

Simon Ninck
Dr. med.

Sekretion, klinische und funktionelle Aspekte angiogener Wachstumsfaktoren in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

Geboren am 23.02.1975 in Aachen
Reifeprüfung am 31.05.1994 in Bottrop
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995/96 bis WS 2002/03
Physikum am 10.09.1997 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg, Montpellier (Frankreich) und Berlin
Praktisches Jahr in Berlin, Paris, Schwyz (Schweiz)
Staatsexamen am 02.12.2003 an der Freien Universität Berlin

Promotionsfach: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. C. Reißer

Die tumorinduzierte Neoangiogenese, d.h. die Versorgung des Tumors mit neuen Blutgefäßen, gilt inzwischen als Grundvoraussetzung für Tumorwachstum und Metastasierung. Sie wird initiiert durch die Abgabe sogenannter angiogener Wachstumsfaktoren von Seiten der Tumorzellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es 1) die Sekretionsmuster der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF-AB, PDGF-BB, G-CSF, GM-CSF und bFGF in HNSCCs zu untersuchen, 2) sich daraus ergebende Wachstumsfaktorprofile auf mögliche Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern zu analysieren, sowie 3) mögliche autokrine Effekte der diesbezüglich in HNSCC noch nicht untersuchten Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF zu untersuchen.

Ad 1) Es wurden zunächst 15 in unserem Labor etablierte HNSCC-Kulturen immunhistochemisch hinsichtlich der Beibehaltung bestimmter tumortypischer Gewebemarker und dem Fehlen von Markern für andere Gewebetypen untersucht. An diesen HNSCC-Kulturen wurde die Abgabe der zuvor genannten Wachstumsfaktoren mit Hilfe eines standardisierten ELISA-Verfahrens im konditionierten Zellkulturmediumüberstand nachgewiesen. Ad 2) Zusätzlich wurden die klinischen Daten der entsprechenden Patienten erhoben und eine statistische Auswertung mittels Fisher-Test und Log-Rank-Test vorgenommen. Ad 3) Zur Überprüfung einer möglichen autokrinen Wirkweise von G-CSF und GM-CSF wurde zunächst die mRNA-Expression dieser Cytokine in den Ausgangsgeweben der HNSCC-Kulturen durch *in situ* Hybridisierungen überprüft. Weiterhin wurde die Expression der entsprechenden Wachstumsfaktorrezeptoren an den korrespondierenden Tumorzelllinien immunhistochemisch nachgewiesen und schließlich *in vitro* der Einfluss von G-CSF und GM-CSF in einem Proliferationsassay in Rezeptor-exprimierenden Kulturen analysiert. Hierbei wurde der photometrisch messbare Einbau des markierten Basenanalogons BrdU bestimmt.

In allen 15 Kulturen konnte eine homogene Expression der epitheltypischen Cytokeratine nachgewiesen werden. Die Expression von Markern, die auf eine Verunreinigung mit Endothelzellen hingedeutet hätten, wurde nicht beobachtet. Die anschließende Quantifizierung verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren an konditionierten Medien dieser Kulturen zeigte, dass VEGF in 13/15 Tumoren (83%), PDGF-AB ebenfalls in 13/15 Tumoren (83%), GM-CSF in 7/15 Tumoren (47%) und G-CSF in 6/15 Tumoren (40%) in biologisch aktiven Mengen sezerniert werden. Vor allem für VEGF, PDGF-AB und GM-CSF konnten Höchstmengen von bis zu 13ng/ml/1 Million Zellen festgestellt werden. Dahingegen waren bFGF und PDGF-BB nur in geringen und nicht in biologisch aktiven Mengen

detektierbar. Die Analyse der gleichzeitig exprimierten Wachstumsfaktoren ergab folgende charakteristische Expressionsprofile: alle Tumorzellkulturen sezernierten VEGF und / oder PDGF-AB. Hierbei konnte in 20% der untersuchten Mediumüberstände die Abgabe eines Wachstumsfaktors, in 60% die von zwei oder drei Wachstumsfaktoren und in weiteren 20% die gleichzeitige Sekretion eines Maximums von vier Wachstumsfaktoren festgestellt werden. Besonders auffallend war außerdem, dass G-CSF und GM-CSF stets in Kombination mit VEGF und / oder PDGF-AB nachgewiesen werden konnten. Der Vergleich mit den klinischen Daten der entsprechenden Patienten zeigte, dass die Abgabe von mehr als zwei Wachstumsfaktoren gleichzeitig, die in der Regel durch eine zusätzliche Abgabe von G-CSF und / oder GM-CSF gekennzeichnet war, mit einem signifikant schlechteren Überleben des Patienten korrelierte.

Die Untersuchungen zur Frage, ob G-CSF und GM-CSF neben der bekannten parakrinen Wirkung auf Endothelzellen auch autokrin auf die Tumorzellen selbst wirken, führten zu folgenden Ergebnissen: Im Ausgangstumorgewebe, das zu den HNSCC-Kulturen korrespondierte, konnte mittels *in situ* Hybridisierung eine mRNA-Expression von G-CSF und GM-CSF in Tumorzellen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde immunhistochemisch die Expression der jeweiligen Rezeptoren in allen untersuchten Tumorzelllinien gezeigt. Die Zugabe von G-CSF bzw. GM-CSF zu Rezeptor-exprimierenden Tumorzellen führte *in vitro* zu einer dosisabhängigen Zunahme der Tumorzellproliferation von bis zu 45% im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Aus den vorgestellten Ergebnissen lassen sich mehrere Schlussfolgerungen ableiten: 1) Die hier vorgestellten Untersuchungen weisen erstmals darauf hin, dass nicht nur VEGF sondern auch PDGF-AB eine zentrale Rolle in der Angiogenese von Kopf-Hals-Tumoren zu spielen scheinen. 2) Die zusätzliche Abgabe von G-CSF und / oder GM-CSF führt zu einer signifikanten Verschlechterung des Überlebens der entsprechenden Patienten. 3) Eine anti-angiogene Therapie bei HNSCC-Patienten, die die Blockierung nur eines angiogenen Wachstumsfaktors bzw. Wachstumsfaktorsignalweges zum Ziel hat, ist deshalb nicht empfehlenswert. 4) G-CSF und GM-CSF scheinen sowohl parakrin auf Endothelzellen wie auch autokrin auf die Proliferation von Rezeptor-exprimierenden Tumorzellen zu wirken. Aufgrund dieser Ergebnisse kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass unter der therapeutischen Applikation von G-CSF und / oder GM-CSF nach einer Chemotherapie auch eine Stimulation der Tumorzellen mit einem nachfolgend verstärktem Tumorwachstum auftreten könnte. Deshalb muss in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse der therapeutische Einsatz dieser Wachstumsfaktoren nach einer tumorsupprimierenden Chemotherapie bei HNSCC kritisch überdacht werden.