörper und der Streptavidin-Peroxidase 30 min. bei RT inkubiert. Alle Waschschritte wurden mit Waschpuffer durchgeführt. Die Entwicklung erfolgte mit *DAB Substrat Chromogen Solution*. Gegengefärbt wurden die Zellkerne mit Hämalaun-Lösung. Als Eindeckmedium der Objektträger wurde verflüssigtes Glycerin verwendet.

Es wurde die Expression der VEGF-Rezeptoren 1 und 2, sowie Neuropilin-1 untersucht. Als Positivkontrolle dienten Schnitte gesunder Nieren, SCC und Angiofibrome. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen ohne den 1. Antikörper inkubiert. HUVEC und SCC-Linien wurden mittels Färbung von CD31 bzw. Zytokeratin charakterisiert. Alle Färbungen wurden parallel durchgeführt. Die Verdünnungen der Antikörper und deren Hersteller sind in Tab. 5 dargestellt.

3.2.14 Proliferationsassay mit VEGF-Subtypen und Bestrahlung

Beim Proliferationsassay wurde der Einfluss von radioaktiver Bestrahlung und VEGF auf das Wachstum von Tumorzelllinien sowie HUVEC untersucht. Dazu wurden die Subtypen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ direkt vor Bestrahlung mit den Intensitäten 1, 2, 4, 6 bzw. 8 Gy in einer Konzentration von 20 ng/ml zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ /ml ausgesät und für 24h kultiviert. Unbestrahlte Zellen und Kulturen ohne VEGF dienten als Kontrolle und wurden mitgeführt. Nach der Inkubationsdauer wurden die Kulturen 3h mit 10% (v/v) AlamarBlue im Kulturmedium

weiter kultiviert. Die Ermittlung der Proliferation erfolgte indirekt im Fluoroskan (Thermo Electron Corporation, Dreieich) bei einer Anregungswellenlänge von 538 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm durch Ermittlung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU, *relative fluorescent units*). Das Chromogen AlamarBlue wird durch die in das Kulturmedium sezernierten Stoffwechselprodukte der Zellen reduziert, was durch einen Farbumschlag von blau (oxidierte Form) nach rot (reduzierte Form) indiziert wird. Im reduzierten Zustand ist das Chromogen durch Licht der Wellenlänge 538 nm anzuregen. Die Fluoreszenz wurde im Fluoroskan Ascent der Firma Thermo Labsystems gemessen, wobei sich die Höhe der RFU proportional zur Zelldichte verhält. Allen Werten wurden die Hintergrundwerte, d.h. Kulturmedium mit AlamarBlue, abgezogen. Zur Auswertung wurden die Werte zur unbestrahlten Kontrolle ohne Inhibitor relativiert.

3.2.15 Koloniebildungsassay

Der Koloniebildungsassay wurde zur Ermittlung der Sensitivität der Zellen gegenüber radioaktiver Bestrahlung in Verbindung mit VEGF-Subtypen, Cox-Inhibitoren bzw. konditionierten Zellkulturüberständen durchgeführt. Für diese Experimente wurden die Tumorklinien Dept, Hun und A549 sowie HUVEC verwendet. Tumorklinien wurden in einer Zelldichte von 250 Zellen/ml in serumreduziertem EBM kultiviert, bei HUVEC wurden 1000 Zellen/ml in supplementreduziertem EBM eingesetzt.

Der Assay wurde in 25 cm²-Kulturschalen durchgeführt. Nach 7-10 Tagen erreichten die Kolonien eine auswertbare Größe. Dazu wurden die Zellen in Ethanol/Aceton-Mischung, 1:1 (v/v), fixiert und mit 10% Giemsa gefärbt. Kolonien bestehend aus mindestens 50 Zellen wurden als solche definiert und gezählt.

3.2.15.1 Koloniebildungsassay mit VEGF-Subtypen und Bestrahlung

Die VEGF-Subtypen 121 bzw. 165 wurden direkt vor der Bestrahlung mit den Intensitäten 0,5, 1, 2, 4, 6 bzw. 8 Gy in einer Konzentration von 5 ng/ml zu Zellen der Linien Hun, Dept sowie HUVEC zugegeben. Unbestrahlte Zellen und Kulturen ohne Wachstumsfaktor dienten als Kontrolle und wurden mitgeführt. Die Zellen wurden unverzüglich nach der Bestrahlung ausgesät. Zur Auswertung wurden die gezählten Kolonien zur unstimulierten und unbestrahlten Kontrolle relativiert.

3.2.15.2 Koloniebildungsassay mit Cox-Inhibitoren

Für den Koloniebildungsassay mit Cox-Inhibitoren wurden Zellen der HNSCC-Linien Hun und Dept verwendet. Die Zellen wurden mit den in Tab. 9 angegebenen Cox-Inhibitoren kultiviert. Als Kontrollen dienten Lösungsmittel- und Mediumkulturen mitgeführt. Zur Auswertung wurden die gezählten Kolonien auf die Kontrolle ohne Lösungsmittel und Wirkstoff relativiert.

<i>Inhibitor</i>	<i>Konzentration</i>
ASA	2 mM
Flurbiprofen	0,2 mM
Meloxicam	6 μ M
NS-398	10 μ M
Lumiracoxib	2; 20; 100 μ M

Tab. 8: Konzentrationen der im Koloniebildungsassay verwendeten Cox-Inhibitoren.

3.2.15.3 Koloniebildungsassay mit konditionierten Tumorüberständen

Zellen der Tumorkinien Hun, Dept und A549 wurden mit autologen CM kultiviert und bestrahlt (Abschn. 3.2.11). Die konditionierten Kulturüberstände wurden im Verhältnis 1:2 mit serumreduziertem EBM verdünnt. Um den Anteil des bestrahlungsinduzierten VEGF und FGF-2 an der Koloniebildung zu untersuchen, wurden dem CM VEGF- und FGF-2- neutralisierende Antikörper eingesetzt. Die eingesetzte Konzentration der Antikörper richtete sich nach dem zuvor im ELISA quantifizierten VEGF bzw. FGF-2 und wurde 10fach höher verwendet (z.B. bei quantifizierten 50 μ g/ml VEGF im Kulturüberstand wurden 0,5 μ g/ml anti-VEGF eingesetzt). Zusätzlich wurden die Kulturen mit 2 Gy bestrahlt. Zur Auswertung des Assays wurden die gezählten Kolonien auf die Anzahl der Donorzellen bezogen.

3.2.16 Migrationsassay

HUVEC wurden in mit Gelatine beschichteten, \varnothing 4 cm-Kulturschälchen ausgesät und bis zur Konfluenz in EBM-Komplettmedium kultiviert. 24h vor Beginn des Experiments wurden die Zellen in serumreduziertem EBM weiter kultiviert. Zum Versuchsbeginn wurde

das Kulturmedium entfernt. Der konfluente Zellrasen wurde mittels steriler 100 µl Pipettenspitze über den gesamten Durchmesser durch Abschaben der Zellen verletzt, wonach die abgeschabten Zellen durch Spülen mit PBS entfernt wurden (SLEVIN 2002). Die Zellen beginnen innerhalb weniger Stunden mit der Migration in den zellfreien Bereich hinein, was als Heilung definiert wird.

Die Weiterkultivierung der HUVEC erfolgte unter den in den folgenden Abschnitten dargestellten Bedingungen. Direkt nach der Verletzung, d.h. zum Zeitpunkt 0h, und nach 6, 24 bzw. 48h wurde die Migration der Zellen in den zellfreien Bereich hinein mit invertiertem Nikon Phasenkontrast-Mikroskop bei 40facher Vergrößerung bei 6 Fotos je Kultur mittels Digitalkamera dokumentiert. Die Fotos wurden mit Hilfe der Lucia Imaging System Software (Nikon) ausgewertet indem zu jedem Zeitpunkt der Abstand der beiden durch die Verletzung entstandenen Zellfronten gemessen wurde.

3.2.16.1 Migrationsassay mit Cox-Inhibitoren

Die HUVEC wurden mit in den in Tab. 10 angegebenen Konzentrationen der Cox-Inhibitoren in serumreduziertem EBM kultiviert. Als Kontrollen wurden die Lösungsmittel- und Kulturmediumkontrollen mitgeführt.

<i>Inhibitor</i>	<i>Konzentration</i>
Flurbiprofen	0,01; 0,2 mM
Meloxicam	2; 6; 100 µM
Lumiracoxib	2; 20; 100 µM

Tab. 9: Konzentrationen der im Migrationsassay verwendeten Cox-Inhibitoren.

3.2.16.2 Migrationsassay mit CM

Durch Bestrahlung konditioniertes Kulturmedium von Dept und Hun wurden 1:2 mit serumreduziertem EBM verdünnt und direkt nach Verletzung des HUVEC-Monolayers auf die Zellen gegeben. Der Heilungsverlauf wurde zu den Zeitpunkten 0h, d.h. direkt nach der Verletzung, 6, 24 und 48h dokumentiert.

3.2.16.3 Auswertung des Migrationsassays

Durch Abstandsmessung der durch die Verletzung entstandenen beiden Zellfronten konnte der Verlauf der Heilung durch migrierende HUVEC ermittelt werden, wobei der Frontenabstand zum Zeitpunkt 0h nach Verletzung als 100% nicht geheilt definiert wurde. Über den beobachteten Zeitraum wanderten die Zellen beider Fronten aufeinander zu und verringerten so den Abstand, was als Heilung definiert wurde. Der gemessene Abstand in μm wurde auf den Abstand zum Zeitpunkt 0h nach Verletzung bezogen und war entsprechend $<100\%$ (Gleichung 2).

$$H = \frac{\text{Verletzungsbreite } T_x}{\text{Verletzungsbreite } T_0}$$

Gleichung 2: Berechnung der Heilung von HUVEC im Migrationsassay. Abkürzungen: H: Heilung, T0: Verletzungsbreite zum Zeitpunkt 0h, Tx: Verletzungsbreite zum Zeitpunkt 6, 24 oder 48h.

3.2.17 Methoden zur Bestimmung der Apoptose bei HUVEC nach Bestrahlung

3.2.17.1 Das Prinzip des Apoptose Assays

Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein. Es besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin, das sich bei intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet. Während der Apoptoseinduktion kommt es sehr schnell zu Veränderungen der Phospholipidorganisation. Dies hat Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran zur Folge, wo es mit Annexin interagieren kann. Annexin dient somit zum Nachweis für frühe Apoptose-typische Veränderungen. Da nekrotische Zellen aufgrund des Verlustes der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden können, ist eine weitere Differenzierung der apoptotischen von nekrotischen Zellen erforderlich. Hierfür eignen sich DNA-Farbstoffe, wie beispielsweise Propidiumiodid, welche die permeabilisierten Membranen nekrotischer und spät-apoptotischer Zellen passieren können und die DNS binden. Die simultane Anwendung von Annexin und Propidiumiodid eröffnet so die Möglichkeit der Differenzierung apoptotischer und nekrotischer Zellen.

Apoptotische Zellen emittieren durch das FITC-Konjugat grünes Licht in einer

Wellenlänge von etwa 525 nm. Mit Propidiumiodid gefärbte Zellen emittieren rotes Licht mit einer Wellenlänge von etwa 600 nm. Die Anregungswellenlänge ist mit 488 nm für beide Chromogene gleich.

3.2.17.2 Evaluation des protektiven Potentials von CM aus bestrahlten Tumorzellen auf den bestrahlungsinduzierten Zelltod bei HUVEC

Um die *in vivo*-Situation im Tumor zu simulieren, wurden HUVEC zusammen mit Zellen der Tumorlinien Dept bzw. Hun kokultiviert. Dazu wurden HUVEC in ø4 cm-Kulturschalen kultiviert und Tumorzellen in Kulturschaleneinsätzen oberhalb der HUVEC ausgesät. In den Kulturschaleneinsätzen befinden sich durchlässige Membranen mit Poren mit einem Durchmesser von 0,4 µm. Die Membran verhindert den direkten Zell-Zell-Kontakt, allerdings ist durch die Poren der Austausch von Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren gewährleistet. Je Zelltyp wurden im entsprechenden Komplettmedium 5×10^4 Zellen/ml ausgesät, wobei HUVEC in den ø4cm-Kulturschalen und die Tumorzellen in den Kulturschaleneinsätzen kultiviert wurden. Am folgenden Tag erfolgte Mediumwechsel mit serumreduziertem EBM, wobei die Einsätze mit den Tumorzellen in die HUVEC enthaltenen Kulturschalen gesetzt wurden. Die Bestrahlung der Kulturen erfolgte nach etwa 1h der Kokultur.

Um eine Bestrahlungsdosisabhängigkeit der Induktion von Faktoren und deren protektives Potential zu evaluieren, wurden die Kokulturen mit 2, 8, 30 bzw. 50 Gy bestrahlt. Nach 48h erfolgte die Färbung der adhären HUVEC mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid, wodurch apoptotische und nekrotische Zellen markiert wurden. In diesen Experimenten erwies sich eine 30 Gy-Dosis hinsichtlich der Protektion als effektiv. Daraufhin wurde diese Intensität verwendet, um eine zeitabhängige Induktion der protektiven Faktoren zu untersuchen. Die Färbung der HUVEC erfolgte daher jeweils zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72h nach Bestrahlung. Unbestrahlte HUVEC, sowie HUVEC ohne Kokultur dienten bei allen Experimenten als Kontrollen.

Mittels invertiertem Fluoreszenzmikroskop und Digitalkamera wurden die markierten Zellen aufgenommen und auf die Gesamtzellzahl bezogen ausgewertet.

3.2.17.3 Evaluierung des protektiven Potentials von CM aus fraktionierter Bestrahlung auf den bestrahlungsinduzierten Zelltod bei HUVEC

In dieser Fragestellung sollte untersucht werden, ob die durch wiederholte (fraktionierte) Bestrahlung mit jeweils 2 Gy von Tumorzellen freigesetzten Faktoren HUVEC vor dem strahleninduzierten Zelltod schützen (siehe Abschn. 3.2.11). Dieses Vorgehen wurde gewählt, um den *in vivo* verwendeten Konditionen der RT näher zu kommen. Neben den CM aus fraktionierter Bestrahlung wurden zusätzlich CM 72h nach einer 30 Gy-Dosis untersucht, da diese sich in vorhergehenden Experimenten als effektiv hinsichtlich der protektiven Eigenschaften gezeigt hatten.

HUVEC wurden in \varnothing 4 cm-Kulturschalen ausgesät und bis 90% Konfluenz kultiviert. 24h vor Beginn des Experiments erfolgte ein Mediumwechsel mit serumreduziertem EBM. Die HUVEC wurden mit den in serumreduziertem EBM verdünnten CM (1:2 v/v) der Tumorzellen mit 2 Gy bestrahlt und weiter kultiviert. 7h nach der Exposition wurden die HUVEC mittels Trypsin/EDTA-Verdau aus den Kulturschalen gelöst und in den nachfolgenden Apoptose Assay eingesetzt. Das Präparieren und Färben der HUVEC für den Apoptose Assay erfolgte nach dem Protokoll für „RAPID Annexin V Binding“ des Apoptose Detection Kit. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte direkt im Anschluss.

3.2.17.4 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorter*) basiert auf der Messung unterschiedlicher Eigenschaften der Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Aufgrund zellbiologischer Parameter wie Größe und Granularität streut jede Zelle das Laserlicht. Darüber hinaus können Zelloberflächen-Antigene durch Markierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern oder anderen Verbindungen nachgewiesen werden, die durch Laserlicht angeregt werden. Bei der Durchflußzytometrie werden folgende optische Parameter gleichzeitig gemessen:

- Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*)

Ein Teil des Lichtes wird relativ zur Achse der Einstrahlung gestreut. Die Streuung des Lichtes verhält sich proportional zur Zellgröße.

- Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideward scatter*)
Diese Bezeichnung bezeichnet das im rechten Winkel zum einfallenden Strahl gestreute Licht. Die Intensität dieses Lichtes ist von der zellulären Granularität abhängig, d.h. eine höhere Granularität entspricht stärkerem Seitwärtsstreulicht.
- Fluoreszenz
Durch das Laserlicht angeregte Fluoreszenzen werden detektiert und erlauben eine synchrone Analyse von bis zu drei verschiedenen Zelloberflächenmerkmalen.

3.2.18 Transplantation von Tumorzellen und Therapieung der Mäuse

Die SCID-Mäuse wurden mit jeweils 10^7 Zellen der Tumorzelle Dept in 200 μ l PBS in den Oberschenkel des rechten Hinterbeins mittels Spritze transplantiert und zur späteren Unterscheidung an den Ohren markiert. Die Volumina der Transplantate wurden täglich gemessen. Erreichten die Tumore einen Durchmesser von etwa 13 mm, was einem Volumen von etwa 1,3 cm^3 entsprach, wurden die Mäuse in Gruppen bestehend aus jeweils vier Tieren unterteilt. Die Tiere der beiden bestrahlten Gruppen wurden mit je 250 μ l Rompun und Ketamin/HCl, im Verhältnis 1:1,6 gemischt, anästhesiert. Die Bestrahlung erfolgte einmalig mit 60 Gy. Die tägliche intraperitoneale Applikation des Cox-Inhibitors NS-398 begann ab dem folgenden Tag für insgesamt 10 Tage bei jeweils vier bestrahlten und unbestrahlten Mäusen. Die Substanz wurde in DMSO gelöst und in der Konzentration von 38 mg/kg Maus in einem Volumen von 200 μ l in DMSO/PBS, 1:4 verdünnt, verabreicht. Vier unbehandelte Tiere wurden als Kontrollgruppe behandelt. Die Mauspopulation wurde 13 Tage nach Bestrahlung terminiert.

3.2.19 Untersuchung der Tumorzelllinien auf Mycoplasmen-Kontamination

In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturüberstände der Tumorzelllinien auf Mycoplasmen-Kontamination mittels Mycoplasmen-*polymerase chain reaction* (PCR) untersucht. Dazu wurden die Linien zuvor für eine Woche in antibiotikafreiem Kompletmedium kultiviert.

3.2.20 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Falls nicht anders angegeben, wurden die Daten als Mittelwerte (MW) +/- Standardabweichung (SD, *standard deviation*) angegeben.

Bei der Ermittlung der Strahlensensitivität von Tumorzellen über den Zeitraum von 96h und der Wirkung der Bestrahlung auf die Sezernierung der angiogenen Faktoren VEGF und FGF-2 wurde ein allgemeines lineares Modell unter Berücksichtigung der Abhängigkeit von Zeit und Bestrahlungsdosis angewendet. P-Werte <0,05 wurden zum Niveau 5% als signifikant gewertet.

Beim Koloniebildungsassay mit rekombinanten VEGF-Subtypen wurden die %-Überlebenden gegen die applizierte Bestrahlungsdosis aufgetragen. Die für die Subtypen erhaltenen Kurven wurden mittels Quadratwurzel linearisiert und mittels xy-Test auf Signifikanzen hin analysiert. P-Werte <0,05 wurden zum Niveau 5% als signifikant erachtet.

Beim Proliferationsassay mit VEGF-Subtypen wurde die prozentuale Proliferation gegen die applizierte Bestrahlungsdosis aufgetragen. Die für die Subtypen erhaltenen Kurven wurden mittels xy-Tests auf Signifikanzen hin analysiert. P-Werte <0,05 wurden zum Niveau 5% als signifikant gewertet.

Zur Berechnung der Signifikanzen der Folgenden Experimente wurde der *unpaired, one-sample t-test, two-tailed* angewendet:

- Untersuchung der Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf die Sezernierung von VEGF und FGF-2 auf Tumorzellen
- Ermittlung der Aktivierbarkeit des VEGFR-2 durch die VEGF-Subtypen bei HUVEC
- Koloniebildungsassay und Proliferationsassay mit Cox-Inhibitoren
- Migrationsassay mit Cox-Inhibitoren, wobei die 25%-ige, 50%-ige, und die 75%-ige Heilung nach Inhibitorinkubation jeweils auf die Kontrolle bezogen wurde.

Bei allen Tests wurden p-Werte <0,05 zum Niveau 5% als Signifikant erachtet.

4. Ergebnisse

Ziel der Studien war, die Mechanismen der Radioresistenzbildung bei Tumorzellen zu beleuchten. Hierzu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Zur Erforschung der Wirkungen radioaktiver Bestrahlung auf die am Tumor beteiligten Zelltypen, wurden mit den in unserem Labor etablierten Tumorzelllinien und frisch isolierten primären Endothelzellen Bestrahlungsexperimente durchgeführt. In Kulturüberständen und Zelllysaten wurde untersucht, ob die Synthese und Freisetzung von VEGF und FGF-2, den beiden wichtigsten angiogenen Wachstumsfaktoren, durch Bestrahlung verändert wird. Auch wurde untersucht, ob sich das Überleben, die Proliferation und das Migrationsverhalten der Zellen infolge der Bestrahlung veränderten, und ob diese Reaktionen durch VEGF und FGF-2 moduliert werden. Schließlich untersuchte ich noch die Wirkungen von rekombinantem VEGF auf die Strahlenresistenz und von Cox-Inhibitoren auf die Freisetzung angiogener Faktoren nach Bestrahlung.

4.1 Synthese und Sezernierung von VEGF und FGF-2 bei Tumorzelllinien

In den ersten Experimenten zur Bearbeitung der Fragestellung wurde das Zytokinexpressionsmuster der HNSCC-Linie Dept untersucht. In den Kulturüberständen und Zelllysaten wurden die beiden wichtigsten proangiogenen Faktoren VEGF und FGF-2 quantifiziert. Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 96h kultiviert (Abschn. 3.2.4). Alle 24h wurden Zellen und Kulturüberstände geerntet, die Faktoren im ELISA quantifiziert und die Werte besserer Vergleichbarkeit zur Zellzahl normalisiert. In Abb. 18A ist das sezernierte und intrazellulär detektierte VEGF dargestellt. Das Sezernierungslevel von VEGF blieb über den beobachteten Zeitraum gleichmäßig bei etwa $150 \text{ pg}/10^5$ Zellen, wohingegen der intrazelluläre VEGF-Gehalt zu jedem Zeitpunkt mit $<10 \text{ pg}/10^5$ Zellen kaum nachweisbar war. FGF-2 wurde mit etwa $20 \text{ pg}/10^5$ Zellen nur sehr schwach in den Kulturüberstand abgegeben (Abb. 18B), wohingegen der intrazelluläre FGF-2 Gehalt mit $722 \text{ pg}/10^5$ Zellen deutlich höher lag. Über den Zeitraum hinweg sank das intrazellulär detektierte FGF-2 kontinuierlich auf etwa $450 \text{ pg}/10^5$ Zellen ab.

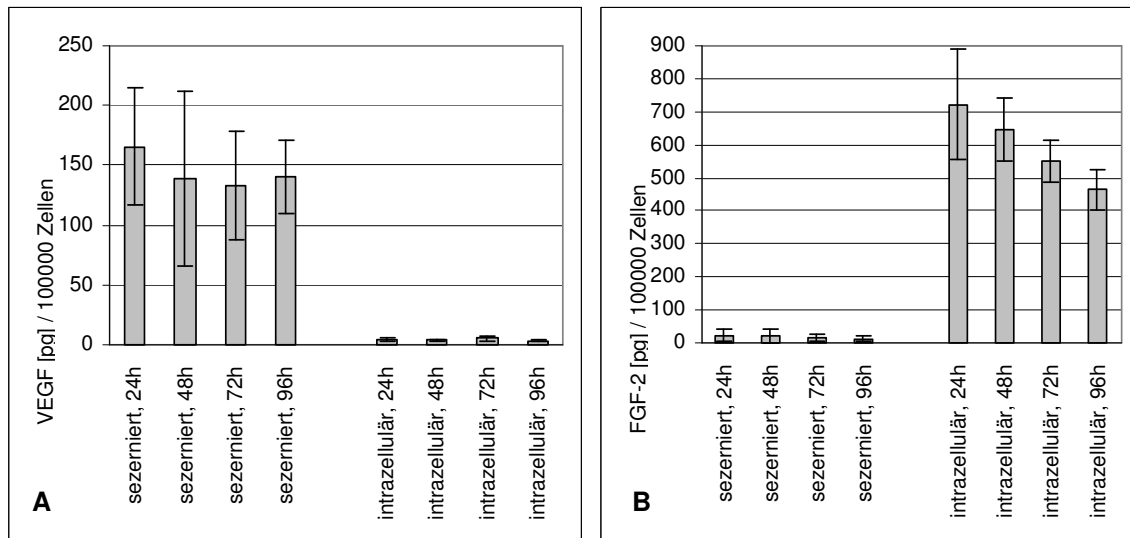


Abb. 18: Sezerniertes und intrazellulär detektiertes VEGF (A) und FGF-2 (B) von Dept. Alle 24h bis insgesamt 96h nach Adhärenz wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, die Zellen wurden gezählt und lysiert. Im ELISA wurde VEGF bzw. FGF-2 aus den Kulturüberständen und den Zelllysaten quantifiziert und zur Zellzahl normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.2 Die Wirkungen radioaktiver Strahlung auf Tumorzellen und HUVEC

Radioaktive Bestrahlung stellt einen wesentlichen Bestandteil der Tumorthherapie im Kopf-Hals-Bereich dar. Die Wirkmechanismen dieser Behandlung sind weitgehend unklar und Gegenstand der aktuellen Forschung. Um die Radioresistenzbildung *in vitro* zu untersuchen, wurden die Effekte der Bestrahlung auf die Zellteilungsrate und die Freisetzung von VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen und HUVEC evaluiert.

4.2.1 Die Wirkung radioaktiver Strahlung auf die Zellzahl

In den ersten Experimenten dazu wurde der Einfluss der Bestrahlung auf die Zellteilung der HNSCC-Linie Dept und von HUVEC untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den Intensitäten 2, 8, 30 und 50 Gy bestrahlt (Abschn. 3.2.4). Die unbestrahlte Kontrolle wurde zu jedem Zeitpunkt mitgeführt. Alle 24h bis insgesamt 96h nach Bestrahlung wurden die Zellen gezählt, um die Effekte der Behandlung auf die Zellteilung zu untersuchen.

Abb. 19 zeigt das zeit- und bestrahlungsabhängige Zunahme von Dept-Zellen. In der unbestrahlten Kontrolle war zunächst bis 72h eine gleichmäßige Verdopplungszeit von etwa 24h zu beobachten, was einem exponentiellen Wachstum entspricht. Die nach 96h dementsprechend zu erwartende Zellzahl von etwa $1,6 \times 10^6$ wurde nicht erreicht. Ab diesem Zeitpunkt deutete sich aufgrund begrenzter Umweltkapazität ein sigmoidaler Verlauf des Zellwachstums an (nach Verhulst-Pearl). Würde das Wachstums weiter verfolgt werden, würde sich das gehemmte Wachstum fortführen und schließlich in der Stagnation enden.

Bereits eine 2 Gy Dosis reduzierte das exponentielle Wachstum der Zellen deutlich. Nach 72h verzögerte sich die Verdopplungszeit um 12h und nach 96h wurden gleich viele Zellen gezählt wie in der Kontrolle nach 72h. Verglichen mit der Kontrolle entspricht dies einer zeitlichen Verzögerung von 24h. Eine 8 Gy Dosis führte zur Stagnation der Zellzahl; es wurde weder eine Zu- noch eine Abnahme beobachtet. Die Bestrahlung mit 30 bzw. 50 Gy verursachte ein massives Zellsterben, so dass nach 96h nur noch etwa 20% der eingesetzten Zellen lebten. Demnach waren deutliche intensitätsabhängige Effekte bei dem Wachstum der Tumorzellen zu verzeichnen.

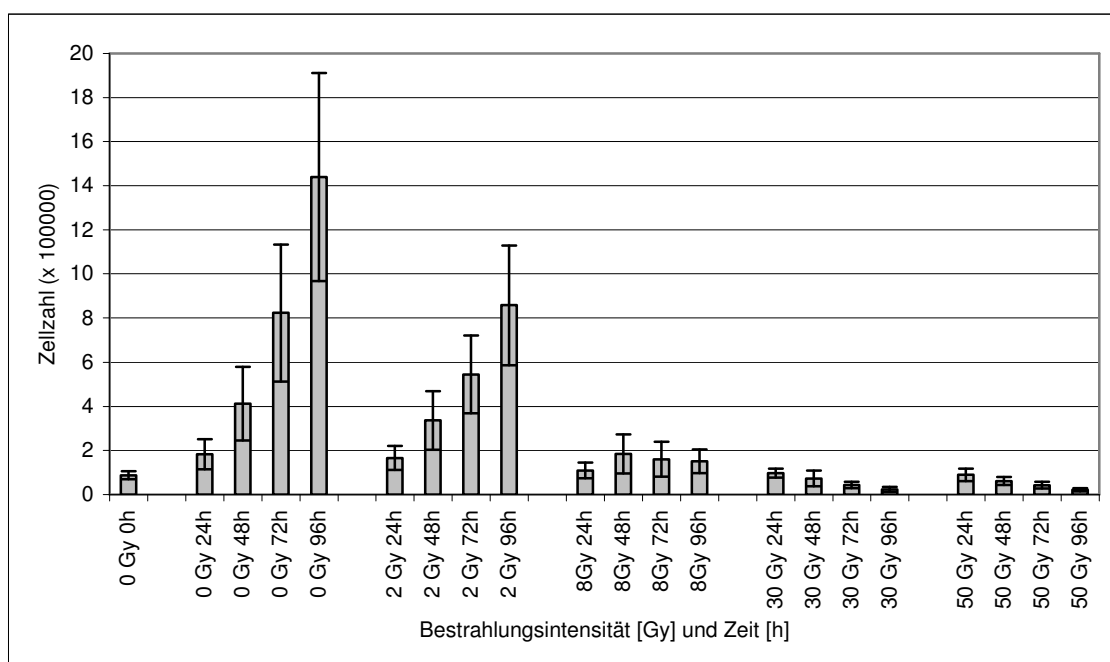


Abb. 19: Bestrahlung verzögert das Wachstum der SCC-Linie Dept. Die Zellen wurden einmalig mit 2, 8, 30 und 50 Gy bestrahlt und bis 96h nach Bestrahlung kultiviert, wobei die Zellen alle 24h gezählt wurden. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Kulturen. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

HUVEC erwiesen sich als sehr strahlenempfindlich. Die Zellen der unbestrahlten Kontrolle zeigten noch eine kontinuierliche Zunahme der Zellzahl über den gesamten Zeitraum (Abb. 20). Allerdings ließen diese Zellen kein exponentielles Wachstum erkennen. Eine 2 Gy-Dosis verursachte eine Stagnation der Zellzahl und die höheren Bestrahlungsintensitäten führten zum Rückgang der Anzahl der vitalen Zellen.

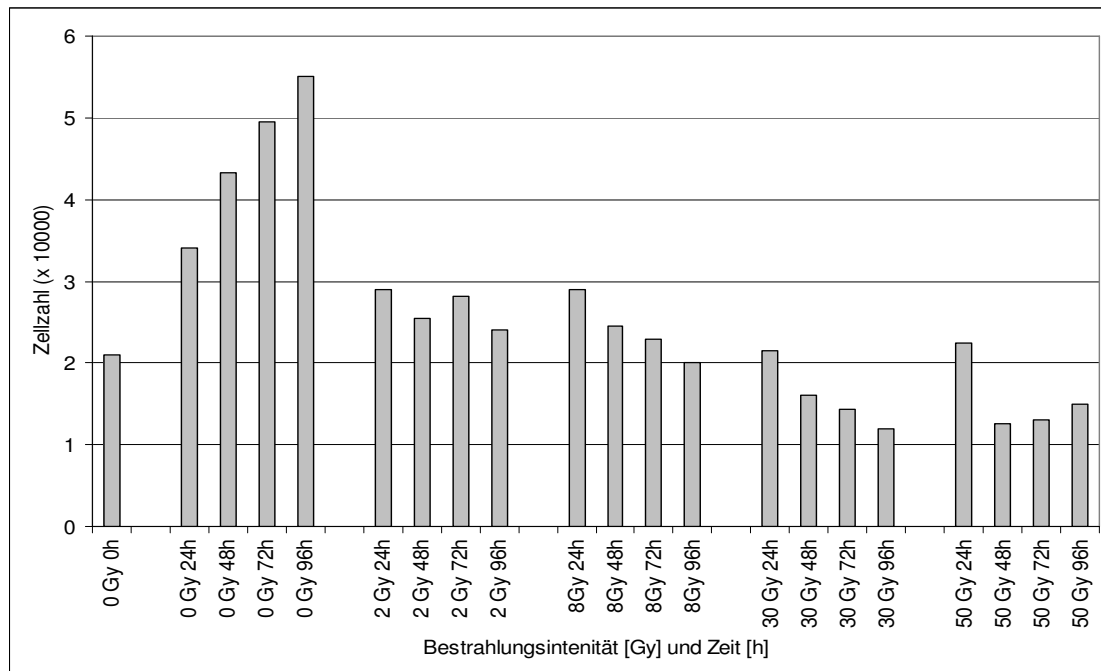


Abb. 20: Bestrahlung verzögert das Wachstum von HUVEC. Die Zellen wurden einmalig mit 2, 8, 30 und 50 Gy bestrahlt und bis 96h nach Bestrahlung kultiviert, wobei die Zellen alle 24h gezählt wurden. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Kulturen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

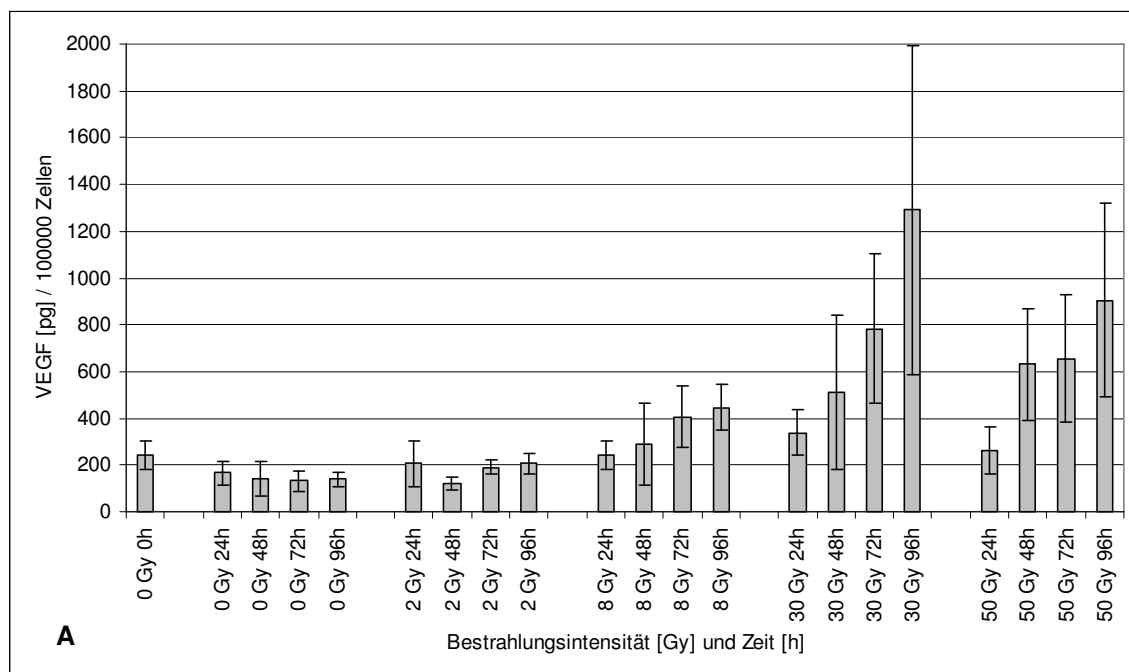
4.2.2 VEGF und FGF-2 werden durch Bestrahlung induziert

In Abschn. 4.1 und 4.2.1 stellte ich die basal in den Kulturüberstand sezernierten und intrazellulär detektierten Konzentrationen von VEGF- und FGF-2 der HNSCC-Linie Dept und die Wirkung der Bestrahlung auf das Zellwachstum dar. Nun wurde untersucht, ob das basale VEGF- und FGF-2-Expressionsmuster durch Bestrahlung beeinflusst wird. Dazu wurden Zellen der Linie Dept und HUVEC mit 2, 8, 30 bzw. 50 Gy bestrahlt und über einen Zeitraum von insgesamt 96h nach Bestrahlung untersucht. Die unbestrahlte Kontrolle wurde zu jedem Zeitpunkt mitgeführt. Alle 24h wurden die Kulturüberstände getauscht, die Zellen wurden gezählt und anschließend lysiert (Abschn. 3.2.4 und 3.2.5).

Mittels ELISA wurden die Faktoren aus den Kulturüberständen und den Zelllysaten quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden diese Daten zur Zellzahl normalisiert (Abschn. 3.2.7).

Abb. 21A und B zeigen den Einfluss der Bestrahlung auf das sezernierte und intrazellulär detektierte VEGF bei Dept. Bestrahlung von Tumorzellen bewirkte einen signifikanten intensitäts- und zeitabhängig Anstieg von sezerniertem und intrazellulärem VEGF (Abb. 21A, $p=0,001$). Bereits eine 2 Gy-Dosis verursachte im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Freisetzung von VEGF über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg (180 vs. 145 pg/10⁵ Zellen). Bestrahlung mit 8 Gy resultierte in erhöhter und im Verlauf des Experiments weiter ansteigender Ausschüttung dieses Faktors. Nach einer 30 bzw. 50 Gy Dosis war eine massive Zunahme des freigesetzten VEGF zu verzeichnen. Die maximale VEGF-Menge wurde 96h nach einer 30 Gy-Dosis mit 1200 pg/10⁵ Zellen detektiert.

Die niedrigen intrazellulären basalen VEGF-Level wurden durch eine 2 Gy Dosis nicht erhöht, wobei mit den höheren Intensitäten ein signifikanter Anstieg des detektierten VEGF zu beobachten war ($p=0,002$) (Abb. 21B). Intrazellulär wurde die maximale VEGF-Menge 96h nach einer 30 Gy-Dosis mit 90 pg/10⁵ Zellen gemessen.



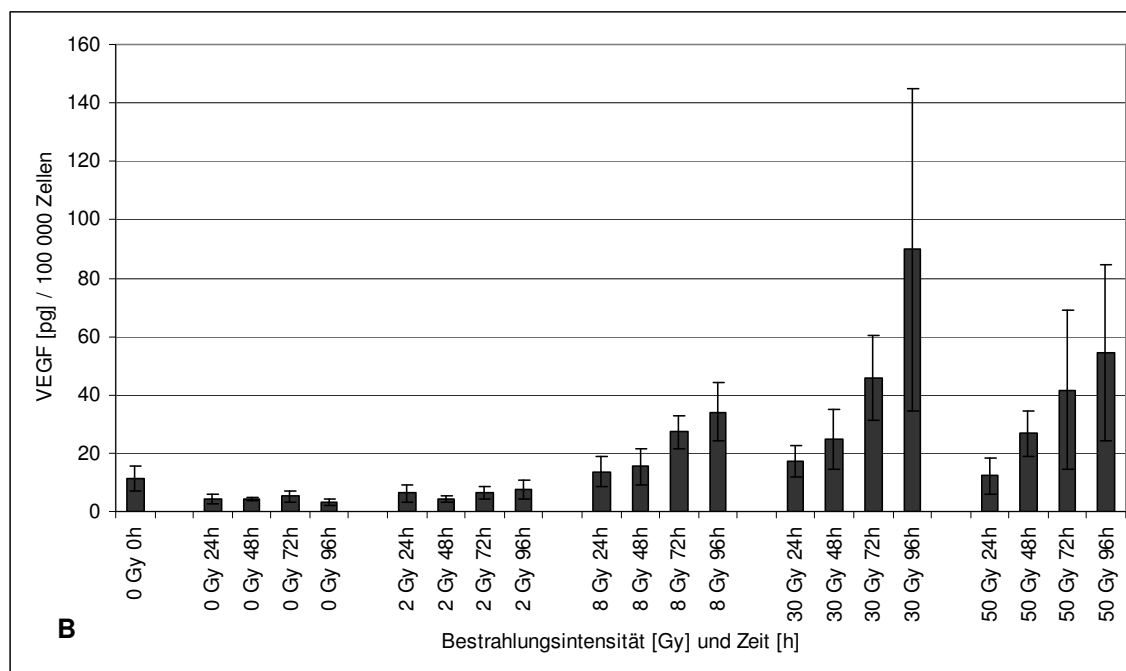


Abb. 21: Bestrahlung steigert die Sezernierung (A) und das intrazelluläre Vorkommen (B) von VEGF bei der HNSCC-Linie Dept. Die Zellen wurden mit ansteigenden Dosen von 0 bis 50 Gy bestrahlt. VEGF wurde 24 bis 96h nach Bestrahlung in den Kulturüberständen und den Zelllysaten mittels ELISA quantifiziert und auf 10^5 überlebende Zellen normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (A $p=0,001$, B $p=0,002$).

Der niedrige basale FGF-2 Level im Kulturüberstand wurde durch eine 2 Gy Dosis kaum verändert (Abb. 22A). Erst die höheren Intensitäten bewirkten über den beobachteten Zeitrahmen eine signifikant verstärkte Freisetzung dieses Faktors ($p<0,005$). Die maximale FGF-2 Konzentration mit $3300 \text{ pg}/10^5$ Zellen wurde, wie bei VEGF, 96 h nach einer 30 Gy-Dosis detektiert.

Die intrazellulären FGF-2 Level wurden durch Bestrahlung ebenfalls mit $p=0,001$ signifikant erhöht (Abb. 22B). So verursachte eine 2 Gy Dosis einen Anstieg von insgesamt $200 \text{ pg}/10^5$ Zellen. Auch hier wurde der Maximalwert 96h nach einer 30 Gy Dosis mit $6700 \text{ pg}/10^5$ Zellen gefunden.

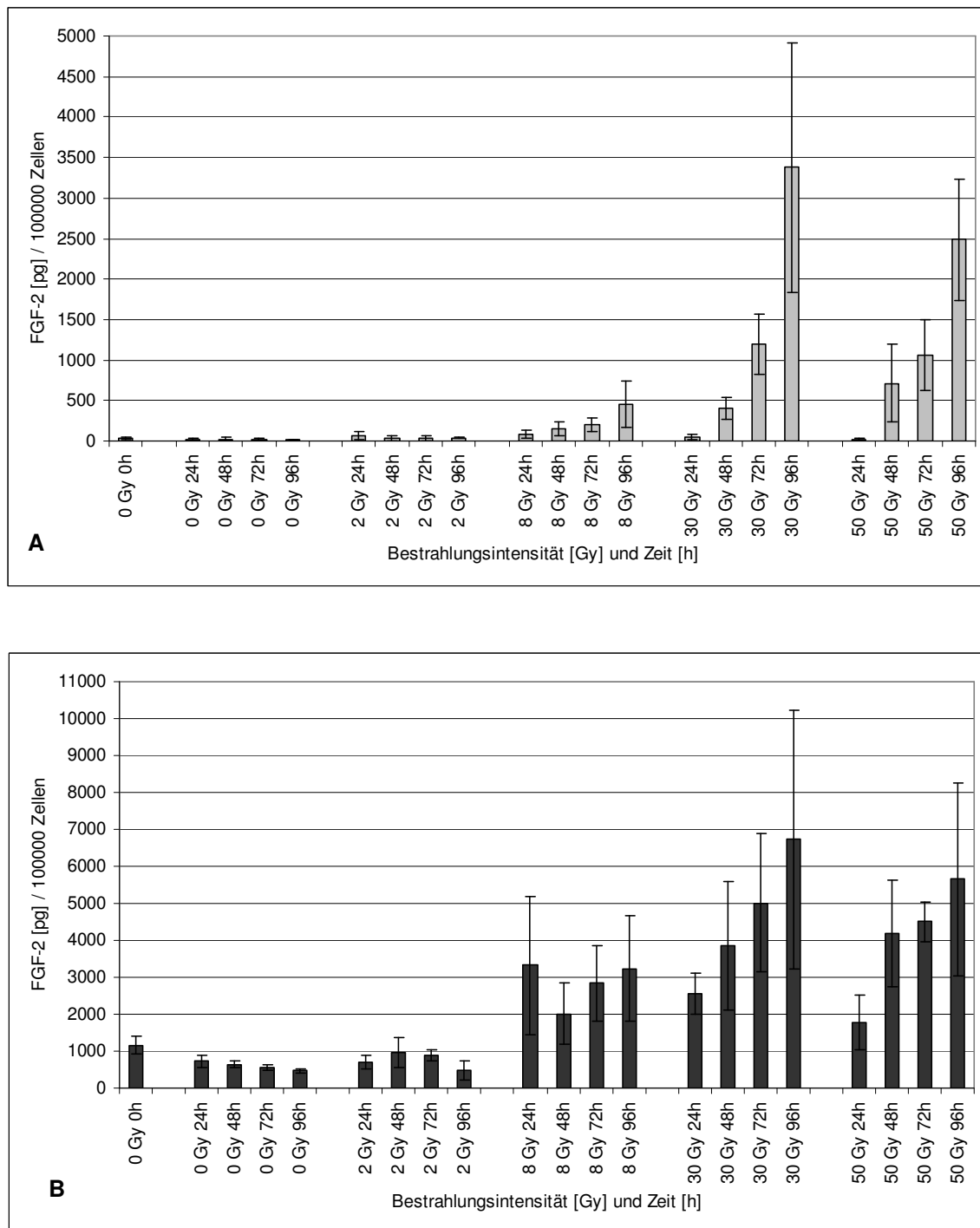


Abb. 22: Bestrahlung steigert die Sezernierung (A) und das intrazelluläre Vorkommen (B) von FGF-2 bei der HNSCC-Linie Dept. Die Zellen wurden mit ansteigenden Dosen von 0 bis 50 Gy bestrahlt. FGF-2 wurde 24 bis 96h nach Bestrahlung in den Kulturüberständen und den Zellysaten mittels ELISA quantifiziert und auf 10^5 überlebende Zellen normalisiert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert \pm SD von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (A $p=0,005$, B $p=0,001$).

Bestrahlung wirkte sich auf das Expressionsverhalten von FGF-2 bei Dept stark induzierend aus. Da im Kulturüberstand unbestrahlter Zellen jedoch nur sehr geringe Mengen des Faktors detektiert wurden, obwohl intrazellulär deutlich größere Mengen

gefunden wurden, scheint Bestrahlung auch die FGF-2 Freisetzung zu stimulieren.

HUVEC wurden den gleichen experimentellen Bedingungen unterworfen wie bei der zuvor beschriebenen Tumorzelllinie (Abschn. 3.2.4). Es wurden weder im Kulturüberstand noch im Zelllysate zu keinem Zeitpunkt und unabhängig von der Bestrahlungsintensität VEGF- bzw. FGF-2- Protein detektiert.

4.2.3 Fraktionierte Bestrahlung induziert VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen

Kopf-Hals Tumoren werden in der klinischen Bestrahlungstherapie fraktioniert bestrahlt, d.h. die Gesamtdosis von 50 bis 70 Gy wird häufig in 2 Gy Einzeldosen appliziert. Um die Effekte dieser Fraktionierung auf Tumorzellen *in vitro* zu untersuchen, wurden Zellen der HNSCC-Linie Dept an vier aufeinander folgenden Tagen mit 2 Gy bestrahlt, was kumulativen Gesamtdosen von 2, 4, 6 bzw. 8 Gy entspricht (Abschn. 3.2.11). Die Kulturüberstände wurden an Tag 1, 2, 3 und 4 nach der ersten Dosis genommen und die Zellen gezählt. Im ELISA wurde VEGF und FGF-2 quantifiziert und zur besseren Vergleichbarkeit der Werte zur Zellzahl normalisiert. Es wurden zu jedem Zeitpunkt unbestrahlte Kontrollen mitgeführt.

Abb. 23A und B zeigen das sezernierte VEGF (A) bzw. FGF-2 (B) nach fraktionierter Bestrahlung. Bereits nach der zweiten 2 Gy-Dosis war eine leichte Induktion von VEGF im Kulturüberstand zu beobachten (137 vs. 107 pg/10⁵ Zellen), was sich durch die weiteren Bestrahlungen signifikant fortsetzte (Abb. 23A, *p<0,05). Die stärkste Induktion war mit 339 vs. 155 pg/10⁵ Zellen nach der vierten 2 Gy-Dosis zu verzeichnen.

Der Verlauf der FGF-2 Freisetzung war dem von VEGF ähnlich (Abb. 23B). In der unbestrahlten Kontrolle waren die FGF-2 Level zu jedem Zeitpunkt der Probennahme mit <20 pg/10⁵ Zellen sehr niedrig. Für die Abnahme der freigesetzten FGF-2 Menge an den folgenden Tagen der unbestrahlten Kontrolle habe ich keine Erklärung. Ein bestrahlungsvermittelter Effekt wurde bei diesem Faktor erst nach der vierten Dosis deutlich, wobei das sezernierte FGF-2 im Vergleich zur Kontrolle des gleichen Zeitpunktes signifikant induziert wurde (Abb. 23B, *p=0,05). Die FGF-2 Freisetzung wurde durch fraktionierte Bestrahlung ebenfalls induziert, allerdings im Vergleich zur VEGF-Induktion zeitlich verzögert.

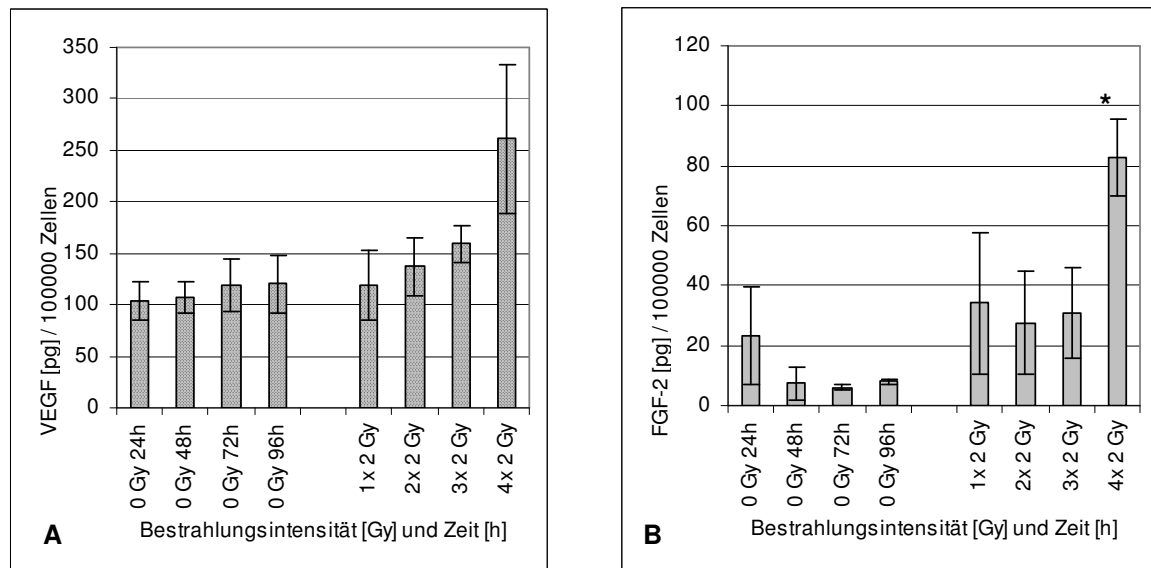


Abb. 23: Fraktionierte Bestrahlung von Dept erhöht die Sekretion von VEGF (A) und FGF-2 (B). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen nach jedem Kulturmediumwechsel mit 2 Gy / Tag bestrahlt. VEGF und FGF-2 wurde in den Kulturüberständen mittels ELISA quantifiziert und auf 10^5 überlebende Zellen normalisiert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert mit \pm SD von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (* $p < 0,05$).

4.3 Wirkungen konditionierter Kulturüberstände auf HUVEC und Tumorzellen

4.3.1 Konditionierte Kulturüberstände erhöhen das Überleben von Tumorzellen

Um die Entstehung von Strahlenresistenzen im Tumor näher zu beleuchten, wurde untersucht, welchen Einfluss die induzierten Faktoren VEGF und FGF-2 auf den strahleninduzierten Zelltod *in vitro* ausüben. Die Experimente dazu verliefen in zwei Stufen (Abschn. 3.2.11 und 3.2.15.3):

- In der ersten Stufe wurden die konditionierten Kulturüberstände (CM, *conditioned media*) generiert. Dazu wurden die Tumorzellen Dept, Hun und A549 einmalig mit 30 Gy bestrahlt. 72h nach täglichem Kulturmediumwechsel wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt.
- In der zweiten Stufe wurden diese Linien mit ihren eigenen CM im Koloniebildungsassay kultiviert. Um eine mögliche Bestrahlungsinduktion zytoprotektiv wirkender Faktoren zu evaluieren, wurden die Kulturen mit 2 Gy

bestrahlt. Durch die Neutralisation von VEGF und FGF-2 in den CM sollte die Beteiligung dieser Faktoren an der Protektion ermittelt werden.

Nach 7 bis 9 Tagen erreichten die Kolonien eine auswertbare Größe. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die gezählten Kolonien auf 10^5 Donorzellen der CM normalisiert.

Die Kultivierung mit CM unbestrahlter Zellen resultierte in 30 bis 50 überlebende Kolonien (Abb. 24A). Durch die Verwendung von CM bestrahlter Zellen wurde die Koloniebildung signifikant um etwa das 10fache erhöht (Abb. 24B, $*p < 0,0005$, $\Delta p = 0,005$). Die zusätzliche Bestrahlung dieser Kulturen mit 2 Gy resultierte in einer deutlichen Reduktion der Überlebenden, allerdings betrug hier die Koloniebildung immer noch das 5fache im Vergleich zu den Kulturen mit unbestrahlten CM (Abb. 24C, $*p < 0,0005$, $\rho p < 0,05$). Dieser Befund deutet auf die Sezernierung protektiver Faktoren hin.

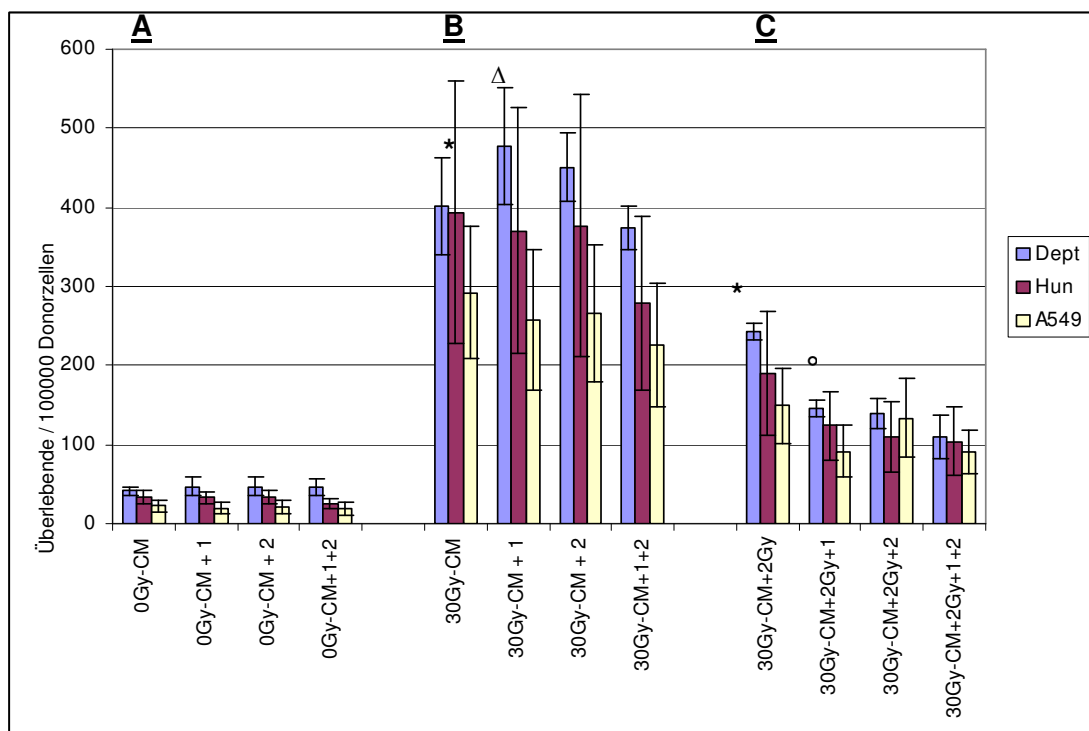


Abb. 24: Durch Bestrahlung konditioniertes Kulturmedium erhöht das Überleben der Tumorzelllinien Dept, Hun und A549. 7 bis 9 Tage nach Kultivierung im CM (A, B) und Bestrahlung mit 2 Gy (C) wurde das Überleben ermittelt. Die Antikörper gegen VEGF (1) und FGF-2 (2) wurden einzeln oder kombiniert direkt vor der Bestrahlung zugegeben. Das Überleben der Zellen wurde durch CM bestrahlter Zellen erhöht (vgl. A mit B); zusätzlich wurden die Zellen vor dem bestrahlungsinduzierten Zelltod durch CM geschützt (vgl. A mit C). Dargestellt ist der Mittelwert mit \pm SD von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($*p < 0,0005$, $\Delta p = 0,005$, $\rho p < 0,05$).

4.3.2 Tumorzellen zeigen erhöhte Strahlenresistenz durch die bestrahlungsinduzierte Freisetzung von VEGF und FGF-2

Um zu untersuchen, ob VEGF und FGF-2 durch Bestrahlung induziert wurden und an der Protektion beteiligt sind, wurden dem CM im Koloniebildungsassay neutralisierende Antikörper gegen VEGF und FGF-2 zugegeben. Die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen mit unbestrahltem CM wurde durch keinen der untersuchten Antikörper beeinflusst (Abb. 24A). Bei den 30 Gy-CM-Kulturen konnte ein leichter Rückgang der Überlebenden mit jeweils einem der beiden Antikörper um etwa 10% festgestellt werden (Abb. 24B). Durch die Kombination beider Antikörper wurden die Überlebenden um weitere 10% reduziert.

Die zusätzliche Bestrahlung mit 2 Gy resultierte in einer um 50% reduzierten Koloniebildung. Neutralisierende Antikörper gegen VEGF bzw. FGF-2 reduzierten diesen Befund um jeweils weitere 20% (Abb. 24C). Die Ausnahme bildete die Linie A549, bei der durch den FGF-2 Antikörper keine weitere Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit beobachtet wurde. Diese Linie zeigte sich allerdings auch negativ im Hinblick auf Sezernierung dieses Faktors in den Kulturüberstand. Diese Beobachtungen waren, wenn auch nicht signifikant, so doch deutlich genug, um einen VEGF- und FGF-2-vermittelten Anteil am Überleben der Zellen zu vermuten.

4.3.3 Tumorzellen protegieren HUVEC vor dem bestrahlungsinduzierten Zelltod

Um die Bildung und Mechanismen von Resistenzen im Tumor näher zu beleuchten, wurden die Wirkungen von Tumorzellen auf Endothelzellen untersucht. Es sollte festgestellt werden, welche Auswirkungen die bei Tumorzellen bestrahlungsinduzierten Faktoren auf das Überleben bestrahlter HUVEC haben. Dazu wurden beide Zelltypen im Kokulturmodell bzw. HUVEC mit CM bestrahlter Tumorzellen kultiviert und mit verschiedenen Intensitäten bestrahlt. Um apoptotische und nekrotische Zellen zu erfassen, wurden die HUVEC im Apoptose Assay mit Annexin V-FITC-Konjugat und Propidiumiodid behandelt. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bzw. durchflusszytometrisch (Abschn. 3.2.17).

Um eine Wirkung der durch Tumorzellen sezernierten Faktoren nicht zu überdecken, wurde mit kleinstmöglichen Serumkonzentrationen im Kulturmedium gearbeitet. Dies führte vermutlich zu der relativ hohen Apoptoserate bei unbestrahlten HUVEC von etwa 38% (Abb. 25). Eine 2 bzw. 8 Gy-Dosis erhöhte die Anzahl der apoptotischen Zellen nur unwesentlich, wohingegen erwartungsgemäß eine 30 bzw. 50

Gy Dosis die Apoptosen um 65 bzw. 54% steigerte. Die Kokultur mit Tumorzellen reduzierte die Apoptoseraten von HUVEC in der unbestrahlten Kokultur um 45%. Nach zusätzlicher Bestrahlung der Zellen wurden jeweils im Vergleich zu den HUVEC-Kulturen allein eine um 65 - 85% reduzierte Apoptoserate festgestellt, was auf die Induktion protektiver Faktoren bei Tumorzellen infolge der Bestrahlung hinweisen könnte. Diese Daten weisen jedoch aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Signifikanz auf.

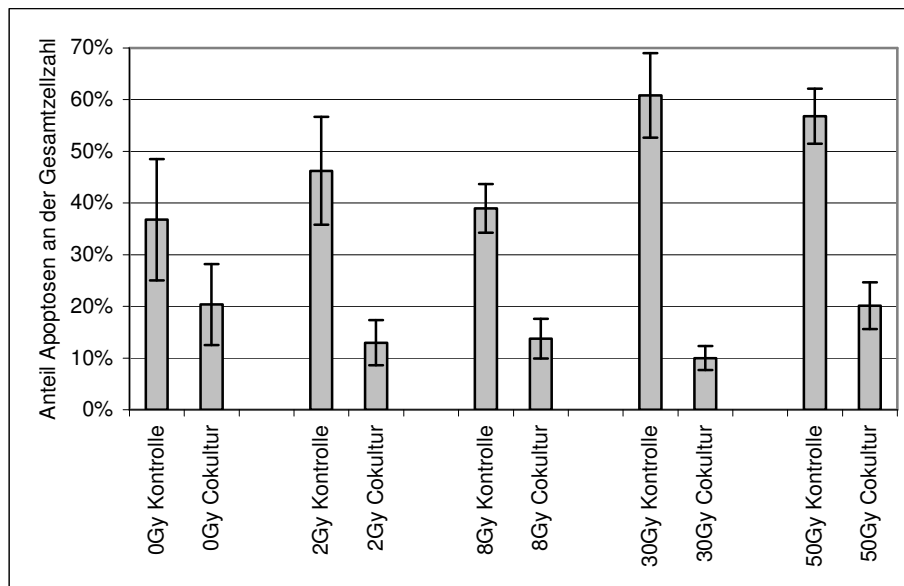


Abb. 25: Die Kokultur von HUVEC mit Tumorzellen reduziert dosisabhängig den strahleninduzierten Zelltod. HUVEC wurden allein bzw. mit der SCC-Linie Dept kokultiviert und neben der unbestrahlten Kontrolle mit 2, 8, 30 und 50 Gy bestrahlt. Nach 48h wurden die HUVEC im Apoptose Assay mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid markiert. Dargestellt ist der gemittelte Anteil von 7 Ausschnitten apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld eines Experimentes.

Nach der 30 Gy-Dosis wurden mit über 80% die stärksten protektiven Effekte bei HUVEC durch die Kokultur mit Tumorzellen beobachtet. Um einen zeitabhängigen Verlauf der Bestrahlungsinduktion protektiv wirksamer Substanzen zu untersuchen, wurde der Apoptose Assay daher nach einer 30 Gy Dosis alle 24, 48 und 72h nach Bestrahlung durchgeführt (Abb. 26). Unbestrahlte HUVEC zeigten über den gesamten Zeitraum hinweg einen kontinuierlichen Anstieg apoptotischer Zellen, was vermutlich durch den niedrigen Serumgehalt im Kulturmedium zu erklären ist. Infolge der Bestrahlung erhöhte sich die Sterberate bei HUVEC etwa um das 4fache nach 24 und 48h im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Nach 72h waren nur noch etwa 35% der Zellen vital. Durch die Kokultur der HUVEC mit der HNSCC-Linie Hun blieb die Sterberate bei den unbestrahlten Kulturen über die gesamten 72h etwa konstant bei 5%. Nach Bestrahlung stieg auch in

der Kokultur die Apoptoserate der HUVEC an. Allerdings blieb diese zu jedem Zeitpunkt etwa auf dem halben Level der bestrahlten HUVEC-Kontrolle. Dieser Befund deutet auf eine zeitabhängige Induktion protektiver Faktoren seitens der kokultivierten Tumorzellen hin, weisen allerdings aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Signifikanz auf.

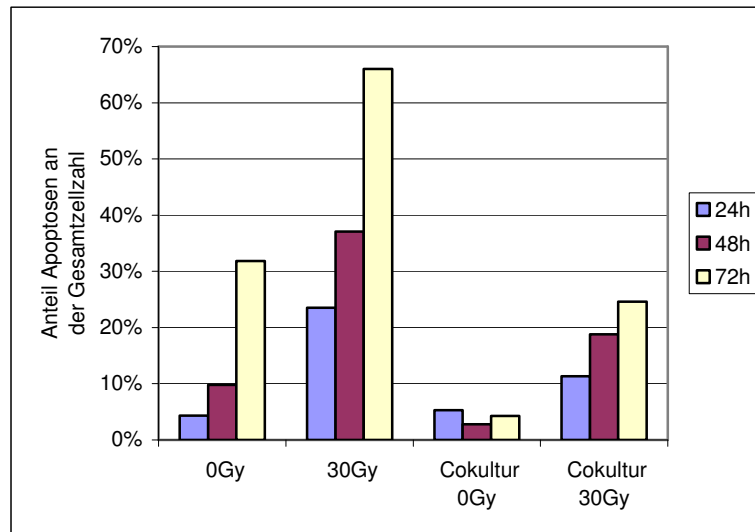


Abb. 26: Die Kokultur von HUVEC mit Tumorzellen reduzierte zeitabhängig den strahleninduzierten Zelltod. HUVEC wurden allein bzw. mit der SCC-Linie Hun kokultiviert und mit 0 und 30 Gy bestrahlt. Nach 24, 48 und 72h wurden die HUVEC mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid markiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskop dokumentiert. Dargestellt ist der gemittelte Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl je Gesichtsfeld von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Anschließend wurde untersucht, ob auch CM von Tumorzellen aus fraktionierter Bestrahlung HUVEC vor dem strahleninduzierten Zelltod schützen. Da sich CM 72h nach einer 30 Gy-Bestrahlung im Apoptose Assay in vorherigen Experimenten als protektiv erwiesen, wurden diese Kulturen als Vergleich mitgeführt. HUVEC wurden mit CM von Dept kultiviert und direkt im Anschluss mit einer 2 Gy-Dosis bestrahlt. Nach weiteren 7h Inkubation erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf die unbestrahlte und unbehandelte Kontrolle bezogen.

Die 0 Gy-CM verursachten verglichen mit der Kontrolle eine Reduktion der Apoptoserate um etwa 30% (Abb. 27A), was durch eine 2 Gy-Dosis nicht erhöht wurde (Abb. 27B). Mit den CM der fraktionierten Bestrahlung war die Apoptoserate etwa wie bei der Kontrolle, d.h. es war kein CM-vermittelter Rückgang zu verzeichnen wie bei den Kulturen mit 0Gy-CM (Abb. 27C). Eine zusätzliche 2 Gy-Dosis bewirkte einen tendenziellen, jedoch nicht signifikanten, Rückgang der Apoptosen bei HUVEC, wobei sich die CM aus 3x2Gy und 4x2Gy Kulturen als effektiver zeigten (Abb. 27D). Die 30 Gy-CM verursachten

verglichen mit der Kontrolle einen Rückgang der Apoptoserate um mehr als 40%, worauf sich eine 2 Gy-Dosis nicht zusätzlich erhöhend auswirkte (Abb. 27E). Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass CM von Tumorzellen HUVEC vor dem bestrahlungsinduzierten Zelltod schützen.

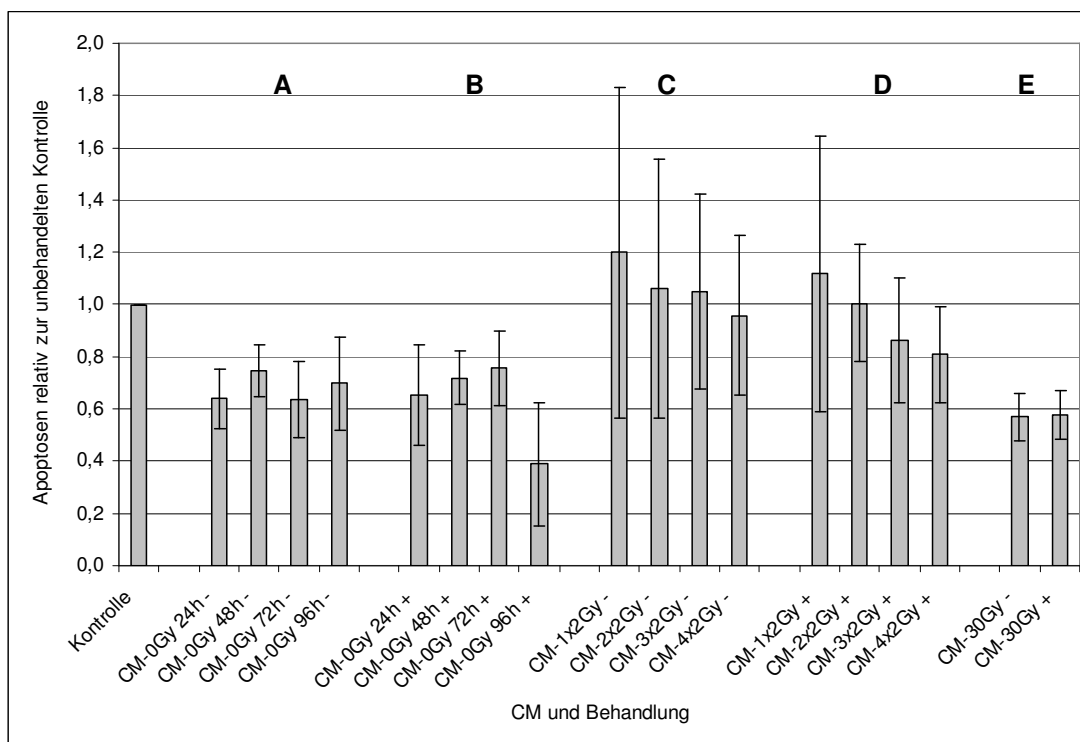


Abb. 27: CM fördern das Überleben von HUVEC nach Bestrahlung. HUVEC wurden mit 0Gy-CM und CM aus fraktionierter Bestrahlung von Dept mit 2 Gy bestrahlt (+) und 7h kultiviert. Die unbestrahlte Kontrolle wurde mitgeführt (-). Die Zellen wurden mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid behandelt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD nach Relativierung auf die unbehandelte Kontrolle von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.3.4 Konditionierte Kulturmedien fördern die Migration von HUVEC

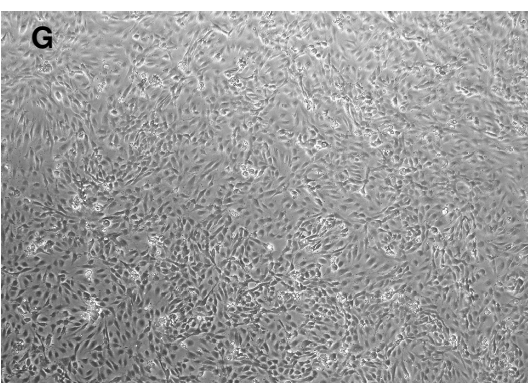
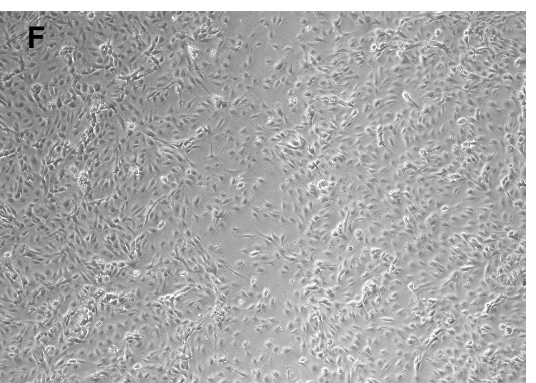
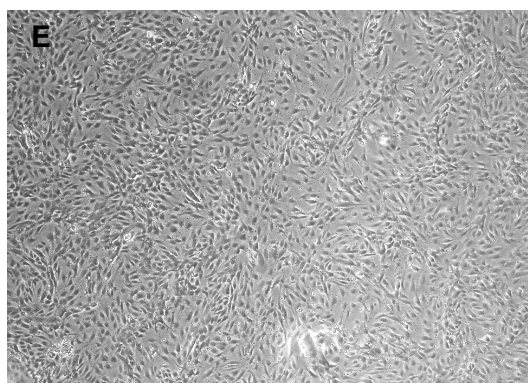
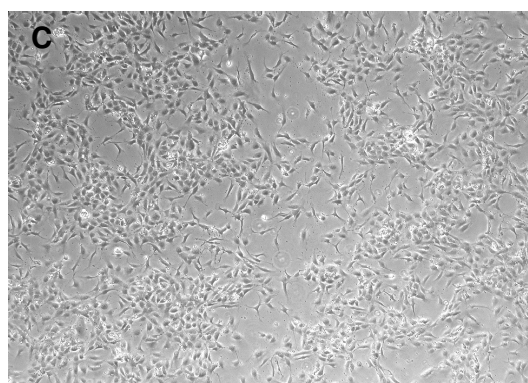
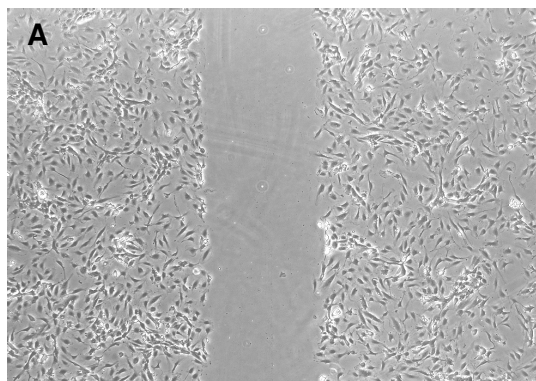
In den vorhergehenden Experimenten wurde dargestellt, welchen Einfluss die Bestrahlungsinduktion von Faktoren auf das Überleben der Tumorzellen selbst und das der HUVEC ausübt. Bei Tumorzelllinien scheinen VEGF und FGF-2 bei dieser Protektion eine Rolle zu spielen. In der klinischen Therapie ist die möglichst umfassende Zerstörung der malignen Bereiche und die Vermeidung der Repopulation während oder nach der RT für den Therapieerfolg wichtig. An der Repopulation ist maßgeblich das tumorassoziierte Gefäßendothel beteiligt. Dieser Aspekt wurde *in vitro* mit dem Migrationsassay mit

HUVEC untersucht. Dazu wurden die CM der Tumorkulturen Dept und Hun aus fraktionierter Bestrahlung mit 1, 2, 3 bzw. 4x2 Gy-Einzeldosen verwendet. Außerdem wurden CM vom Zeitpunkt 72h nach einer 30 Gy Einzeldosis untersucht (Abschn. 3.2.16).

Beim Migrationsassay wird die Eigenschaft der HUVEC genutzt, die Verletzung eines konfluenten HUVEC-Monolayers durch Wanderung zu heilen. Durch die Verletzung entstehen zwei Zellfronten, die im Laufe der Heilung durch migrierende Zellen aufeinander zu wandern und so die Verletzung schließen. Der Verlauf dieser Heilung wurde zu den Zeitpunkten 0, 6, 24 und 48h durch Abstandsmessung der beiden Zellfronten verfolgt und dokumentiert.

Bild 1A S. 75 zeigt die Verletzung zum Zeitpunkt 0h. Die Bilder 1B und C dokumentieren den Heilungsverlauf der Kontrolle nach 24h (B) und 48h (C). Nach 48h ist die Verletzung durch migrierende HUVEC fast vollständig geschlossen, wobei der ursprüngliche Verlauf noch deutlich zu erkennen ist. Mit 0 Gy-CM konnte eine die Heilung fördernde Wirkung beobachtet werden (Bilder 1D und E), wobei sich das durch eine 30 Gy-Dosis konditionierte Medium als effektiver erwies (Bilder 1F und G): Bei diesen Kulturen war die Heilung nach 24h so weit fortgeschritten, dass der Verletzungsverlauf nur noch schwach zu erkennen war.

Bild 1, S. 73: Konditionierte Tumorzellkulturüberstände förderten die Migration von HUVEC. Ein konfluenter HUVEC-Monolayer wurde verletzt und mit CM kultiviert. Die Heilung wurde nach 0, 24 und 48h dokumentiert. Die Bilder A, B und C zeigen den Heilungsverlauf der Kontrolle nach 0, 24 und 48h, D und E zeigen den Verlauf der Heilung mit 0 Gy-CM von Dept nach 24 und 48h, F und G mit 30 Gy-CM von Dept nach 24 und 48h. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte eines Experimentes. Vergrößerung x40.



Auch die CM der fraktionierten Bestrahlung wirkten sich fördernd auf die Heilung von HUVEC aus. Dabei zeigten sich Hun-CM tendenziell effektiver als Dept-CM (Abb. 28). 3x2 Gy-CM dieser Linie verursachte eine um etwa 20% geförderte Heilung. Bei Dept-CM konnte die stärkste Heilungsförderung von etwa 13% mit 2x2 Gy-CM beobachtet werden. Bei beiden Linien zeigten sich die CM der 30 Gy-Kulturen mit 28% (Hun) bzw 19% (Dept) hinsichtlich der Heilungsförderung von HUVEC am effektivsten.

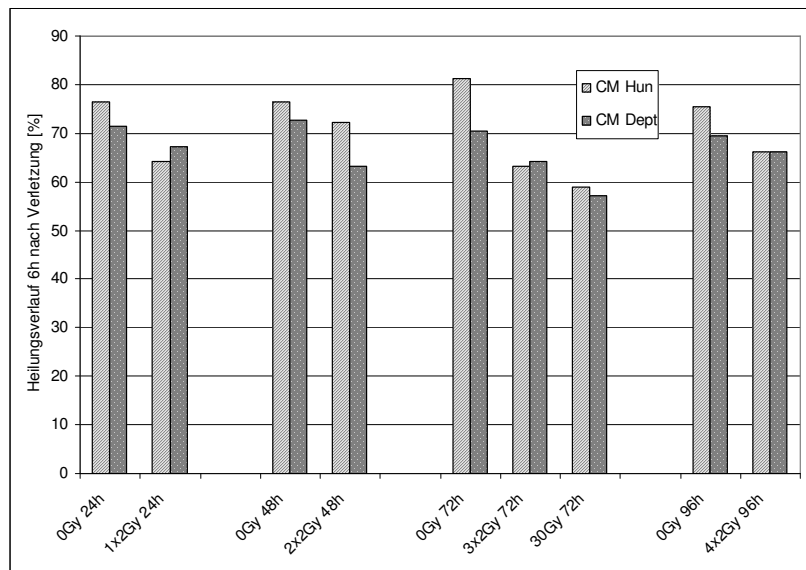


Abb. 28: Durch Bestrahlung konditionierte Tumorzellkulturüberstände förderten die Migration von HUVEC. Ein konfluenter HUVEC-Monolayer wurde verletzt und mit 0 Gy-, 1x2 Gy-, 2x2 Gy-, 3x2 Gy-, 4x2Gy- und 30 Gy 72h-CM von Hun bzw. Dept kultiviert. Durch Abstandsmessung der Zellfronten wurde die Heilung zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24h verfolgt. Dargestellt ist der Mittelwert des Heilungsverlaufes zum Zeitpunkt 6h von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten je Tumoralinie.

4.4 Die Wirkung von VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ auf Überleben und Proliferation von Tumoralinien und HUVEC

4.4.1 Die VEGF-Subtypen erhöhen das Überleben von Tumoralinien und HUVEC nach Bestrahlung

In den vorangegangenen Abschnitten stellte ich die Wirkung der Bestrahlung auf die Zellen dar, insbesondere auf die Induktion der beiden angiogenen Faktoren VEGF und FGF-2. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Faktoren an einer autologen Protektion der Tumorzellen gezeigt werden. Im Folgenden sollte untersucht werden:

- Lässt sich die Beteiligung von VEGF mit rekombinantem VEGF nachweisen und bestätigen?
- Gibt es Unterschiede in der Wirksamkeit der VEGF-Subtypen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅?

Zellen der Tumorkulturen Hun und Dept, sowie HUVEC wurden im Koloniebildungsassay mit Intensitäten von 0,5 bis 8 Gy bestrahlt und mit der unbestrahlten Kontrolle verglichen. Vor der Bestrahlung wurden jeweils 5 ng/ml rekombinantes VEGF₁₂₁ bzw. VEGF₁₆₅ zugegeben (Abschn. 3.2.15.1). Die gezählten Kolonien wurden zur unbestrahlten Kontrolle relativiert. Den Erwartungen entsprechend nahm mit zunehmender Intensität die Zahl der überlebenden Zellen bei beiden Tumorkulturen und HUVEC ab (Abb.29).

Bei beiden Tumorkulturen überlebten nur noch wenige Kolonien nach einer 8 Gy Dosis. Durch die Gabe von VEGF₁₂₁ konnte das Überleben signifikant erhöht werden ($p < 0,05$). VEGF₁₆₅ zeigte ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der überlebenden Tumorzellen, allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Beim Vergleich der Intensitäten, die zur LD₅₀ (letale Dosis 50%) bei Tumorzellen nötig sind, fiel auf, dass durch die Einwirkung beider VEGF-Subtypen dieser Wert deutlich verschoben wurde. Bei der SCC-Kultur Dept lag die LD₅₀ bei etwa 1,2 Gy. VEGF₁₆₅ verschob dies auf 2,7 Gy, was einer Zunahme der Strahlenresistenz um 83% entspricht. Durch VEGF₁₂₁ wurden die Zellen noch stärker geschützt ($p < 0,05$). Die LD₅₀ wurde durch diesen Subtyp um 125% erhöht, was einer Intensität von 2,7 Gy entspricht (Abb. 29A). Mit der SCC-Kultur Hun ergaben sich ähnliche Resultate. Auch bei dieser Linie zeigte sich VEGF₁₂₁ deutlich effektiver als VEGF₁₆₅. Die LD₅₀ wurde durch VEGF₁₆₅ um lediglich 5% verringert, was nicht als Beeinflussung gewertet werden kann, und durch VEGF₁₂₁ um 55% gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht (Abb. 29B)

Bei den HUVEC-Kulturen konnte ebenfalls das Überleben der Zellen durch VEGF tendenziell erhöht werden ($p > 0,05$) (Abb. 29C). Die LD₅₀ wurde durch VEGF₁₆₅ von 0,7 auf 1,4 Gy um 100% erhöht und durch VEGF₁₂₁ auf 1 Gy (+ 43%). Im Gegensatz zu den untersuchten Tumorkulturen, erwies sich bei HUVEC VEGF₁₆₅ hinsichtlich der Erhöhung des Überlebens nach Bestrahlung im Vergleich zu VEGF₁₂₁ effektiver. Diese Beobachtungen unterscheiden sich deutlich von denen der SCC-Kulturen, bei welchen Zellen sich der Subtyp VEGF₁₂₁ als signifikant protektiver erwies.

Hinsichtlich der Strahlensensitivität zeigten sich HUVEC im Vergleich zu den untersuchten SCC-Kulturen deutlich sensitiver. Die LD₅₀ der HUVEC lag bei 0,7 Gy, wobei die von Dept bei 1,2 Gy lag und Hun bei 2,1 Gy.

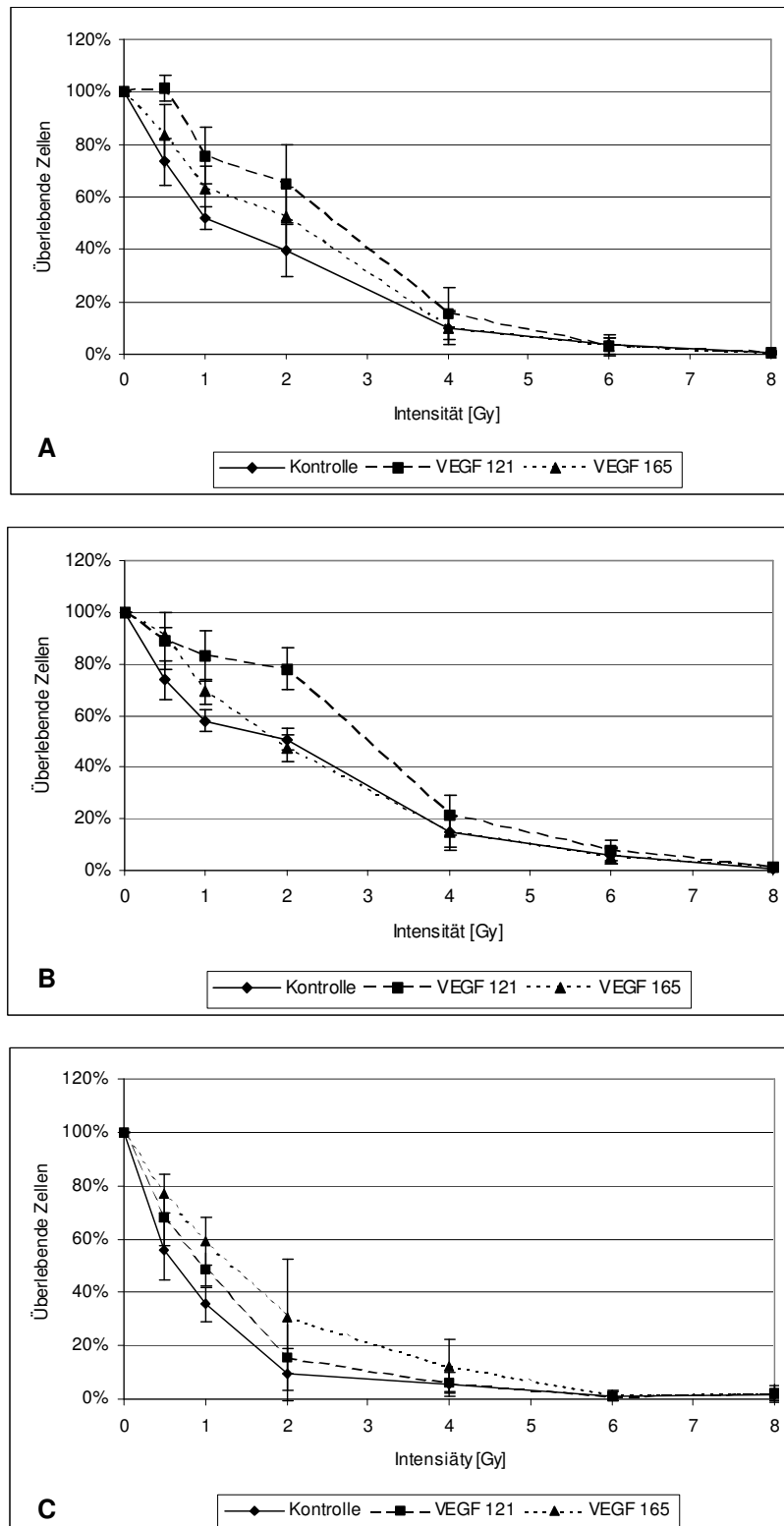
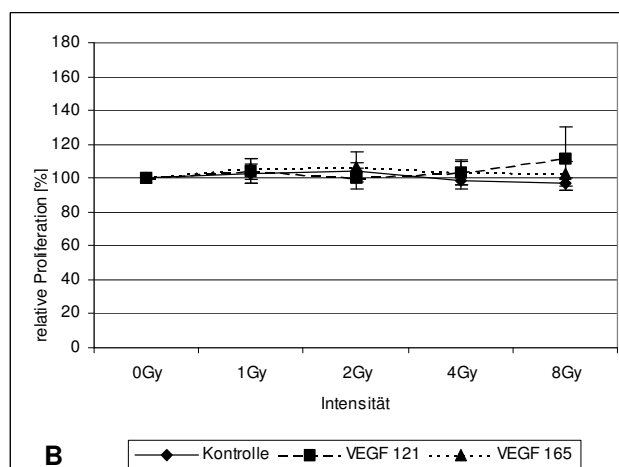
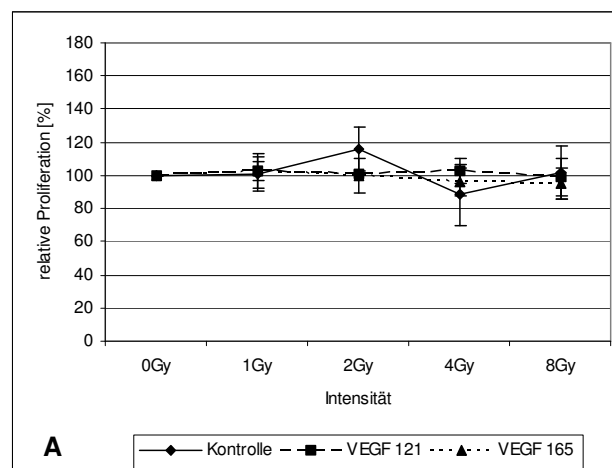


Abb. 29: Koloniebildung der SCC-Linien Dept (A), Hun (B) und HUVEC (C) mit VEGF-Subtypen. Das Überleben wurde nach 7 bis 9 Tagen ermittelt. Die VEGF-Subtypen 121 und 165 wurden in der Konzentration von 5 ng/ml direkt vor der Bestrahlung mit den Intensitäten 0,5, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy zugegeben. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.4.2 Die Wirkung der VEGF-Subtypen auf die Proliferation von Tumorklinien und HUVEC nach Bestrahlung

Die SCC-Linien Dept und Hun, sowie HUVEC wurden im Proliferationsstest untersucht (Abb. 30). Die Zellen wurden mit jeweils 20 ng/ml der Subtypen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ inkubiert und mit Intensitäten von 1 bis 8 Gy bestrahlt (Abschn. 3.2.14). Die Ergebnisse wurden zu den Werten der unbestrahlten Kontrolle relativiert.

Bestrahlung reduzierte bei keiner der untersuchten Linien signifikant die Proliferation ($p > 0,05$). Unter Zugabe der VEGFs wurde ebenfalls keinerlei Wirkung hinsichtlich der Proliferationsrate der Zellen festgestellt (Abb. 30A und B). Wie bei HUVEC erwartet, reduzierte Bestrahlung der Zellen die Proliferationsrate; allerdings betrug diese nach einer 8 Gy Dosis immer noch etwa 90% der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 30C). Beide VEGF-Subtypen erhöhten die Proliferation signifikant, wobei sich VEGF₁₆₅ im Vergleich zu VEGF₁₂₁ als effektiver zeigte ($p < 0,05$). Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen, die mit HUVEC bei der Koloniebildung gemacht wurden (Abschn. 4.4.1).



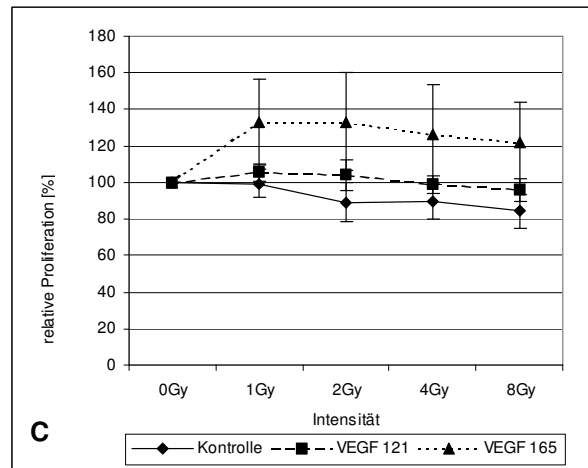


Abb. 30: Proliferation der SCC-Linien Dept (A), Hun (B) und HUVEC (C) mit VEGF-Subtypen. Die Proliferation wurde 24h nach Bestrahlung bestimmt. Die VEGF-Subtypen wurden direkt vor der Bestrahlung zugegeben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

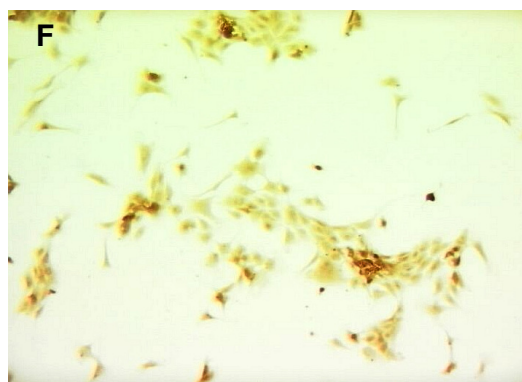
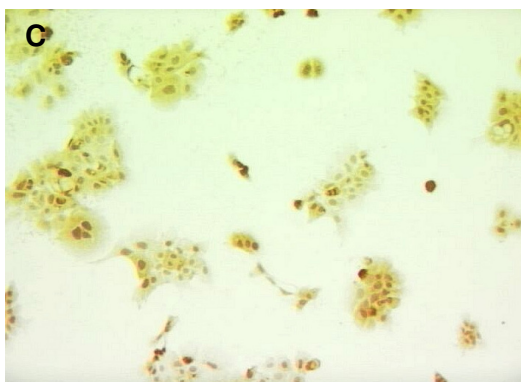
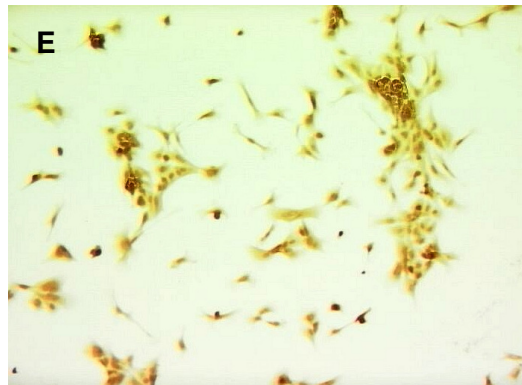
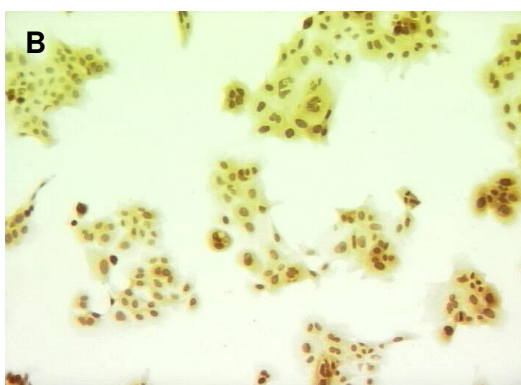
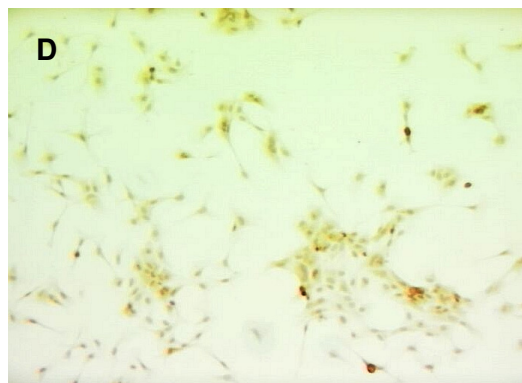
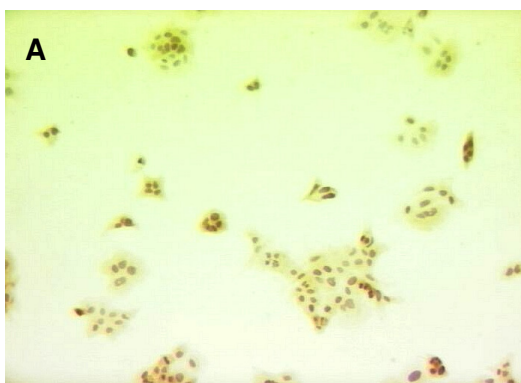
4.5 Immunhistochemischer Nachweis der VEGF-Rezeptoren bei HNSCC-Linien und HUVEC

Um eine mögliche Beteiligung der VEGF-Rezeptoren an der beschriebenen autokrinen bzw. parakrinen Effekte der bestrahlungsinduzierten Faktoren auf Tumorzellen und HUVEC, sowie der im Koloniebildung- und Proliferationsassay gezeigten Subtypspezifität zu evaluieren, wurden immunhistochemische Analysen der drei VEGF-Rezeptoren 1 und 2 (VEGFR-1 und VEGFR-2) und Neuropilin-1 (NP-1) durchgeführt (Abschn. 3.2.13). Dazu wurden die Zellen auf *chamber-slides* kultiviert und gefärbt. Bei allen untersuchten Zellkulturen zeigten zwischen 50 und 100% der Zellen eine mittlere bis starke Positivfärbung für alle drei Rezeptoren (Tab. 10). In Bild 2 S. 82 sind repräsentative Beispiele von HNSCC-Linien und HUVEC dargestellt. Die Identität der Zelltypen wurde mittels CD31-Färbung (HUVEC) bzw. Zytokeratin (HNSCC-Linien) verifiziert (nicht gezeigt).

HNSCC-Linie	VEGFR-1	VEGFR-2	NP-1
Hun	100%, +++	100%, ++	100%, ++
Dept	70%, ++	100%, ++	50%, ++
HUVEC	100%, +++	100%, +++	50%, ++

Tab. 10: Verteilung und Intensität der immunhistochemischen Färbung bei Dept, Hun und HUVEC. Die Zellen wurden auf *chamber-slides* kultiviert und immunhistochemisch gegen die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und NP-1 gefärbt. Dargestellt sind die %-positiv gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl eines Gesichtsfeldes, sowie die Intensität der Färbung, wobei +++ starker Färbung und ++ mittlerer Färbung entspricht.

Bild 2, S. 80: Immunhistochemischer Nachweis der VEGF-Rezeptoren bei HNSCC und HUVEC. Dargestellt sind repräsentative Färbungen der SCC-Linie Hun (A-C) und einer HUVEC-Kultur (D-F). Hun und HUVEC zeigen für alle drei Rezeptoren eine positive Färbung. Neuropilin (A, D), VEGFR-1 (B, E), und VEGFR-2 (C, F). Vergrößerung x 100.



4.6 VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ bewirken eine subtypspezifische Aktivierung des VEGFR-2

Da der VEGFR-2 bei der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt und um die subtypspezifischen Effekte zu bestätigen, wurde dessen Aktivierbarkeit durch VEGF bei Tumorzellen und HUVEC untersucht. Die Zellen wurden mit jeweils 20 ng/ml VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ 1, 5, 10 bzw. 30 min. inkubiert und direkt lysiert (Abschn. 3.2.8). Eine Kontrolle ohne VEGF wurde zu jedem Zeitpunkt mitgeführt. Aus den Zelllysaten wurde der Proteingehalt photometrisch mittels Proteinassay ermittelt. Der gesamte und der aktivierte, d.h. phosphorylierte, VEGFR-2 Gehalt der Lysate wurde mittels ELISA quantifiziert und zur Proteinmenge normalisiert. In Abb. 31A und B ist der Gesamtgehalt des VEGFR-2 (VEGFR2 total), sowie dessen VEGF-subtypenabhängige Stimulierung (Phospho-VEGFR2, phosphoryliert) bei HUVEC (A) und Dept (B) dargestellt. Der Gesamtgehalt des Rezeptors blieb bei HUVEC wie erwartet unter jeder Behandlung konstant (nicht gezeigt). Etwa 7% der gesamten Rezeptormenge lag in der unbehandelten HUVEC-Kontrolle zu jedem Zeitpunkt phosphoryliert vor. Die Inkubation dieser Zellen mit VEGF verursachte eine deutliche Steigerung des Anteils an aktiviertem VEGFR-2. So erhöhte VEGF₁₂₁ bereits nach 1 min. Phospho-VEGFR2 um das 5fache (200 vs. 1000 pg/mg Protein). Die maximale Aktivierung des Rezeptors mit VEGF₁₂₁ war nach 10 min. Inkubation zu verzeichnen (180 vs. 1800 pg/mg Protein, $p=0,007$). Nach 30 min. sank der Anteil des aktivierten Rezeptors zwar wieder auf den gleichen Wert wie nach 1 min. Inkubationszeit ab, allerdings blieb er immer noch deutlich über der Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt. Zu keinem Zeitpunkt der Inkubation mit VEGF₁₂₁ lagen die Rezeptoren des Typs 2 vollständig phosphoryliert vor. Die Wirkung von VEGF₁₆₅ war deutlich stärker und setzte früher ein: Bereits nach 1 min. war der gesamte VEGF-Rezeptorgehalt phosphoryliert, was im Vergleich zur Kontrolle des gleichen Zeitpunktes einem Anstieg um das 21fache entspricht (220 vs. 4700 pg/mg Protein, $*p<0,01$). Im weiteren Verlauf war ein kontinuierlicher Rückgang des Phospho-VEGFR-2 zu beobachten. Nach 30 min. Inkubation mit beiden VEGF-Subtypen war im Vergleich zur Kontrolle noch etwa 4fach mehr aktivierter Rezeptor vorhanden (800 vs. 200 pg/mg Protein). Die maximale Aktivierung des Rezeptors fand mit VEGF₁₂₁ nach 10 min. statt und war im Vergleich zur Kontrolle des gleichen Zeitpunktes mit $*p<0,01$ signifikant. Beim Vergleich der maximalen Stimulation durch die Subtypen (mit VEGF₁₂₁ nach 10 min, mit VEGF₁₆₅ nach 1 min.) aktivierte VEGF₁₆₅ den Rezeptor deutlich stärker ($*p<0,05$).

Die signifikant stärkere Aktivierbarkeit des VEGFR-2 durch VEGF₁₆₅ bei HUVEC deckt sich mit den in Abschn. 4.4 beschriebenen Beobachtungen, wobei dieser Subtyp das Überleben und die Proliferation von HUVEC deutlich stärker als VEGF₁₂₁ förderte.

Bei Dept war der Gehalt an Gesamt- und Phospho-VEGFR-2 kaum detektierbar und zu niedrig, um valide Aussagen über Veränderungen durch die Behandlung der Zellen machen zu können (Abb. 31B).

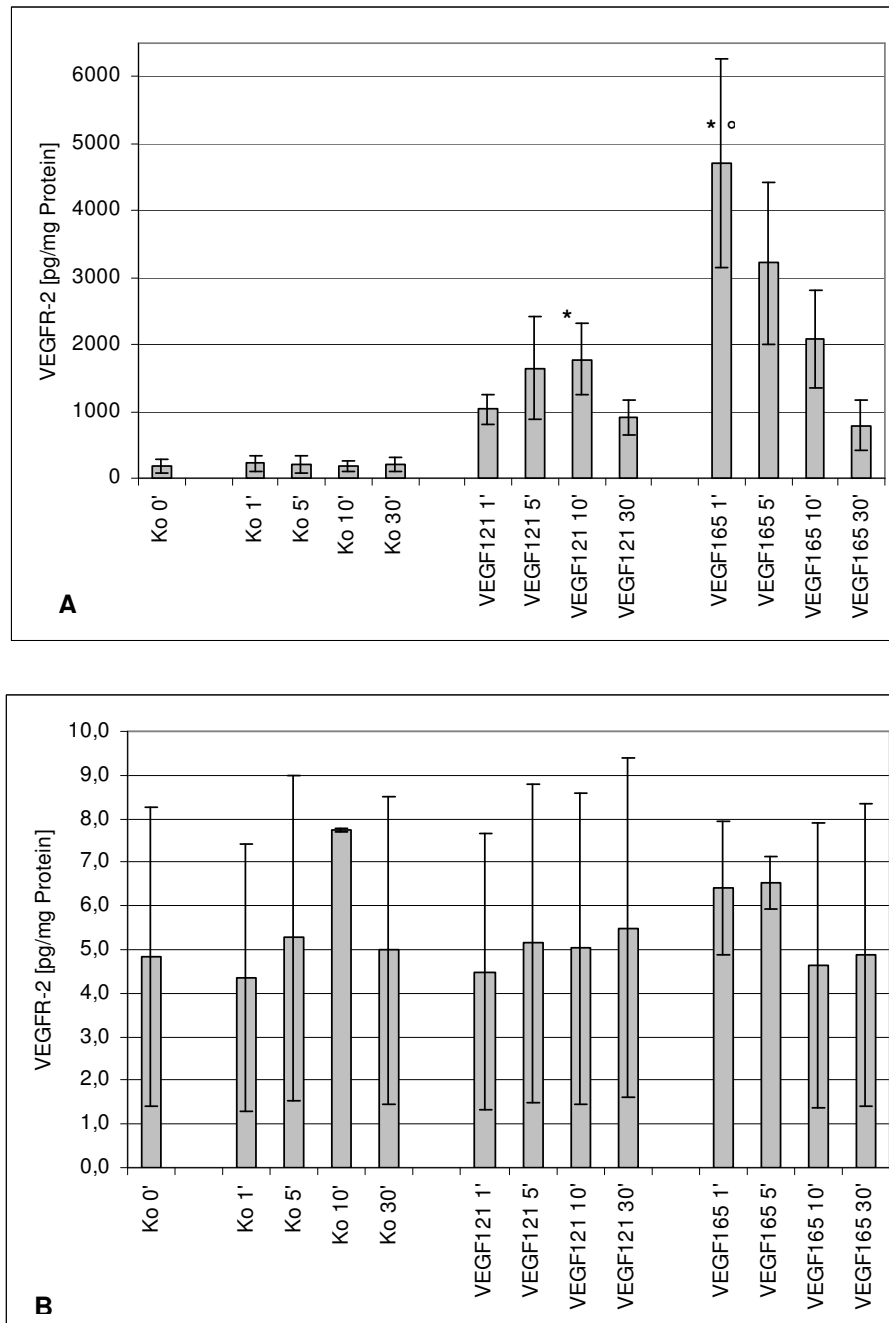


Abb. 31: Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅. HUVEC (A) und Dept (B) wurden 1, 5, 10 bzw. 30 min. mit VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ inkubiert und direkt anschließend lysiert. Aus den Zelllysaten wurde der Proteingehalt, sowie der Anteil an Gesamt-VEGFR-2 bzw. Phospho-VEGFR-2 bestimmt. Die unstimulierte Kontrolle wurde mitgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD des Phospho-VEGFR-2 von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (* $p < 0,008$, $\text{p} < 0,05$).

4.7 Die Wirkung von Bestrahlung auf den Aktivierungszustand des VEGFR-2

Um die Wirkung der Bestrahlung auf den Aktivierungszustand des VEGFR-2 zu untersuchen, wurden Zellen der Tumorklinie Dept und HUVEC einmalig mit 2 Gy bestrahlt und nach 1, 5, 10 und 30 min. lysiert. Aus den Lysaten wurde photometrisch der Proteingehalt, und mittels ELISA der Gehalt an Gesamt-VEGFR-2 bzw. VEGFR-2 phosphoryliert bestimmt. Die unbestrahlten Kontrollen wurden zu jedem Zeitpunkt mitgeführt.

Die Wirkung der 2 Gy-Dosis auf den VEGFR-2 bei HUVEC und Dept ist in Abb. 32A und B dargestellt. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte veränderte sich durch die Bestrahlung der Phosphorylierungszustand des Rezeptors. Bei Dept waren die quantifizierten Rezeptormengen wie im Experiment vorher sehr niedrig, so dass keine verlässlichen Aussagen über die bestrahlungsvermittelte Aktivierung getroffen werden können. Dennoch ist zu bemerken, dass die detektierten Phospho-VEGFR-2 Mengen bei diesen Zellen durch Bestrahlung zunahmen, und dass sich eine Tendenz zu einer bestrahlungsvermittelten erhöhten Aktivierung erkennen lässt.

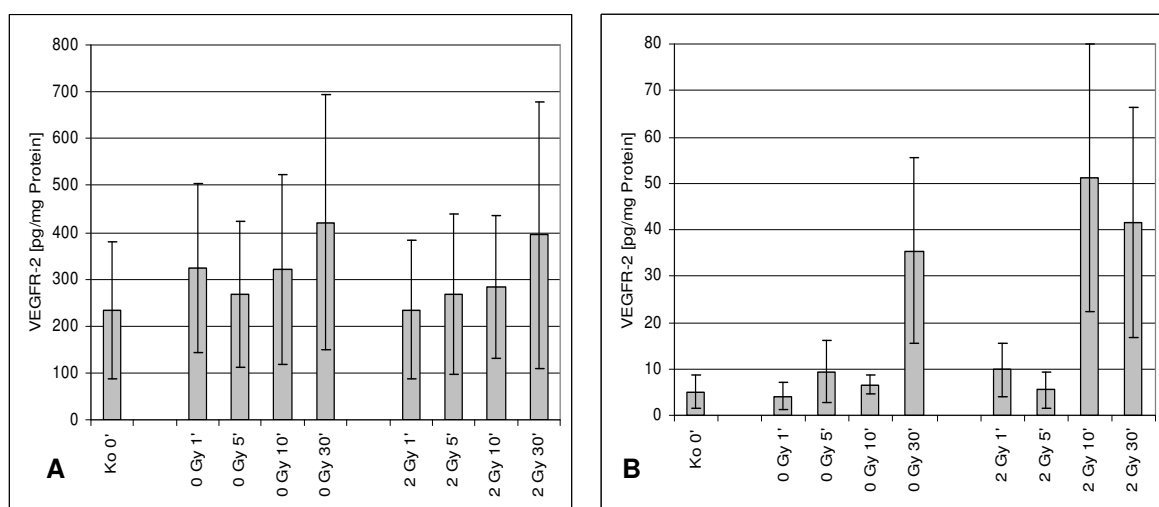


Abb. 32: Wirkung der Bestrahlung auf die Aktivierung des VEGFR-2. HUVEC (A) und Dept (B) wurden nach einer 2 Gy-Dosis 1, 5, 10 bzw. 30 min. inkubiert und lysiert. Aus den Zelllysaten wurde der Proteingehalt, sowie der Anteil an Gesamt-VEGFR-2 bzw. Phospho-VEGFR-2 bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD des Phospho-VEGFR-2 von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.8 Untersuchungen zur Wirksamkeit der Cyclooxygenase-Inhibitoren

Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte die hohe Relevanz bestrahlungsinduzierter Faktoren, insbesondere der beiden angiogenen Faktoren VEGF und FGF-2 für die Strahlenresistenz und die Heilungsförderung gezeigt werden. In den folgenden Experimenten sollten die folgenden Fragen untersucht werden:

I. Ist die strahleninduzierte Freisetzung durch Cyclooxygenase-Inhibitoren zu hemmen?

Es existieren Hinweise auf eine mögliche Regulation von VEGF u.a. über die Cyclooxygenasen (INIGUEZ 2003), was als Ansatzpunkt zur Reduktion der bestrahlungsinduzierten Freisetzung angiogener Faktoren angesehen werden könnte.

II. Modifizieren Cox-Inhibitoren das Überleben und die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen?

III. Beeinflussen Cox-Inhibitoren die Migrationsfähigkeit von Endothelzellen?

Um die Beteiligung beider Cox-Isoenzyme an diesen Fragestellungen zu evaluieren, wurden Zellen der HNSCC-Linien Dept und Hun mit den Cox-unselektiven Inhibitoren ASA und Flurbiprofen bzw. mit den Cox-2 selektiven Substanzen Meloxicam, NS-398 und Lumiracoxib kultiviert. Da keine Informationen zur intrazellulären Wirksamkeit und optimalen Konzentration in unserer Zellkultur vorlagen, wurden jeweils mehrere Inhibitor-Konzentrationen untersucht.

4.8.1 Cox-Inhibitoren verringern das Überleben von Tumorzellen

In den ersten Experimenten sollte der Einfluss der Inhibitoren NS-398, Meloxicam, Flurbiprofen und Lumiracoxib auf das Überleben der SCC-Linien Hun und Dept im Koloniebildungsassay untersucht werden (Abschn. 3.2.15.2). Als Kontrollen dienten Kulturen nur mit Kulturmedium. Kulturen mit Lösungsmittel und ohne Substanz wurden mitgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Anzahl der überlebenden Kolonien zur Kontrolle relativiert.

Der als Cox-unselektiv beschriebene Inhibitor Flurbiprofen reduzierte in der eingesetzten Konzentration von 0,2 mM das Überleben der Tumorkulturen Hun und Dept mit $p < 0,005$ signifikant (Abb. 33).

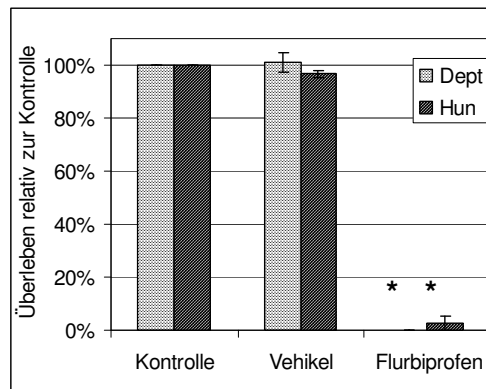


Abb. 33: Die Koloniebildungsfähigkeit wird durch Flurbiprofen deutlich reduziert. Zellen der SCC-Linien Dept und Hun wurden mit 0 und 200 μM Flurbiprofen im Koloniebildungsassay kultiviert. Die gezählten Kolonien wurden zur unbehandelten Kontrolle relativiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (* $p < 0,005$).

Lumiracoxib ist ein hochselektiver Inhibitor für Cox-2. Er wurde in den Konzentrationen 0, 2, 20 und 100 μM bei den Tumorklinen Dept und Hun im Koloniebildungsassay untersucht (Abb. 34). Bei Hun wurden mit 2 und 20 μM Lumiracoxib ein um etwa 10% reduziertes Überleben festgestellt, wohingegen der 100 μM -Kultur keine Kolonien mehr gefunden wurden. Bei Dept bewirkten 2 μM Lumiracoxib ein um etwa 15% erhöhtes Überleben. Bei den 20 μM -Kulturen waren noch etwa 10% überlebende Kolonien zu verzeichnen und bei der höchsten Konzentration waren keine Kolonien mehr zu finden. Die Daten weisen jedoch aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Signifikanz auf.

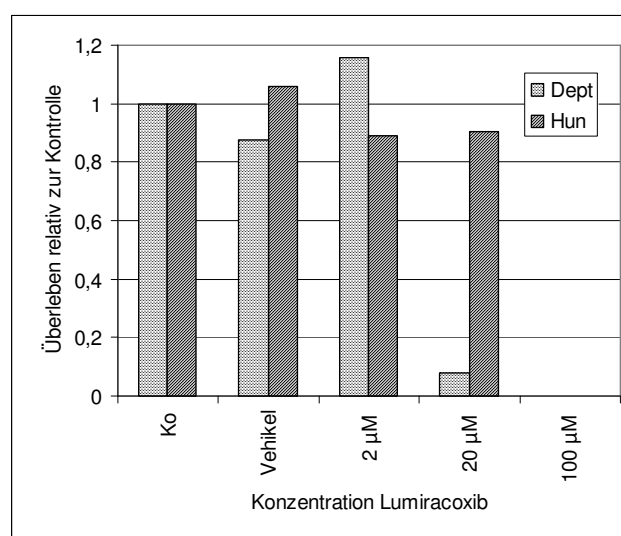


Abb. 34: Die Koloniebildungsfähigkeit nach Inkubation mit Lumiracoxib. Zellen der SCC-Linien Dept und Hun wurden mit 0, 2, 20 und 100 μM Lumiracoxib im Koloniebildungsassay kultiviert. Die gezählten Kolonien wurden zur unbehandelten Kontrolle relativiert. Dargestellt ist der Mittelwert eines Experimentes je Zelllinie.

Um die Effekte weiterer Substanzen auf das Überleben von Tumorzellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Cox-unselektiven Inhibitor ASA sowie den selektiven Cox-2 Inhibitoren Meloxicam und NS-398 kultiviert. Mit der hier eingesetzten ASA-Konzentration von 2 mM wurden nahezu keine überlebenden Zellen gefunden (* $p < 0,05$) (Abb. 35A). Das Lösungsmittel DMSO reduzierte in der verwendeten Konzentration kaum das Überleben der Zellen, dargestellt. Meloxicam verringerte in einer Konzentration von 6 μM die Zahl der Überlebenden im Vergleich zur Kontrolle signifikant um etwa 20% ($p < 0,05$), wohingegen 10 μM NS-398 das Überleben der Tumorzellen nicht reduzierte (Abb. 35B).

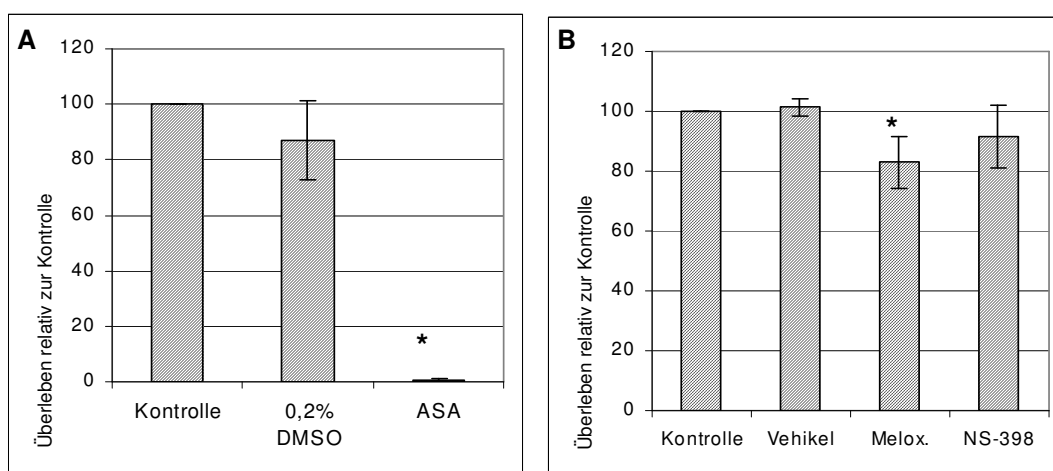


Abb. 35: Die Koloniebildungsfähigkeit wird durch Cox-Inhibitoren reduziert. Zellen der Linie Hun wurden mit 2 mM ASA (A), 6 μM Meloxicam (B), 10 μM NS-398 (B) und der jeweiligen Vehikel-Kontrolle im Koloniebildungsassay kultiviert. Die gezählten Kolonien wurden zur unbehandelten Kontrolle relativiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von vier (A) bzw. drei (B) unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (* $p < 0,05$).

4.8.2 Flurbiprofen reduziert die bestrahlungsinduzierte PGE₂-Freisetzung

Die bisher mit Cox-Inhibitoren, insbesondere mit Flurbiprofen und Lumiracoxib, gezeigten Daten lassen eine mögliche Wirksamkeit der Substanzen erahnen. Cox-Inhibitoren greifen in den Eicosanoid-Stoffwechsel ein indem sie die Metabolisierung von Arachidonsäure zu PGH₂ durch Cox-1 und Cox-2 inhibieren. PGE₂ entsteht im nächsten Schritt durch die PGE₂-Synthetase aus PGH₂. Die Inhibition der Cyclooxygenasen sollte demzufolge in verringerter PGE₂-Konzentration resultieren. Um dies zu bestätigen, wurde die PGE₂-Konzentration der Tumorzelle Dept nach einer 30 Gy-Dosis und Inkubation mit den Flurbiprofen-Konzentrationen 0,04, 0,4, 2, 4 und 200 μM im Kulturüberstand untersucht. Die Zellen wurden bis 72 h nach Bestrahlung weiter kultiviert, wobei der

Inhibitor täglich erneuert wurde. In den Experimenten wurden Flurbiprofen-Konzentrationen im selektiven Cox-1 Bereich und unselektiven Bereich gewählt. Der IC_{50} für Cox-1 wurde in der Literatur mit $0,04 \mu\text{M}$ angegeben (BARNETT 1994). Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Zellzahl normalisiert.

In Abb. 36 ist die Flurbiprofen-abhängige PGE_2 -Sekretion bei Dept dargestellt. Zellen dieser Linie sezernierten basal nur sehr geringe Mengen an PGE_2 in den Kulturüberstand, was durch den Inhibitor nicht beeinflusst wurde. Eine 30 Gy-Dosis wirkte sich stark induzierend auf die PGE_2 -Sekretion aus. Durch die niedrigste eingesetzte Flurbiprofen-Konzentration ($0,04 \mu\text{M}$), sank die Bestrahlungsinduktion von PGE_2 bereits um 84% ab. Höhere Flurbiprofen-Konzentrationen verhinderten nahezu vollständig die Bestrahlungsinduktion dieses Faktors.

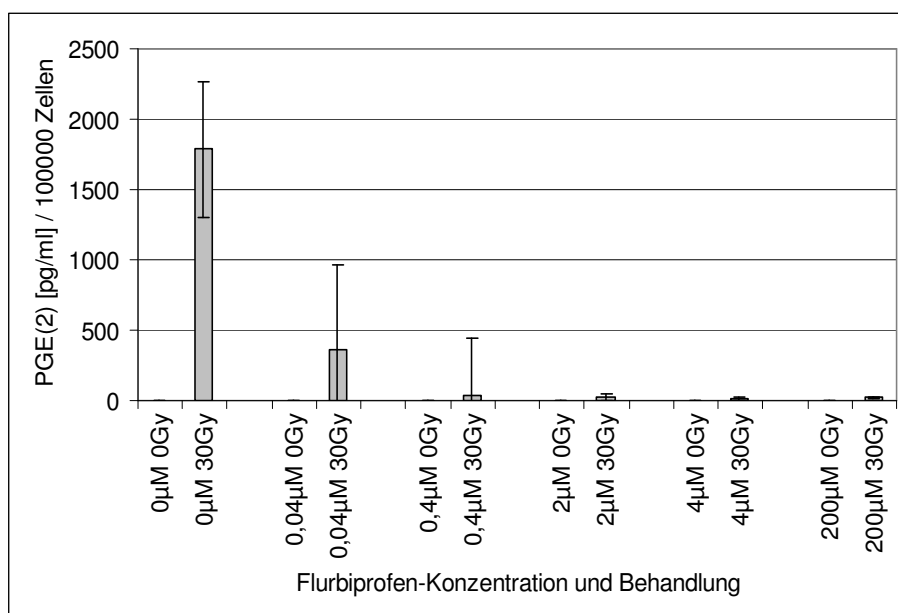


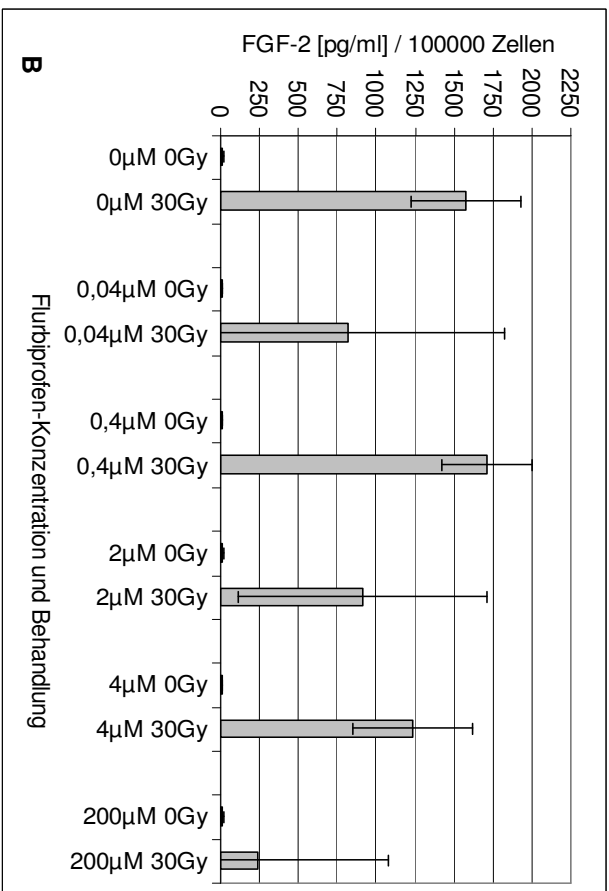
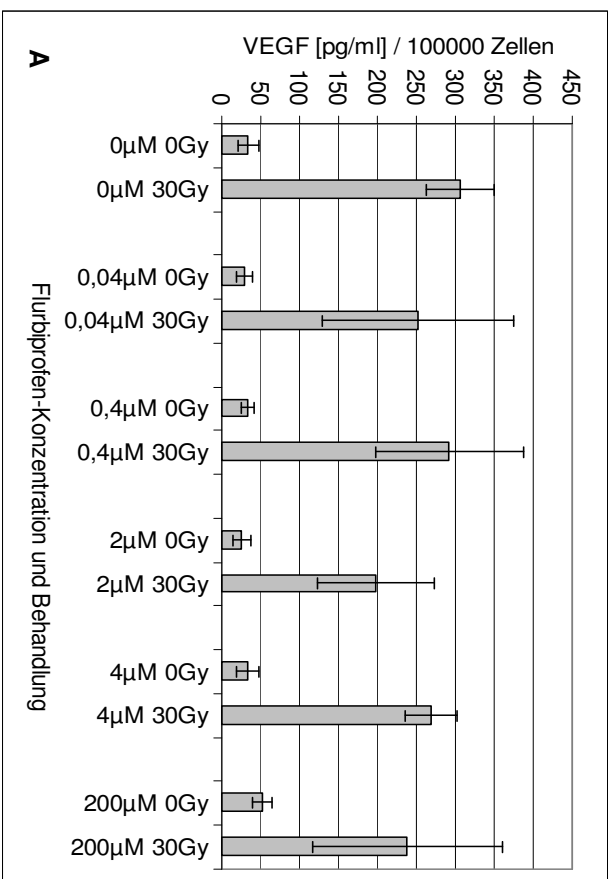
Abb. 36: Flurbiprofen inhibierte die Bestrahlungsinduktion von PGE_2 . Die Tumorzelle Dept wurde mit Flurbiprofen in den Konzentrationen 0, 0,04, 0,4, 2, 4 und 200 μM inkubiert und mit 30 Gy bestrahlt. Der Inhibitor wurde täglich erneuert. 72 h nach Bestrahlung wurde das Experiment beendet. Aus dem Zellkulturüberstand wurde PGE_2 mittels Immunoassay quantifiziert, zur Zellzahl normalisiert und zur 30 Gy-Vehikelkontrolle (0 μM) relativiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit \pm SD von drei Experimenten, die jeweils 4fach durchgeführt wurden.

4.8.3 Die Wirkung von Flurbiprofen auf die bestrahlungsinduzierte Sezernierung von Interleukin-8, VEGF und FGF-2

Flurbiprofen zeigte im vorangegangenen Experiment intrazelluläre Wirksamkeit, indem es die bestrahlungsassoziierte PGE₂ Sezernierung deutlich reduzierte (Abb. 36). In Abschn. 4.2.2 stellte ich die zeit- und dosisabhängige Induktion von VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen nach Bestrahlung dar. Nun sollte untersucht werden, ob Flurbiprofen ein modulierendes Potential bzgl. dieser Induktion mit dem Ziel der Reduktion besitzt. Neben VEGF und FGF-2 wurde das bestrahlungsvermittelte Sezernierungsmuster von IL-8, einem weiteren potenten angiogenen Faktor, in die Untersuchungen mit einbezogen.

Zellen der Tumormlinie Dept wurden eine Stunde vor einer 30 Gy-Dosis mit Flurbiprofen inkubiert. Die Zellen wurden über 72h bei täglichem Mediumwechsel inklusive Inhibitor weiter kultiviert. Als Kontrollen wurden Kulturen ohne Substanz, d.h. nur mit Lösungsmittel, mitgeführt. Nach 72h wurde das Experiment beendet, indem die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt wurden. Alle drei Faktoren wurden in den Kulturüberständen mittels ELISA quantifiziert. Die auf die Zellzahl bezogenen Werte dieser Faktoren sind in den Abb. 37A (VEGF), Abb. 37B (FGF-2) und Abb. 37C (IL-8) dargestellt.

Die Freisetzung aller drei Faktoren wurde durch Bestrahlung massiv stimuliert. Die VEGF-Konzentration erhöhte sich um das 9fache (Abb. 37A), die FGF-2-Konzentration um das 131fache (Abb. 37B) und die IL-8-Konzentration um das 56fache (Abb. 37C). Flurbiprofen übte unterschiedliche Wirkungen auf die Bestrahlungsinduktion dieser Faktoren aus. Die VEGF-Sekretion von Dept wurde durch keine der untersuchten Inhibitor-Konzentrationen modifiziert (Abb. 37 A). Bei den Konzentrationen 0,04 bzw. 2 µM war zwar ein leichter, allerdings nicht signifikanter Rückgang von 20 bzw. 25% zu beobachten. Die FGF-2 Induktion wurde durch den Inhibitor bei 2 bzw. 200 µM um 30 bzw. 75% reduziert (Abb. 37 B). Die übrigen untersuchten Konzentrationen übten keinen modulierenden Einfluss auf die Induktion dieses Faktors aus. In den Konzentrationen 2 und 200 µM bewirkte die Substanz einen Rückgang der Bestrahlungsinduktion von IL-8 um etwa 30%, wohingegen die übrigen Konzentrationen einen zusätzlichen Anstieg um 25-30% verursachten (Abb. 37 C).



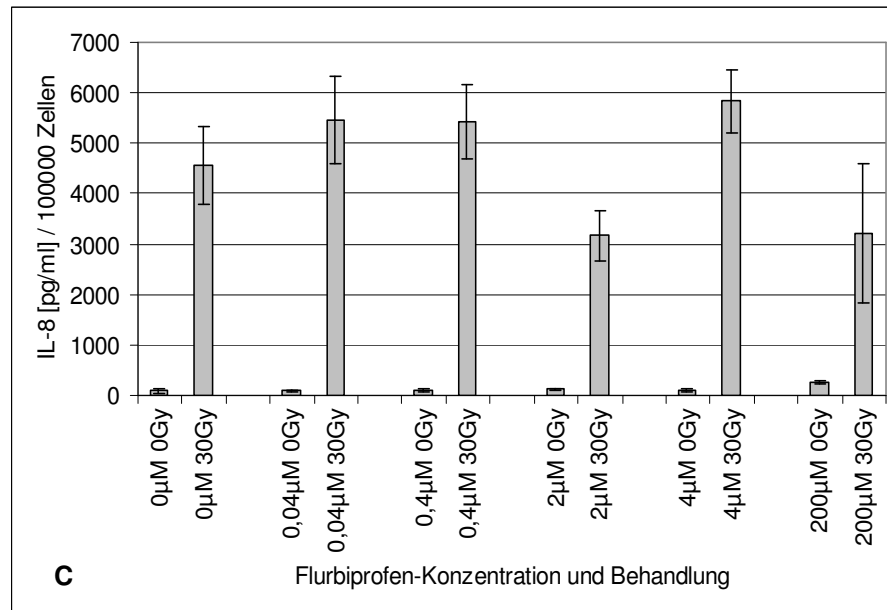


Abb. 37: Wirkung von Flurbiprofen auf das bestrahlungsinduzierte VEGF (A), FGF-2 (B) und IL-8 (C). Dept-Zellen wurden mit den Flurbiprofen-Konzentrationen 0,04, 0,4, 2, 4 und 200 µM inkubiert und mit 30 Gy bestrahlt. Die 0 Gy- sowie die Lösungsmittelkontrolle wurden mitgeführt. Nach 72h wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt. Das quantifizierte VEGF (A), FGF-2 (B) und IL-8 (C) wurde zur Zellzahl normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit +/- SD von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils 4fach durchgeführt wurden.

Um festzustellen, ob der beobachtete Effekt der Reduktion des bestrahlungsinduzierten FGF-2 durch 0,2 mM Flurbiprofen auch bei anderen Tumorzelllinien auftritt, wurden drei weitere Linien mit der Substanz kultiviert und bestrahlt. In Abb. 38A ist das durch eine 30 Gy-Dosis induzierte VEGF bei den Tumorzelllinien Dept, Hun, Lau und A549 dargestellt. Bei allen Linien ist eine massive und teilweise signifikante Induktion dieses Faktors infolge der Bestrahlung zu beobachten (Dept * $p < 0,05$, Hun $p = 0,005$, Lau, A549 $p > 0,05$), die durch Flurbiprofen nur leicht, d.h. um etwa 30% bei Dept und Hun, reduziert wurde. In Abb. 38B ist die FGF-2 Sekretion der untersuchten Tumorzelllinien abgebildet. In diesen Experimenten wurde bei den Linien Dept, Lau und A549 kein basal sezerniertes FGF-2 festgestellt, was sich auch durch Flurbiprofen nicht änderte. Durch Bestrahlung fand außer bei A549 bei allen Linien eine deutliche Induktion dieses Faktors infolge der Bestrahlung statt (* $p < 0,05$). A549 blieb auch nach Bestrahlung FGF-2 negativ. Flurbiprofen reduzierte die bestrahlungsassoziierte FGF-2 Sekretion zwischen 84 und 93% ($p < 0,005$).

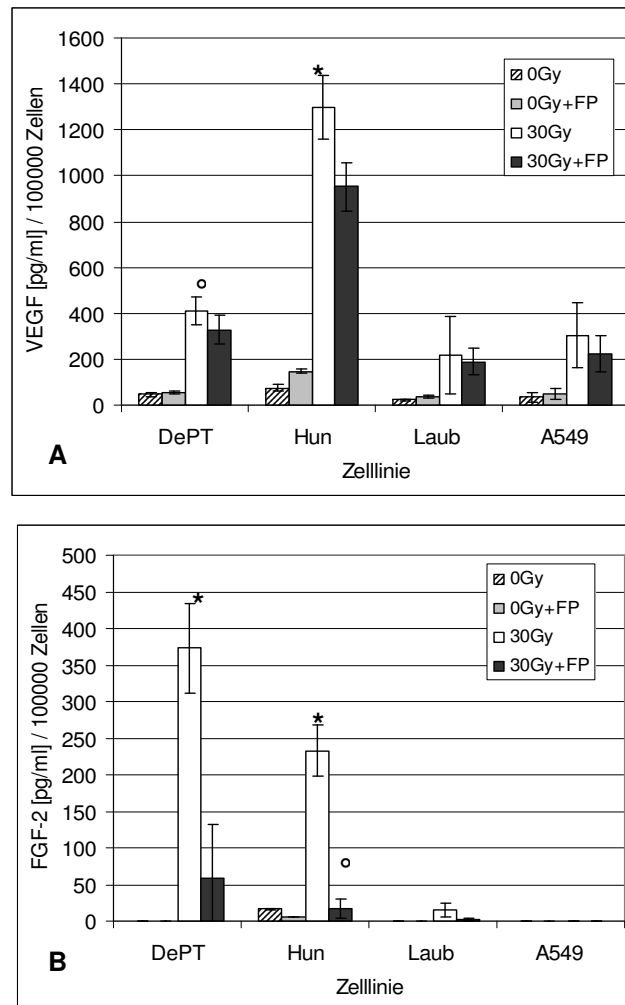


Abb. 38: Wirkung von Flurbiprofen auf das bestrahlungsinduzierte VEGF (A), FGF-2 (B). Die Tumorzellen DePT, Hun, Lau und A549 wurden mit 200 µM Flurbiprofen inkubiert und mit 30 Gy bestrahlt. Die 0 Gy- sowie die Lösungsmittelkontrolle wurden mitgeführt. Nach 72h wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt. Das quantifizierte VEGF (A), FGF-2 (B) wurde zur Zellzahl normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (* $p < 0,05$, $p = 0,005$).

4.8.4 Die Wirkung von Lumiracoxib auf die Bestrahlungsinduktion von VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen

Flurbiprofen konnte die bestrahlungsinduzierte Freisetzung von FGF-2 deutlich reduzieren (Abb. 37B und 38B). Im Folgenden sollte festgestellt werden, ob mit dem hochselektiven Cox-2 Inhibitor Lumiracoxib ein weiterer potentieller Modulator dieser Induktion durch Bestrahlung vorläge. Zellen der SCC-Linien Hun und DePT wurden eine Stunde vor einer 30 Gy-Dosis mit den Inhibitor-Konzentrationen 0,002, 0,2, 2, 20, 70 und 100 µM weitere 72h kultiviert. Kontrollen, Analysen und Auswertung erfolgten nach dem gleichen Schema wie bei Flurbiprofen. Die auf die Zellzahl normalisierten VEGF-

Konzentrationen sind in Abb. 39 (Hun und Dept) dargestellt, die FGF-2 Konzentrationen in den Abb. 40A (Hun) und B (Dept). 10^5 Hun-Zellen sezernierte in der unbestrahlten $0 \mu\text{M}$ -Kontrolle etwa 45 pg/ml , bei Dept wurden basal etwa 65 pg/ml pro 10^5 Zellen freigesetzt (Abb. 39). Die Bestrahlung mit 30 Gy bewirkte, wie in den vorherigen Experimenten auch, eine starke Induktion der VEGF-Konzentrationen im Kulturmedium (etwa 300 pg/ml pro 10^5 Zellen bei Hun bzw. 500 pg/ml pro 10^5 Zellen bei Dept). Lumiracoxib modulierte in den hier untersuchten Konzentrationen nicht die Bestrahlungsinduktion von VEGF.

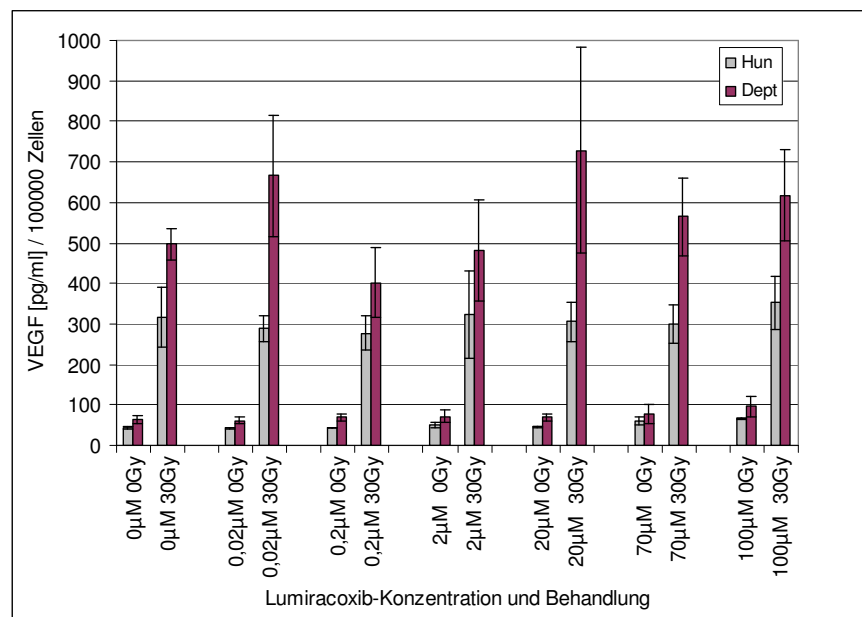


Abb. 39: Wirkung von Lumiracoxib auf das bestrahlungsinduzierte VEGF. Die Tumorzellen Hun und Dept wurden mit den Lumiracoxib-Konzentrationen $0,02$, $0,2$, 2 , 20 , 70 und $100 \mu\text{M}$ inkubiert und mit 30 Gy bestrahlt. Die 0 Gy - sowie die Lösungsmittelkontrolle wurden mitgeführt. Nach 72 h wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt. Das quantifizierte VEGF (A), FGF-2 (B) wurde zur Zellzahl normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei Experimenten, die jeweils 4fach durchgeführt wurden.

Abb. 40A und B zeigen die FGF-2 Konzentrationen der Kulturüberstände von Hun und Dept. In den unbestrahlten Kontrollen war nahezu kein FGF-2 detektierbar, was sich auch durch Lumiracoxib nicht änderte. Eine 30 Gy Dosis verursachte wiederum eine erhöhte Freisetzung von FGF-2 bei beiden Linien. Bei Hun bewirkte die Substanz wie auch bei Flurbiprofen nur in der hohen Konzentration einen tendenziellen, jedoch nicht signifikanten, Rückgang des induzierten FGF-2 (Abb. 40A) ($p > 0,05$). Die übrigen untersuchten Konzentrationen veränderten die FGF-2 Induktion nicht. Bei Dept übte Lumiracoxib eine die Bestrahlungsinduktion von FGF-2 zusätzlich erhöhende Wirkung

aus, die mit steigender Konzentration abnahm (Abb. 40B). Mit der höchsten Substanzkonzentration war das FGF-2 Level auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle.

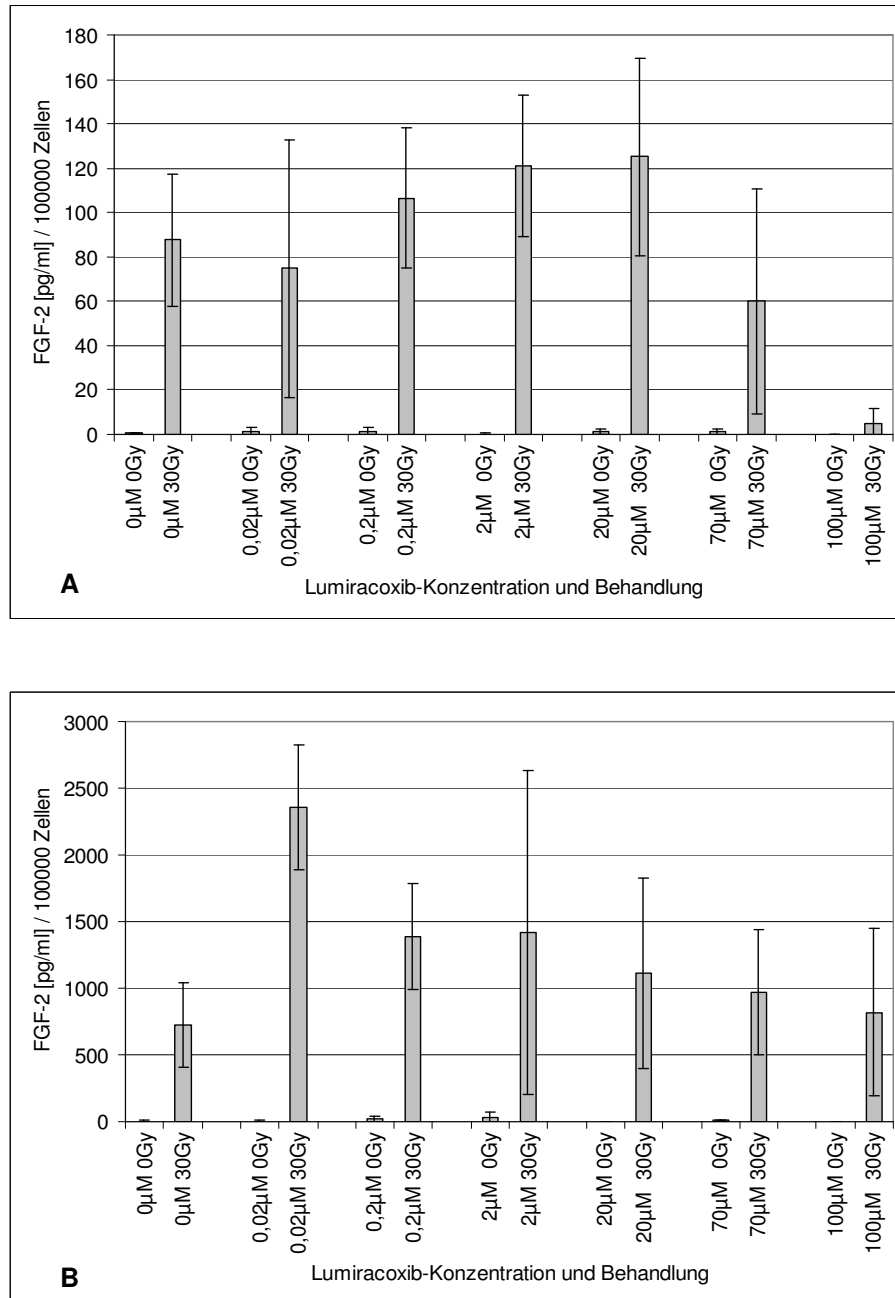


Abb. 40: Das bestrahlungsinduzierte FGF-2 wird durch Lumiracoxib reduziert. Die Tumorkulturen Hun und Dept wurden mit den Lumiracoxib-Konzentrationen 0,02, 0,2, 2, 20, 70 und 100 µM inkubiert und mit 30 Gy bestrahlt. Die 0 Gy- sowie die Lösungsmittelkontrolle wurden mitgeführt. Nach 72h wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt. Das quantifizierte VEGF (A), FGF-2 (B) wurde zur Zellzahl normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD von drei Experimenten, die jeweils 4fach durchgeführt wurden.

4.8.5 Die Wirkung von Meloxicam auf die Bestrahlungsinduktion von VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen

Schließlich wurde der selektive Cox-2 Inhibitor Meloxicam auf dessen die Bestrahlungsinduktion von VEGF und FGF-2 modulierendes Potential hin untersucht. Dazu wurden Zellen der Linien Hun und Dept mit den Substanz-Konzentrationen 0,5, 2, 4, 6, 10 und 100 μM inkubiert und mit einer 30 Gy-Dosis bestrahlt und weitere 72h kultiviert. Kontrollen, Analysen und Auswertung erfolgten nach dem gleichen Schema wie bei Flurbiprofen.

Das basale VEGF-Sekretionslevel von etwa 600 pg/ml pro 10^5 Zellen wurde bei beiden Linien durch keine der verwendeten Meloxicam-Konzentrationen verändert (Abb. 41). Durch Bestrahlung mit 30 Gy wurde VEGF bei beiden Linien etwa 10fach verstärkt sezerniert. Allerdings konnte keine substanzvermittelte Modifikation festgestellt werden.

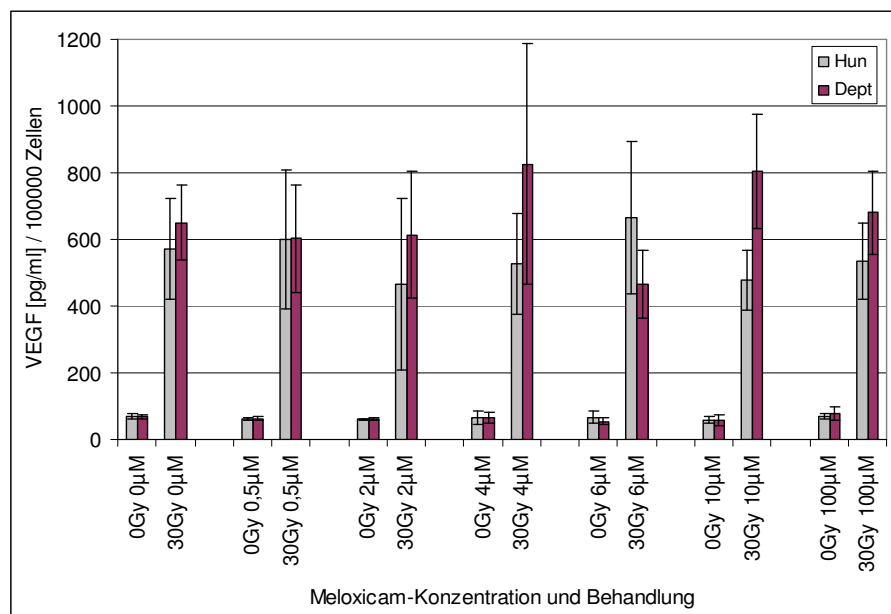
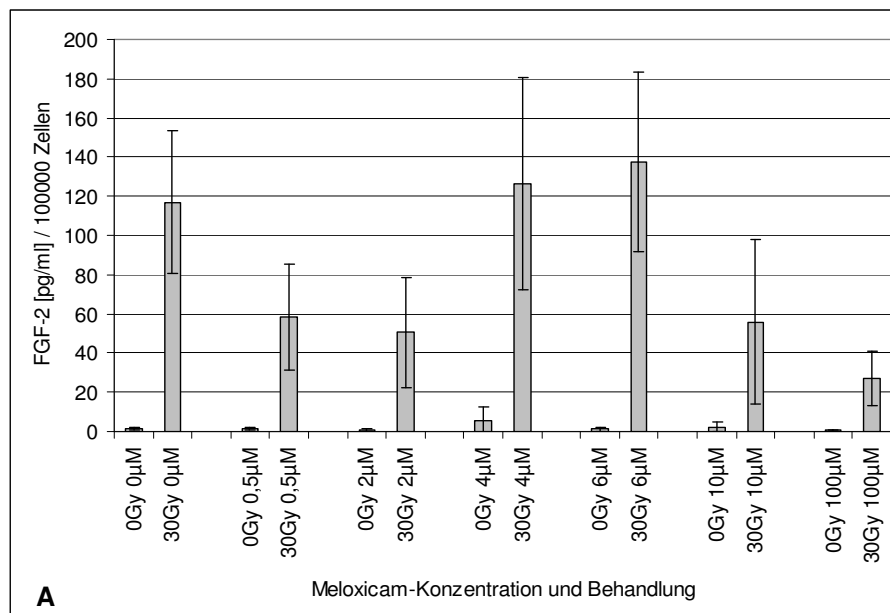


Abb. 41: Wirkung von Meloxicam auf das bestrahlungsinduzierte VEGF. Die Tumorklinien Hun und Dept wurden mit den Meloxicam-Konzentrationen 0,5, 2, 4, 6, 10 und 100 μM inkubiert und mit 30 Gy bestrahlt. Die 0 Gy- sowie die Lösungsmittelkontrolle wurden mitgeführt. Nach 72h wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt. Das quantifizierte VEGF (A), FGF-2 (B) wurde zur Zellzahl normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei Experimenten, die jeweils 4fach durchgeführt wurden.

Abb. 42A und B zeigen die FGF-2 Konzentrationen in den Kulturüberständen von Hun und Dept. In den unbestrahlten Kontrollen beider Linien war nahezu kein FGF-2 detektierbar, was auch durch Meloxicam nicht verändert wurde. Wie erwartet verursachte

eine 30 Gy-Dosis eine 80 bzw. 120fache Verstärkung der FGF-2 Sekretion bei Hun bzw. Dept. Die Wirkung von Meloxicam auf die Bestrahlungsinduktion von FGF-2 zeigte bei Hun teilweise einen konzentrationsabhängigen Verlauf (Abb. 42A): 0,5 und 2 μM reduzierten das sezernierte FGF-2 um jeweils etwa 50%. Mit 4 und 6 μM Meloxicam veränderte sich an der Bestrahlungsinduktion von FGF-2 im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle nichts. 10 und 100 μM verursachten wiederum einen Rückgang der Bestrahlungsinduktion von FGF-2 um 60 bzw. 78%. Zu beachten ist allerdings die große Schwankungsbreite der Messwerte, welche sich in entsprechend großen Fehlerbalken niederschlagen. Bei der Linie Dept sind aufgrund der erheblichen Schwankungen in den detektierten FGF-2 Freisetzungen keine verlässlichen Aussagen über einen Effekt durch Meloxicam zu treffen (Abb. 42B).



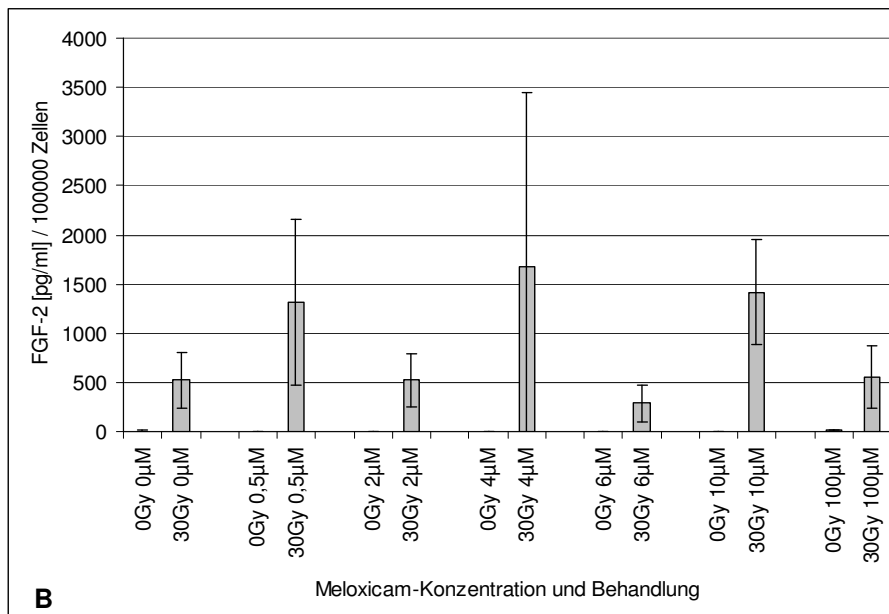


Abb. 42: Das bestrahlungsinduzierte FGF-2 wird durch Meloxicam reduziert. Zellen der HNSCC-Linien Hun und Dept wurden mit den Meloxicam-Konzentrationen 0,5, 2, 4, 6, 10 und 100 µM inkubiert und mit 30 Gy bestrahlt. Die 0 Gy- sowie die Lösungsmittelkontrolle wurden mitgeführt. Nach 72h wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen gezählt. Das quantifizierte VEGF (A), FGF-2 (B) wurde zur Zellzahl normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD von drei Experimenten, die jeweils 4fach durchgeführt wurden.

4.8.6 NS-398 erhöht *in vivo* nicht die Radioresponse

Cox-Inhibitoren verringerten die Überlebensrate von Tumorzellen und zeigten modulierende Effekte auf die Bestrahlungsinduktion angiogener Faktoren, wobei insbesondere die PGE₂ und FGF-2 Freisetzung gehemmt wurden. *In vivo* wurde nun die Wirkung des selektiven Cox-2 Inhibitors NS-398 auf die Progression xenotransplanteder Tumorzellen der Linie Dept nach Bestrahlung untersucht. Dazu wurden die Mäuse mit verschiedenen Therapieformen behandelt: Bei der NS-398 Gruppe erhielten die Tiere täglich intraperitoneal 38 mg Substanz/kg Maus, bei der RT-Gruppe wurde der Tumor einmalig mit 60 Gy bestrahlt und bei der kombinierten Gruppe wurden die Behandlungen der NS-398 und der RT-Gruppe vereint (Abschn. 3.2.18). Die Kontrollgruppe blieb unbestrahlt und unbehandelt. Die Behandlung der transplantierten Mäuse begann bei einem Tumervolumen von etwa 1,3 cm³ und die Zunahme des Tumervolumens wurde täglich erfasst. Nach 12 Tagen wurde die Mauspopulation terminiert. Der Verlauf der Tumorprogression unter den vier Therapiemodi ist in Abb. 43 dargestellt.

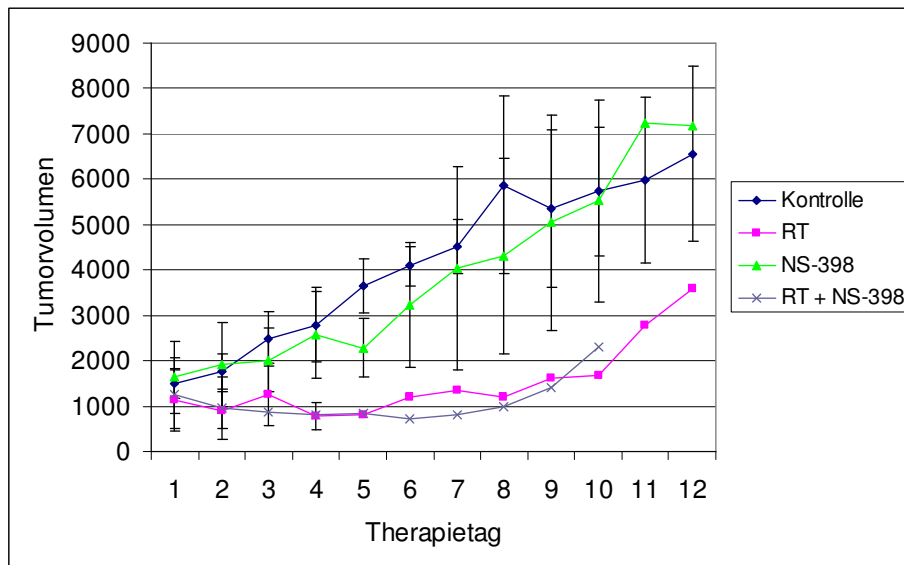


Abb. 43: Die Tumorprogression wird durch Bestrahlung reduziert, allerdings nicht durch NS-398. Dept-Zellen wurden xenotransplantiert. Die Therapie der Mäuse begann bei Erreichen eines Volumens von etwa $1,3 \text{ cm}^3$. Die NS-398 Gruppe erhielt täglich intraperitoneal 38 mg Substanz/kg Maus, bei der RT-Gruppe wurde der Tumor einmalig mit 60 Gy bestrahlt und bei der kombinierten Gruppe wurden die Behandlungen der NS-398 und der RT-Gruppe vereint. Die Kontrollgruppe blieb unbestrahlt und unbehandelt. Die Zunahme des Tumorzellen wurde täglich erfasst. Nach 12 Tagen wurde die Mauspopulation terminiert. Jede der vier Gruppen bestand zum Versuchsbeginn aus 4 Tieren.

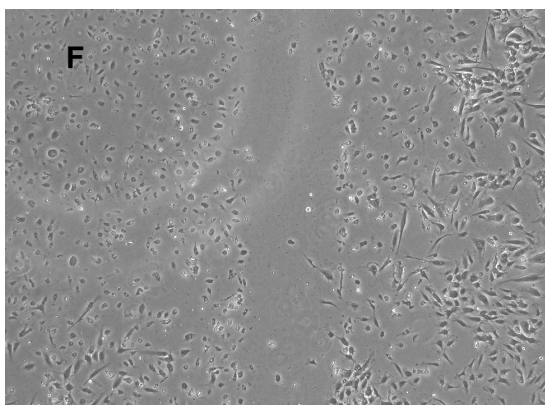
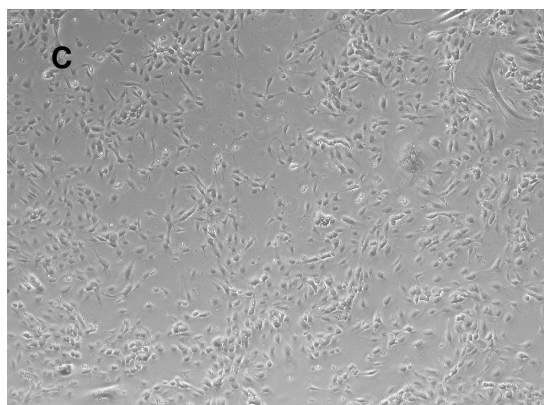
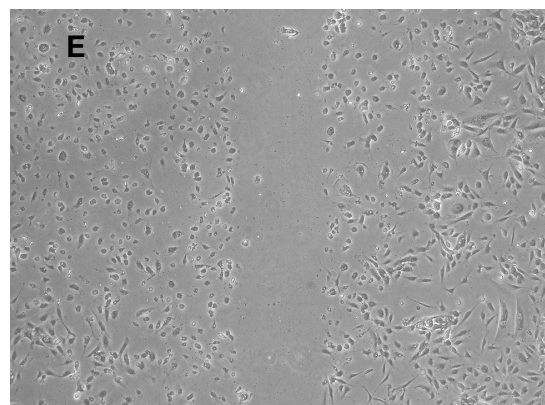
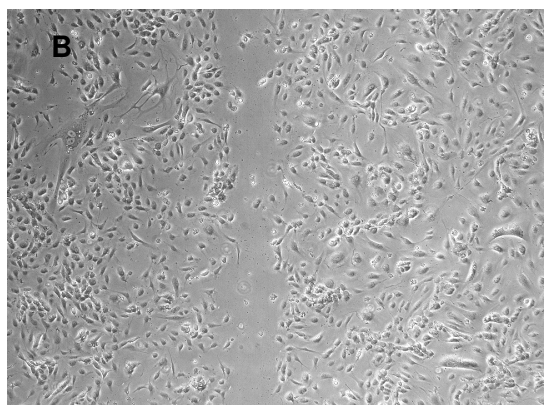
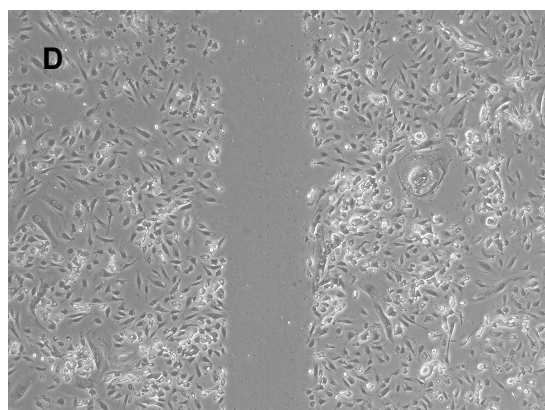
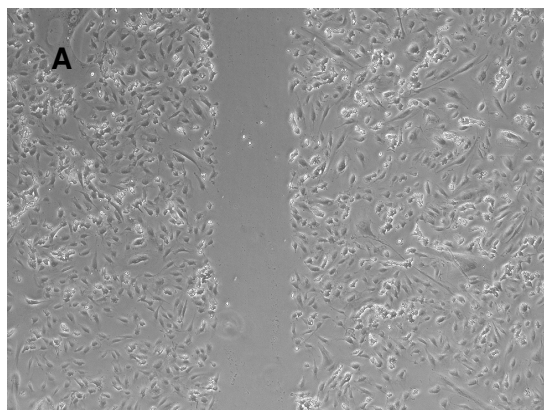
Die Tumorzellen der Kontrollgruppe nahmen über den gesamten Zeitraum hinweg kontinuierlich zu und waren zum Ende des Experiments um das 5fache angestiegen. NS-398 bewirkte keine Verzögerung der Tumorzellen. Das Wachstum der Tumore stagnierte nach der Bestrahlung bis zum Tag 9, setzte dann jedoch verstärkt sein Wachstum fort. Bei der kombinierten Therapie waren die gleichen wachstumsverzögernden Effekte zu verzeichnen, wie bei der RT-Gruppe allein, d.h. die Applikation des Inhibitors zeigte keine Effekte.

4.8.7 Migrationsassay mit Cox-Inhibitoren

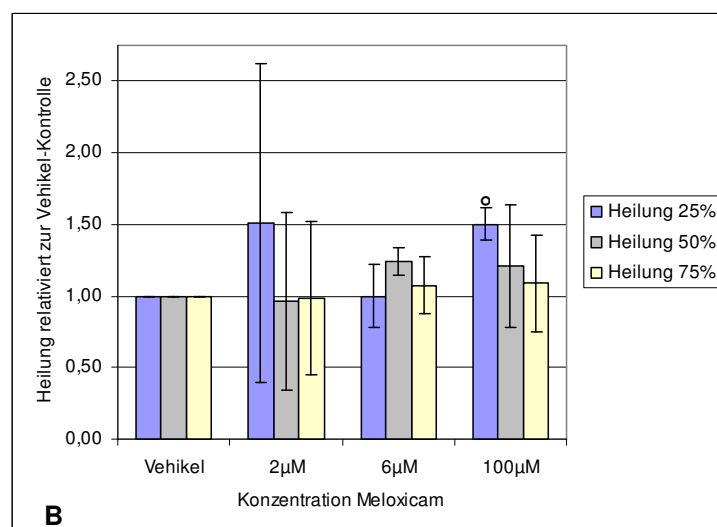
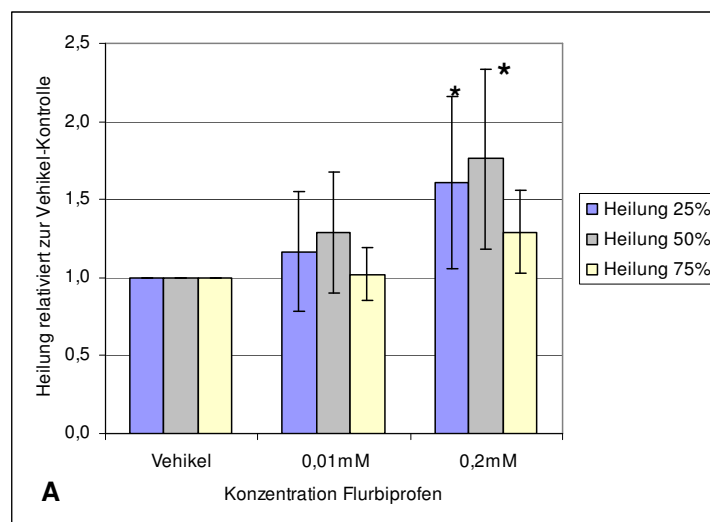
In den vorherigen Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss die untersuchten Cox-Inhibitoren auf die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen ausüben. In den nun folgenden Experimenten wurde die Wirkung dieser Substanzen auf die Heilungsfähigkeit von HUVEC geprüft. Dazu wurden die Zellen direkt nach Verletzung des Monolayers mit den Cox-Inhibitoren Meloxicam, Flurbiprofen und Lumiracoxib kultiviert. Der Heilungsverlauf wurde zu den Zeitpunkten 0, 6, 24 und 48 h durch Abstandsmessung der Zellfronten verfolgt und dokumentiert. Und um die Effekte der

Substanzen zu erfassen, wurden die Zeitpunkte der 25, der 50 und der 75%igen Heilung ermittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Werte zur Lösungsmittelkontrolle (Vehikel) relativiert. In Bild 3 S. 101 ist exemplarisch ein solcher Heilungsverlauf mit 0,2 mM Flurbiprofen und der Lösungsmittelkontrolle gezeigt, wobei die Bilder 3A, B und C die Lösungsmittelkontrolle repräsentieren. Die Bilder 3D, E und F stellen den Heilungsverlauf mit Inhibitor dar. Bei der Kontrolle war bereits nach 6h eine deutliche Heilungstendenz zu erkennen (Bild 3B) und nach 24h war der ursprüngliche Verlauf der Verletzung vollständig geheilt (Bild 3C). Flurbiprofen wirkte sich verzögernd auf die Heilung aus. Nach 6h setzte die Heilung nur sehr schwach ein (Bild 3E) und nach 24h erreichte der Heilungsverlauf noch nicht den Stand der Kontrolle zum Zeitpunkt 6h nach Verletzung (Bild 3F).

Bild 3, S.99: Flurbiprofen verzögert die Heilung bei HUVEC. Ein konfluenten HUVEC-Monolayer wurde verletzt und mit Lösungsmittel (A, B, C) bzw. 0,2 mM Flurbiprofen (D, E, F) weiter kultiviert. Der Verlauf der Verletzung wurde zu den Zeitpunkten 0 h (A, D), 6 h (B, E) und 24 h (C, F) dokumentiert. Vergrößerung x 40.



In Abb. 44 ist die zur Lösungsmittelkontrolle relativierte 25, 50 und 75%ige Heilung von HUVEC mit Flurbiprofen (A), Meloxicam (B) und Lumiracoxib (C) dargestellt. Flurbiprofen (Abb. 44A) verursachte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle in der 0,2 mM-Konzentration eine deutliche 25%ige und 50%ige Heilungsverzögerung von 60 bzw. 80% (* $p < 0,05$). Die niedrigere Wirkstoffkonzentration wirkte sich nicht verzögernd auf die Heilungsfähigkeit aus. Der Heilungsverlauf mit Meloxicam ist in Abb. 44B dargestellt, wobei auch bei diesem Inhibitor nur die höchste Wirkstoffkonzentration eine deutliche 25%ige Heilungsverzögerung um 50% bewirkte ($p < 0,005$). In Abb. 44C ist der Heilungsverlauf mit Lumiracoxib veranschaulicht. Keine der untersuchten Konzentrationen verzögerte die Heilung der Endothelzellen. Allerdings war eine tendenzielle Verzögerung der 25%igen Heilung bei der höchsten Wirkstoffkonzentration zu verzeichnen.



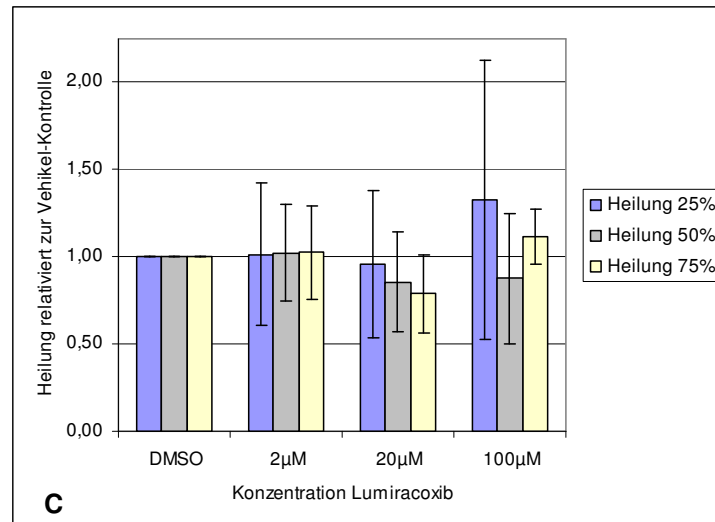


Abb. 44: Cox-Inhibitoren verzögern die Heilung von HUVEC. Konfluente HUVEC-Monolayer wurden verletzt und mit den Cox-Inhibitoren Flurbiprofen (A) (0,01 und 0,2 mM), Meloxicam (B) (2, 6 und 100 µM) und Lumiracoxib (C) (2, 20 und 100 µM) inkubiert. Die Lösungsmittelkontrolle (Vehikel-Kontrolle) wurde mitgeführt. Der Verlauf der Heilung wurde nach 0, 6, 24 und 48 h durch Abstandsmessung bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD der 25%igen, 50%igen und 75%igen Heilungsrate der Zellen nach Relativierung zur Vehikel-Kontrolle von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (* $p < 0,05$, $^{\circ}p < 0,005$).

5. Diskussion

Die Prognosen der derzeit praktizierten Therapien bei Tumorerkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches sind mit einer 5-Jahresüberlebensrate von etwa 50% und einer Rezidivrate von 80% seit Jahren nach wie vor schlecht. Der operativen Entfernung malignen Gewebes folgt in der Regel die radioaktive Bestrahlung. Über die durch Bestrahlung aktivierten Mechanismen und die zellulären und molekularen Grundlagen der Resistenzbildung ist wenig bekannt. Es mehren sich allerdings Indizien, dass sich die Radiotherapie (RT) fördernd auf die Produktion angiogener Faktoren im Tumor auswirken könnte. Diese Faktoren scheinen ein protektives Potential zu besitzen und könnten zelluläre Schutzmechanismen induzieren, die vor weiteren Strahlenschäden schützen. Da dies für die Beeinträchtigung des Therapieerfolgs durch Förderung der Strahlenresistenz verantwortlich sein könnte, finden derzeit intensive Studien mit dem Ziel der effektiveren Gestaltung der Tumorthherapie statt. In der vorliegenden Arbeit werden die Wirkungen radioaktiver Bestrahlung auf Tumor- und Endothelzellen und die Freisetzung zytoprotektiver Faktoren mit dem Ziel der Evaluierung beteiligter Mechanismen untersucht.

5.1 Bestrahlung induziert angiogene Wachstumsfaktoren

VEGF und FGF-2 sind hoch potente angiogene Faktoren und spielen bei der Tumorangiogenese eine herausragende Rolle. Die Faktoren besitzen insoweit zytoprotektives Potential als sie Zellen bei Bestrahlung vor dem Zelltod schützen. Der Erfolg der RT bei Tumoren des Kopf-Hals Bereiches ist nur mäßig und die Mechanismen der Radioresistenzbildung beim Tumor sind unvollständig aufgeklärt. Um zu untersuchen, ob VEGF und FGF-2 daran beteiligt sind, untersuchte ich das Expressionsmuster der in unserem Labor etablierten HNSCC-Linien hinsichtlich VEGF und FGF-2 (Abschn. 4.1). Beide Faktoren werden auch bei einer Vielzahl weiterer Tumorenitäten gefunden (BERNS 2003, FONTANINI 1997, JANET 1995, LEE 2000, MANDERS 2002, ZUCK 1992).

Die Bestrahlung der Zellen bewirkte eine dosis- und zeitabhängige Abnahme der Zellzahl. Diese Beobachtung wurde von uns auf apoptotische Vorgänge zurückgeführt, da die Apoptose als die vorherrschende bestrahlungsvermittelte Todesform angesehen wird (VERHEIJ 2000). Bei Tumorzelllinien verschiedener Enitäten wurde mit dem Anstieg der

Bestrahlungsdosen auch eine Zunahme von Störungen des Zellzyklus und damit eine gestörte Mitose oder der eintretende Zelltod festgestellt. SHINOMIYA *et al.* beschrieben eine zeit- und dosisabhängige Zunahme der bei apoptotischen Vorgängen induzierten DNS-Fragmentation (SHINOMIYA 2001).

Die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung stiegen auch in den gezeigten Experimenten mit Dosis und Zeit an, und die stärksten Effekte konnten so bei 30 Gy und nach 72h beobachtet werden (Abschn. 4.2.1). Um die Wirkung der Bestrahlung auf die einzelne Zelle bzgl. FGF-2- und VEGF-Freisetzung untersuchen zu können, wurden die quantifizierten Werte auf die Zellzahl der Überlebenden und damit funktionellen Zellen bezogen. Wir fanden heraus, dass Bestrahlung die Konzentrationen der untersuchten Faktoren sowohl intrazellulär als auch im Kulturüberstand deutlich erhöhte (Abschn. 4.2.2). Der beobachtete Anstieg der Faktoren war proportional zur applizierten Bestrahlungsdosis. VEGF wurde intrazellulär in niedrigeren Konzentrationen gefunden als im Kulturüberstand, was auf die zügige Freisetzung dieses Faktors hindeutet.

Die Bestrahlungsinduktion von VEGF ist nicht auf HNSCC-Linien beschränkt. ANDO *et al.* zeigten beim Lungenepithelkarzinom *in vitro* erhöhte VEGF-mRNA- und -proteinlevel 16-24h nach Röntgenbestrahlung (ANDO 1998 und 2000). Bei verschiedenen Tumorenitäten fanden GORSKI *et al.* eine erhöhte VEGF-Freisetzung ebenfalls nach Röntgenbestrahlung (GORSKI 1999). Erhöhte VEGF-Promoteraktivität und -mRNA-Level wurden bei Glioblastomzelllinien nach einer 10 Gy Bestrahlungsdosis festgestellt (MORI 2000). PARK *et al.* beschrieben bei malignen Zellen von Ratten nach Bestrahlung mit 2 Gy erhöhte VEGF-Promoteraktivität und -Proteinlevel (PARK 2001B). Der gezeigte Anstieg des freigesetzten VEGF bei HNSCC wird durch die beschriebenen Berichte bestätigt.

FGF-2 war im Kulturüberstand unbestrahlter Kulturen kaum nachzuweisen, wohingegen intrazellulär größere Mengen dieses Faktors gefunden wurden. Bestrahlung bewirkte, wie auch bei VEGF, eine erhöhte Expression und Freisetzung von FGF-2. Erwähnenswert ist dabei jedoch, dass FGF-2, unabhängig von Zeitpunkt und Behandlung, intrazellulär in deutlich größeren Mengen vorhanden war. Ein Verdünnungseffekt ist auszuschließen, da die Werte auf die Volumina der jeweiligen Proben bezogen wurden.

Eine erhöhte FGF-2-Freisetzung nach Bestrahlung wurde bei HeLa-Zellen gezeigt: KRAMER *et al.* fanden erhöhte FGF-2-mRNA und -Proteinkonzentrationen nach UV-Bestrahlung (KRAMER 1993). Bei Mammakarzinomzellen beobachteten LEE *et al.* nach Röntgenbestrahlung erhöhte FGF-2-mRNA-Konzentration (LEE 1995). Der dargestellte FGF-2-Anstieg nach radioaktiver Bestrahlung bei HNSCC wird durch die beschriebenen Berichte bestätigt.

Die Mechanismen, die zur Induktion von FGF-2 nach Bestrahlung führen können,

sind vielfältig. Denkbar ist, dass die durch Bestrahlung entstandenen Schäden auf zellulärer Ebene neben der Neusynthese auch dessen Freisetzung aus intrazellulären Speichern induzierte. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtungen von SCHWEIGERER *et al.* und MCNEIL *et al.* Die Autoren berichteten von der FGF-2 Freisetzung nach sublethaler Verletzung oder induzierter Apoptose bei Endothelzellen (SCHWEIGERER 1987, MCNEIL 1989). Parallel zur FGF-2 Freisetzung wurden durch Verletzung keine zytoplasmatischen Bestandteile gefunden, was auf einen kontrollierten zellulären Vorgang schließen lässt (KANDEL 1991). TAVERNA *et al.* beschrieben nach Stressinduktion ein Abschnüren FGF-2-gefüllter Membranvesikel *in vitro* (TAVERNA 2003). Denkbar ist auch, dass das induzierte VEGF einen Stimulus der FGF-2 Freisetzung darstellt. JONCA *et al.* beschrieben die VEGF-vermittelte Freisetzung von bioaktivem FGF-2 (JONCA 1997).

Neben der Bestrahlungsinduktion von VEGF und FGF-2 fanden sich in der vorliegenden Studie auch erhöhte Konzentrationen von IL-8 und PGE₂ in den Kulturüberständen der untersuchten Tumorzellen (Abschn. 4.8.3 und 4.8.2). Die erhöhte PGE₂-Freisetzung könnte mit einem erhöhten Substratangebot – der Arachidonsäure – aufgrund einer strahlenaktivierten Phospholipase A zusammenhängen (CHOY 2003). Denkbar ist weiterhin eine erhöhte Cox-2-Expression nach Bestrahlung, die mit einer erhöhten PGE₂-Freisetzung korrelierte (BILLINGS 1994, LI 2003B, STEINAUER 2000). Beide Mechanismen – ein erhöhtes Substratangebot sowie eine erhöhte Cox-2 Konzentration – könnten an der strahlenvermittelten PGE₂-Induktion bei den untersuchten Tumorzelllinien beteiligt sein.

Da die beobachtete deutliche Induktion von Wachstumsfaktoren nach der Einzelexposition bei hohen Strahlendosen festgestellt wurde, wurde weiterhin die Wirkung der fraktionierten Bestrahlung bei Tumorzellen untersucht (Abschn. 4.2.3). Die fraktionierte Bestrahlung mit 2 Gy-Einzeldosen findet in der klinischen Tumorthherapie Anwendung, wobei bis zu einer kumulativen Gesamtdosis von 60 bis 80 Gy bestrahlt wird. Um die Effekte der Fraktionierung *in vitro* zu simulieren, wurden Zellen einer Tumorzelllinie über einen Zeitraum von vier Tagen mit jeweils 2 Gy bestrahlt, was letztendlich einer kumulativen Gesamtdosis von 8 Gy entspricht. Ein bestrahlungsvermittelter Rückgang der Zellzahl wurde erst nach der dritten 2 Gy-Dosis, also nach kumulierten 6 Gy, festgestellt. Entsprechend stieg die VEGF-Konzentration im Kulturüberstand an (Abb. 25). Die FGF-2-Freisetzung erhöhte sich allerdings erst nach kumulierten 8 Gy. Meinen Daten zufolge wirkten sich Bestrahlungsdosen bis 4 Gy weder reduzierend auf das Zellwachstum, noch induzierend auf die VEGF und FGF-2 Expression aus, wohingegen sich die einmalig applizierten hohen Dosen auf die Induktion eines breiten Spektrums von Faktoren – neben VEGF und FGF-2 auch IL-8 und PGE₂ - auswirkten. Die durch niedrige

Bestrahlungsdosen verursachten Schäden auf subzellulärer Ebene können vermutlich noch ausreichend durch Reperaturmechanismen behoben werden und es kommt, im Gegensatz zu den höheren Dosen, nicht der stressbedingten erhöhten Freisetzung von Faktoren.

TAMATANI *et al.* fanden bei Oralkarzinomzellen nach Strahlenexposition einen deutlichen Anstieg der IL-8 Sezernierung (TAMATANI 2004). Eine gemeinsame Hochregulation von VEGF und IL-8 nach UVA-Bestrahlung beschrieben auch BACHELOR *et al.* bei Melanomzellen der Haut (BACHELOR 2004). IL-8 scheint auch über die Aktivierung der MAP-Kinase p38 induziert zu werden (XU 2004). Auf die Bedeutung und die Involvierung der MAP-Kinasen in die VEGF-Induktion komme ich später zurück.

Die bei der Bestrahlungsinduktion angiogener Faktoren beteiligten Mechanismen sind vielfältig, wovon ich einige zentrale regulatorische Komponenten im Zusammenhang mit der Thematik dieser Arbeit beschreibe:

BACHELOR *et al.* beschrieben weiterhin eine UVA-vermittelte Hochregulation des Transkriptionsfaktors AP-1 und von Cox-2, was in erhöhten IL-8 und VEGF-Konzentrationen bei Melanomzellen resultierte (BACHELOR 2004). Die Aktivierung von AP-1 wird auch durch die MAP-Kinasen p38 und JNK reguliert, welche wiederum durch zellulären Stress und Schäden an der DNS aktiviert werden sollen (IP 1998, KYRIAKIS 1996). MORI *et al.* zeigten weiterhin die Beteiligung der MAP-Kinasen Erk 1/2 an der AP-1 vermittelten Hochregulation von VEGF nach Bestrahlung (MORI 2000). Auch könnte an der bestrahlungsvermittelten Hochregulation der VEGF-Freisetzung die EGFR-Aktivierung beteiligt sein. Der Rezeptor wurde bei HNSCC überexprimiert gefunden (POMERANTZ 2003, KANVANAGH 1995) und scheint an der Regulation von VEGF beteiligt zu sein: Der EGFR aktiviert die MAP-Kinasen Erk 1/2 und p38, die wiederum an der Aktivierung von AP-1 beteiligt sind und so die VEGF-Transkription induzieren (AKAGI 2003). Auch wurde durch einige Arbeiten die bestrahlungsvermittelte Aktivierung des EGFR gezeigt, was aufgrund gleicher Komponenten der Signaltransduktionskaskade in unmittelbarem Zusammenhang zur VEGF-Induktion stehen könnte (CONTESSA 1999, KAVANAGH 1995, SCHMIDT-ULLRICH 1997 und 2003).

Die bestrahlungsvermittelte Freisetzung des VEGF könnte ebenso auch durch PGE₂ induziert werden. Entsprechend fanden DING *et al.* erhöhte VEGF mRNA- und Proteinkonzentrationen nach Inkubation mit PGE₂ bei Magenkarzinomzellen, was vermutlich über die unspezifische Aktivierung der EGFR-MAPK Signaltransduktionskaskade verläuft (DING 2005). Da auch die Induktion von Cox-2 nach Bestrahlung beschrieben wurde (BILLINGS 1994, LI 2003B, STEINAUER 2000), könnte hier ein wichtiger Wirkmechanismus vorliegen. Auf Cox-2 gehe ich in Abschn. 5.4 ausführlich ein.

Denkbar wäre weiterhin die Regulation von VEGF und FGF-2 über Hif-1. MOELLER *et al.* fanden *in vivo* im Zuge der bestrahlungsvermittelten Tumorreoxygenierung eine deutliche Hochregulation von Hif-1. Die Autoren beobachteten die Kolokalisation von VEGF und FGF-2 mit der Hif-1 Aktivierung infolge der Bestrahlung (MOELLER 2004). Bei der Bestrahlung entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen, die *in vitro* einen stabilisierenden Effekt auf Hif-1 ausüben (Abb.45) (BRUNE 2003, GAO 2002, PARK 2003).

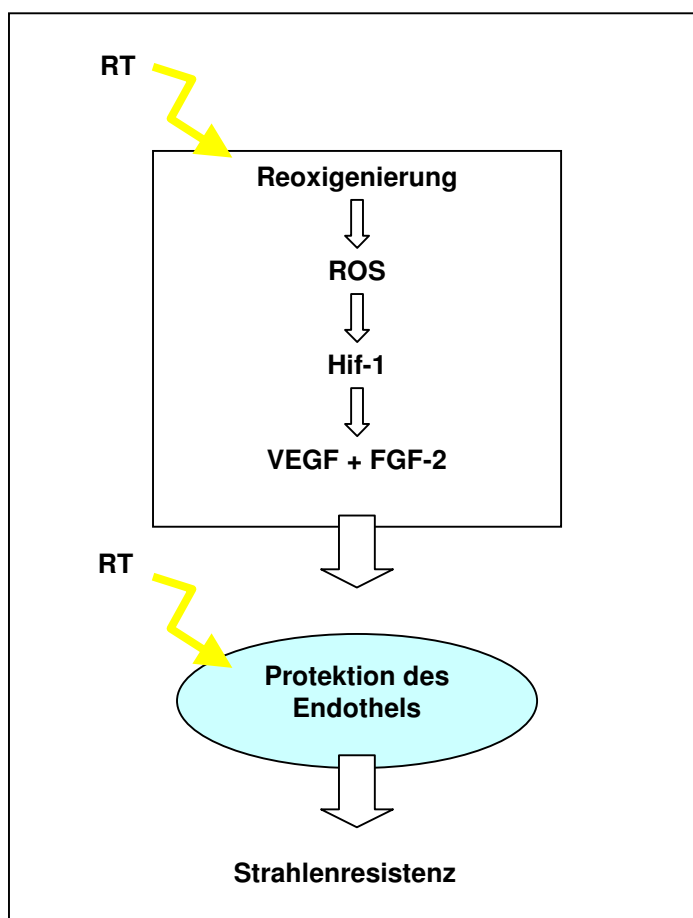


Abb. 45: Bestrahlung induziert Hif-1 und die Produktion protektiver Faktoren. RT verursacht die Reoxigenierung von hypoxischen Tumorzellen und die Entstehung von ROS, welche die Aktivität von Hif-1 stabilisieren. Hif-1 aktiviert direkt die Transkription des VEGF-Gens und die FGF-2 Expression (die Mechanismen der FGF-2 Induktion durch Hif-1 sind unbekannt). Die sezernierten Faktoren fördern das Überleben der tumorassoziierten Endothelzellen. Eine intakte Gefäßversorgung fördert wiederum das Überleben der Tumorzellen (verändert nach SEMENZA 2004).

Die sehr vielfältigen Effekte der Bestrahlung bieten Hinweise auf einen potentiellen Wirkmechanismus auf die in dieser Arbeit beschriebenen induzierten Faktoren. Die Evaluierung der bei HNSCC durch Bestrahlung induzierten / aktivierten subzellulären Komponenten, wie MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren, und deren Inhibition könnte

in der Vermeidung einer erhöhten Freisetzung angiogener Faktoren seitens der Tumorzellen resultieren. Auf die Notwendigkeit der Reduktion der bestrahlungsvermittelten Induktion dieser Faktoren wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

5.2 Bestrahlungsinduzierte Faktoren wirken auf Tumorzellen und Endothelzellen protektiv

Unlängst wurde das tumorassoziierte Endothel und dessen bestrahlungsvermittelte Apoptose als der vorherrschende Grund für den Erfolg der RT diskutiert, da die zur Apoptoseinduktion notwendigen Bestrahlungsdosen bei Epithelzellen höher sind (GARCIA-BARROS 2003, PARIS 2001). PARIS *et al.* beschrieben ein Plateau der Endothelzellapoptose 4h nach einer 15 Gy-Dosis, und nach weiteren 48h die völlige Gefäßzerstörung. Bei Epithelzellen wurde nach dieser Behandlung keine erhöhte Apoptoserate gefunden. Der infolge der RT zu beobachtende Rückgang des Tumorumfanges resultiert infolgedessen nicht auf apoptotischen Vorgängen beim malignen Gewebe, sondern wird durch die nun fehlende Versorgung mit O₂ und Nährstoffen verursacht (GENG 2001). Trotz des RT-vermittelten Tumorschrumpfens setzt häufig eine erneute Repopulation maligner Zellen samt nachfolgender Gefäßversorgung ein. Es ist daher zu vermuten, dass die bei der Bestrahlung von Patienten häufig auftretende Resistenzbildung gegenüber der RT durch die Induktion angiogener Faktoren während dieser Behandlung verursacht wird (Abb. 45).

Auf zellulärer Ebene könnte die erhöhte Freisetzung angiogener Faktoren nach Bestrahlung zur Kompensation strahlenverursachter Schäden dienen. Dies könnte auch in der Selektion von Zellen resultieren, welche diese Faktoren in höherem Maße sezernieren und sich damit selbst schützen. Beide Aspekte könnten zur Strahlenresistenz von Tumoren beitragen. Daten von SHINTANI *et al.* untermauern diese Hypothese, indem sie beim oralen SCC nach der Radiotherapie neben einer deutlich reduzierten Gefäßdichte eine erhöhte VEGF-Expression der überlebenden Tumorzellen fanden (SHINTANI 2000). Die Autoren postulierten daher, dass die VEGF-Expression eine Stressantwort auf die Bestrahlung darstellt.

Da die Tumor-Tumor-Interaktionen und Tumor-Endothel-Wechselwirkungen bei der Strahlenresistenz eine wichtige Rolle bei der Radioresistenz zu spielen scheinen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche Wirkungen bestrahlungsinduzierte

Faktoren, insbesondere VEGF und FGF-2, auf das Überleben von Tumorzellen nach Bestrahlung *in vitro* ausüben. Dazu wurden Tumorzelllinien mit durch Bestrahlung konditionierten Kulturüberständen, kultiviert und erneut bestrahlt (Abb. 26). Eine 2 Gy-Dosis bewirkte eine Reduktion der Überlebenden um die Hälfte. Dies waren 5fach mehr Überlebende als mit unbestrahlten CM. Durch die Applikation von VEGF- bzw. FGF-2 neutralisierenden Antikörpern konnte die Protektion um etwa 50% gesenkt werden. Dies zeigt, dass VEGF und FGF-2 an der Protektion vor dem bestrahlungsvermittelten Zelltod beteiligt sind, und auch dass neben VEGF und FGF-2 weitere Faktoren mit protektivem Potential stimuliert wurden.

Für IL-8 und PGE₂ konnte in anderen Experimenten eine bestrahlungsvermittelte Freisetzung aus Tumorzellen gezeigt werden. Da für beide Faktoren protektive Eigenschaften beschrieben wurden, könnten sie einen Teil der Protektion vermittelt haben. MARINARI *et al.* beschreiben, dass IL-8 T-Lymphozyten vor der bestrahlungsinduzierten Apoptose schützt, was über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB vermittelt wird (MARINARI 2004). Da NF-kappaB auch in Tumorzellen gefunden wird (BERMAN 2002, XU 2004), könnte die Beteiligung bei der beobachteten Protektion durch IL-8 über die Aktivierung dieses Faktors verlaufen. Dafür spricht auch die Erhöhung der Radioresponse durch die Inhibition von NF-kappaB bei Prostatakarzinomzelllinien (KIM 2005).

HANSON *et al.* zeigten die schützenden Effekte von PGE₂ beim intestinalen Darmepithel vor der bestrahlungsinduzierten Apoptose (HANSON 1985). Bei Tumorzellen wurden diesem Eicosanoid ebenfalls protektive Wirkungen nach Bestrahlung zugeschrieben (MILAS 1990). In Anbetracht dieser publizierten Daten könnten IL-8 und PGE₂ auch bei HNSCC an der Protektion vor dem strahleninduzierten Zelltod beteiligt sein. Um die molekularen Ereignisse, die zu der beobachteten Protektion führen, aufzuklären, sollten weitere Studien durchgeführt werden.

Die induzierten Faktoren der Tumorzellen schützten auch Endothelzellen vor dem strahleninduzierten Zelltod, was nach Inkubation von HUVEC mit CM und bei der Kokultur deutlich wurde: Nach Bestrahlung der HUVEC war die Zahl der Überlebenden, die mit bestrahlten Tumorzellen oder deren CM kultiviert wurde, höher (Abb. 27, 28 und 29). Bei der CM-vermittelten Protektion erwiesen sich CM der höheren Bestrahlungsdosen als effektiver im Vergleich zu CM niedrigerer Dosen. Weiterhin wirkten sich CM auch fördernd auf die Heilungsfähigkeit von HUVEC aus, wobei sich auch hier wieder die CM höherer Bestrahlungsintensitäten als effektiver erwiesen (Bild 1 und Abb. 30). Den gezeigten Daten zu folge verursachten die hohen Strahlendosen die Induktion einer Stressantwort, die in der erhöhten Freisetzung u.a. protektiv wirkender Faktoren resultierte. Dies wird

durch die deutlicheren Effekte der Protektion von HUVEC durch CM von mit 30 Gy bestrahlten Tumorzellen unterstützt.

Für VEGF und FGF-2 wurden bei Endothelzellen protektive Eigenschaften nach Bestrahlung beschrieben (GORSKI 1999, PARIS 2001), was die eigenen Ergebnisse bzgl. der Protektion durch VEGF untermauert (BRIEGER 2004). Wie in vorherigen Experimenten gezeigt, sezernieren die untersuchten HNSCC-Linien beide Faktoren, wodurch vermutlich ein Teil der HUVEC-Protektion durch Kokultur oder CM vermittelt wurde. Neben VEGF und FGF-2 ist sicherlich eine Reihe weiterer Faktoren für die Protektion des Endothels verantwortlich. Die das Überleben der Endothelzellen fördernden Effekte der Tumorzellen wurden in anderen *in vitro*-Studien mit Glioblastomzelllinien festgestellt. KHODAREV *et al.* beschrieben eine tumorzellvermittelte erhöhte Proliferation, Migration und Angiogenese der HUVEC (KHODAREV 2002). Die Autoren stellten auch fest, dass sich die tumorzellvermittelte Aktivierung ruhender Endothelzellen in der Induktion von proangiogen wirkenden Rezeptoren und Liganden auswirkte. Die Autoren vermuten in diesem Zusammenhang eine Induktion durch seitens der Tumorzellen freigesetzten Wachstumsfaktoren. In der gleichen Arbeitsgruppe wurde unlängst gezeigt, dass HUVEC durch kokultierte Glioblastomzellen vor dem strahlenvermittelten Zelltod geschützt wurden (BROWN 2004). Durch die Behandlung mit Antikörpern gegen VEGF und der daraus resultierenden erhöhten strahleninduzierten Apoptose zeigten die Autoren die Beteiligung dieses Faktors an der tumorzellvermittelten Protektion. Die Autoren schlossen daraus, dass tumorassoziierte Endothelzellen durch die erhöhte Expression von Genen, die mit dem Überleben assoziiert sind, wie Zellzyklus regulierende und DNS-Reparaturproteine, Resistenz gegenüber zytotoxischen Therapien entwickeln können. Die Arbeiten von BROWN *et al.* und KHODAREV *et al.* untermauern die in dieser Arbeit gezeigten Daten der Protektion durch die untersuchten HNSCC-Linien und zeigen mögliche Wirkmechanismen der Kokultur auf. Allerdings steht die weitere Evaluation der beteiligten Faktoren an der bestrahlungsvermittelten Protektion bei HNSCC und HUVEC noch aus. Um die durch HNSCC-Linien induzierten Faktoren und Mechanismen bei HUVEC umfänglich zu erfassen, würde sich die Analyse der Genexpression bei HUVEC mittels Microarray anbieten. Die Aufklärung dieser Faktoren könnte einen wichtigen Beitrag zum weiteren Verständnis der Strahlenresistenz leisten.

5.3 Die VEGF-subtypspezifische Protektion von Tumor- und Endothelzellen vor dem strahleninduzierten Zelltod

Für die Progression neoplastischer Gewebe ist die Neoangiogenese essentiell. Das Blutgefäßsystem sorgt nicht nur für die Nährstoffversorgung und den Abtransport von Stoffwechselprodukten, sondern ermöglicht auch die Ausdehnung des Tumors. Die VEGF-Expression wurde bei vielen Tumorenitäten gefunden (NISHIKAWA 1998, PLATE 1992, BROWN 1993A und B, 1995, BRIEGER 1999), und schützt, wie in vorherigen Experimenten gezeigt, Tumor- und Endothelzellen vor dem bestrahlungsinduzierten Zelltod. Derzeit gibt es keine übereinstimmenden Aussagen über die Bedeutung der VEGF-Subtypen bei der Tumorgenese. Dass den Subtypen eine wichtige Rolle zukommen könnte, zeigen die Daten von VLACHTSIS *et al.* Die Autoren fanden, dass das Wachstum transplantierte Tumore vom Expressionsverhältnis der VEGF-Subtypen zueinander abhängt (VLACHTSIS 2002). Da die Bedeutung der VEGF-Subtypen beim Überleben und der Proliferation von Tumor- und Endothelzellen nach Bestrahlung bisher nicht gezeigt wurde, wurden die wichtigsten an der Angiogenese beteiligten VEGF-Subtypen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ diesbezüglich untersucht.

Im Koloniebildungsassay wurden Tumorzelllinien und HUVEC mit Intensitäten von 0,5 bis 8 Gy bestrahlt. Verglichen mit der Kontrolle nahm die Anzahl der überlebenden Zellen mit ansteigenden Intensitäten ab (Abb. 29). Für beide Subtypen konnten protektive Eigenschaften gegenüber Bestrahlung bei beiden Zelltypen festgestellt werden, wenngleich mit unterschiedlicher Effektivität: VEGF₁₂₁ bewirkte bei den HNSCC-Linien einen signifikant höheren Schutz vor dem bestrahlungsinduzierten Zelltod als VEGF₁₆₅. HUVEC wurden stärker durch VEGF₁₆₅ geschützt. Beim Vergleich der Intensität, die das Überleben um 50% reduziert (LD₅₀, letale Dosis), wurde bei den Tumorzelllinien durch VEGF₁₆₅ eine Erhöhung um 1 Gy festgestellt, entsprechend 83%. VEGF₁₂₁ erhöhte die LD₅₀ bei diesen Zellen um 1,5 Gy, entsprechend 125%. Das Überleben der HUVEC nach Bestrahlung wurde stärker durch VEGF₁₆₅ geschützt. Dieser Subtyp bewirkte eine um 100% erhöhte LD₅₀. VEGF₁₂₁ verschob die LD₅₀ noch um 43%. Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu den erhobenen Daten mit Tumorzellen, wobei VEGF₁₂₁ effektiver schützte als VEGF₁₆₅.

Übereinstimmend mit den Daten des Koloniebildungsassays, wurde die Proliferation der HUVEC durch die Administration beider VEGFs erhöht. Wie beim Koloniebildungsassay auch, übte VEGF₁₆₅ einen stärkeren Effekt als VEGF₁₂₁ aus (Abb. 30C). Im Gegensatz zum Überleben wurde die Proliferation der untersuchten Tumorzelllinien durch VEGF nicht beeinflusst (Abb. 30C).

Um die Beteiligung von VEGF-Rezeptoren an den zytoprotektiven Effekten der VEGF-Subtypen zu evaluieren, wurden die Tumorzelllinien und HUVEC auf die Expression von VEGFR-1, VEGFR-2 und NP-1 untersucht. Alle Kulturen zeigten sich hinsichtlich der Rezeptor-Expression positiv.

Die beobachtete Protektion und erhöhte Proliferation von HUVEC durch VEGF₁₆₅ nach Bestrahlung wurde auch in anderen Studien gezeigt. GORSKI *et al.* fanden ein erhöhtes Überleben von HUVEC durch VEGF₁₆₅ nach Bestrahlung, und KERMANI *et al.* beschrieben eine erhöhte Proliferation von HUVEC durch diesen VEGF-Subtyp nach Bestrahlung (GORSKI 1999, KERMANI 2001). Die Bestrahlungsinduktion von VEGF bei verschiedenen Tumorzelllinien wurde ebenfalls durch GORSKI *et al.* gezeigt und durch die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt (BRIEGER 2004 und 2005B, GORSKI 1999).

Die Proliferation der Tumorzellen hingegen wurde durch keinen der beiden VEGF-Subtypen erhöht. Die Daten von GORSKI *et al.* zeigten nach Inkubation von Tumorzellen mit VEGF₁₆₅ ebenfalls keine erhöhte Proliferation, was durch VEGF-neutralisierende Antikörper verifiziert wurde (GORSKI 1999). Dies korreliert mit der fehlenden Antwort der Tumorzellen auf diesen VEGF-Subtyp beim Koloniebildungsassay.

Die Erhöhung der LD₅₀ durch VEGF um bis zu 1,5 Gy bei Tumorzellen und 0,7 Gy bei Endothelzellen könnte bei der RT relevant sein, da hier in der Regel mit 2 Gy bestrahlt wird. Möglicherweise könnte das bestrahlungsinduzierte VEGF der Tumorzellen das Überleben der tumorassoziierten Endothelzellen erhöhen, was somit zur Erhöhung der Radioresistenz beitragen würde.

Um die Korrelation der subtypspezifischen Effekte mit der VEGF-Rezeptor Expression zu evaluieren, wurde die Expression des VEGFR-1, VEGFR-2 und von NP-1 auf den Tumor- und Endothelzellen untersucht. LALLA *et al.* wiesen ebenfalls VEGFR-1 und VEGFR-2 auf HNSCC mittels immunhistochemischer Detektion nach (LALLA 2003). Obwohl die NP-1 Expression auch auf anderen Tumorenitäten wie des Magens und der Prostata gezeigt wurde (AKAGI 2003, MIAO 2000, SOKER 1998), wurde dieser Rezeptor meiner Erkenntnis nach bisher nicht auf HNSCC nachgewiesen. Da alle untersuchten Zelltypen, wenn auch mit leicht unterschiedlicher Ausprägung, positiv für die Rezeptoren waren liegt hier sicher nicht die Ursache der beobachteten subtypspezifischen Effekte. Die unterschiedlichen Antworten auf die VEGF-Subtypen könnten daher in zelltypspezifischen Unterschieden der intrazellulären Signaltransduktion nach Rezeptoraktivierung liegen. Andererseits könnte die angewandte Methode der Immunhistochemie nicht sensitiv genug sein, um geringe, aber möglicherweise physiologisch relevante Unterschiede der Expressionsniveaus zu detektieren, worauf die subtypspezifischen Effekte zurückzuführen sein könnten.

Anhand der gezeigten Daten könnte durch die Neutralisation des VEGF ein wichtiger Mediator der Radioresistenz während der Tumorthherapie entfernt werden, wodurch möglicherweise die Effektivität der Behandlung zu steigern wäre. Mit Avastin wurde ein spezifischer Antikörper gegen humanes VEGF entwickelt, der beim Kolonkarzinom bereits klinische Anwendung findet (PRESTA 1997). Allerdings ist zu bedenken, dass eine vollständige VEGF-Inhibition die Kompensation durch andere Mechanismen induzieren könnte. Auch unterscheidet eine solche Therapie nicht zwischen den VEGF-Subtypen, was auch die Inhibition von Subtypen mit antiangiogenen Eigenschaften, wie die des VEGF_{165b}, zur Folge hätte (WOOLARD 2004, BATES 2002). Die kombinierte Therapie aus Bestrahlung und antiangiogenen Substanzen wurde von anderen Autoren untersucht und zeigte viel versprechende Ergebnisse, so dass es bereits zur Anwendung in klinischen Studien kam. Auf weitere antiangiogene Therapien wird in den folgenden Abschnitten weiter eingegangen.

Bei der Inhibition der VEGF-vermittelten Zellantwort sollte jedoch die mögliche Induktion kompensatorischer Wege in Betracht gezogen werden, die das Fehlen des VEGF-Signals aufheben könnten. Daher stellt die Inhibition der Bestrahlungsinduktion von VEGF und der Beteiligung der induzierten intrazellulären Signaltransduktionskomponenten ein wichtiges Ziel weiterer Studien dar.

5.4 Die Bedeutung des VEGFR-2 bei der VEGF- und bestrahlungsvermittelten Zellantwort

Der VEGFR-2 vermittelt die meisten an der Angiogenese beteiligten Mechanismen. Proliferation, Migration, Invasion und Überleben der Endothelzellen werden maßgeblich über diesen Rezeptor gesteuert. In einer aktuellen Studie zeigten LI *et al.*, dass die Blockierung des VEGFR-2 durch einen spezifischen Antikörper bei HUVEC verschiedene, in die Angiogenese involvierte Stufen, inhibierte. Dazu zählen die Proliferation, das Überleben, die Migration und die Differenzierung der Zellen zum angiogenen Phänotyp (LI 2005). Die intrazelluläre Signaltransduktion des VEGFR-2 nach Ligandenbindung oder Bestrahlung verläuft u.a. über die Aktivierung von PI3K / Akt (ABEDI 1997, EDWARDS 2002, VEIKKOLA 2000, ZACHARY 2003). Beide Komponenten regulieren ihrerseits neben der VEGF- auch die FGF-2 Expression (GAO 2002, ZACHARY 2003). Die Vermeidung der VEGFR-2 Aktivierung könnte daher zum Erfolg der RT beitragen, da dessen Aktivierung vermutlich auch mit der Radioresistenz korreliert. Dies konnte bei verschiedenen *in vivo*-Studien

durch die kombinierte Gabe von VEGFR-2 spezifischen Antikörpern mit Bestrahlung gezeigt werden. KOZIM *et al.* beschrieben bei Xenotransplantaten eine Verringerung der zur 50%igen Tumorkontrolle notwendigen Bestrahlungsdosis um das 1,5fache durch einen VEGFR-2 spezifischen Antikörper (KOZIM 2001). LI *et al.* zeigten *in vivo* die additiven Effekte eines VEGFR-2 Antikörpers in Kombination mit Bestrahlung (LI 2005). Zusammengefasst verdeutlichen diese Daten die wichtige Funktion des VEGFR-2 bei der Radioresistenzbildung im Tumorgewebe.

In vorherigen Experimenten wurde die unterschiedliche VEGF-subtypspezifische Protektion von HUVEC und Tumorzellen gezeigt. VEGF schützte beide Zelltypen, allerdings mit unterschiedlicher Subtypspezifität: HUVEC wurden stärker durch VEGF₁₆₅ und Tumorzellen durch VEGF₁₂₁ vor dem bestrahlungsinduzierten Zelltod geschützt. Durch den immunhistochemischen Nachweis der VEGF-Rezeptoren ließ sich die Subtypspezifität der Zelltypen jedoch nicht erklären, da die untersuchten Zelltypen alle drei Rezeptoren exprimierten. In weiteren Untersuchungen sollte mit den VEGF-Subtypen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ die Aktivierbarkeit, d.h. Phosphorylierung des VEGFR-2 bei HUVEC und Tumorzellen evaluiert werden.

Dazu wurden HUVEC und Zellen einer HNSCC-Linie mit beiden VEGF-Subtypen kultiviert. Die Rezeptoraktivierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Der VEGFR-2 wurde bei HUVEC durch beide VEGF-Subtypen aktiviert (Abb. 31A). Es war jedoch eine deutliche Subtypspezifität erkennbar. Durch die Stimulation mit VEGF₁₂₁ war eine zeitliche Zunahme der Rezeptoraktivierung festzustellen. Nach 10 min wurde die maximale Aktivierung festgestellt und es lagen 65% des gesamten VEGFR-2 phosphoryliert vor. VEGF₁₂₁ bewirkte zu keinem Zeitpunkt die Aktivierung des gesamten VEGFR-2. Mit VEGF₁₆₅ war die maximale Stimulation bereits nach einer Minute erreicht, und der gesamte VEGFR-2-Gehalt war aktiviert. Im weiteren Verlauf nahm der Gehalt an phospho-VEGFR-2 kontinuierlich ab.

Die Tumorzelllinie war immunhistochemisch für den VEGFR-2 positiv. Um die Beteiligung des Rezeptors an der in vorherigen Experimenten gezeigten Protektion durch autologes und rekombinantes VEGF festzustellen, wurden Zellen einer Tumorzelllinie mit den VEGF-Subtypen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ kultiviert. Allerdings war der im Zelllysate quantifizierte Rezeptorgehalt zu niedrig, um verlässliche Aussagen über dessen Phosphorylierungszustand zu machen. Es sei jedoch erwähnt, dass unter jeder Behandlung Phospho-VEGFR-2 detektiert wurde, wobei allerdings keine Subtypspezifität erkennbar war (Abb. 31B).

Die deutlich stärkere Rezeptoraktivierung durch VEGF₁₆₅ bei HUVEC bestätigt die Daten des Koloniebildungs- und Proliferationsassays. Bei beiden Studien zeigte dieser

Subtyp deutlichere Effekte im Vergleich zu VEGF₁₂₁. Demzufolge könnte für die Erhöhung des Überlebens und der Proliferation von HUVEC eine stärkere Rezeptoraktivierung von Vorteil sein. VEGF₁₂₁ verursachte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte die Aktivierung des gesamten VEGFR-2. Dies könnte eine schwächere intrazelluläre Signaltransduktion und als Folge eine geringeren Induktion von Reperaturmechanismen und Expression weiterer das Überleben fördernden Faktoren verursachen, wodurch sich letztendlich die beobachtete geringere Protektion dieses Subtyps bei HUVEC erklären ließe.

Da der VEGFR-2 bei Tumorzellen nicht die gleiche Aktivierbarkeit aufweist wie bei Endothelzellen, scheint die Funktion der Rezeptoren Tumorzellen unklar. Die in dieser Arbeit beschriebene autologe Protektion der Tumorzellen durch das in den konditionierten Kulturmedien enthaltene freigesetzte VEGF und die Protektion durch rekombinantes VEGF scheint demnach nicht durch den VEGFR-2 vermittelt zu werden.

Der VEGFR-2 wurde neben HNSCC auch bei anderen Tumoren wie dem Mammakarzinom und Glioblastom gezeigt (LALLA 2003, MENTLEIN 2004, PRICE 2001). Nach bisherigen Erkenntnissen ist die Funktion der VEGF-Rezeptoren auf Tumorzellen unklar. LALLA *et al.* vermuteten allerdings die autokrine Regulation der Tumorzellaktivität über die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 (LALLA 2003). Die in dieser Arbeit untersuchte Tumorzelllinie sezerniert VEGF (Abb. 18), was jedoch keine Korrelation zu der Aktivierbarkeit des VEGFR-2 erkennen lässt. MENTLEIN *et al.* fanden die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und -2 auf Glioblastomzellen im Vergleich zu kultivierten Endothelzellen ebenfalls deutlich schwächer exprimiert (MENTLEIN 2004). Glioblastomzellen sezernieren auch VEGF, allerdings war durch die Applikation von VEGF, wie in den eigenen Untersuchungen auch, eine nur sehr schwache Rezeptoraktivierung festzustellen. Die Aktivierung nachgeschalteter Kinasen oder Transkriptionsfaktoren konnten die Autoren nicht feststellen, woraus sie schlossen, dass die funktionellen Effekte der VEGF-Rezeptoraktivierung bei Glioblastomzellen niedrig sind und, falls überhaupt, nur eine sehr geringe autokrine Wachstumsstimulation stattfindet. Bei der autokrinen Regulation der Zellaktivität müsste demzufolge die Aktivierung des VEGFR-2 durch das autologe VEGF erfolgen, was jedoch, wie auch in den eigenen Arbeiten gezeigt, nicht zu beobachten war.

Die beobachteten protektiven Effekte des VEGF bei Tumorzellen könnten auch über den VEGFR-1 vermittelt worden sein. Die Tumorzelllinien zeigten sich für diesen Rezeptor immunhistochemisch ebenfalls positiv. Um dessen Bedeutung an der VEGF-vermittelten Protektion zu analysieren wäre es sinnvoll, die Aktivierung des VEGFR-1 durch VEGF zu untersuchen. HEROLD-MENDE *et al.* zeigten die Expression dieses Rezeptors auf HNSCC und beschrieben, dass die Stimulation des VEGFR-1 mit VEGF₁₆₅ eine proliferationsregulierende Funktion ausübt (HEROLD-MENDE 1999). Die Autoren

überlegten, dass die Rezeptoraktivierung ein autokrines Signal zur Wachstumsinhibition vermitteln könnte, das bei entsprechenden Umweltbedingungen das Überleben der Zellen sicherstellen würde. Dies könnte dann nötig sein, wenn der Tumor durch das ungehemmte Wachstum über dessen versorgendes Gefäßsystem hinauswächst. Durch die eintretende Hypoxie wird VEGF induziert, was die Aktivierung des gefäßassoziierten Endothels verursacht. Sinnvollerweise würden sich die Tumorzellen damit selbst signalisieren das eigene Wachstum einzustellen, um so lange zu überleben, bis die Gefäßversorgung wieder gewährleistet ist. Dies könnte daher auch die das Überleben der Tumorzellen fördernden Effekte des VEGF beim Koloniebildungsassay erklären, da sich dieser Assay über einen längeren Zeitraum als der Proliferationsassay erstreckt (10 Tage vs. 24h). Die beschriebene VEGF-vermittelte Protektion bei Tumorzellen wurde erst nach diesem längeren Zeitraum deutlich. Für diese Sicht spricht auch die Tatsache, dass Bestrahlung neben der direkten Induktion der Apoptose auch den Stillstand des Zellzyklus verursacht, wonach die geschädigten Zellen auch erst nach weiteren Mitosen sterben. Dementsprechend könnte die VEGF-vermittelte Protektion auch erst nach einem längeren Zeitraum eintreten. Würde eine Beteiligung des VEGFR-1 bei der Tumorzellprotektion durch VEGF bestätigt, würden mit dem Einsatz anti-VEGF-Antikörper neben der Inhibition der Endothelzellaktivierung auch die proliferationsreduzierende Wirkung des VEGF auf VEGFR-1 exprimierende Tumorzellen aufgehoben werden. Da proliferierende Zellen durch Bestrahlung angreifbarer sind, wären die in ihrer Proliferation ungehemmten Tumorzellen einer RT besser zugänglich.

Diese Daten sprechen aber auch für die Bedeutung des VEGFR-2 beim tumorassoziierten Endothel und betonen auch in Anlehnung an Abschnitt 5.3 die Notwendigkeit der Vermeidung der Rezeptoraktivierung bei Endothelzellen zur Erhöhung des Erfolges der RT.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass anti-VEGFR-2 Antikörper den Erfolg der RT bei xenotransplantierten Tumoren erhöhen (KOZIN 2001, LI 2005). Bestrahlung scheint weiterhin auch generell die Aktivierung von Rezeptoren des Thyrosinkinase-Typs zu bewirken. Die bestrahlungsvermittelte, ligandenunabhängige Aktivierung wurde für den EGFR bei Tumorzellen, wie auch für den VEGFR-2 bei Endothelzellen gezeigt (CONTESSA 1999, KAVANAGH 1995, SCHMIDT-ULLRICH 1997 und 2003, ZINGG 2004). Daher sollte bei den im Labor etablierten HNSCC-Linien die ligandenunabhängige Aktivierung des VEGFR-2 durch Bestrahlung eruiert werden. Da die bestrahlungsvermittelte Aktivierung des Rezeptors bei HUVEC gezeigt wurde, wurden diese Zellen zur Bestätigung mitgeführt. Weder HUVEC noch Tumorzellen zeigten zu einem der untersuchten Zeitpunkte eine ligandenunabhängige Aktivierung des VEGFR-2 nach einer 2 Gy-Dosis (Abb. 34A und B). Bei der

untersuchten Tumorzelllinie wurden auch in diesen Experimenten nur sehr geringe Konzentrationen des aktivierten VEGFR-2 detektiert, so dass aufgrund der hohen Meßgenauigkeit keine verlässige Aussage über eine bestrahlungsvermittelte Aktivierung gemacht werden kann. Es sei dennoch erwähnt, dass ein leichter Anstieg des Phospho-VEGFR-2 nach einer 2 Gy-Dosis zu verzeichnen war.

Im Gegensatz zu den Daten von ZINGG *et al.* konnte in den eigenen Untersuchungen keine bestrahlungsvermittelte Aktivierung des VEGFR-2 bei HUVEC festgestellt werden. ZINGG *et al.* beschrieben die ligandenunabhängige VEGFR-2 Aktivierung 5 Minuten nach einer 2 Gy-Dosis bei Endothelzellen *in vitro*, was die Aktivierung der PI3K / Akt Kaskade bewirkte (ZINGG 2004). In der eigenen Arbeit wurden die Zeitpunkte 1, 2, 5, 10 und 30 Minuten nach einer 2 Gy-Dosis untersucht und zu keinem der Meßpunkte wurde eine erhöhte Phosphorylierung des Rezeptors festgestellt. ZINGG *et al.* bestimmten die Phosphorylierung des VEGFR-2 mittels Immunfluoreszenz, während in der vorliegenden Arbeit die getrennte Quantifizierung des Gesamt- und des Phospho-VEGFR-2-Gehalts mittels sensitiverem ELISA erfolgte. Die verwendeten Methoden zwar sind unterschiedlich sensitiv, der Nachweis mittels Immunfluoreszenz ist, wie ELISA auch, dennoch sehr spezifisch, was die widersprüchlichen Ergebnisse nicht begründet. Auch ist ein Defekt der Bestrahlungsanlage auszuschließen, da deren Wirksamkeit in anderen Experimenten gezeigt wurde. Aufgrund der beobachteten Abnahme der Zellzahl nach hohen Bestrahlungsintensitäten (Abb. 19) ist davon auszugehen, dass die Bestrahlung der Zellen auch in diesen Experimenten stattfand. Daher bleibt unklar, weshalb keine bestrahlungsvermittelte VEGFR-2 Aktivierung in den Studien zu dieser Arbeit gefunden wurde.

VEGF fördert das Überleben von Tumor- und Endothelzellen nach Bestrahlung. Bei Endothelzellen werden die Effekte des VEGF auch über den VEGFR-2 vermittelt. Daher scheint die Inhibition der VEGFR-2 Aktivierung bei der Tumorthherapie zur Erhöhung des RT-Erfolges sinnvoll. Untersuchungen mit Rezeptor-spezifischen Antikörpern und der daraus resultierenden Inhibition der Kinaseaktivität zeigen viel versprechende Wirkungen. Teilweise finden die Inhibitoren bereits Anwendung in der klinischen Tumorthherapie. So blockiert beispielsweise PTK787 / ZK222584 die Aktivierung aller bekannten VEGF-Rezeptoren, reduziert die Endothelzellproliferation, jedoch nicht die Tumorzellproliferation, und bewirkte den deutlichen Rückgang transplantierte humaner Tumorzelllinien (HESS-STUMPP 2005). In der kombinierten Therapie mit Bestrahlung zeigte PTK787 / ZK222584 additive Effekte (HESS 2001). Die Substanz befindet sich in der III. Phase klinischer Studien zur Anwendung bei Karzinomen des Kolorektums. Mit AZD2171 wurde ein selektiver VEGFR-2 Inhibitor entwickelt, der die Endothelzellproliferation sowie

die Etablierung und das Wachstum xenotransplanteder Tumore reduziert. Die Substanz findet Anwendung in der klinischen Tumorthapie (WEDGE 2005). SU5419 ist ein selektiver VEGFR-2 Inhibitor, der in Verbindung mit Bestrahlung und Chemotherapie Proliferation, Überleben, Migration und Differenzierung von Endothelzellen *in vitro* über die Inhibition der Akt-Phosphorylierung deutlich reduzierte, wobei die Effekte bei Tumorzellen schwächer ausfielen (BISCHOF 2004).

In den beschriebenen Studien verursachte die VEGFR-Blockierung den Rückgang der Tumorprogression. Das Schrumpfen der transplantierten Tumore ist in den meisten Fällen auf den Rückgang der Gefäßdichte zurückzuführen. Durch die reduzierte Gefäßversorgung wird das maligne Gewebe schnell hypoxisch und unzureichend mit Nährstoffen versorgt. Dauert die VEGFR-2 Blockierung an, kann keine Rekrutierung neuer Gefäße durch die Hypoxie-induzierte VEGF-Freisetzung seitens des Tumors stattfinden, woraufhin das Tumolvolumen abnimmt. Bei der kombinierten Antiangiogenese-Radiotherapie wird der Erfolg der RT durch die eintretende Hypoxie infolge der reduzierten Gefäßdichte im Tumor eingeschränkt. Im hypoxischen Gewebe entstehen aufgrund des niedrigen pO_2 weniger Sauerstoffradikale in der Zellen, wodurch die Strahlenschäden in geringerem Maße auftreten als bei gut oxigenierten Geweben. Diese Beobachtung machten WILLIAMS *et al.* bei der kombinierten Behandlung von VEGFR-Inhibitoren mit Bestrahlung *in vivo* (WILLIAMS 2004). Die Autoren fanden, dass der Erfolg der durchaus vom Behandlungsplan abzuhängen scheint, da eine deutlich verstärkte Wachstumsverzögerung der transplantierten Tumore bei Gabe des Inhibitors nach der letzten Dosis der Bestrahlungsreihe im Vergleich zur Gabe vor jeder Bestrahlung zu beobachten war. WINKLER *et al.* beobachteten bei der Blockierung des VEGFR-2 ein „optimales Fenster“ mit erhöhter Tumoroxygenierung, in dem die RT am effektivsten war (WINKLER 2004). Da der Erfolg vor und nach diesem „Fenster“ geringer war, schlossen die Autoren, dass die kombinierte Antiangiogenese-Radiotherapie bei soliden Tumoren mit einer zytotoxischen Therapie kombiniert werden sollte.

Für die Notwendigkeit der Anwendung von Substanzen mit verschiedenen zellulären Zielen spricht auch die Beobachtung der sich im Verlauf der Tumorprogression oder Resistenzbildung verändernden Expressionsmuster angiogener Faktoren (RELF 1997). Daher könnten sich Inhibitoren, die nur ein angiogenes Ziel haben, durch die Entwicklung einer „erworbenen Substanzresistenz“ als unwirksam erweisen. Das sich während der Therapie meist spät entwickelnde Ausbleiben der Antwort auf die Behandlung könnte durch die rechtzeitige Kombination mit weiteren Angiogeneseinhibitoren und/oder zytotoxischer Chemotherapie verhindert werden (BROWDER 2000, HANAHAN 2000A, KLEMENT 2000).

5.5 Die Effekte der Cox-Inhibitoren

Ionisierende Strahlung verursacht neben den erwünschten Effekten wie Induktion der Apoptose und Wachstumsstillstand, auch die erhöhte Freisetzung angiogener Faktoren wie u.a. VEGF und FGF-2 bei Tumorzellen. Diese Faktoren schützen Tumor- und Endothelzellen von dem Strahlentod, was den Erfolg der RT maßgeblich reduziert. In vorherigen Abschnitten wurde die Bedeutung des VEGF und dessen Rezeptoraktivierung bei der Progression etablierter Tumore dargestellt und es wurden die viel versprechenden antitumoralen Effekte antiangiogener Substanzen wie Antikörper gegen VEGF und die VEGF-Rezeptoren in Verbindung mit Bestrahlung aufgezeigt. Zur Erhöhung der Antwort auf die RT scheint jedoch die Vermeidung der Induktion protektiv wirkender Faktoren bei Tumorzellen durch Bestrahlung sinnvoll.

Cox-2 ist ein induzierbares Enzym, das die Synthese der Prostaglandine katalysiert. Die Prostaglandine, insbesondere PGE₂ spielen bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle, da sie die Proliferation, Apoptose und Angiogenese beeinflussen (DANNENBERG 2001, SHENG 1998). Cox-2 liegt bei vielen Tumorerkrankungen, wie auch dem HNSCC häufig überexprimiert vor und scheint mit einer schlechten Prognose zu korrelieren (CHAN 1999, ZWEIFEL 2002). Pharmakologische *in vivo*-Studien zeigten, dass Cox-2 Inhibitoren die Tumormanifestation und –progression reduzieren (SAWAOKA 1999, ZWEIFEL 2002). Dieser Rückgang *in vivo* beruht auf apoptotischen Vorgängen der malignen Zellen. *In vitro* wurde keine Cox-Inhibitor vermittelte Induktion der Apoptose festgestellt (SAWAOKA 1999). Cox-Inhibitoren bewirken weiterhin eine Verstärkung der antitumoralen Effekte der RT (MILAS 1999 und 2001). Die zellulären Zusammenhänge zwischen dem Schrumpfen malignen Gewebes und der Cox-Expression wurden bisher nicht klar erkannt. Allerdings scheinen die antitumoralen Effekte der NSAIDs neben der Cox-abhängigen auch Cox-unabhängige Mechanismen zu induzieren.

Nach Bestrahlung wurde neben erhöhten PGE₂-Konzentrationen auch eine erhöhte Cox-2-Expression gefunden (BILLINGS 1994, LI 2003B, STEINAUER 2000). LIM *et al.* zeigten eine Korrelation der Cox-2 Überexpression mit der VEGF-Expression (LIM 2003) und beim Prostatakarzinom wurde die Hochregulation der VEGF-Expression infolge der Cox-2-Induktion dargestellt (LIU 1999). Weiterhin beschrieben CHENG *et al.* die erhöhte VEGF- und FGF-2-mRNA Expression nach Inkubation mit PGE₂ bei Rattenzellen (CHENG 1998).

Diese Beobachtungen lassen einen regulatorischen Zusammenhang der Cox-2- und VEGF-Expression beim Tumor nach Bestrahlung vermuten. Daher wurde in dieser Arbeit die Beteiligung der Cyclooxygenasen an der Bestrahlungsinduktion durch die Applikation von Cox-Inhibitoren bei Tumorzelllinien untersucht.

Tumorzellen zweier Linien wurden mit den Cox-Inhibitoren Flurbiprofen, Meloxicam und Lumiracoxib kultiviert und bestrahlt (Abb. 36 – 42). Da die Angaben der IC₅₀-Werte der Cox-Inhibitoren häufig aus Inhibitionsexperimenten mit rekombinanten Cox-Enzymen stammen, und daher nicht uneingeschränkt auf die vorliegenden *in vitro* Bedingungen übertragbar sind, wurden die drei Substanzen in Konzentrationsreihen angewendet. Die intrazelluläre Wirksamkeit von Flurbiprofen wurde durch den nahezu vollständigen Rückgang des induzierten PGE₂ gezeigt (Abb. 39).

Weder Flurbiprofen, Meloxicam noch Lumiracoxib reduzierten mit den untersuchten Konzentrationen deutlich die Bestrahlungsinduktion von VEGF und IL-8 bei Tumorzelllinien. Die basale VEGF-Freisetzung der Zellen wurde durch die Substanzen ebenfalls nicht moduliert. Da die Cox-Inhibitoren weder im selektiven, noch unselektiven Konzentrationsbereich die Freisetzung von VEGF und IL-8 verringerte, scheinen die Cyclooxygenasen nicht an der Bestrahlungsinduktion dieser Faktoren beteiligt zu sein. Angaben der Literatur zufolge, bewirkten die selektiven Cox-2-Inhibitoren Diclofenac und Rofecoxib bei Karzinomzelllinien des Ösophagus eine deutliche Reduktion der VEGF-Expression, wohingegen der unselektive Inhibitor SC-560 die VEGF-Expressionslevel der untersuchten Zelllinien nicht beeinflusste (VON RAHDEN 2005). In dieser Studie wurden die Zellen längstens 24h mit den Inhibitoren kultiviert. In den Untersuchungen dieser Arbeit wurden das freigesetzte VEGF der Tumorzelllinien erst nach 72h quantifiziert. Da das Kulturmedium täglich erneuert wurde, konnte nur die innerhalb der letzten 24h freigesetzten Faktoren gemessen werden. Eine möglicherweise zeitlich begrenzte Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten Cox-Inhibitoren auf die VEGF-Expression könnte durch eine häufigere Probenahme festgestellt werden.

Die Cox-Inhibitoren Flurbiprofen, Meloxicam und Lumiracoxib modulierten die strahleninduzierte FGF-2 Freisetzung bei den untersuchten Tumorzelllinien. Dabei waren konzentrationsabhängige Effekte zu erkennen. Nur die höchste Flurbiprofen-Konzentration bewirkte eine deutlich reduzierte bestrahlungsinduzierte FGF-2 Freisetzung bei allen Tumorzelllinien. Die niedrigeren Lumiracoxib-Konzentrationen induzierten die bestrahlungsvermittelte FGF-2 Sezernierung zusätzlich. Wie auch bei Flurbiprofen zu beobachten war, reduzierte die höchste Lumiracoxib-Konzentration die Bestrahlungsinduktion von FGF-2. Bei Meloxicam bewirkte ebenso nur die höchste Konzentration eine tendenziell verringerte Bestrahlungsinduktion dieses Faktors.

Da die Inhibitoren nur die bestrahlungsinduzierte und nicht die basale FGF-2 Sezernierung modulierten, scheinen die intrazellulären Ziele der Substanzen neben der Cox-Inhibition auch bestrahlungsinduzierte Faktoren zu sein. Die verringerte Bestrahlungsinduktion von FGF-2 trat bei allen untersuchten Inhibitoren erst mit der

jeweils höchsten Substanzkonzentration auf. Bei Flurbiprofen war diese Konzentration mit 200 μM deutlich höher als zur Inhibition der PGE_2 -Synthese nötig gewesen wäre (die nahezu vollständige Inhibition der PGE_2 -Induktion wurde bereits mit 0,4 μM Flurbiprofen erreicht, Abb. 39). Da die Effekte der Substanz auf die Bestrahlungsinduktion von FGF-2 bei einer Konzentration von 200 μM festgestellt wurden, sind Cox-unabhängige Mechanismen des Flurbiprofen zu vermuten. Bei den selektiven Cox-2 Inhibitoren Meloxicam und Lumiracoxib zeigten ebenfalls nur Konzentrationen deutlich oberhalb der IC_{50} für Cox-1 reduzierende Effekte auf die Induktion von FGF-2. Da bei den jeweils höchsten Substanzkonzentrationen (100 μM) die Cyclooxygenasen vermutlich vollständig inhibiert waren, scheinen, wie auch bei Flurbiprofen, Cox-unabhängige Mechanismen bei den beobachteten Effekten eine Rolle zu spielen.

Dass die antitumoralen Effekte der NSAIDs *in vivo* nicht nur auf die Apoptose-induktion bei Tumorzellen direkt zurückzuführen ist, sondern indirekt über Cox-unabhängige Mechanismen vermittelt werden, ist inzwischen gut belegt. Die Tumorangio-genese wird durch das Zusammenspiel sezernierter Wachstumsfaktoren aller am Tumor beteiligten Zelltypen wie den malignen Zellen selbst aber auch von Endothelzellen, Fibroblasten und tumorinfiltrierenden inflammatorischen Zellen gesteuert. Es häufen sich die Vermutungen, dass das tumorassoziierte Endothel und/oder das Stroma am NSAIDs-vermittelten Schrumpfen des Tumors beteiligt sind. SAWAOKA *et al.* beschrieben eine reduzierte VEGF- und FGF-2-Proteinkonzentrationen sowie eine deutlich reduzierte Angiogenese durch den Cox-2 Inhibitor NS-398 *in vivo* (SAWAOKA 1999). JONES *et al.* zeigten weiterhin die Beteiligung der MAP-Kinase Erk2 an der Angiogeneseinhibition durch die Cox-Inhibitoren NS-398 und Indomethazin bei Endothelzellen (JONES 1999).

Cox-unabhängige Effekte der NSAIDs wurden durch die Arbeiten von WILLIAMS *et al.* bei xenotransplantierten Cox-2 *knock-out* Mäusen deutlich (WILLIAMS 2000A). Die Autoren fanden neben der drastisch abgeschwächten Tumorprogression auch eine um 30% reduzierte Gefäßdichte durch den selektiven Cox-2 Inhibitor Celecoxib. Zudem wurde die VEGF-Sezernierung der tumorassoziierten, also Cox-2-negativen Fibroblasten bei Cox-2-defizienten Mäusen um über 90% verringert. Cox-unabhängige Effekte der Inhibitoren wurden auch bei xenotransplantierten Cox-2-defizienten Zelllinien durch die Reduktion der Tumorprogression festgestellt (GROSCH 2001, MARX 2001, ZHANG 1999). Dass Cox-Inhibitoren nicht nur bei Tumorzellen wirken, sondern auch Effekte auf Endothelzellen ausüben, konnte durch die in dieser Arbeit festgestellten Cox-unabhängigen Wirkungen bei HUVEC festgestellt werden. Die jeweils höchsten Konzentrationen von Flurbiprofen und Meloxicam bewirkten im Migrationsassay tendenziell eine Heilungsverzögerung (Abb. 44).

Der Rückgang des Tumorumfangs bei Cox-2 defizienten Tumortransplantaten oder transplantierten Cox-2 *knock out* Mäusen könnte auch darauf beruhen, dass Cox-2 bei Endothelzellen durch zelluläre Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und dem tumorassoziierten Gefäßendothel induziert wurde (MASFERRE 2000). Dies würde bedeuten, dass Tumorzellen die sie umgebenden Zellen hinsichtlich der Cox-2 Expression beeinflussen würden. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung von SOSLOW *et al.* unterstützt, bei welcher nur direkt benachbarte nicht-neoplastische Epithelzellen Cox-2 exprimierten und nicht die weiter entfernt liegenden epithelialen Bereiche (SOSLOW 2000). SATO *et al.* beschrieben die Zell-Zell-Kommunikation bei Tumorzellen und Fibroblasten. Durch die Kokultur wurde bei beiden Zelltypen die Hochregulation vieler Faktoren, mit teilweise proangiogenen Effekten wie u.a. Cox-2, festgestellt (SATO 2004).

Um die antitumoralen Effekte des Cox-2 Inhibitors NS-398 in Kombination mit Bestrahlung *in vivo* zu untersuchen, wurden Zellen einer HNSCC-Linie in SCID-Mäuse transplantiert. Dabei sollte festgestellt werden, ob durch NS-398 die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung erhöht werden können.

Beim Glioblastom-Xenotransplantat zeigte der Cox-2 Inhibitor SC-236 deutliche, die Bestrahlung erhöhenden Effekte (PETERSEN 2000). Die gleiche Substanz bewirkte in Kombination mit Bestrahlung eine etwa 3fach erhöhte Wachstumsverzögerung etablierter Mauskarzinome verglichen zur Wachstumsverzögerung durch Bestrahlung allein und ein um das 6fache verzögertes Wachstum im Vergleich zur alleinigen pharmakologischen Behandlung (MILAS 1999). Bei beiden Studien war die Antwort mit einer reduzierten Neovaskularisation assoziiert. PYO *et al.* fanden nur bei Cox-2-exprimierenden transplantierten Lungenkarzinomzellen durch NS-398 eine deutliche Wachstumsverzögerung in Kombination mit Bestrahlung (PYO 2001). Bei Cox-2-negativen Transplantaten zeigte NS-398 keine additiven Effekte zur Bestrahlung.

Obwohl von der in der vorliegenden Arbeit transplantierte Tumorzelllinie Cox-2-mRNA exprimiert wird (nicht publizierte Daten der eigenen Arbeitsgruppe) zeigte NS-398 keine die bestrahlungsvermittelte Regression des Tumors erhöhenden Effekte. Die RT an sich bewirkte bereits die vollständige Stagnation der Tumorprogression bis zum Tag 9 nach Behandlungsbeginn, was möglicherweise der Grund für die nicht beobachteten bestrahlungserhöhenden Effekte des NS-398 war. Dies würde bedeuten, dass durch die gewählte Bestrahlungsdosis die maximale Tumorkontrolle erreicht, und die NS-398-vermittelten Effekte überdeckt wurden. Dafür sprechen auch die Daten von PYO *et al.* Die Autoren fanden die Effekte der Bestrahlung erhöhenden Wirkungen von NS-398 bei transplantierten Cox-2-positiven Lungenkarzinomzellen. Allerdings wurden die Tumore mit einer kumulierten Gesamtdosis von 10 Gy (2 Gy/Tag an 5 aufeinander folgenden Tagen)

bestrahlt (PYO 2001). Wie in der eigenen Studie auch, fanden die Autoren in der NS-398-behandelten Gruppe ohne Bestrahlung ebenfalls keine wachstumsverzögernden Effekte.

Die in dieser Arbeit untersuchten Cox-Inhibitoren ließen bei den verwendeten Tumorzelllinien keine zytotoxischen Effekte erkennen. In weiteren Experimenten sollte festgestellt werden, welche Effekte die Substanzen auf das zelluläre Überleben ausüben. Dazu wurden die Tumorzellen im Koloniebildungsassay mit den Cox-Inhibitoren Flurbiprofen, Meloxicam, Lumiracoxib, NS-398 sowie ASA kultiviert. Nach etwa 10 Tagen wurden die Kolonien gezählt. Außer NS-398, bewirkten alle Substanzen ein deutlich reduziertes Überleben (Abb. 33 und 34). Demnach scheinen NSAIDs nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* antitumorale Effekte auszuüben. Dies wird durch *in vitro* Untersuchungen bei Kolonkarzinomzellen mit dem Cox-2-Inhibitor Celecoxib und dem Cox-1-Inhibitor SC560 deutlich. Die Substanzen bewirkten ein reduziertes Überleben der Zellen über die Inhibition des Zellzyklus (GROSCH 2001). Neben einer reduzierten Proliferation aufgrund des gestörten Zellzyklus, verursachte ASA auch eine veränderte Expression von Tumorsuppressorproteinen (GOLDBERG 1996).

Die Stimulation der Apoptose durch NSAIDs bei den Tumorzellen selbst wird als antitumorale substanzvermittelte, Cox-unabhängige Wirkung diskutiert, wodurch die Effekte der Bestrahlung erhöht werden können. Die zugrunde liegenden (dys-)regulierten molekularen Mechanismen sind unvollständig verstanden. Es gibt jedoch Hinweise, dass Transkriptionsfaktoren wie NF-kappaB und AP-1 sowie MAP-Kinasen an den Cox-unabhängigen zytotoxischen Effekten der NSAIDs beteiligt sind. Eine Inhibitor-vermittelte reduzierte Konzentration des antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L sowie die Inhibition des *peroxisome proliferator activator receptor-δ* erhöhte die Apoptoserate in Tumorzellen (PARK 2001A, ZHANG 2000). SHIFF *et al.* beschrieben eine durch ASA vermittelte reduzierte Proliferation, Stillstand des Zellzyklus und erhöhte Apoptose bei Adenomzellen des Kolons (SHIFF 1995). Weiterhin zeigten TEGEDER *et al.* *in vitro* eine Inhibition der DNA-Bindungsaktivität von NF-kappaB und AP-1, sowie eine Inhibition der nukleären Translokation von NF-kappaB durch den Cox-Inhibitor Flurbiprofen (TEGEDER 2001A). NF-kappaB ist ein durch zellulären Stress aktivierbarer Transkriptionsfaktor, der die Expression von über 150 Genen reguliert, darunter auch solche, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlung bewirken (WANG 1999). AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der u.a. den VEGF-Promoter bindet und dessen Aktivität reguliert. MORI *et al.* zeigten die Beteiligung von Erk1/2 an der AP-1 vermittelten Hochregulation von VEGF nach Bestrahlung (MORI 2000). MAP-Kinasen (*mitogen associated protein* Kinasen), wie Erk1/2, JNKs und p38, werden durch DNA-Schäden infolge radioaktiver Bestrahlung aktiviert (KYRIAKIS 1996, MARSHALL 1995). Zur Vermeidung der Induktion angiogener Faktoren mit

protektivem Potential, wie VEGF und FGF-2, bei Tumorzellen, wird nach bestrahlungsinduzierten Transduktionswegen gesucht. Dies könnte zur Entwicklung neuer oder einer neuen Anwendung bekannter Substanzen führen, die in diese Transduktionskaskaden eingreifen und als *radiosensetizer* wirken.

5.6 Ausblick

Das Interesse zur intensiveren Untersuchung der in dieser Arbeit beschriebenen Zusammenhänge zwischen Tumorzellen und Endothelzellen wurde durch die Beobachtung gefördert, dass die Radioresistenz des Tumors vermutlich durch die Interaktionen der malignen Zellen mit den am Tumor beteiligten Zelltypen wie u.a. Endothelzellen und Fibroblasten gefördert wird. Die Unterdrückung dieser zellulären Kommunikation innerhalb des Tumors könnte daher zur Erhöhung des Therapieerfolges beitragen. Es wurden zwei mögliche Strategien untersucht, um die RT-induzierte Protektion des Endothels zu unterdrücken.

1. Identifizierung und Inhibierung der bestrahlungsinduzierten protektiven Signale durch Cox-Inhibitoren.

Von Nachteil bei der Inhibition der das Überleben des tumorassoziierten Endothels fördernden Signale wäre jedoch die mögliche Radiosensitivierung auch von normalem, d.h. nicht-malignem Gewebe. Daher sollte bei einer solchen Therapie möglichst nur das proliferierende tumorassoziierte Gefäßendothel betroffen sein.

2. Vermeidung der bestrahlungsinduzierten Antwort an der Quelle, der Tumorzelle selbst.

Denn theoretisch würde sich so die Entstehung der Protektion des Endothels durch bestrahlungsinduzierte Faktoren vermeiden lassen, da es gar nicht erst zur Sezernierung protektiver Faktoren kommt. Dieser Ansatz würde nicht nur dem Erreichen effizienter Radiosensitivität des Endothels dienen, es wären zudem selektiv die tumorassoziierten Gefäße betroffen. Multimodale Therapiemöglichkeiten, welche die verschiedenen beteiligten Zelltypen und intrazellulären Mechanismen angreifen, könnten dabei von Vorteil sein.

Die gezeigten Daten leisten einen Beitrag zum Verständnis der vielfältigen zellulären Regulationsmöglichkeiten der bestrahlungsbedingten Freisetzung von VEGF

und FGF-2 und der Beteiligung dieser Faktoren an der Erhöhung der Strahlenresistenz. Die Erforschung neuer therapeutischer Ansätze sollte in Richtung der Vermeidung der Aktivierung von Transduktionswegen gehen, um damit der Induktion von „tumor- und gefäßprotektiven“ Faktoren während der Strahlentherapie entgegenzuwirken. In Verbindung mit Cox-Inhibitoren als *radiosensetizer* deuten sich Möglichkeiten zur Verringerung der Resistenzbildung an, wodurch der Erfolg der RT erhöht werden könnte.

6. Literaturverzeichnis

Abate A, Yang G, Dennerly PA, Oberle S, Schroder H. Synergistic inhibition of cyclooxygenase-2 expression by vitamin E and aspirin. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(11):1135-42.

Abraham JA, Whang JL, Tumolo A et al. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.* 1986;5(10):2523-8.

Achen MG, Jeltsch M, Kukk E et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the Tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(2):548-53.

Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol.* 1998;79(5):255-65.

Adegboyega PA, Olojede O. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal kidneys. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2004;12(1):71-4.

Akagi M, Kawaguchi M, Liu W et al. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer.* 2003;88(5):796-802.

Akarasereenont PC, Techatraisak K, Thaworn A, Chotewuttakorn S. The expression of COX-2 in VEGF-treated endothelial cells is mediated through protein Tyrosine kinase. *Mediators Inflamm.* 2002;11(1):17-22.

Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates Tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15442-51.

Albanell J, Gascon P. Small molecules with EGFR-TK inhibitor activity. *Curr Drugs Targets.* 2005;6(3):259-74.

Allen KN. Aspirin--now we can see it. *Nat Med.* 1995 Sep;1(9):882-3.

Altorki NK, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract tumors. *Semin Oncol.* 2004;31(2 Suppl 7):30-6.

Amano H, Hayashi I, Endo H et al. Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med.* 2003;197(2):221-32.

Amirghahari N, Harrison L, Smith M et al. NS 398 radiosensitizes an HNSCC cell line by possibly inhibiting radiation-induced expression of COX-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;57(5):1405-12.

Ando S, Nojima K, Majima H et al. Evidence for mRNA expression of vascular endothelial growth factor by X-ray irradiation in a lung squamous carcinoma cell line. *Cancer Lett* 1998;132:75-80.

Ando S, Nojima K, Ishihara H et al. Induction by carbon-ion irradiation of the expression of vascular endothelial growth factor in lung carcinoma cells. *Int J Radiat Biol.* 2000;76(8):1121-7.

Aoki T, Nagakawa Y, Tsuchida A et al. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in pancreatic tumors. *Oncol Rep.* 2002;9(4):761-5

Arikawa T, Omura K, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2004;200(3):400-6.

Arun B, Goss P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin Oncol.* 2004 Apr;31(2 Suppl 7):22-9.

Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 1977;14(1):53-65.

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* 2003;9(7):936-43.

- Bachelor** MA, Bowden GT. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(2):131-8.
- Baez** A, Almodovar JI, Cantor A et al. High frequency of HPV16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck.* 2004;26(9):778-84.
- Bandoh** N, Hayashi T, Takahara M et al. VEGF and bFGF expression and microvessel density of maxillary sinus squamous cell carcinoma in relation to p53 status, spontaneous apoptosis and prognosis. *Cancer Lett.* 2004;208(2):215-25.
- Barnett** J, Chow J, Ives D et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1209(1):130-9.
- Bates** DO, Cui TG, Doughty JM et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(14):4123-31.
- Bhatia** S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, Meadows AT. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1996;334(12):745-51.
- Baxevanis** CN, Reclos GJ, Gritzapis AD et al. Elevated prostaglandin E₂ production by monocytes is responsible for the depressed levels of natural killer and Lymphokine-activated killer cell function in patients with breast cancer. *Cancer* 1993;72:491-501.
- Bayer online:** www.aspirin.de
- Bedford** JS. Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;21(6):1457-69.
- Ben-Av** P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995;372(1):83-7.
- Berenbaum** F, Grifka J, Brown JP et al. Efficacy of lumiracoxib in osteoarthritis: a review of nine studies. *J Int Med Res.* 2005;33(1):21-41.
- Berman** KS, Verma UN, Harburg G et al. Sulindac enhances tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of lung cancer cell lines by inhibition of nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res.* 2002;8(2):354-60.
- Berns** EM, Klijn JG, Look MP et al. Combined vascular endothelial growth factor and TP53 status predicts poor response to tamoxifen therapy in estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(4):1253-8.
- Berse** B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell.* 1992;3(2):211-20.
- Billings** PC, Maki PA, Kennedy AR. Effect of modifiers of arachidonic acid metabolism on radiation transformation and eicosanoid formation in C3H/10T1/2 cells. *Cancer Biochem Biophys.* 1994;14:211-20.
- Bischof** M, Abdollahi A, Gong P et al. Triple Combination of irradiation, chemotherapy (Pemetrexed), and VEGFR inhibition (SU5416) in human endothelial and tumor cells. *In J Rad Oncol Biol Phys.* 2004;60(4):1220-32.
- Blanckaert** VD, Hebbbar M, Louchez MM et al. Basic fibroblast growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4(12):2939-47.
- Brahimi-Horn** C, Berra E, Pouyssegur J. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol.* 2001 Nov;11(11):S32-6.
- Bresalier** RS, Sandler RS, Quan H et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med.* 2005; 352(11):1092-102.
- Brieger** J, Weidt EJ, Schirmacher P et al. Inverse regulation of vascular endothelial growth factor and VHL tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinomas is correlated with vascular growth: an in vivo study on 29 tumors. *J Mol Med.* 1999;77:505-510.

- Brieger J**, Schroeder P, Gosepath J, Mann WJ. The cyclooxygenase inhibitor flurbiprofen reduces radiation-induced angiogenic growth factor secretion of squamous cell carcinoma cell lines. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1030:37-42.
- Brieger J**, Schroeder P, Gosepath J, Mann WJ. VEGF-subtype specific protection of SCC and HUVECs from radiation induced cell death. *Int J Mol Med.* 2005;15(1):145-51.A
- Brieger J**, Schroeder P, Gosepath J, Mann WJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are released by squamous cell carcinoma cells after irradiation and increase resistance to subsequent irradiation. *Int J Mol Med* 2005;16(1):159-64.B
- Bristow RG**, Hill RP: Molecular and cellular basis of radiotherapy, in Tia HR (ed): *The Basic Science of Oncology*. New York, NY, McGraw-Hill, 1998:295-322.
- Brogi E**, Schatteman G, Wu T et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest.* 1996;97(2):469-76.
- Browder T**, Butterfield CE, Kraling BM et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60:1878–86. 35.
- Brown LF**, Berse B, Jackman RW. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993;53:4727-4735A.
- Brown LF**, Berse B, Jackman RW. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinoma. *Am J Pathol.* 1993;143:1255-1262B.
- Brown CK**, Khodarev NN, Yu J et al. Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells. *FEBS Lett.* 2004;565(1-3):167-70.
- Brune B**, Zhou J, von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int. Suppl.* 2003;84:S22-24.
- Bruns CJ**, Harbison MT, Davis DW et al. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):1936-48.
- Bussolino F**, Albini A, Camussi G et al. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer.* 1996;32A(14):2401-12.
- Bussolino F**, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci.* 1997;22(7):251-6.
- Callejas NA**, Casado M, Diaz-Guerra MJ, Bosca L, Martin-Sanz P. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology.* 2001;33(4):860-7.
- Camphausen K**, Menard C. Angiogenesis inhibitors and radiotherapy of primary tumours. *Expert Opin Biol Ther.* 2002;2(5):477-81.
- Cancer Consultants**, Oncology research centre, Head and Neck treatment information, www.patient.cancerconsultants.com
- Canete JD**, Pablos JL, Sanmarti R et al. Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(5):1636-41.
- Cao Y**. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* 1999;84:643–50.
- Carabaza A**, Cabre F, Rotllan E, Gomez M, Gutierrez M, Garcia ML, Mauleon D. Stereoselective inhibition of inducible cyclooxygenase by chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Pharmacol.* 1996;36(6):505-12.
- Carmeliet P**, Dor Y, Herbert JM et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature (Lond.)*, 1998;394: 485-490.
- Carmeliet P**, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*;2000;407:249-57.
- Castelao JE**, Yuan JM, Gago-Dominguez M, Yu MC, Ross RK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *Br J Cancer.* 2000;82(7):1364-9.

- Chan G**, Boyle JO, Yang EK et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 1999;59(5):991-4.
- Chang YS**, di Tomaso E, McDonald DM, et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14608-13.
- Charlier C**, Michaux C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem.* 2003;38(7-8):645-59.
- Charnock-Jones DS**, Sharkey AM, Rajput-Williams J et al. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod.* 1993;48(5):1120-8
- Chen CC**, Sun YT, Chen JJ, Chang YJ. Tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and I κ B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol Pharmacol.* 2001;59(3):493-500.
- Cheng T**, Cao W, Wen R et al. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat müller cells. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(3):581-91.
- Chiarugi V**, Magnelli L, Gallo O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med.* 1998;2(6):715-9.
- Choy H**, Milas L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: A rational advance? *J. Nat. Can. I.* 2003;95:1440-1452.
- Ciardello F**, Bianco R, Damiano V et al. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2000;6(9):3739-47.
- Ciardello F**, Caputo R, Bianco R et al. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor Tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2001;7(5):1459-65.
- Cohn SM**, Schloemann S, Tessner T et al. Crypt Stem Cell Survival in the Mouse Intestinal Epithelium Is Regulated by Prostaglandins Synthesized through Cyclooxygenase-1. *J. Clin. Invest.* 1997;99:1367-1379.
- Coleman CN**: Radiation oncology: Linking technology and biology in the treatment of cancer. *Acta Oncol.* 2002;41:6-13.
- Contessa JN**, Reardon DB, Todd D et al. The inducible expression of dominant-negative epidermal growth factor receptor-CD53 results in radiosensitization of human mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 1999;5: 405-411.
- Conway EM**, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):507-21.
- Costa C**, Soares R, Reis-Filho JS et al. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55(6):429-34.
- Cotran RS**, Kumar V, Robbins SL. Environmental Pathology. In: Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: WB Saunders, 1989: 9.
- Cross DS**, Platt JL, John SK, Bach FH, Adams GL. Tumor infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of head and neck: Mechanism of enhancement using PG synthetase inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 1997;400 (Pt. B): 1013-24.
- Cross MJ**, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(9):488-94.
- Cryer B**, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* 1998;104(5):413-21.
- Dannenberg AJ**, Altorki NK, Boyle JO et al. Cyclooxygenase-2: A pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2001;2:544-51.

- Davies** JA, Fisher CE. Genes and proteins in renal development. *Exp Nephrol.* 2002;10(2):102-13.
- Denekamp** J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol.* 1993;66(783):181-96.
- Desbaillets** I, Diserens AC, Tribolet N et al. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med.* 1997;186(8):1201-12.
- Desbaillets** I, Diserens AC, de Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma. *Oncogene.* 1999;18(7):1447-56.
- DeWitt** DL, Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(5):1412-6.
- DeVries** C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosin kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 1992;55:989-91.
- Dicker** AP, Williams TL, Grant DS. Targeting angiogenic processes by combination rofecoxib and ionizing radiation. *Am J Clin Oncol.* 2001;24(5):438-42.
- Ding** XZ, Tong WG, Adrian TE. Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 2000;20(4):2625-31.
- Ding** YB, Shi RH, Tong JD et al. PGE(2) up-regulates Vascular Endothelial Growth Factor expression in MKN28 gastric cancer cells via Epidermal Growth Factor Receptor signaling system. *Exp Oncol.* 2005;27(2):108-13.
- Dougher-Vermazen** M, Hulmes JD, Bohlen P, Terman BI. Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Nov 30;205(1):728-38.
- Duperron** C, Castonguay A. Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis.* 1997;18(5):1001-6.
- Enomoto** H, Inoki I, Komiya K et al. Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol.* 2003;162(1):171-81.
- Farrow** DC, Vaughan TL, Hansten PD, Stanford JL. Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(2):97-102.
- Fenton** BM, Beauchamp BK, Paoni SF, Okunieff P, Ding I. Characterization of the effects of antiangiogenic agents on tumor pathophysiology. *Am J Clin Oncol.* 2001;24(5):453-7
- Fernig** DG, Gallagher JT. Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog Growth Factor Res.* 1994;5(4):353-77.
- Ferrara** N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 15;161(2):851-8.
- Ferrara** N, Winer J, Burton T. Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors.* 1991;5(2):141-8.A
- Ferrara** N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.* 1991;47(3):211-8.B
- Ferrara** N, Carver-Moore K, Chen H et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996;380(6573):439-42. A
- Ferrara** N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer.* 1996 Dec;32A(14):2413-22. B
- Ferrara** N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
- Fischer** Susan M. Prostaglandins and cancer [Reviews: Basic Science]. *Front Biosci* 1997;2:482-500.
- Fleischmann** R, Iqbal I, Slobodin G. Meloxicam. *Expert Opin Pharmacother.* 2002;3(10):1501-12.

- Floege J**, Hudkins KL, Eitner F et al. Localization of fibroblast growth factor-2 (basic FGF) and FGF receptor-1 in adult human kidney. *Kidney Int.* 1999;56(3):883-97.
- Folberg R**, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000;156(2):361-81.
- Folkman J**. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
- Folkman J**. The vascularization of tumors. *Sci. Am.* 1976;234:58-64, 70-73.
- Folkman J**. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest.* 1984;51(6):601-4.
- Folkman J**, Ingber D. Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1992;3(2):89-96.A
- Folkman J**, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267:10931-34.B
- Folkman J**. Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(2):398-400.
- Folkman J**. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Sem Oncol.* 2002;29:15-18.
- Folkman J**. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS.* 2004;112(7-8):496-507.
- Fong CY**, Pang L, Holland E, Knox AJ. TGF-beta1 stimulates IL-8 release, COX-2 expression, and PGE(2) release in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(1):L201-7.
- Fontanini G**, Lucchi M, Vignati S et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(12):881-6.
- Forastiere A**, Koch W, Trott A. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2001;345:1890-1900.
- Fosslien E**. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2000;37(5):431-502.
- Fosslien E**. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci.* 2001;31(4):325-48.
- Fox A**, Medhurst S, Courade JP et al. Anti-hyperalgesic activity of the cox-2 inhibitor lumiracoxib in a model of bone cancer pain in the rat. *Pain.* 2004;107(1-2):33-40.
- Freeman MR**, Schneck FX, Gagnon ML et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res.* 1995;55(18):4140-5.
- Fukata S**, Inoue K, Kamada M et al. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005;103(5):931-42.
- Fukuda R**, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003;63(9):2330-4.
- Funkhouser EM**, Sharp GB. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer.* 1995;76(7):1116-9.
- Furuta Y**, Hall ER, Sanduja S, Barkley T Jr, Milas L. Prostaglandin production by murine tumors as a predictor for therapeutic response to indomethacin. *Cancer Res.* 1988;48(11):3002-7.
- Futaki N**, Takahashi S, Yokoyama M et al. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins.* 1994;47(1):55-9.
- Gao N**, Ding M, Zheng JZ et al. Vanadate induces expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2002;277:31963-71.
- Garcia-Barros M**, Paris F, Cordon-Cardo C et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science.* 2003;300(5622):1155-9.
- Gately S**. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19(1-

2):19-27.

Geng L, Donnelly E, McMahon G et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res.* 2001;61(6):2413-9.

Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;34(3):185-94.

Geusens P, Alten R, Rovensky J et al. Efficacy, safety and tolerability of lumiracoxib in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pract.* 2004;58(11):1033-41.

Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril.* 2000;74(3):429-38.

Gilroy DW, Colville-Nash PR. New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med.* 2000;78(3):121-9.

Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ et al. Aspirin and the Risk of Colorectal Cancer in Women. *N Eng J Med* 1995;333:609-14.

Gingis-Velitski S, Zetser A, Flugelman MY, Vlodayvsky I, Ilan N. Heparanase induces endothelial cell migration via protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem.* 2004;279(22):23536-41.

Gitay-Goren H, Cohen T, Tessler S et al. Selective binding of VEGF121 to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5519-23.

Ghilardi JR, Svensson CI, Rogers SD, Yaksh TL, Mantyh PW. Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injury-induced hyperalgesia. *J Neurosci.* 2004;24(11):2727-32.

Goerig M, Habenicht AJ, Heitz R et al. sn-1,2-Diacylglycerols and phorbol diesters stimulate thromboxane synthesis by de novo synthesis of prostaglandin H synthase in human promyelocytic leukemia cells. *J Clin Invest.* 1987;79(3):903-11.

Goldberg Y, Nassif II, Pittas A et al. The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene.* 1996;12(4):893-901.

Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol.* 1983;3(4):295-315.

Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res.* 1999;59(14):3374-8.

Gospodarowicz D, Lau K. Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Nov 30;165(1):292-8.

Greenberg ER, Baron JA, Freeman DH Jr, Mandel JS, Haile R. Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users. The Polyp Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Jun 2;85(11):912-6.

Grosch S, Tegeder I, Niederberger E et al. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.* 2001;15(14):2742-4.

Grosch S, Tegeder I, Schilling K et al. Activation of c-Jun-N-terminal-kinase is crucial for the induction of a cell cycle arrest in human colon carcinoma cells caused by flurbiprofen enantiomers. *FASEB J.* 2003;17(10):1316-8.

Grosch S, Schilling K, Janssen A et al. Induction of apoptosis by R-flurbiprofen in human colon carcinoma cells: involvement of p53. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(5):831-9.

Grubbs CJ, Juliana MM, Eto I et al. Chemoprevention by indomethacin of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder tumors. *Anticancer Res.* 1993;13(1):33-6.

Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT et al. Celecoxib inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and female Fischer-344 rats. *Cancer Res.* 2000;60(20):5599-602.

- Guo D**, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes Tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 1995;270(12):6729-33.
- Gupta VK**, Jaskowiak NT, Beckett MA et al. VEGF enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance. *Cancer J.* 2002;8:47-54.
- Gupta MK**, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2003 Jun;9(6):1144-55.
- Haagedoorn**, Oldhoff, Bender, Clarke, Sleifer. Basiswissen Onkologie. Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden 1996.
- Hanahan D**, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2000;105:1045–7.A
- Hanahan D**, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.B
- Hancock SL**, Tucker MA, Hoppe RT. Breast cancer after treatment of Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(1):25-31.
- Hanif R**, Pittas A, Feng Y et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol.* 1996;52:237-45.
- Hanson WR**, Ainsworth EJ. 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 induces radioprotection in murine intestinal and hematopoietic stem cells. *Radiat. Res.* 1985;103:196–203.
- Hanson WR**, Houseman KA, Collins PW. Radiation protection in vivo by prostaglandins and related compounds of the arachidonic acid cascade. *Pharmacol Ther.* 1988;39(1-3):347-56.
- Harmey JH**, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays.* 2002;24(3):280-3.
- Harris RC Jr.** Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol.* 2002;89(6A):10D-17D.
- Hefti MA**, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(11):2873-92.
- Helisch A**, Schaper W. Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Z Kardiol.* 2000;89(3):239-44.
- Hempel SL**, Monick MM, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest.* 1994;93(1):391-6.
- Hendrix MJ**, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):411-21.
- Hernandez GL**, Volpert OV, Iniguez MA et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med.* 2001;193(5):607-20.
- Herold-Mende C**, Andl T, Laemmler F, Reisser C, Mueller MM. Funktionelle Expression des VEGF-Rezeptors Flt-1 auf Plattenepithelkarzinomzellen. *HNO.* 1999;47:706-11.
- Hess C**, Vuong V, Hegyi I, Riesterer O, Wood J, Fabbro D. Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth. *Br J Cancer.* 2001;85:2010-16.
- Hess-Stumpp H**, Haberey M, Thierauch KM. PTK 787/ZK222584, a Tyrosine kinase inhibitor of all known VEGF receptors, represses tumor growth with high efficiency. *Chembiochem.* 2005;6(3):550-57.
- Hla T**, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(16):7384-8.
- Holmgren L**, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995;1(2):149-53.

- Houchen** CW, George RJ, Sturmoski MA, Cohn SM. FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. *Am J Physiol.* 1999;276(1 Pt 1):G249-58.
- Houchen** CW, Stenson WF, Cohn SM. Disruption of cyclooxygenase-1 gene results in an impaired response to radiation injury. *Am. J. Physiol.* 2000;279:G858-865.
- Houck** KA, Ferrara N, Winer J et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991;5(12):1806-14.
- Houck** KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992 25;267(36):26031-7.
- Hussey** DH. Principles of Radiation Oncology. In: Bailey BJ, et al, eds. *Head and Neck Surgery-Otolaryngology.* Philadelphia: JB Lippincott, 1993: 82.
- Iliopoulos** O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10595-9.
- Ip** YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:205-219.
- Ito** N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 Tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem.* 1998;273(36):23410-18.
- Ivan** M, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:27-34.
- Janet** T, Ludecke G, Otten U, Unsicker K. Heterogeneity of human neuroblastoma cell lines in their proliferative responses to basic FGF, NGF, and EGF: correlation with expression of growth factors and growth factor receptors. *J Neurosci Res.* 1995;40(6):707-15.
- Jiang** BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.* 1996;271: C1172-C1180.
- Jee** SH, Chu CY, Chiu HC et al. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol.* 2004;123(6):1169-75.
- Jeon** YK, Lee BY, Kim JE, Lee SS, Kim CW. Molecular characterization of Epstein-Barr virus and oncoprotein expression in nasopharyngeal carcinoma in Korea. *Head Neck.* 2004;26(7):573-83.
- Jeong** HJ, Chung HS, Lee BR et al. Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1alpha and NF-kappaB activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306(4):805-11.
- Joki** T, Heese O, Nikas DC et al. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res.* 2000;60(17):4926-31.
- Jonca** F, Ortega N, Gleizes PE et al. Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1997;272:24203-9.
- Jones** DA, Carlton DP, McIntyre TM et al. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem.* 1993;268(12):9049-54.
- Jones** MK, Wang H, Peskar BM et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med.* 1999;5(12):1418-23.
- Jones** MK, Szabo IL, Kawanaka H et al. von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB J.* 2002;16(2):264-6.
- Joo** YE, Rew JS, Seo YH et al. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2003;37(1):28-33.
- Josko** J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit.* 2000;6(5):1047-52.

- Joukov V**, Pajusola K, Kaipainen A et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor Tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996;15(7):1751.
- Kalka C**, Asahara T, Krone W, Isner JM. [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization] *Herz.* 2000;25(6):611-22.
- Kanda S**, Hodgkin MN, Woodfield RJ et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase-independent p70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation of endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272(37):23347-53.
- Kandel J**, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F et al. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell.* 1991;66(6):1095-104.
- Kanematsu A**, Marui A, Yamamoto S et al. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. *J Control Release.* 2004;99(2):281-92.
- Kavanagh BD**, Lin PS, Chen P et al. Radiation-induced enhanced proliferation of human squamous cancer cells in vitro: a release from inhibition by epidermal growth factor. *Clin Cancer Res.* 1995;1:1557-1562.
- Kawamori T**, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1998 Feb 1;58(3):409-12.
- Kedar D**, Baker CH, Killion JJ, Dinney CP, Fidler IJ. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res.* 2002 Nov;8(11):3592-600.
- Kerbel RS.** Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bio Essays.* 1991;1:31.
- Kerbel RS.** A cancer therapy resistant to resistance. *Nature.* 1997 Nov 27;390(6658):335-6.
- Kewley RJ**, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(2):189-204.
- Khwaja F**, Allen J, Lynch J, Andrews P, Djakiew D. Ibuprofen inhibits survival of bladder cancer cells by induced expression of the p75NTR tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 2004 1;64(17):6207-13.
- Kim KJ**, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993;362:841-844.
- Kim YM**, Hwang S, Kim YM et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27872-9.
- Kim BY**, Kim KA, Kwon O et al. NF- κ B inhibition radiosensitizes Ki-Ras-transformed cells to ionizing radiation. *Carcinogenesis.* 2005;26(8):1395-1403.
- King JG Jr**, Khalili K. Inhibition of human brain tumor cell growth by the anti-inflammatory drug, flurbiprofen. *Oncogene.* 2001;20(47):6864-70.
- Kirschenbaum A**, Liu X, Yao S, Levine AC. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology.* 2001;58(2 Suppl 1):127-31.
- Kishi K**, Petersen S, Petersen C et al. Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res.* 2000;60(5):1326-31.
- Klement G**, Baruchel S, Rak J et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000;105:R15-24.
- Koki AT**, Khan NK, Woerner BM et al. Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(1):13-8.
- Kornberg LJ**, Shaw LC, Spoerri PE, Caballero S, Grant MB. Focal adhesion kinase overexpression induces enhanced pathological retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(12):4463-9.

- Kozin SV**, Boucher Y, Hicklin DJ et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Res.* 2001;61:39-44.
- Kramer M**, Sachsenmaier C, Herrlich P, Rahmsdorf HJ. UV irradiation-induced interleukin-1 and basic fibroblast growth factor synthesis and release mediate part of the UV response. *J Biol Chem.* 1993;268(9):6734-41.
- Kuball J**, Schuler M, Huber C. Sekundäre Neoplasien. *Onkologe.* 1998;4:965-973.
- Kumar R**, Yarmand-Bagheri R. The role of HER2 in angiogenesis. *Semin Oncol.* 2001;28(5 Suppl 16):27-32.
- Kung AL**, Wang S, Kico JM, Kaelin WG, Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat. Med.* 2000;6:1335-1340.
- Kunz M**, Hartmann A. Angiogenesis--anti-angiogenesis. Significance for tumor growth and metastasis. *Hautarzt.* 2002;53(6):373-84.
- Kurumbail RG**, Stevens AM, Gierse JK et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature.* 1996;384(6610):644-8.
- Kyriakis JM**, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays.* 1996;18:567-577.
- Lalla RV**, Boisoneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(8):882-8.
- Langenbach R**, Loftin CD, Lee C, Tiano H. Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;889:52-61.
- Lanza-Jacoby S**, Dicker AP, Miller S et al. Cyclooxygenase (COX)-2-dependent effects of the inhibitor SC236 when combined with ionizing radiation in mammary tumor cells derived from HER 2/neu mice. *Mol Cancer Ther.* 2004;3:417-424.
- Laporte JD**, Moore PE, Lahiri T et al. p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(5):L932-41.
- Laramore GE**. The Physics and Biophysics of Radiation Therapy. Cummings CW, et al, eds. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* St. Louis: Mosby-Year Book, 1993:4.
- Lee YJ**, Galoforo SS, Berns CM et al. Effect of ionizing radiation on AP-1 binding activity and bFGF gene expression in drug-sensitive human breast carcinoma MCF-7 and multidrug-resistant MCF-7/ADR cells. *J Biol Chem.* 1995;270:28790-28796.
- Lee JC**, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer.* 2000;36(6):748-53.
- Li M**, Wu X, Xu XC. Induction of apoptosis by cyclo-oxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome C-dependent pathway in esophageal cancer cells. *Int J Cancer.* 2001;93(2):218-23.
- Li G**, Yang T, Yan J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299(5):886-90.
- Li C**, Guo B, Ding S et al. TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res.* 2003;23(2B):1189-96.A
- Li L**, Steinauer KK, Dirks AJ, Husbeck B, Gibbs I, Knox SJ. Radiation-induced cyclooxygenase 2 on is dependent on redox status in prostate cancer cells. *Radiat Res.* 2003;160:617-21.B
- Li J**, Huang S, Armstrong EA et al. Angiogenesis and radiation response modulation after vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR²) blockade. *Int J Radiat Oncol Phys.* 2005;62(5):1477-85.
- Lim SC**, Park SY, Do NY. Correlation of cyclooxygenase-2 pathway and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2003;10(5):1073-9.

- Liu XH**, Kirschenbaum A, Yao S et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Metastasis*. 1999;17(8):687-94.
- Liu XH**, Kirschenbaum A, Yao S, Lee R, Holland JF, Levine AC. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *J Urol*. 2000;164(3 Pt 1):820-5.
- Liu XH**, Kirschenbaum A, Yu K, Yao S, Levine AC. Cyclooxygenase-2 suppresses hypoxia-induced apoptosis via a combination of direct and indirect inhibition of p53 activity in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem*. 2005;280(5):3817-23.
- Lockhart AC**, Braun RD, Yu D, Ross JR, Dewhirst MW, Klitzman B, Yuan F, Grichnik JM, Proia AD, Conway DA, Mann G, Hurwitz HI. A clinical model of dermal wound angiogenesis. *Wound Repair Regen*. 2003;11(4):306-13.
- Loft S**, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med*. 1996;74(6):297-312.
- Loll PJ**, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol*. 1995;2(8):637-43.
- Lundholm K**, Gelin J, Hyltander A et al. Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors. *Cancer Res* 1994;54:5602-6.
- Luong C**, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol*. 1996;3(11):927-33.
- Lutsenko SV**, Kiselev SM, Severin SE. Molecular mechanism of tumor angiogenesis. *Biochem (Moscow)*. 2003;68(3):349-65.
- Lyttle DJ**, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*. 1994;68(1):84-92.
- Manders P**, Beex LV, Tjan-Heijnen VC et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer*. 2002;87(7):772-8
- Maniotis AJ**, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999;155(3):739-52.
- Mann M**, Sheng H, Shao J, Williams CS, Pisacane PI, Sliwkowski MX, DuBois RN. Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology*. 2001;120(7):1713-9.
- Marinari B**, Costanzo A, Marzano V, Piccolella E, Tuosto L. CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6098-103.
- Marshall CJ**. Specificity of receptor Tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995;80:179-185.
- Marx J**. Cancer research. Anti-inflammatories inhibit cancer growth--but how? *Science*. 2001;291(5504):581-2.
- Matsuoka Y**, Okazaki M, Zhao H et al. Phosphorylation of c-Jun and its localization with heme oxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in CA1 pyramidal neurons after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(11):1247-55.
- Maxwell PH**, Wiesener MS, Chang GW et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271-5.
- Maxwell PH**, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(1):29-37.
- McNeil PL**, Muthukrishnan L, Warder E, D'Amore PA. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol*. 1989;109(2):811-22.

- Menard S**, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E. Role of Her2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2004;6(23):2965-78.
- Mendel DB**, Laird AD, Xin X et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel Tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):327-37.
- Mentlein R**, Forstreuter F, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Functional significance of vascular endothelial growth factor receptor expression on human glioma cells. *J Neurooncol.* 2004;67(1-2):9-18.
- Merlie JP**, Fagan D, Mudd J, Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem.* 1988;263(8):3550-3.
- Meyer M**, Clauss M, Lepple-Wienhues A et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor Tyrosine kinases. *EMBO J.* 1999;18(2):363-74.
- Miao HQ**, Lee P, Lin H, Soker S, Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J.* 2000;14(15):2532-9.
- Milas L**, Furuta Y, Hunter N. Dependence of indomethacin-induced potentiation of murine tumor radioresponse on tumor host immunocompetence. *Cancer Res.* 1990;50:4473-7.
- Milas L**, Kishi K, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ. Enhancement of tumor response to g-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999 91:1501-1504.
- Milas L**. Cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme inhibitors as potential enhancers of tumor radioresponse. *Semin Radiat Oncol.* 2001;11(4):290-9.
- Mitchell JA**, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol.* 1999;128(6):1121-32.
- Moeller BJ**, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell.* 2004;5(5):429-41.
- Moos PJ**, Edes K, Fitzpatrick FA. Inactivation of wild-type p53 tumor suppressor by electrophilic prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):9215-20.
- Mori K**, Tani M, Kamata K et al. Mitogen-activated protein kinase, ERK1/2, is essential for the induction of vascular endothelial growth factor by ionizing radiation mediated by activator protein-1 in human glioblastoma cells. *Free Radic Res.* 2000;33(2):157-166.
- Muller YA**, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure.* 1997;5(10):1325-38.
- Mutschler E**, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. *Chemotherapie maligner Tumoren in: Mutschler Arzneimittelwirkungen (8. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2001: 873-907.*
- Nakamura F**, Kalb RG, Strittmatter SM. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol.* 2000;44(2):219-29.
- Nakata H**, Uemura Y, Kobayashi M et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 suppresses cell growth and constitutive production of granulocyte-colony stimulating factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor in lung cancer cells. *Cancer Sci.* 2003;94(2):173-80.
- Narumiya S**, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1193-226.
- Naski MC**, Ornitz DM. FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci.* 1998;3:d781-94.
- Nicosia RF**, Villaschi S. Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall. *Int Rev Cytol.* 1999;185:1-43.

- Niuro H**, Otsuka T, Ogami E et al. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(2):200-5.
- Nishikawa R**, Cheng SV, Nagashima R, Huang HJ, Cavenee WK, Matsutani M. Expression of vascular endothelial growth factor in human brain tumors. *Acta Neuropathol.* 1998;96:453-462.
- O'Banion MK**, Sadowski HB, Winn V, Young DA. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem.* 1991;266(34):23261-7.
- O'Banion MK**, Winn VD, Young DA. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(11):4888-92.
- Oberle S**, Polte T, Abate A, Podhaisky HP, Schroder H. Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. *Circ Res.* 1998;82(9):1016-20.
- Olofsson B**, Korpelainen E, Pepper MS et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11709-14.
- O'Reilly MS**, Holmgren L, Shing Y et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79:315-28.
- O'Reilly MS**, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997;88(2):277-85.
- Orlandini M**, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11675-80. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(4):1603.
- Ornitz DM**. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays.* 2000;22(2):108-12.
- Oshima M**, Dinchuk JE, Kargman SL et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell.* 1996;87(5):803-9.
- Otto JC**, DeWitt DL, Smith WL. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1993 Aug 25;268(24):18234-42.
- Pai R**, Soreghan B, Szabo IL et al. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med.* 2002;8(3):289-93.
- Pairet M**, van Ryn J, Schierok H, Mauz A, Trummlitz G, Engelhardt G. Differential inhibition of cyclooxygenases-1 and -2 by meloxicam and its 4'-isomer. *Inflamm Res.* 1998;47(6):270-6.
- Pande P**, Soni S, Kaur J, Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Prognostic factors in betel and tobacco related oral cancer. *Oral Oncol.* 2002;38(5):491-9.
- Paper DH**. Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Med.* 1998;64(8):686-95.
- Paris F**, Fuks Z, Kang A et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science.* 2001;293(5528):293-7.
- Park JE**, Chen HH, Winer J et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994;269:25646-54.
- Park BH**, Vogelstein B, Kinzler KW. Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2598-603.
- Park JS**, Qiao L, Su ZZ, Hinman D et al. Ionizing radiation modulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression through multiple mitogen activated protein kinase dependant pathways. *Oncogene.* 2001;20:3266-80.
- Park JH**, Kim TY, Jong HS et al. Gastric epithelial reactive oxygen species prevent normoxic degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2003;9:433-440.

- Patan S.** Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 2000;50(1-2):1-15.
- Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, Hage WJ, de Laat SW.** Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Cell.* 1993;74(3):565-75.
- Pepper MS, Sappino AP, Montesano R, Orci L, Vassalli JD.** Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in migrating endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1992;153(1):129-39.
- Peters LJ.** Biology of Radiation Therapy. In: Thawley SE, Panje WR, et al, eds. *Comprehensive Management of Head and Neck Tumors.* Philadelphia: WB Saunders, 1987:8.
- Petersen C, Petersen S, Milas L, Lang FF, Tofilon PJ.** Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2513-20.
- Petkova DK, Clelland C, Ronan J et al.** Overexpression of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer. *Respir Med.* 2004;98(2):164-72.
- Picot D, Loll PJ, Garavito RM.** The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature.* 1994;367(6460):243-9.
- Pike SE, Yao L, Jones KD et al.** Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med.* 1998;188(12):2349-56.
- Pillinger MH, Capodici C, Rosenthal C et al.** Modes of action of aspirin-like drugs:salicylates inhibit erk activation and integrin-dependent neutrophil adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;14540-45.
- Pirhonen JP, Grenman SA, Bredbacka AB, Bahado-Singh RO, Salmi TA.** Effects of external radiotherapy on uterine blood flow in patients with advanced cervical carcinoma assessed by color Doppler ultrasonography. *Cancer.* 1995;76(1):67-71.
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W.** Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* 1992;359:845-848.
- Plendl J, Snyman C, Bhoola KD.** Visualization of the sequential changes in immunolabelled tissue kininogenase which accompany follicular development and luteinization of angiogenic granulosa cells of the ovary. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(13-14):1981-94.
- Pluda JM.** Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin Oncol.* 1997;24(2):203-18.
- Pomerantz, R. G. and Grandis, J. R.** The role of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2003;5:140-146.
- Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB.** Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol.* 1986;6(11):4060-6.
- Presta LG, Chen H, O'Connor SJ et al.** Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997;57:4593-4599.
- Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H.** Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 2001;12(3):129-35.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):677-84.
- Pyo H, Choy H, Amorino GP, Kim JS, Cao Q, Hercules SK, DuBois RN.** A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res.* 2001;7(10):2998-3005.
- Radford IR.** Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1986;49(4):611-20.

- Rassekh C**, Kyle K, Quinn FB. Principles of radiation oncology. UTMB Dept. Otolaryngology Grand Rounds. 1997.
- Reddy BS**, Hirose Y, Lubet R et al. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res.* 2000;60(2):293-7.
- Reiger MK**, DeWitt DL, Schindler MS, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in murine 3T3 cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993;301(2):439-44.
- Renan MJ**. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993;7(3):139-46.
- Relf M**, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997;57: 963-9.
- Reuss B**, von Bohlen und Halbach O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2003;313(2):139-57.
- Reynolds LP**, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod.* 2001;64(4):1033-40.
- Ribatti D**, Presta M, Vacca A et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood.* 1999;93(8):2627-36.
- Ribatti D**, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med.* 2002;2(6):537-43.
- Ribatti D**, Marimpietri D, Pastorino F, Brignole C, Nico B, Vacca A, Ponzoni M. Angiogenesis in neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1028:133-42.
- Rioux N**, Castonguay A. Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res.* 1998;58(23):5354-60.
- Risau W**. What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer Metastasis Rev.* 1996;15(2):149-51.
- Risau W**. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.
- Ristimaki A**, Sivula A, Lundin J et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62(3):632-5.
- Rozic JG**, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer.* 2001;93(4):497-506.
- Ryan DP**, Compton CC, Mayer RJ. Carcinoma of the anal canal. *N Engl J Med.* 2000;342:792-800.
- Samuelsson B**, Granstrom E, Green K, Hamberg M, Hammarstrom S. Prostaglandins. *Annu Rev Biochem.* 1975;44:669-95.
- Sankila R**, Garwicz S, Olsen JH et al. Risk of subsequent malignant neoplasms among 1,641 Hodgkin's disease patients diagnosed in childhood and adolescence: a population-based cohort study in the five Nordic countries. Association of the Nordic Cancer Registries and the Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology. *J Clin Oncol.* 1996;14(5):1442-6.
- Sano H**, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:2556-9.
- Sandler AB**, Dubinett SM. COX-2 inhibition and lung cancer. *Semin Oncol.* 2004;31(2 Suppl 7):45-52.
- Sato N**, Maehara N, Goggins M. Gene expression filing of tumor-stromal interactions between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts. *Cancer Res.* 2004;64:690-56.
- Sawano A**, Takahashi T, Yamaguchi S et al. Flt-1 but not KDR/Flk-1 Tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ.* 1996;7(2):213-21.

- Sawano A**, Takahashi T, Yamaguchi S, Shibuya M. The phosphorylated 1169-Thyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238(2):487-91.
- Sawaoka H**, Tsuji S, Tsuji M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 1999;78:1469-77.
- Sawdy RJ**, Sullivan MH, Bennett PR. The effects of non-steroidal anti-inflammatory compounds on human myometrial contractility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;109(1):33-40.
- Schadendorf**, Moller, Algermissen, Worm, Sticherling, Czarnetzki. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol.* 1994;153(7):3360.
- Schlesinger-Raab A**, Lang S, Steuer-Vogt MK, Hölzel D. Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome. Tumorzentrum München und W. Zuckschwedt Verlag München. 2003:3-14.
- Schmidt-Ullrich RK**, Mikkelsen RB, Dent P et al. Radiation induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR Thyrosine phosphorylation. *Oncogene.* 1997;15:1191-1197.
- Schmidt-Ullrich RK**, Contessa JN, Dent P, et al: Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. *Radiat Oncol Investig.* 1999;7:321-330.
- Schmidt-Ullrich RK**, Contessa J, Lammering G, Amorino G, Lin P. ERBB receptor Thyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene.* 2003;22: 5855-5865.
- Schreinemachers DM**, Everson RB. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology.* 1994;5(2):138-46.
- Schröder JM**, Christophers E. Identification of C5ades arg and an anionic neutrophil-activating peptide (ANAP) in psoriatic scales. *J Invest Dermatol.* 1986;87(1):53-8.
- Schweigerer L**, Neufeld G, Friedman J et al. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature.* 1987;325(6101):257-9.
- Schwenger P**, Bellosta P, Victor I et al. Sodium salicylate induces apoptosis via p38 activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor- induced c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:2869-73.
- Seetharam L**, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from FLT Thyrosin kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene.* 1995;10:135-147.
- Semenza GL**. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:993-998.
- Semenza GL**. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell.* 2004;5:405-6.
- Senger DR**, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986;46(11):5629-32.
- Sheng H**, Shao J, Morrow JD et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58:362-6.
- Shiff SJ**, Qiao L, Tsai LL et al. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest.* 1995;96(1):491-503.
- Shinomiya N**. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med.* 2001;5(3):240-53.
- Shintani S**, Kiyota A, Mihara M et al. Association of preoperative radiation effect with tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2000;91(10):1051-7.
- Shtivelband MI**, Juneja HS, Lee S, Wu KK. Aspirin and salicylate inhibit colon cancer medium- and VEGF-induced endothelial tube formation: correlation with suppression of cyclooxygenase-2 expression. *J Thromb Haemost.* 2003;1(10):2225-33.

- Siemeister** G, Marme D, Martiny-Baron G. The alpha-helical domain near the amino terminus is essential for dimerization of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273(18):11115-20.
- Singh** RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res.* 1994;54(12):3242-7.
- Slevin** M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem.* 2002;277(43):41046-59.
- Smith** SK. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(4):147-51.
- Soker** S, Fidler H, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5761-7.
- Soker** S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998;92(6):735-45.
- Sonneaux** P, Brouet A, Havaux X. et al. Irradiation-induced angiogenesis through the up-regulation of the nitric oxide pathway: implications for tumor radiotherapy. *Cancer Res.* 2003;63(5):1012-9.
- Soslow** RA, Dannenberg AJ, Rush D et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer* 2000;89:2637-45.
- Souza** RF, Shewmake K, Beer DG et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2000;60(20):5767-72.
- Spisni** E, Tomasi V. Involvement of prostanoids in angiogenesis In: Bicknell Roy, Lewis Claire E and Ferrara Napoleone, editors. *Tumor Angiogenesis.* 1st ed. NewYork: Oxford University Press; 1997:291-300.
- Steel** GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1979;5(1):85-91.
- Steinauer** KK, Gibbs I, Ning S, French JN, Armstrong J, Knox SJ. Radiation induces upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in PC-3 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:325-8.
- Steinbach** G, Lynch PM, Phillips RK et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 2000;342(26):1946-52.
- Strieter** RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Kunkel SL. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock.* 1995;4(3):155-60.A
- Strieter** RM, Polverini PJ, Kunkel SL et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995;270(45):27348-57.B
- Subbaramaiah** K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem.* 1999;274(16):10911-5.
- Suhardja** A, Hoffman H. Role of growth factors and their receptors in proliferation of microvascular endothelial cells. *Microsc Res Tech.* 2003;60(1):70-5.
- Szekanecz** Z, Szegedi G, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: pathogenic and clinical significance. *J Investig Med.* 1998;46(2):27-41.
- Swordlow** AJ, Barber JA, Hudson GV et al. Risk of second malignancy after Hodgkin's disease in a collaborative British cohort: the relation to age at treatment. *J Clin Oncol.* 2000;18(3):498-509.
- Swinney** DC, Mak AY, Barnett J, Ramesha CS. Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid. *J Biol Chem.* 1997;272(19):12393-8.
- Taketo** MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(20):1529-36.A
- Taketo** MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(21):1609-20.B

- Tamanini C**, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim.* 2004;39(4):206-16.
- Tamatani T**, Azuma M, Ashida Y et al. Enhanced radiosensitization and chemosensitization in NF-kappaB-suppressed human oral cancer cells via the inhibition of gamma-irradiation- and 5-FU-induced production of IL-6 and IL-8. *Int J Cancer.* 2004;108:912-21.
- Tay A**, Squire JA, Goldberg H, Skorecki K. Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1994;23(3):718-9.
- Tegeder I**, Niederberger E, Israr E, Guhring H, Brune K, Euchenhofer C, Grosch S, Geisslinger G. Inhibition of NF-kappaB and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *FASEB J.* 2001;15(1):2-4.A
- Tegeder I**, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.* 2001;15(12):2057-72.B
- Teicher BA**, Holden SA, Dupuis NP. Anti-angiogenic agents can increase tumor oxygenation and response to radiation therapy. *Radiat Oncol Invest.* 1995;2:269-276.
- Tessner TG**, Muhale F, Schloemann S et al. Basic fibroblast growth factor upregulates cyclooxygenase-2 in I407 cells through p38 MAP kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(2):G269-79.
- Thun MJ**, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med.* 1991;325(23):1593-6.
- Thun MJ**, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res.* 1993;53(6):1322-7.
- Tnettenberg J**, Grobholz R, Korn T et al. Continuous low-dose chemotherapy plus inhibition of cyclooxygenase-2 as an antiangiogenic therapy of glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131(1):31-40.
- Torrance CJ**, Jackson PE, Montgomery E, Kinzler KW, Vogelstein B, Wissner A, Nunes M, Frost P, Discafani CM. Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat Med.* 2000;6(9):1024-8.
- Travis LB**, Hill DA, Dores GM et al. Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with Hodgkin disease. *JAMA.* 2003 Jul 23;290(4):465-75. Erratum in: *JAMA.* 2003;290(10):1318.
- Tsubouchi Y**, Mukai S, Kawahito Y, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Sano H. Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2000;20(5A):2867-72.
- Tsuji M**, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998;93(5):705-16.
- Tsurumi Y**, Murohara T, Krasinski K et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med.* 1997;3(8):879-86.
- Tucker MA**. Solid second cancers following Hodgkin's disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1993;7(2):389-400.
- Uefuji K**, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(1):135-8.
- Vaupel P**. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2004 Jul;14(3):198-206.
- Veikkola T**, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000;60(2):203-12.
- Verheij M**, Bose R, Lin XH et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature.* 1996;380(6569):75-9.
- Verheij M**, Bartelink H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301:133-142.
- Viac J**, Palacio S, Schmitt D, Claudy A. Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 1997;289(3):158-63.

- Vlachtsis** K, Brieger J, Kim DW et al. Quantitative analysis of VEGF-isoforms in head and neck squamous cell carcinoma cell lines: relation to xenotransplantability and tumour progression in mice. *Oncol Rep.* 2002;9(5):1133-8.
- Waltenberger** J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994;269(43):26988-95.
- Wang** CC. General Principles of Radiation Therapy of Head and Neck Tumors. In: Suen JY, Myers EN, eds. *Cancer of the Head and Neck.* New York: Churchill Livingstone, 1981: 7.
- Wang** GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92: 5510-5514.
- Wang** CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med.* 1999;5(4):412-17.
- Wantanabe** T, Satoh H, Togoh M, Taniguchi S, Hashimoto Y, Kurokawa K. Positive and negative regulation of cell proliferation through prostaglandin receptor in NIH- 3T3 cells. *J Cell Physiol* 1998;169:401-9
- Warner** TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* 2004;18(7):790-804.
- Wechter** WJ, Kantoci D, Murray Jr ED et al. R-flurbiprofen chemoprevention and treatment of intestinal adenomas in the APC(Min)/+mouse model: implications for prophylaxis and treatment of colon cancer. *Cancer Res.* 1997;57:4316-24.
- Wechter** WJ, Leipold DD, Murray Jr ED, Quiggle DD, McCracken JD, Barrios RS, Greenberg NM. E-7869 (R-flurbiprofen) inhibits progression of prostate cancer in the TRAMP mouse. *Cancer Res.* 2000;60:2203-08.
- Wedge** SR, Kendrew J, Hennequin LF. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Cancer Res.* 2005;65(10):4389-400.
- Westwick** JK, Bielawska AE, Dbaiibo G, Hannun YA, Brenner DA. Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1995;270(39):22689-92.
- Williams** CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.* 1999;18(55):7908-16.
- Williams** CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest.* 2000;105:1589-94.A
- Williams** CS, Sheng H, Brockman JA et al. A cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-58125) blocks growth of established human colon cancer xenografts. *Neoplasia.* 2001;3(5):428-36.
- Williams** KJ, Telfer BA, Brave S et al. ZD6476, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling combined with radiotherapy: schedule-dependent enhancement of antitumor activity. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8587-93.
- Wilkie** AO, Patey SJ, Kan SH, van den Ouweland AM, Hamel BC. FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. *Am J Med Genet.* 2002;112(3):266-78.
- Winkler** F, Kozin SV, Tong RT et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell.* 2004;6(6):553-63.
- Withers** HR, Taylor JM, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol.* 1988;27(2):131-46.
- Wong** BC, Jiang XH, Lin MC, Tu SP, Cui JT, Jiang SH, Wong WM, Yuen MF, Lam SK, Kung HF. Cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-236) suppresses activator protein-1 through c-Jun NH2-terminal kinase. *Gastroenterology.* 2004;126(1):136-47.

- Woolard J**, Wang WY, Bevan HS et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 2004;64(21):7822-35.
- Wright JA**, Huang A. Growth factors in mechanisms of malignancy: roles for TGF-beta and FGF. *Histol Histopathol.* 1996;11(2):521-36.
- Xu L**, Pathak PS, Fukumura D. Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10(2):701-7.
- Yamada T**, Ohyama H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1988;53(1):65-75.
- Yang W**, Klos K, Yang Y, Smith TL, Shi D, Yu D. ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma. *Cancer.* 2002;94(11):2855-61.
- Yao PL**, Lin YC, Wang CH et al. Autocrine and Paracrine Regulation of IL-8 Expression in Lung Cancer Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(6):540-7.
- Yin MJ**, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature.* 1998;396(6706):77-80.
- Yokoyama C**, Takai T, Tanabe T. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.* 1988;231(2):347-51.
- Zachary I**. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 6):1171-7.
- Zhang X**, Morham SG, Langenbach R, Young DA. Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts. *J Exp Med.* 1999;190:451-60.
- Zhang L**, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science.* 2000;290(5493):989-92.
- Zingg D**, Riesterer O, Fabbro D et al. Differential activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt survival pathway by ionizing radiation in tumor and primary endothelial cells. *Cancer Res.* 2005;64(15):5398-406.
- Zuck B**, Goepfert C, Nedlin-Chittka A et al. Regulation of fibroblast growth factor-like protein(s) in the androgen-responsive human prostate carcinoma cell line LNCaP. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;41(3-8):659-63.
- Zweifel BS**, Davis TW, Ornberg RL, Masferrer JL. Direct evidence for a role of cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 in human head and neck xenograft tumors. *Cancer Res.* 2002;62(22):6706-11.

7. Anhang

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Ak	Antikörper
ASA	Acetylsalicylsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> – Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Cox(e)	Cyclooxygenase(n)
DAB	Diamino benzidine tetrachlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N', N'-tetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
FGF-2	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung
Gy	Gray
h	hours – Stunden
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HRP	<i>Horse Raddish Peroxidase</i>
hu	human
IC ₅₀	<i>Inhibition concentration 50</i>
IL	Interleukin
JNK	<i>c-JUN N-terminal kinases</i>
Konz.	Konzentration(en)
l	Liter
LD ₅₀	letale Dosis 50
Lsg.	Lösung
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
mg	Milligramm
min.	Minuten
mm	Millimeter
mM	Milimolar
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
NF-kappaB	<i>Nuclear factor-kappaB</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid

NSAIDs	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory Drugs</i>
O ₂	molekularer Sauerstoff
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
pg	Pikogramm
PG	Prostaglandin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PK	Proteinkinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
pM	Pikomolar
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	<i>Radiation Therapy</i> , Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
ü.N.	über Nacht
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

II. Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 1:	Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese	4
Abb. 2:	Modell des Tumorexigenenzustandes und der Radioresistenz in Abhängigkeit von der TumorgroÙe.	7
Abb. 3:	Hypoxie und Bestrahlung induzieren angiogene Faktoren wie VEGF, wodurch die Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Therapien erhöht wird.....	9
Abb. 4:	Angiogeneseabhängige Erkrankungen.....	10
Abb. 5:	Initiation der Angiogenese.	11
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Wirkungen der Tumortherapien.....	12
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Tumorangiogenese und Antiangiogenese.....	14
Abb. 8:	Regulation der Degradation und Stabilität von HIF-1 α unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen.	18
Abb. 9:	Übersicht der VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und NP-1.	20
Abb. 10:	Signaltransduktionskaskade von VEGF.....	21
Abb. 11:	Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden von FGF-2.....	24
Abb. 12:	Prostaglandinproduktion durch die Cyclooxygenasen und deren Inhibition.....	26
Abb. 13:	Strukturformel der Acetylsalicylsäure.....	31
Abb. 14:	Strukturformel von Flurbiprofen.	32
Abb. 15:	Strukturformel von Meloxicam.	33
Abb. 16:	Strukturformel von NS-398.	33
Abb. 17:	Strukturformel von Lumiracoxib	34
Abb. 18:	Sezerniertes und intrazellulär detektiertes VEGF (A) und FGF-2 (B) von Dept.	59
Abb. 19:	Bestrahlung verzögert das Wachstum der SCC-Linie Dept.....	60
Abb. 20:	Bestrahlung verzögert das Wachstum von HUVEC.	61
Abb. 21:	Bestrahlung steigert die Sezernierung (A) und das intrazelluläre Vorkommen (B) von VEGF bei der HNSCC-Linie Dept.	63
Abb. 22:	Bestrahlung steigert die Sezernierung (A) und das intrazelluläre Vorkommen (B) von FGF-2 bei der HNSCC-Linie Dept.....	64
Abb. 23:	Fraktionierte Bestrahlung von Dept erhöht die Sekretion von VEGF (A) und FGF-2 (B)	66

Abb. 24:	Durch Bestrahlung konditioniertes Kulturmedium erhöht das Überleben der Tumorzelllinien Dept, Hun und A549.	67
Abb. 25:	Die Kokultur von HUVEC mit Tumorzellen reduziert dosisabhängig den strahleninduzierten Zelltod	69
Abb. 26:	Die Kokultur von HUVEC mit Tumorzellen reduziert zeitabhängig den strahleninduzierten Zelltod	70
Abb. 27:	CM fördern das Überleben von HUVEC nach Bestrahlung.	71
Abb. 28:	Durch Bestrahlung konditionierte Tumorzellkulturüberstände förderten die Migration von HUVEC	74
Abb. 29:	Koloniebildung der SCC-Linien Dept (A), Hun (B) und HUVEC (C) mit VEGF-Subtypen	76
Abb. 30:	Proliferation der SCC-Linien Dept (A), Hun (B) und HUVEC (C) mit VEGF-Subtypen	78
Abb. 31:	Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF121 und VEGF165.	82
Abb. 32:	Wirkung der Bestrahlung auf die Aktivierung des VEGFR-2	83
Abb. 33:	Die Koloniebildungsfähigkeit wird durch Flurbiprofen deutlich reduziert	85
Abb. 34:	Die Koloniebildungsfähigkeit nach Inkubation mit Lumiracoxib	85
Abb. 35:	Die Koloniebildungsfähigkeit wird durch Cox-Inhibitoren reduziert	86
Abb. 36:	Flurbiprofen inhibierte die Bestrahlungsinduktion von PGE2.	87
Abb. 37:	Wirkung von Flurbiprofen auf das bestrahlungsinduzierte VEGF (A), FGF-2 (B) und IL-8 (C)	90
Abb. 38:	Wirkung von Flurbiprofen auf das bestrahlungsinduzierte VEGF (A), FGF-2 (B)	91
Abb. 39:	Wirkung von Lumiracoxib auf das bestrahlungsinduzierte VEGF	92
Abb. 40:	Das bestrahlungsinduzierte FGF-2 wird durch Lumiracoxib reduziert	93
Abb. 41:	Wirkung von Meloxicam auf das bestrahlungsinduzierte VEGF	94
Abb. 42:	Das bestrahlungsinduzierte FGF-2 wird durch Meloxicam reduziert	96
Abb. 43:	Die Tumorprogression wird durch Bestrahlung reduziert, allerdings nicht durch NS-398.	97
Abb. 44:	Cox-Inhibitoren verzögern die Heilung von HUVEC.	101
Abb. 45:	Bestrahlung induziert Hif-1 und die Produktion protektiver Faktoren.	106

III. Tabellenverzeichnis

Seite

Tab. 1:	Behandlungserfolg bei kombinierter Radio-Chemotherapie und RT.	5
Tab. 2:	Angiogene und angiostatische Faktoren	15
Tab. 3:	Induktoren und natürliche Inhibitoren von Cox-2	27
Tab. 4:	SCC-Linien und deren Herkunft	36
Tab. 5:	Hersteller und verwendete Verdünnungen der Antikörper	38
Tab. 6:	Konzentrationen der untersuchten Cox-Inhibitoren	46
Tab. 7:	Schema der fraktionierten Bestrahlung und Probenahme	48
Tab. 8:	Konzentrationen der im Koloniebildungsassay verwendeten Cox-Inhibitoren	51
Tab. 9:	Konzentrationen der im Migrationsassay verwendeten Cox-Inhibitoren	52
Tab. 10:	Verteilung und Intensität der immunhistochemischen Färbung bei Dept, Hun und HUVEC	79