

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München  
(Leiter: Priv.-Doz. Dr. V. Meinecke)

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

Untersuchungen zum Einfluss von  $\beta$ 1-Integrin auf die  
Zellzyklusregulation in normalen Fibroblasten nach Exposition mit  
ionisierender Strahlung

Rita Anne Zettl

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. N. Cordes,  
Technische Universität Dresden  
2. Univ.- Prof. Dr. G. Multhoff

Die Dissertation wurde am 27.01.2011 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2011  
angenommen.

## **Kurz-Zusammenfassung**

$\beta$ 1-Integrin vermittelte Zelladhäsion führt zu gesteigerter Radio- und Chemoresistenz von Tumorzellen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von  $\beta$ 1-Integrin auf den Zellzyklus analysiert. Drei murine Zelllinien, GD25 (ohne  $\beta$ 1-Integrinexpression), GD25 $\beta$ 1A (mit funktionsfähigen  $\beta$ 1-Integrin) und GD25 $\beta$ 1B (mit mutiertem  $\beta$ 1-Integrin) wurden bezüglich ihrer Verteilungen auf die Zellzyklusphasen untersucht. Auf Fibronektin und Polystyrol kultivierte Zellen wurden in An- und Abwesenheit von Serum, unter Inhibition der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) und des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) bis 6 Gy bestrahlt.  $\beta$ 1-Integrinsignale führen, unabhängig von Bestrahlung, PI3K- und EGFR-Funktion, zur zellulären Akkumulation in der G2-Phase. Wachstumsfaktoren verstärken diesen Effekt und Entzug derselben führt postradiogen stets zur Ausbildung eines S-Phaseblocks. Fibronektin trägt unabhängig von  $\beta$ 1-Integrinsignalen, zur zellulären Progression durch den Zellzyklus bei.

## Short Abstract

$\beta$ 1-Integrin mediated cell adhesion is established to confer to cellular radio and chemo resistance of tumor cells. To determine the influence of  $\beta$ 1-integrin on cell cycle after genotoxic injury, three different cell lines, the integrin  $\beta$ 1-deficient GD25 cell line, wild-type  $\beta$ 1-integrin expressing GD25 $\beta$ 1A and GD25 $\beta$ 1B cells which express signal incompetent  $\beta$ 1B-integrin were analyzed in respect to their distribution on cell cycle phases. Cells, grown on fibronectin and polystyrol were exposed to ionizing radiation. The investigations included depletion of growth factors as well as inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and epidermal growth factor receptor (EGFR). We found that  $\beta$ 1A-integrin signaling significantly elevated the content of cells in G2-phase consistently. This effect was amplified by growth factors and was independent of ionizing radiation and inhibition of PI3K and EGFR. After irradiation growth factor depletion caused constantly, dependent of competent integrin signaling, an accumulation of cells in S-phase. In presence of fibronectin, cells showed accelerated progression through cell cycle independent of  $\beta$ 1-integrin signaling. This study illustrates an essential influence of  $\beta$ 1-Integrin signaling on cellular progression through cell cycle after genotoxic injury.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Wirkung von $\beta$ 1-Integrin unter ionisierender Strahlung	5
1.2 Wirkung von $\beta$ 1-Integrin auf den Zellzyklus	7
<b>2. Material</b>	<b>13</b>
2.1 Zelllinien	13
2.2 Medium	13
2.3 Geräte und Hilfsmittel	14
2.4 Reagenzien	14
2.5 Rezeptorliganden und Inhibitoren	15
2.6 Antikörper	15
<b>3. Methoden</b>	<b>16</b>
3.1 Zellkultur	16
3.2 Bestrahlung	16
3.3 Zellzyklusanalyse	17
3.4 Statistik	18
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>19</b>
4.1 Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 und GD25 $\beta$ 1A Zellen über 48 Stunden ohne Bestrahlung sowie nach 2 Gy und 6 Gy Bestrahlung	19
4.2 Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Plastik	23
4.2.1 Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen unter Einfluss ionisierender Strahlung und Wachstumsfaktoren	23
4.2.2 Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen unter Einfluss von PI3K-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren	28

## Inhaltsverzeichnis

4.2.3	Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen unter Einfluss von DMSO, mit und ohne Wachstumsfaktoren	35
4.2.4	Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen unter Einfluss von EGFR-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren	35
4.3	Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin	39
4.3.1	Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin unter Einfluss ionisierender Strahlung und Wachstumsfaktoren	39
4.3.2	Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin unter Einfluss von PI3K-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren	42
4.3.3	Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin unter Einfluss von DMSO, mit und ohne Wachstumsfaktoren	49
4.3.4	Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin unter Einfluss von EGFR-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren	49
4.4	Vergleich von GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1B und GD25 Fibroblasten nach 0 Gy und 6 Gy Bestrahlung	54
4.4.1	Nach Kultivierung auf Plastik	55
4.4.2	Nach Kultivierung auf Fibronectin	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
5.1	Untersuchungen ohne Bestrahlung	58
5.1.1	Voruntersuchungen ohne Wachstumsfaktoren	58
5.1.2	Untersuchungen mit Wachstumsfaktoren	59
5.2	Untersuchungen mit ionisierender Strahlung ohne Wachstumsfaktoren	62

## Inhaltsverzeichnis

5.3 Untersuchungen mit ionisierender Strahlung mit Wachstumsfaktoren	63
5.3.1 Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A mit GD25 Zellen über 48 Stunden	63
5.3.2 Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A mit GD25 $\beta$ 1B Zellen	63
5.4 Vergleiche der drei Zelllinien	65
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>75</b>

# 1. Einleitung

Tumorerkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen der westlichen Industrieländer. Neben den konventionellen Therapiemöglichkeiten der Chirurgie, der Chemotherapie und der Strahlentherapie stellt die Entwicklung und Kombination molekulargenetischer Therapeutika einen großen Hoffnungsträger für die zukünftige Krebstherapie dar.

Die zelluläre Interaktion mit der extrazellulären Matrix sowie deren Modulation durch Tumorzellen konnte mit einer signifikant erhöhten Resistenz gegenüber genotoxischen Einflüssen wie Zytostatika und ionisierender Strahlung assoziiert werden. Integrine, eine Familie transmembraner Adhäsionsrezeptoren, kommen auf nahezu allen Zelloberflächen von Säugetieren vor. Sie beeinflussen dabei entscheidend die Assoziation zwischen extrazellulärer Matrix (EZM) und intrazellulären Signalproteinen durch Interaktion mit multiplen Signal- und Adapterproteinen sowie Wachstumsfaktorrezeptoren. Durch Integrine hervorgerufene Signalkaskaden haben wesentliche Auswirkungen auf essentielle Zellfunktionen wie Überleben, Differenzierung, Migration, Apoptose und Proliferation.

Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die Signaltransduktion von  $\beta$ 1-Integrin signifikanten Einfluss auf die zelluläre Progression durch den Zellzyklus nach Exposition mit ionisierender Strahlung hat. Dazu wurden drei murine Fibroblasten-Zelllinien kultiviert und untersucht. GD25 Zellen exprimieren kein  $\beta$ 1-Integrin, GD25 $\beta$ 1A Zellen exprimieren Wildtyp- $\beta$ 1-Integrin, GD25 $\beta$ 1B Zellen exprimieren mutiertes  $\beta$ 1-Integrin. GD25 $\beta$ 1B Zellen können adhärieren, sind aber zur Signaltransduktion unfähig.

Ziel der Arbeit war die Bedeutung der Signaltransduktion von  $\beta$ 1-Integrin unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit und ohne ionisierender Strahlung herauszustellen. Dazu wurden die Einflüsse von Wachstumsfaktoren, des endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin in Bezug auf die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen untersucht.

Im Wesentlichen ist über die Wirkung von  $\beta$ 1-Integrin folgendes bekannt:

### 1.1 Wirkung von $\beta$ 1-Integrin nach ionisierender Strahlung

Durch zelluläre Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine wie zum Beispiel Fibronectin führen  $\beta$ 1-Integrine zu gesteigerter zellulärer Radioresistenz (CAM-RR) und Chemoresistenz (CAM-CR) [11]. Dies wurde zum Beispiel für das kleinzellige Bronchialkarzinom [28], das Mammakarzinom [63] und das frühe Glottiskarzinom [8] nachgewiesen. Cordes et al. haben an humanen Tumorzelllinien, als auch an normalen humanen Zellen eine durch Bestrahlung induzierte, vermehrte  $\beta$ 1-Integrin Zelloberflächenexpression mit entsprechend verstärkter Adhäsion beobachtet. Dies war abhängig von Strahlendosis und den Matrixproteinen, auf welchen die Zellen kultiviert wurden. Die Kultivierung auf Fibronectin führte dabei nach ionisierender Strahlung zu starker Zunahme zellulärer  $\beta$ 1-Integrin-Oberflächenexpression [10]. Die daraus resultierende, gesteigerte zelluläre Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, wird mit einer Erhöhung der Strahlenresistenz bei einer Vielzahl humaner Malignome diskutiert. Die vermehrte  $\beta$ 1-Integrin-Expression konnte *in vivo* mit erhöhtem Tumorwachstum, größerer Invasions- und Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert werden [10]; [27]. Schlüsselproteine waren dabei vor allem die fokale Adhäsionskinase (FAK), die Integrin-gekoppelte Kinase (ILK), die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (AKT) [27].

Durch ionisierende Strahlung werden große Mengen von reaktiven Sauerstoff-Radikalen (ROS) erzeugt. Durch die instabile Elektronenkonfiguration reagieren ROS überaus leicht mit anderen Molekülen [57] und können das zelluläre Überleben nach Bestrahlung beeinflussen. Ionisierende Strahlung kann indirekt über ROS zu spezifischen Phosphorylierungen von Signalproteinen an fokalen Adhäsionen führen. Durch die  $\beta$ 1-Integrin-assoziierte fokale Adhäsionskinase (FAK) kann das zelluläre Überleben nach ionisierender Strahlung gefördert werden. Ionisierende Strahlung führt zu einer gesteigerten Autophosphorylierung von FAK wodurch die Interaktion mit Signalproteinen wie src-Kinasen, Paxillin und p130CAS begünstigt wird. Durch die anschließende Rekrutierung von Grb2/SOS kommt es unter anderem zur überlebensfördernden Aktivierung des Ras/Raf/MEK/MAPK Signalweges. Über den PI3K/AKT Signalweg wird zudem die Apoptose assoziierte DNA Fragmentierung und Aktivierung der Caspasen 3 und 8 gehemmt [12]; [33]; [35]. Über denselben Signalweg wird auch die Expression von Apoptose-induzierenden Proteinen wie zum Beispiel Bad gehemmt [27]. Weitere Untersuchungen von  $\beta$ 1A-Integrin haben eine von FAK unabhängige Transduktion der überlebensfördernden Signale über p130CAS, Paxillin und JNK beschrieben [14].



## Einleitung

Signalfähigkeit von  $\beta$ 1-Integrin steigert das postradiogene Überleben. Seidler et al. erklärten die Signalfähigkeit der zytoplasmatischen Domäne von  $\beta$ 1-Integrin als entscheidende Ursache des gesteigerten zellulären Überlebens nach ionisierender Strahlung [54].  $\beta$ 1-Integrin wirkt dabei über die PI3K-abhängige Stimulation von PKB/Akt und den Signalweg über p130CAS/ Paxillin/ c-Jun N-terminale Kinase (JNK) überlebensfördernd [18]. Diese Beobachtung war von Wachstumsfaktoren unabhängig.

Unter ionisierender Strahlung konnte eine durch  $\beta$ 1-Integrin vermittelte erhöhte Expression von Matrix-Metalloprotease-2 (MMP-2) beobachtet werden. Dies beeinflusst die zelluläre Differenzierung, die Motilität und das Remodelling der EZM [11]. Die enzymatische Spaltung der EZM durch MMP-2 bewirkt die Freisetzung von Faktoren, welche zelluläres Wachstum und Migration fördern. Diese sind physiologisch bei der Wundheilung von Bedeutung und haben bei Malignomen eine pro-proliferative und pro-migrative Wirkung [53]. Die  $\beta$ 1-Integrin-Bindung mit der extrazellulären Matrix (EZM) bewirkt eine Stabilisierung der Mitochondrienmembran, wodurch die Aktivierung der Procaspasen 3 und 9 gehemmt wird [16]. Die Expression von Apoptose-hemmenden Proteinen der Bcl-2-Familie wird durch die  $\beta$ 1-Integrin vermittelte Zelladhäsion gesteigert. Integrin vermittelte Adhäsion an die EZM wirkt überlebensfördernd durch die Herunterregulation pro-apoptotischer Proteine wie Bim und Bax [40]; [24]; [27].

$\beta$ 1-Integrin vermittelte zelluläre Adhäsion führt zu einer Komplexbildung von  $\beta$ 1-Integrin mit Akt und Procaspase 8. Dadurch wird die PI3K-abhängige, durch Procaspase 8 vermittelte, Apoptose verringert [52].

$\beta$ 1-Integrin beeinflusst die zelluläre Radiosensitivität auch durch die Integrin gekoppelte Kinase (ILK). In der Literatur werden dazu verschiedene Ansichten diskutiert. Cordes et al. und Eke et al. führten bei murinen Fibroblasten und Bronchialkarzinomzellen eine höhere Aktivität von ILK auf gesteigerte zelluläre Radiosensitivität verbunden mit reduziertem, postradiogenen Überleben zurück. Dies wurde unter anderem mit einer Beeinträchtigung der Zell-Matrix-Adhäsion und einer Dysregulation des AKT/ MAPK-Signalweges erklärt. Im Gegensatz dazu wurde unter anderem bei Kolonkarzinomzellen und Chondrosarkomzellen gesteigerte Aktivität von ILK mit schlechterer zellulärer Differenzierung und höherem Tumorigrad assoziiert. Der Einfluss von ILK auf die zelluläre Radiosensitivität und Malignität wird aktuell zelllinienspezifisch beschrieben [16]; [19].

## 1.2 Wirkung von $\beta$ 1-Integrin auf den Zellzyklus

Die  $\beta$ 1-Integrin vermittelte Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix kann, Zelllinien variabel, positiv regulierenden Einfluss auf die Proliferation haben. Über die Blockierung der Proteolyse von Cyclin D1 sowie über die Hyperphosphorylierung von Protein Retinoblastom (pRB) kann das zelluläre Fortschreiten im Zellzyklus gefördert werden [29].

Zelladhäsion durch  $\beta$ 1-Integrin an die EZM fördert bei normalen Fibroblasten die zelluläre Passage durch die G<sub>1</sub>-Phase. Ligandenbindung führt zu einer Aktivierung von ILK, wodurch eine PI3K-abhängige Phosphorylierung und damit Inhibition von Glycogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) entsteht. Dies führt einerseits zur Hemmung der Proteolyse von Cyclin D1, zum anderen wird die Transcription von NF $\kappa$ B /AP1 induziert. Dadurch entsteht die Induktion von D-Typ Cyclinen und eine Erhöhung der Stabilität Cyclin D1 (über die PKB-abhängige Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ ). Der Abbau der Cyclin-inhibitorischen Kinasen p21<sup>CIP/WAF1</sup> und p27Kip1 wird zudem gefördert und trägt zur Progression der Zellen aus der G<sub>1</sub> in die S-Phase bei [1]; [62].

Als maßgeblich beteiligt bei diesem Integrin-Signalweg wird auch die Aktivierung der MAPK-Kaskade diskutiert. Zelluläre Adhäsion durch  $\beta$ 1-Integrin führte nach Exposition mit ionisierender Strahlung bei humanen Fibroblasten der Lunge zu einer Verlängerung des Zellzyklusarrests in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase. Dieses verlängerte Zeitintervall wird als Maßnahme zur Optimierung der DNA-Reparatur angesehen [27].

Durch die Beeinflussung der Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen hat  $\beta$ 1-Integrin auch Einfluss auf die allgemeine zelluläre Radiosensibilität. Die zelluläre Radiosensibilität ist von der Zellzyklusphase abhängig. Zellen in der G<sub>1</sub> oder G<sub>0</sub>-Phase sind nahezu strahlenresistent. In der S-, G<sub>2</sub>- oder M-Phase hingegen sind die Zellen strahlensensibel [12].

Die Signalwege von  $\beta$ 1-Integrin wirken zudem förderlich auf die Integrität des Genoms. Bei hämatopoetischen Tumorzellen wurde eine  $\beta$ 1-Integrin vermittelte Adhäsion an Fibronectin mit einer Reduzierung von DNA-Doppelstrangbrüchen und Apoptose assoziiert. Dies wurde mit einer verringerten enzymatischen Aktivität von DNA-Topoisomerase-II beobachtet [25]; [26]. Tumorzellen, wie zum Beispiel Bronchialkarzinom-Zellen, konnten, lt. Hodkinson et al. durch  $\beta$ 1-Integrin vermittelte Adhäsion an die EZM den physiologischen G<sub>2</sub>/M-Phase Arrest des Zellzyklus nach genotoxischer Schädigung überwinden. Dies wurde durch die  $\beta$ 1-Integrin vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase hervorgerufen. Die Aktivierung von PI3K durch  $\beta$ 1-Integrin führt dabei, nach Phosphorylierung von PKB und GSK3 $\beta$ , zur Herunterregulation der

## Einleitung

Expression von Zellzyklus hemmenden Proteinen wie p21<sup>CIP/WAF1</sup> und p27Kip1 sowie zu reduzierter Phosphorylierung von Cyclin-abhängiger Kinase1 (CDK1). Dadurch kommt es zur Aufrechterhaltung der Expression von Cyclin D, E, A und B und der Phosphorylierung von Cyclin-abhängiger Kinase2 (CDK2) (Abb.1). Dies war unabhängig von persistierendem DNA-Schaden und förderte die zelluläre Progression durch den Zellzyklus. Nach genotoxischem Schaden durch ionisierende Strahlung kann  $\beta$ 1-Integrin vermittelte zelluläre Adhäsion bei Tumorzellen einen verlängerten Zellzyklusarrest und die Aktivierung von Caspase 3 mit nachfolgender Apoptose verhindern [28].

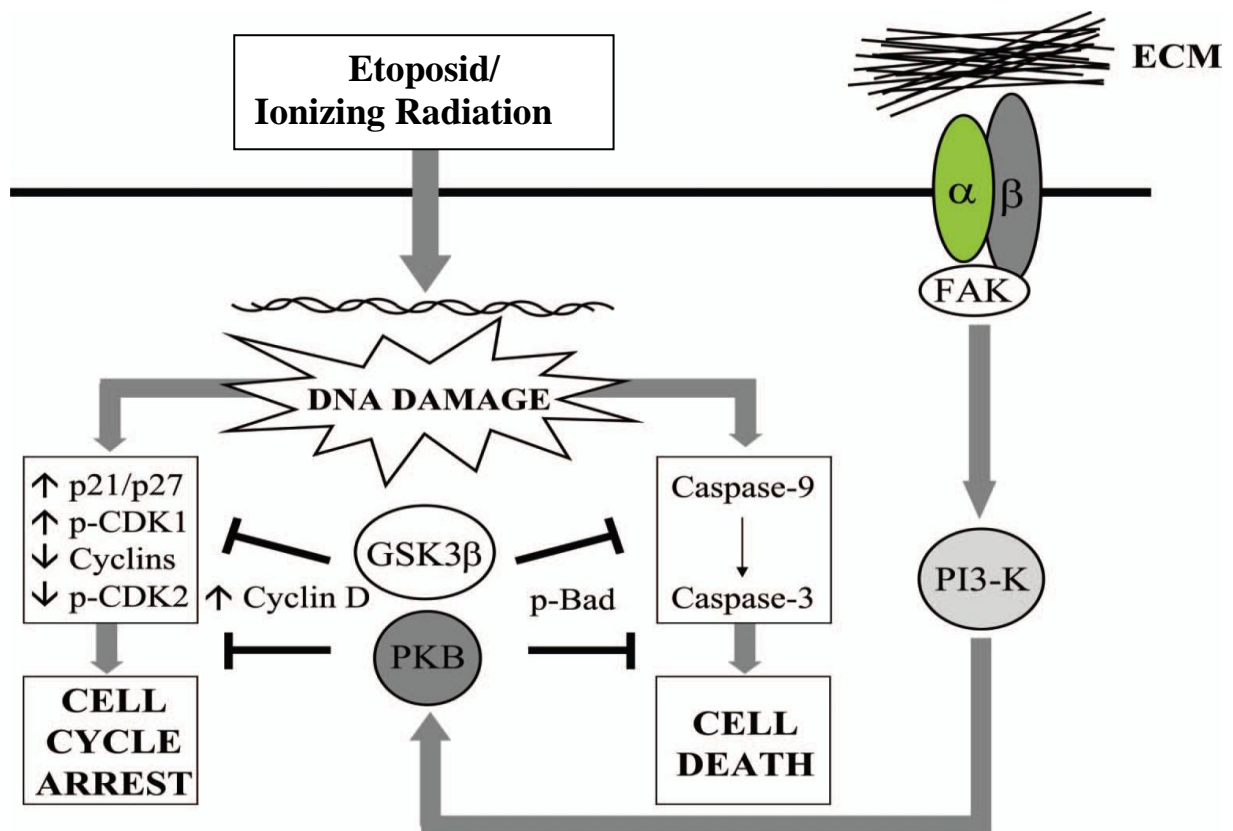


Abb1.1: Übersicht zum Einfluss von  $\beta$ 1-Integrin vermittelter Zelladhäsion auf den Zellzyklus und das Überleben in Bronchialkarzinomzellen nach DNA-Schaden durch ionisierende Strahlung oder Etoposid [29].

### **1.3 Interaktion von $\beta$ 1-Integrin- und Wachstumsfaktor-Rezeptor-Signalwegen**

Signalwege von  $\beta$ 1-Integrinen und Wachstumsfaktorrezeptoren (Rezeptor-Tyrosinkinasen, RTK) beeinflussen durch wechselseitige Interaktion die zelluläre Progression durch den Zellzyklus. Diese ist abhängig von separaten  $\beta$ 1-Integrin Signalen, separaten RTK-Signalen, und der Kombination von  $\beta$ 1-Integrin und RTK-Signalen. Die Interaktionen der Signalwege von  $\beta$ 1-Integrinen mit epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR) waren bei mehreren Zelllinien über den Signalweg der über extrazelluläre Signale regulierten Kinase (ERK) und AKT vermittelt [55]. Ein Schlüsselmoment in der Regulation der zellulären Progression durch die G<sub>1</sub>-Phase ist die durch RTK-Integrin-Signale induzierte Cyclin D1 Expression. Die Aktivierung des gemeinsamen Signalwegs von MEK mit Translokation von ERK in den Zellkern resultiert, über Transkription von Erg-1-Gen und Abbau von p27, in einer vermehrten Expression von Cyclin D1. Dadurch wird die Progression der Zellen durch die G<sub>1</sub>- in die S-Phase gefördert. Diese ist bei Fibroblasten abhängig von Integrin vermittelter Adhäsion an die EZM. Die Adhäsion an die EZM wurde als Voraussetzung für alle adhären Zellen zur Progression durch den Zellzyklus beschrieben [6], [50], [55].

In der Literatur wurden Integrinsignale allein als nicht ausreichend bezeichnet, um Rezeptor-Tyrosinkinasen adäquat zu aktivieren. Erst eine Kombination von Signalen durch Wachstumsfaktor- RTK, Integrin- RTK und direkten Integrinsignalen führt zur zellulären Progression durch den Zellzyklus [32].

$\beta$ 1-Integrin zeigt über eine Kooperation mit Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), wie zum Beispiel dem epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor-1 (VEGFR-1), die Förderung der Expression von Cyclin D1. Dies wird über die gemeinsame Aktivierung von PI3K/AKT und Shc mit nachfolgender Wirkung auf GEF (engl. guanine nucleotide exchange factor), SOS (engl. son of sevenless), Rac-1 und anderen noch unbekanntem Signalmolekülen hervorgerufen. Ein Schlüsselprotein zwischen  $\beta$ 1-Integrin- und Wachstumsfaktor-Rezeptor-Signalweg ist dabei phosphoryliertes Caveolin-1. [17]; [42].

$\beta$ 1-Integrin Expression und RTK-Aktivität beeinflussen sich wechselseitig. Die adhäsionsbedingte Aktivierung von  $\beta$ 1-Integrin kann über den Komplex von Src und p130CAS zu einer Phosphorylierung und Aktivierung des EGF-Rezeptors führen. Dies war auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren auffällig. In Folge zeigte sich eine Aktivierung

## Einleitung

von Shc A, ERK und AKT. Dies hatte die Expression von Cyclin D1, die Phosphorylierung von CDK 4 und Protein Retinoblastom (Rb) zur Folge. Zur zellulären Progression des Zellzyklus aus der G1- in die S-Phase wurde die Liganden-induzierte Aktivierung der RTK beschrieben. Erst danach war die Herunterregulation von p27, die Aktivierung von CDK 2, Myc und Cyclin A mit entsprechendem Eintritt der Zelle in die S-Phase aufgetreten [55].

$\beta$ 1-Integrin kann die RTK-Aktivität auch negativ kontrollieren. Dies wurde bei Kollagen-bindendem  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin nachgewiesen. Die Interaktion von EGFR mit Shc A und Grb2 wurde dabei unterbunden [41]. Im Gegenzug kann die Expression von  $\beta$ 1-Integrin und die Aktivierung zur Bindung der EZM durch bestimmte Wachstumsfaktoren gesteigert werden. Fibroblastenwachstumsfaktor-2 kann eine Erhöhung der Expression von  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin bewirken. Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 führt ebenfalls zu einer Steigerung der  $\beta$ 1-Integrin und  $\beta$ 5-Integrin Expression [9]; [64]. In neuesten Untersuchungen zeigen auch die let-7a microRNA und Tetraspanine Einfluss auf die Integrin-Regulation [45], [4].

Die Bindungsaffinität von  $\beta$ 1-Integrin wird auch durch Elektrolyte wie Magnesium und Kalzium beeinflusst. Magnesium fördert die Integrin-Ligandenbindung, Kalzium wirkt dabei als kompetitiver Antagonist [38].

Bei GD25 Zellen wird sogar unabhängig von  $\beta$ 1-Integrin und EGF-Rezeptor-Signalen der PI3K/AKT Signalweg getriggert. AKT wird dabei über separate, noch unbekannt Mechanismen, von EGFR, FAK/Src, Abl oder anderen Src-Kinasen unabhängig aktiviert [3]; [59].

## Einleitung

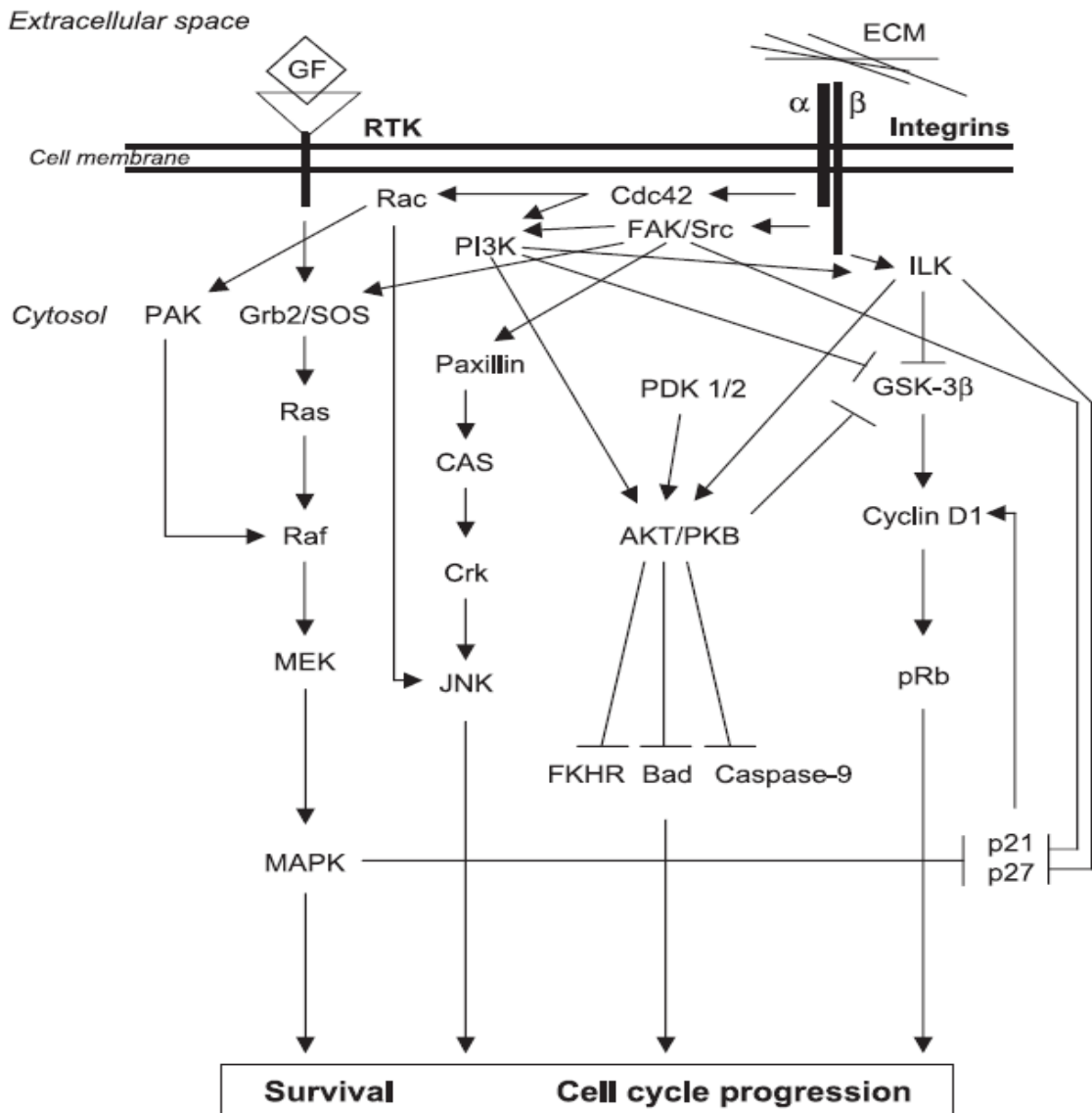


Abb. 1.2: Übersicht zur wechselseitigen Interaktion der Signalwege von  $\beta$ 1-Integrin und Wachstumsfaktor-Rezeptor [12].

Einfluss von  $\beta$ 1-Integrin auf den Zellzyklus ist auch über mechanische Transduktion möglich.  $\beta$ 1-Integrine stellen als Transmembranrezeptoren auch Mechanosensoren dar, die eine Verbindung zwischen der EZM, dem intrazellulären Aktinzytoskelett und dem Zellkern bewirken [39]. Durch Spannungsänderung der Zytoskelettfasern erfolgt eine Veränderung der Oberfläche des Zellkerns. Dadurch wird der nukleare Import von Transkriptionsfaktoren und damit Genexpression beeinflusst [22]. Die Bindung von  $\beta$ 1-Integrin an Fibronectin führt zu einer spannungsabhängigen Rekrutierung von mRNA und Ribosomen an die fokalen Adhäsionen. [7]. Die Translation von Cyclin D1 mRNA erfolgt dabei adhäsionsabhängig.

## Einleitung

Erhöhte Spannung der Zytoskelettfasern führt zu erhöhter Cyclin D1 Expression und Herunterregulation von CDK-Inhibitor p27Kip1. Dadurch wird die zelluläre Progression durch die G<sub>1</sub>/S-Phase begünstigt [30].

Mechanische Transduktion beeinflusst zudem das zelluläre Überleben. Abhängig von der Faserdehnung wird eine gesteigerte Bindung von Signalproteinen wie FAK, Paxillin und p130cas an das Zytoskelett hervorgerufen [56]. Folglich kann die EZM-β1-Integrin-Zytoskelett-Verbindung mechanische Kräfte in chemische Signale übersetzen. Neben zellulärem Überleben wird auch die zelluläre Progression des Zellzyklus durch Adhäsion beeinflusst.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinien

GD25	$\beta$ 1 - Integrin-defiziente Mausfibroblasten
GD25 $\beta$ 1A	GD25 Zellen mit Integrin $\beta$ 1A
GD25 $\beta$ 1B	GD25 Zellen mit Integrin $\beta$ 1B

Die GD25- $\beta$ 1A Zellen wurden in einer Kooperation mit Prof. Fässler (Abteilung für Molekulare Medizin, Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried), die GD25- $\beta$ 1B Zellen wurden von Dr. Velling (Department of Medical Biochemistry and Microbiology, The Biomedical Center, Uppsala University, Sweden) zur Verfügung gestellt. Die GD25 Zellen, welchen die Expression der  $\beta$ 1-Integrin Untereinheit auf Grund einer Null-Mutation im  $\beta$ 1-Integrin-Gen fehlt, leiten sich von dem embryonalen Stammzellklon G201 ab [61].

G201 Zellen wurden mit dem SV40 T-Antigen und Klonring transformiert, so dass immortalisierte  $\beta$ 1-Integrin defiziente Zellen entstanden. GD25-Zellen sind folglich homozygote  $\beta$ 1-Integrin knock-out Zellen. Über Transfektion dieser GD25-Zellen mit den cDNA-Vektoren  $\beta$ 1A und  $\beta$ 1B entstanden entsprechend die beiden Zelllinien GD25- $\beta$ 1A und GD25- $\beta$ 1B [2]. GD25- $\beta$ 1A-Zellen exprimieren dazu eine adhäsions- und signalkompetente Integrinvariante mit zur Interaktion mit Signalmolekülen fähigen NPxY-Motiven. Bei GD25- $\beta$ 1B-Zellen sind die letzten 21 Aminosäuren (AS) der cytoplasmatischen Domäne durch 12 AS einer Intron-Sequenz ersetzt, so dass diesen das NPxY-Motiv fehlt [14]. GD25- $\beta$ 1B-Zellen sind daher zwar adhäsionsfähig, weisen jedoch eine Bindungsinkompetenz für Signalproteine wie FAK, Paxillin, Talin und ILK auf. Auf beiden Membranoberflächen der Zelllinien wird die entsprechende Integrinvariante quantitativ gleich exprimiert [2].

### 2.2 Medium

DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium (Gibco, Karlsruhe)
FCS	Fetal Calf Serum Gold (PPA, Pasching, Österreich)
NEA	nichtessentielle Aminosäuren (Gibco, Karlsruhe)

Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM (500ml) mit 10% FCS (55ml) und 1% NEA (5,5ml) versetzt. Lagerung steril bei 4°C.



## 2.3 Geräte und Hilfsmittel

### **Zellkultur**

<i>Sterilbank</i>	Hera safe (Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau)
<i>Brutschrank</i>	BBD 6220 (Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau)
<i>Wasserbad</i>	TW 8 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)
<i>Umkehrmikroskop</i>	Axiovert 10 (Zeiss, Oberkochen)
<i>Neubauer Zählkammer</i>	(Baacklab, Schwerin)
<i>Zellzähler</i>	Z2 Particle Analyzer (Beckham Coulter, Krefeld)
<i>Zellkulturflaschen</i>	25cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Falcon-Röhrchen</i>	15ml, 50ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Kryoröhrchen</i>	1ml (Nalgene, Hereford, United Kingdom)
<i>Abkühlbehälter</i>	Freezing Container (Nalgene, Hereford, United Kingdom)

### **Bestrahlung**

<i>Röntgenröhre</i>	Isovolt 320/10 (Seifert, Ahrensburg)
<i>Dosimeter</i>	SN-4 (PTW, Freiburg)
<i>Prüfstrahler</i>	Isotop: 90 Sr, 33 MBq (Dr. Pychlau, Freiburg)

### **Zellzyklus-Analyse**

<i>Zenrifuge</i>	Sigma 202-MK (Sigma, Osterode)
<i>Durchflusszytometer</i>	FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Software</i>	CELLQuest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg)

## 2.4 Reagenzien

### **Zellkultur**

<i>Trypsin</i>	Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe)
----------------	--------------------------------------

### **Zellzyklus-Analyse**

<i>BrdU</i>	5-Brom-2-deoxyuridin 1mM (Serva, Heidelberg)
<i>Ribonuklease A</i>	III-A 0,01% PBS (Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>Pepsin</i>	0.7 FIP-U 0,5% in 0,05N HCL pH 1,3 (Merck, Darmstadt)

## Material

<i>Propidium Jodid</i>	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>HCL</i>	Salzsäure 37% (Merck, Darmstadt)

### *Phosphat gepufferte Salzlösung (Stammlösung, 10-fach PBS)*

<i>NaCl</i>	80g
<i>KCl</i>	2g
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	11g
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	2g

Ad 1l Aqua bidest. 1xPBS: 100ml 10xPBS auf 1l Aqua bidest.

## 2.5 Rezeptorliganden und Inhibitoren

<i>Fibronektin</i>	1mg/ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>LY294002</i>	PI3K-Inhibitor 1250µM in Ethanol (Calbiochem, Bad Soden)
<i>BIBX1382BS</i>	RTK-Inhibitor 20mM in DMSO (Boehringer Ingelheim, Wien, Österreich)

## 2.6 Antikörper (primäre und sekundäre)

### *Primärantikörper*

<i>BrdU</i>	monoklonal, Maus IgG, (Becton Dickinson, Heidelberg) DZ 1:10 BSA
-------------	---

### *Sekundärantikörper*

<i>mouse IgG, FITC konj.</i>	polyklonal, Hase, (DAKO, Glostrup, Dänemark) DZ 1:50 BSA
------------------------------	---

## 3. Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### *Subkultivierung*

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 10% und einem pH-Wert von 7,4 kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen einmal mit Trypsin gespült, anschließend abtrypsiniert und im Verhältnis 1:4 - 1:10 passagiert.

#### *Einfrieren*

Die Zellen wurden abtrypsiniert und mit der Neubauer Zählkammer gezählt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 800 rpm, wurde der Überstand entfernt, die Zellen in  $\frac{\text{Gesamtzahl}}{1000000}$  ml des Einfriermediums (Standardmedium mit 20% FCS und 5% DMSO) resuspendiert und je ein Milliliter der Suspension in Kryoröhrchen gegeben. Diese kühlten in einem speziellen Behälter mit einer Abkühlgeschwindigkeit von ca. 1°C/min auf -80°C. Nach 24 Stunden erfolgte die Lagerung bei -130°C.

#### *Auftauen*

Das Kryoröhrchen wurde zügig erwärmt und der Inhalt in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturfläche mit 12 ml Medium gegeben. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

### 3.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei 20°C Raumtemperatur (RT). Die Anodenspannung der Röntgenröhre betrug 240 kV, der Anodenstrom 13 mA und die Dosisleistung etwa 1 Gy/min. Zwischen Röhre und Probe bestand ein Abstand von 22 cm, wobei die Strahlung mittels einer 3 mm dicken Berylliumplatte gefiltert wurde.

Die applizierte Dosis wurde mit einem Dosimeter, das zuvor anhand eines Prüfstrahlers kalibriert worden war, gemessen.

### 3.3 Zellzyklus-Analyse

#### *Ansatz*

##### 1. Versuchsteil:

GD25- und GD25-β1A Zellen wurden abtrypsiniert, deren Zellzahl bestimmt und je 50.000 Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät. Nach 72-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit 2 Gy und 6 Gy bestrahlt, bzw. die Kontrollen unbestrahlt gelassen. Nach 0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 24h, 48h erfolgte die Inkubation mit BrdU und anschließend die Fixation.

##### 2. Versuchsteil:

GD25-, GD25-β1A und GD25-β1B Zellen wurden auf Polystyrol bzw. Fibronectin beschichteten Kulturflaschen ausgesät, mit DMEM mit FCS 72h kultiviert und anschließend mit 6 Gy bestrahlt, bzw. nicht bestrahlt. Nach 12h erfolgte die Fixierung.

##### 3. Versuchsteil:

Subkonfluente GD25-β1A- und GD25-β1B-Zellen wurden abtrypsiniert, deren Zellzahl bestimmt und je 25.000 Zellen auf Polystyrol bzw. in mit Fibronectin beschichtete 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in DMEM mit und ohne FCS ausgesät und für 60 Stunden kultiviert. Dann folgte die Inkubation mit DMSO, BIBX, LY oder ohne Zusatz für weitere 12 Stunden, bevor die Zellen mit 2 oder 6 Gy bestrahlt wurden, bzw. unbestrahlt blieben und nach weiteren 12h fixiert wurden.

#### *Fixierung*

Nach oben genanntem Zeitintervall wurde dem Medium BrdU (Endkonzentration 10 μM) beigelegt, welches für 10 Minuten einwirkte, dann wurden die Zellen abtrypsiniert, mit eiskaltem 1x PBS gewaschen (Zentrifugation: 1000 rpm, 3 min) und in Ethanol 80% fixiert. die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### *Messung*

Nach Zugabe von 2 ml Ethanol zu einem Aliquot von 1 Mio. fixierter Zellen, folgte eine Zentrifugation mit 1000 rpm für 8 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und dem Pellet 2 ml Ribonuklease A beigelegt. Dann wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Daran schloss sich eine Inkubation mit Pepsin bei 37°C für 10 Minuten an, bevor die Zellen mit 3 ml eiskaltem 1xPBS verdünnt und für weitere 5 Minuten auf Eis gekühlt wurden. Nach

## Methoden

erneuter Zentrifugation wurde 2 ml 2n HCL zugegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten belassen. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS und einmal mit BSA-Lösung (1% in 1x PBS) gewaschen, jeweils mit Zentrifugation zwischen den einzelnen Wäschen. Anschließend wurde das Pellet mit 200 µl Anti-BrdU Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgten eine erneute Zentrifugation und die Zugabe des Sekundärantikörpers, der für 30 Minuten lichtgeschützt einwirkte, bevor die Zellen ein letztes Mal zentrifugiert werden. Nachdem die Zellen einmal mit 500 µl Propidium Jodid gewaschen worden waren, wurde 250 µl Propidium Jodid hinzu pipettiert und 30 Minuten inkubiert. Zur Messung diente ein FACS-Gerät.

### *Auswertung*

Die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurde mittels der Analyse-Software CELLQuest<sup>®</sup> anhand von DNA-Streudiagrammen ermittelt.

### **3.4 Statistik**

Für die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurde Microsoft Excel verwendet. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mittels ANOVA. Zur graphischen Darstellung diente SigmaPlot.

## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind immer Darstellungen von Zellverteilungen auf bestimmte Phasen des Zellzyklus. Die untersuchten Zelllinien unterscheiden sich bezüglich der  $\beta 1$ -Integrin Signalkompetenz und Expression. Der Einfluss der Signalkompetenz  $\beta 1$ -Integrins wurde unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit und ohne Bestrahlung untersucht. Nachfolgend wurde grundlegend der Einfluss von  $\beta 1$ -Integrin auf die Verteilung von Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne ionisierende Strahlung dargestellt.

### 4.1 Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 und GD25 $\beta 1A$ Zellen über 48 Stunden ohne Bestrahlung sowie nach 2 Gy und 6 Gy Bestrahlung

In den Abbildungen 4.1 und 4.2 ist die Verteilung von GD25 und GD25 $\beta 1A$  Fibroblasten in den Zellzyklusphasen in Abhängigkeit von der Zeit der Zellen in Kultur dargestellt. Bei GD25 Zellen ist ein, im Vergleich zu GD25 $\beta 1A$  Zellen, signifikant ( $p < 0,001$ ) geringerer G<sub>2</sub>-Phase-Anteil auffällig. Die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen bleibt, verglichen mit der Gesamtzellzahl, bis 20 Stunden im Wesentlichen gleich. Nach 24 Stunden fällt bei GD25 $\beta 1A$  Fibroblasten der Zellanteil der S-Phase von 43% auf 29%, bezogen auf die Gesamtzellzahl, ab.

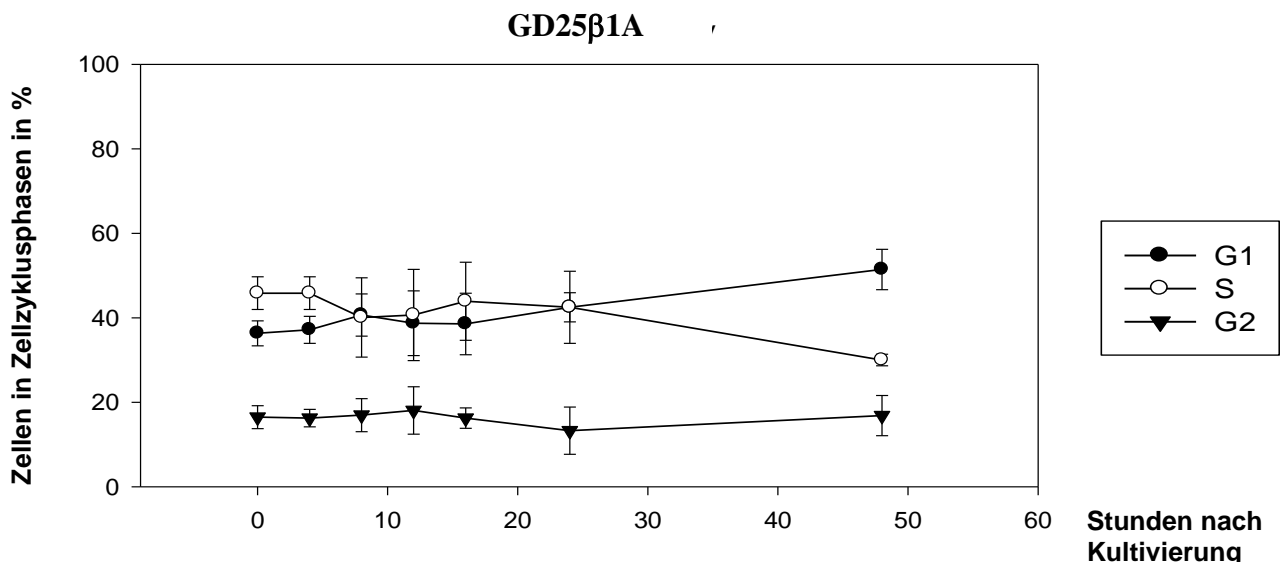


Abbildung 4.1 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta 1A$  Zellen auf die Zellzyklusphasen in Abhängigkeit der Zeit. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## Ergebnisse

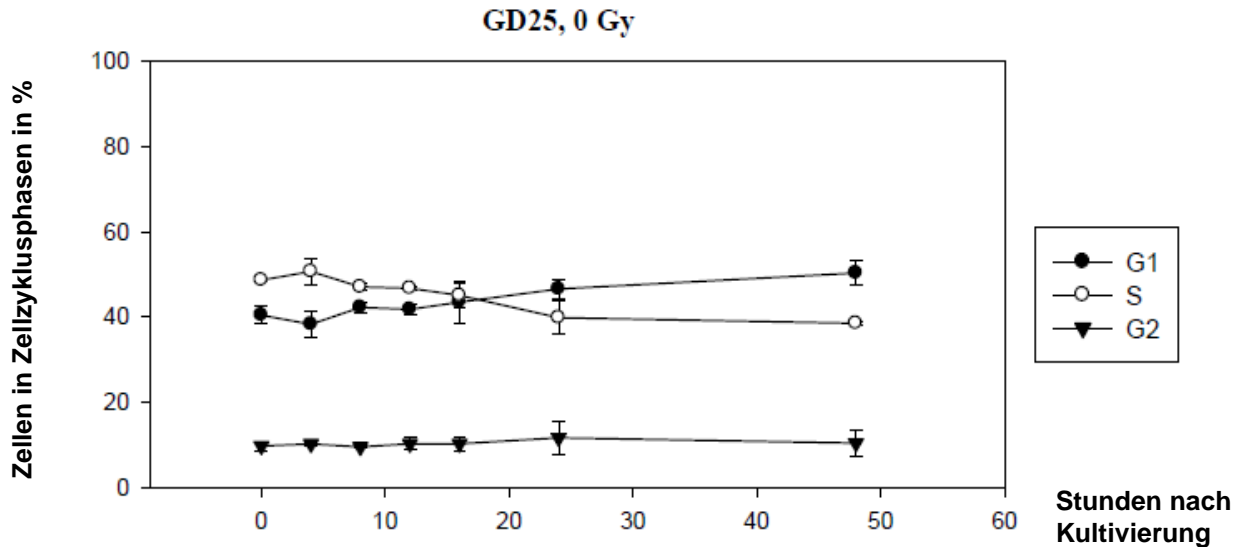


Abbildung 4.2 zeigt die Verteilung von GD25 Zellen auf die Zellzyklusphasen in Abhängigkeit der Zeit. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen die Verteilung von GD25 und GD25 $\beta$ 1A Fibroblasten in den Zellzyklusphasen in Abhängigkeit der Zeit der Zellen nach 2 Gy Bestrahlung. Bei GD25-Zellen ist wiederum ein, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1A Zellen, signifikant ( $p < 0,001$ ) geringerer G<sub>2</sub>-Phase-Anteil auffällig. Die G<sub>1</sub>- und S-Phasenanteile beider Zelllinien sind bis 20 Stunden, bezogen auf die Gesamtzellzahl, im Wesentlichen gleich ( $p > 0,38$ ). Nach 24 Stunden zeigt sich bei den GD25 $\beta$ 1A Zellen ein Abfallen des prozentualen Anteils der S-Phase von 40% auf 33% bezogen auf die Gesamtzellzahl.

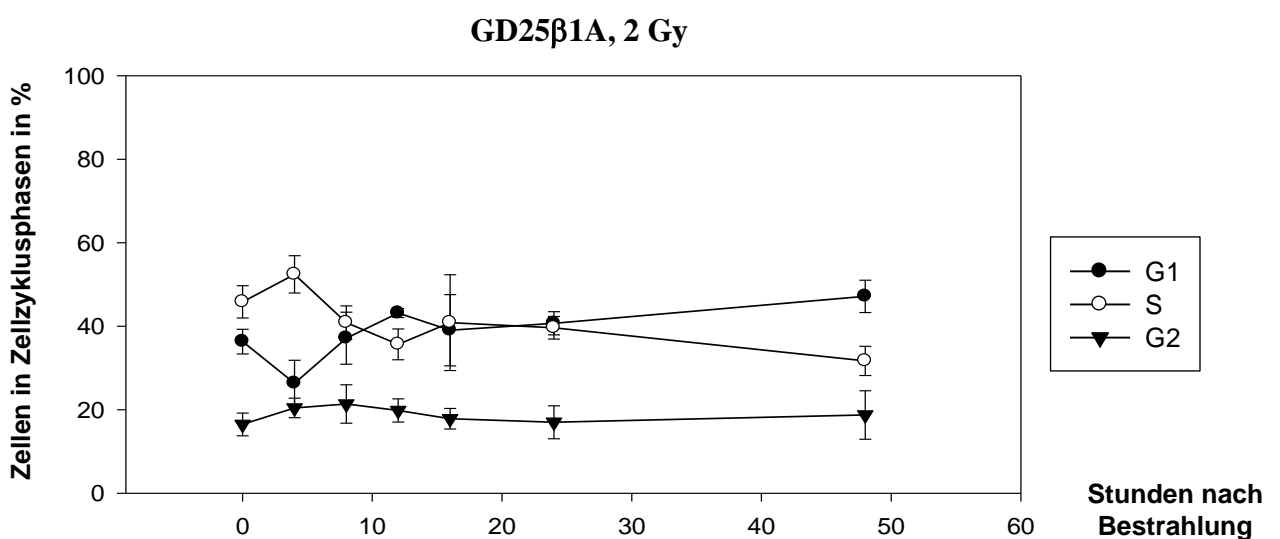


Abbildung 4.3

## Ergebnisse

### GD25, 2 Gy

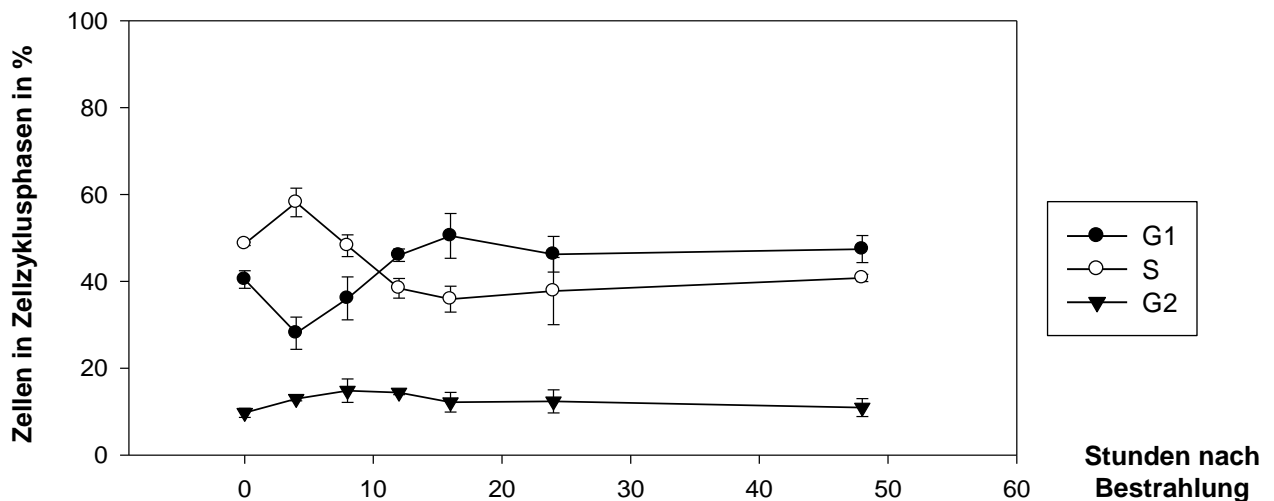


Abbildung 4.4

Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen die Verteilung von GD25 und GD25 $\beta$ 1A Fibroblasten auf die Zellzyklusphasen nach 2 Gy Bestrahlung in Abhängigkeit der Zeit. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen die Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25 und GD25 $\beta$ 1A Fibroblasten nach 6 Gy Bestrahlung in Abhängigkeit der Zeit nach Bestrahlung. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 Zellen ( $p > 0,26$ ) in Bezug auf die Gesamtzellzahl über 48 Stunden. Beide Zelllinien zeigen bis vier bzw. bis acht Stunden zunächst einen Anstieg der Zellen in der S-Phase auf ca. 60%.

Nach zwölf Stunden zeigen GD25 $\beta$ 1A Zellen im Vergleich mit GD25 Zellen einen um ca. 15% geringeren Anteil in der S-Phase mit entsprechend höherem Anteil von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase.

Nach 16 Stunden zeigt sich ein Absinken auf ca. 25% in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Spiegelbildlich fällt dazu in der gleichen Zeit der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase von initial 40% auf ca. 15% in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Nach 48 Stunden ist nahezu wieder die Ausgangssituation der Zellzyklusphasenverteilung erreicht. Der zelluläre Anteil an der S-Phase ist insgesamt um ca. 10 % geringer verglichen mit dem Anteil der S-Phase vor Bestrahlung.



## Ergebnisse

### GD25 $\beta$ 1A, 6 Gy

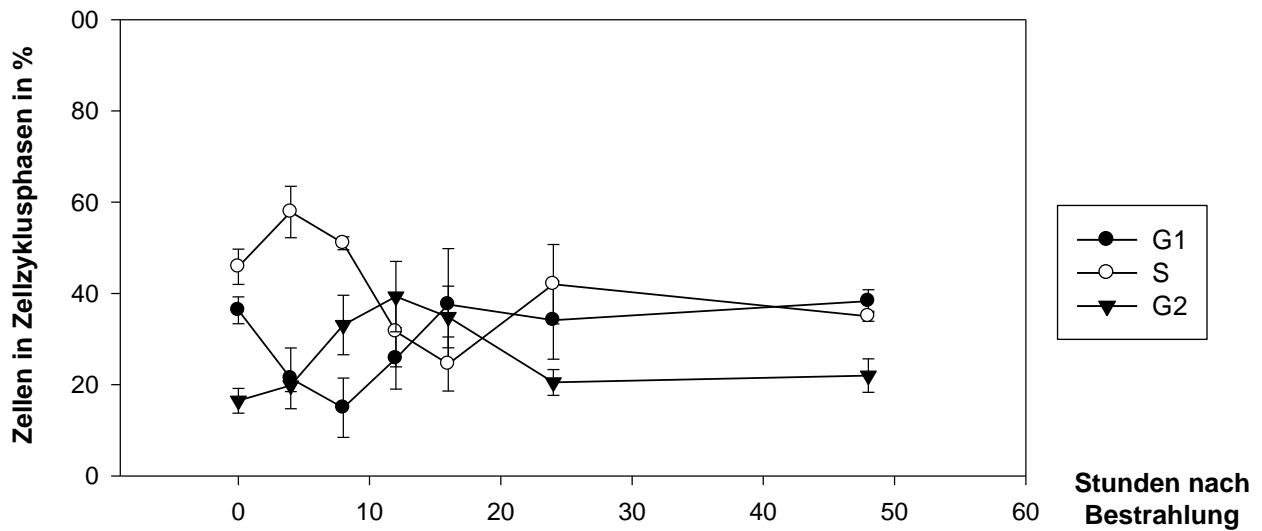


Abbildung 4.5

### GD25, 6 Gy

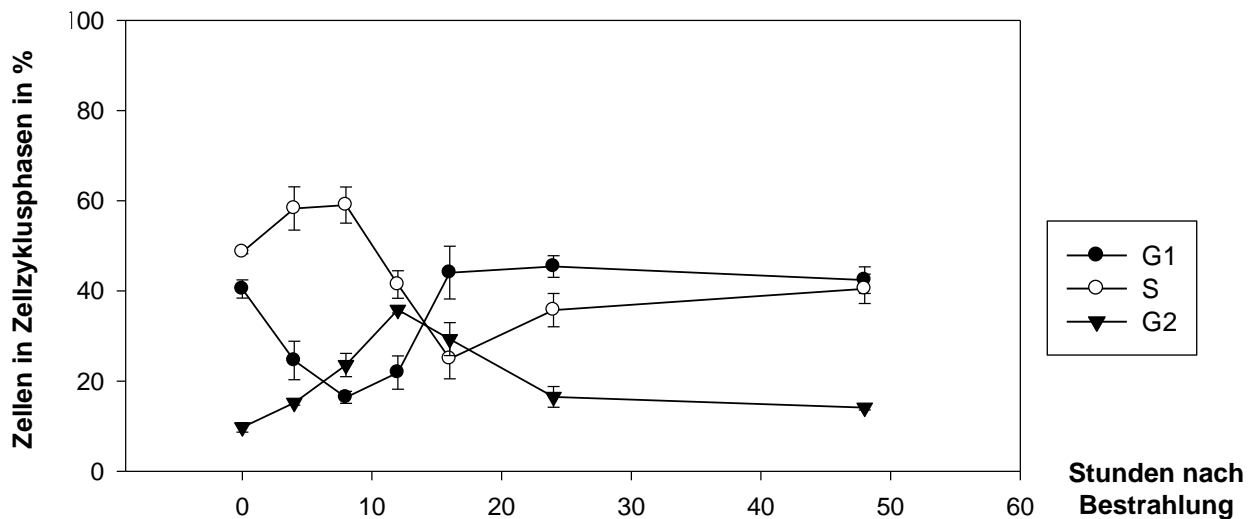


Abbildung 4.6

Die Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen die Verteilung von GD25 und GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 6 Gy Bestrahlung in Abhängigkeit der Zeit. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

GD25 und GD25 $\beta$ 1A Zellen weisen deutliche Unterschiede der Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen zwölf Stunden nach ionisierender Strahlung auf. Daher wurden im Anschluss Untersuchungen zum Einfluss der Signalkompetenz  $\beta$ 1-Integrins auf den Zellzyklus zwölf Stunden nach Bestrahlung beziehungsweise nach Kultivierung untersucht.

## 4.2 Vergleiche der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A- und GD25 $\beta$ 1B-Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Polystyrol, mit und ohne ionisierende Strahlung, Wachstumsfaktoren, PI3K- und EGFR-Inhibition

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss der  $\beta$ 1-Integrin-Signaltransduktion auf die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit Einfluss von ionisierender Strahlung dargestellt. Die prozentuale Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen werden unter den Auswirkungen von Bestrahlung, Wachstumsfaktoren (Serum) und Inhibitoren (PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 und EGFR-Inhibitor BIBX1382BS) mit einander verglichen. Es sind jeweils zwölf-Stunden-Werte nach Bestrahlung bzw. Kultivierung dargestellt. Signaleffekte durch  $\beta$ 1-Integrin auf die Verteilung der Zellzyklusphasen werden dadurch erkennbar.

### 4.2.1 Vergleiche der Zellzyklusphasenverteilungen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B-Zellen unter Einfluss von ionisierender Strahlung und Wachstumsfaktoren

Abbildung 4.7 zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A Zellen zwölf Stunden nach 6 Gy Bestrahlung bzw. nach Kultivierung. Auffällig ist eine nach 6 Gy ionisierender Strahlung signifikante Verringerung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase von ca. 45% auf 18%. Spiegelbildlich dazu zeigt sich eine signifikante Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase von 20% auf 47% in Bezug auf die Gesamtzellzahl.

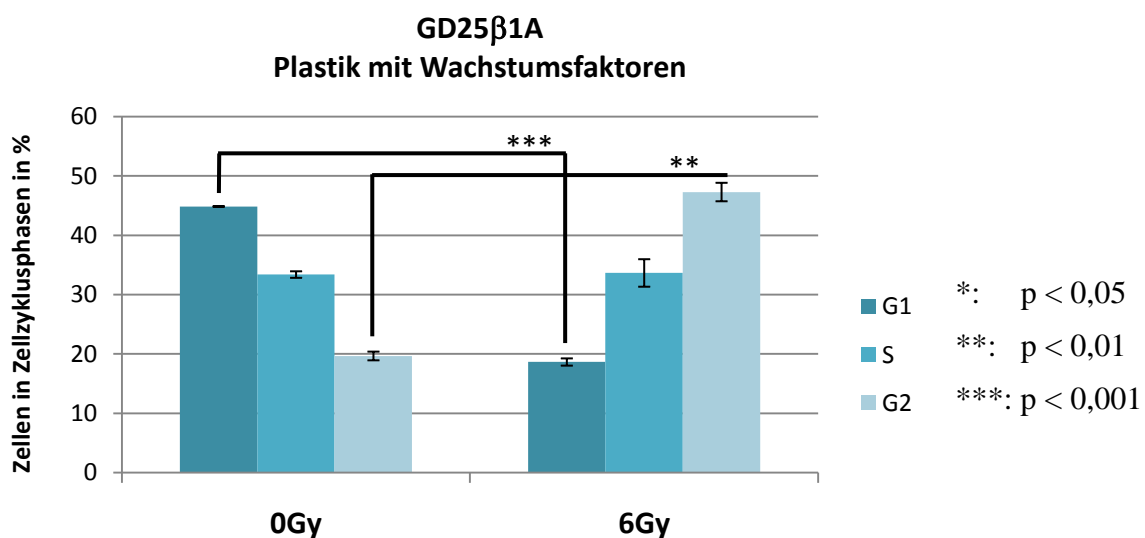


Abbildung 4.7 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 0 Gy und 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## Ergebnisse

Abbildung 4.8 zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A Zellen zwölf Stunden nach 6 Gy bzw. ohne Bestrahlung unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Auffällig ist eine signifikante Verringerung des zellulären G<sub>1</sub>-Phase Anteils um ca. 20% und eine signifikante Zunahme des prozentualen S- und G<sub>2</sub>-Phase Anteils um ca. 10%.

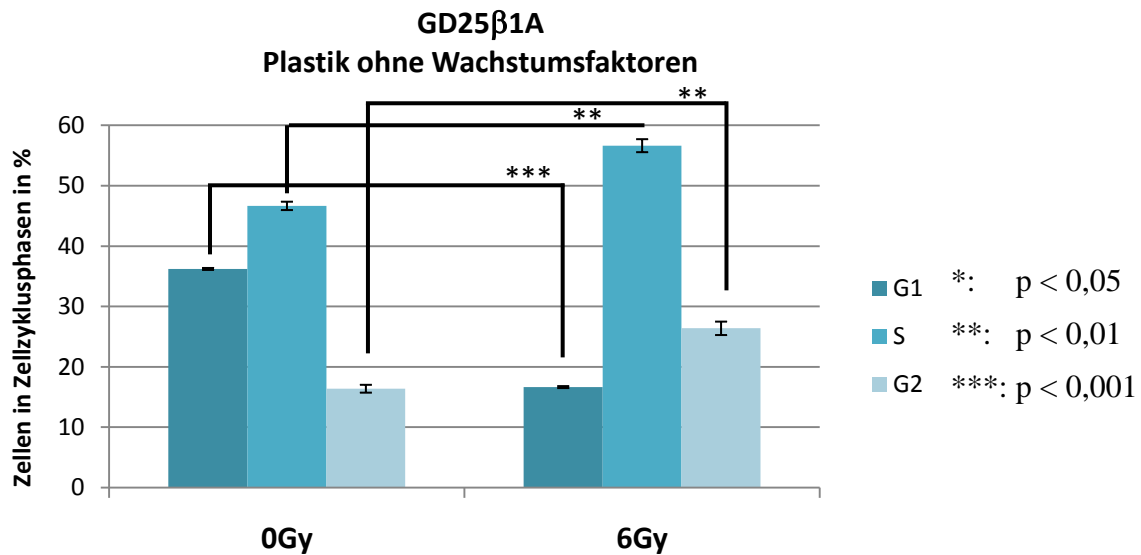


Abbildung 4.8 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 6 Gy bzw. ohne Bestrahlung, unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

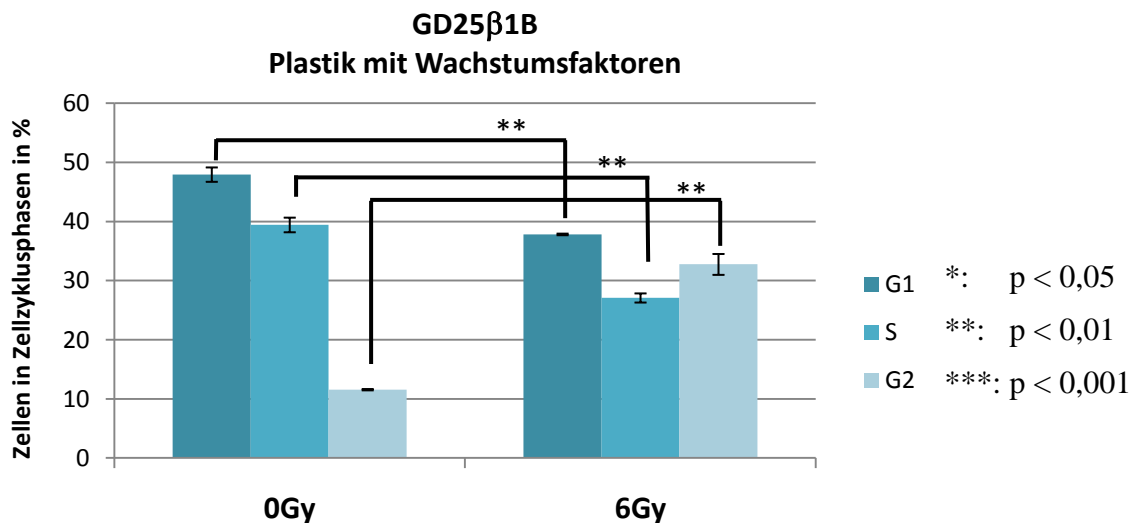


Abbildung 4.9 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 6 Gy bzw. ohne Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.9 zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1B Zellen zwölf Stunden nach 6 Gy Bestrahlung bzw. nach Kultivierung. Auffällig ist eine nach 6 Gy ionisierender Strahlung signifikante Verringerung der Zellen in der G<sub>1</sub>- und S-Phase von ca. 10%.

## Ergebnisse

Spiegelbildlich dazu zeigt sich eine signifikante Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase von 12% auf 32% in Bezug auf die Gesamtzellzahl.

Abbildung 4.10 zeigt die Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen zwölf Stunden nach 6 Gy Bestrahlung bzw. Kultivierung unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Auffällig ist eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um ca. 18%. Dabei zeigt sich eine signifikante Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 15%.

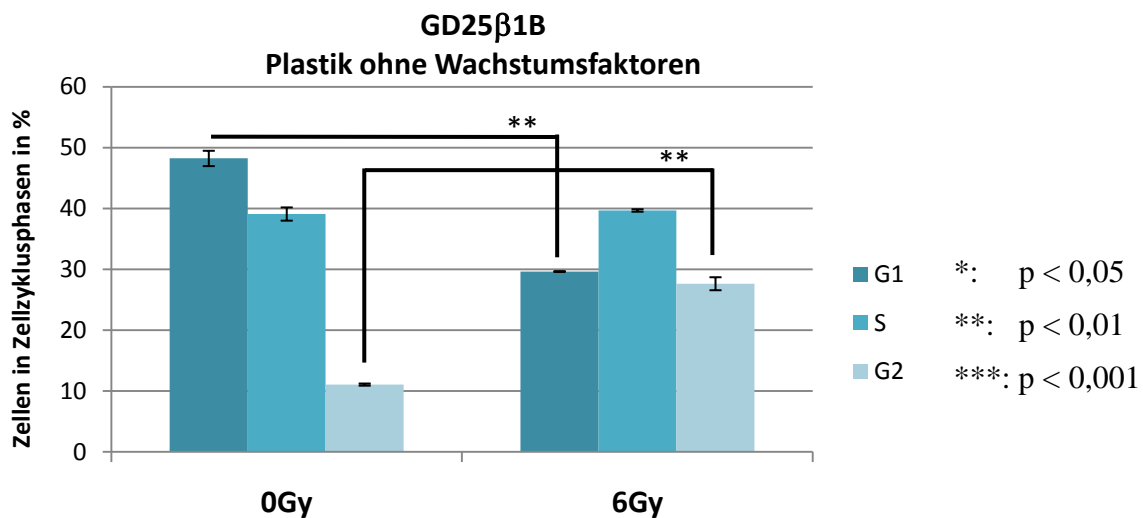


Abbildung 4.10 zeigt die Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 6 Gy bzw. ohne Bestrahlung, unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Es folgt nun noch ein Vergleich der Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 0 Gy und 6 Gy Bestrahlung, mit und ohne Wachstumsfaktoren.

Abbildung 4.11 vergleicht hier die Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25β1A und GD25β1B Zellen ohne Bestrahlung. Auffällig ist ein mäßig geringerer Zellanteil von GD25β1A Zellen in der S-Phase. Der Anteil von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase ist dazu signifikant höher ca. 8%. Dies entspricht bei GD25β1A einem nahezu doppelten Prozentsatz an G<sub>2</sub>-Zellen.

## Ergebnisse

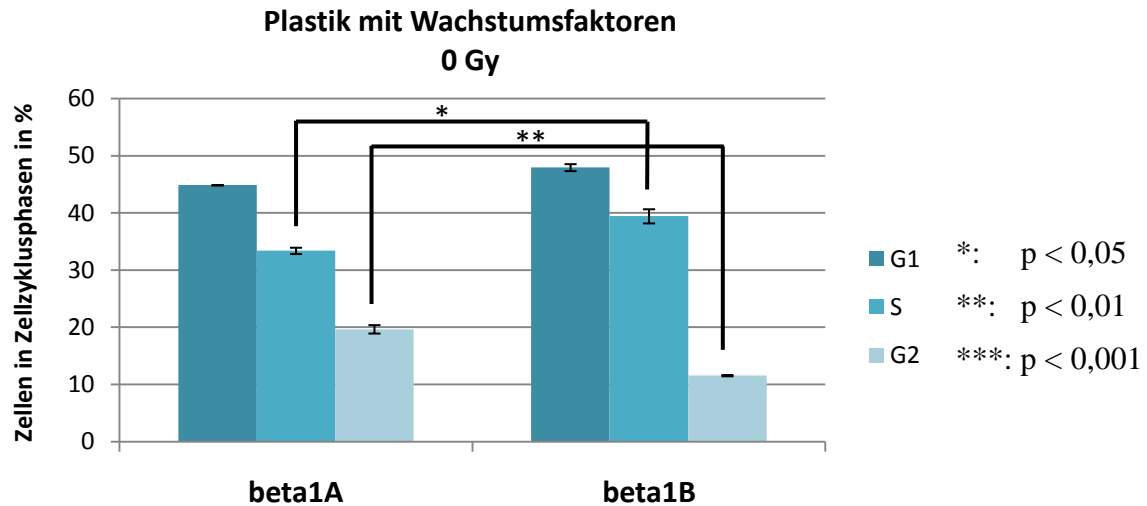


Abbildung 4.11 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen ohne Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.12 vergleicht die Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25β1A und GD25β1B Zellen zwölf Stunden nach 6 Gy Bestrahlung. Auffällig ist eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Es zeigt sich ein signifikanter Zuwachs von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase.

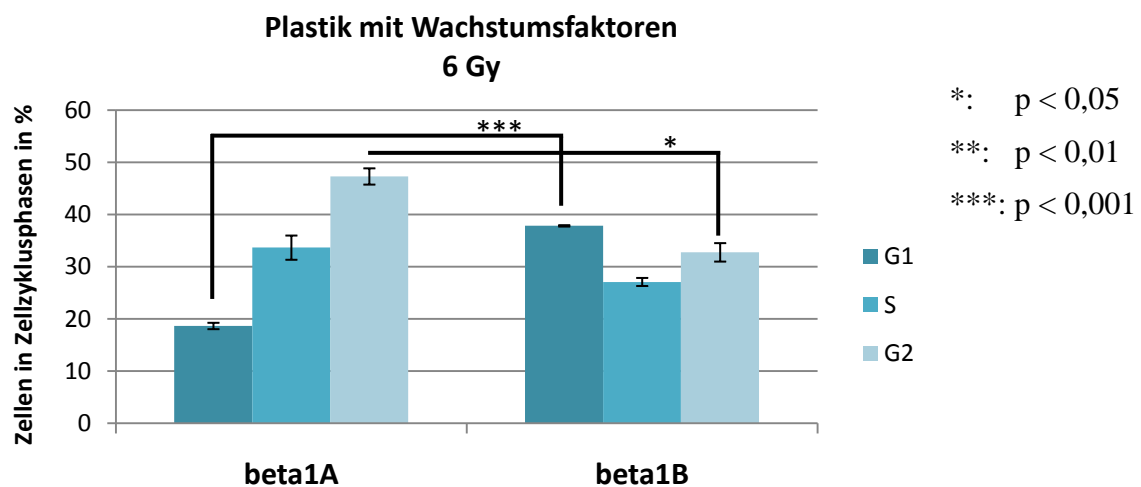


Abbildung 4.12 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.13 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Entzug von Wachstumsfaktoren ohne Bestrahlung. Auffällig ist bei GD25β1A Zellen eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Zudem zeigt sich eine signifikante Zunahme von Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase.

## Ergebnisse

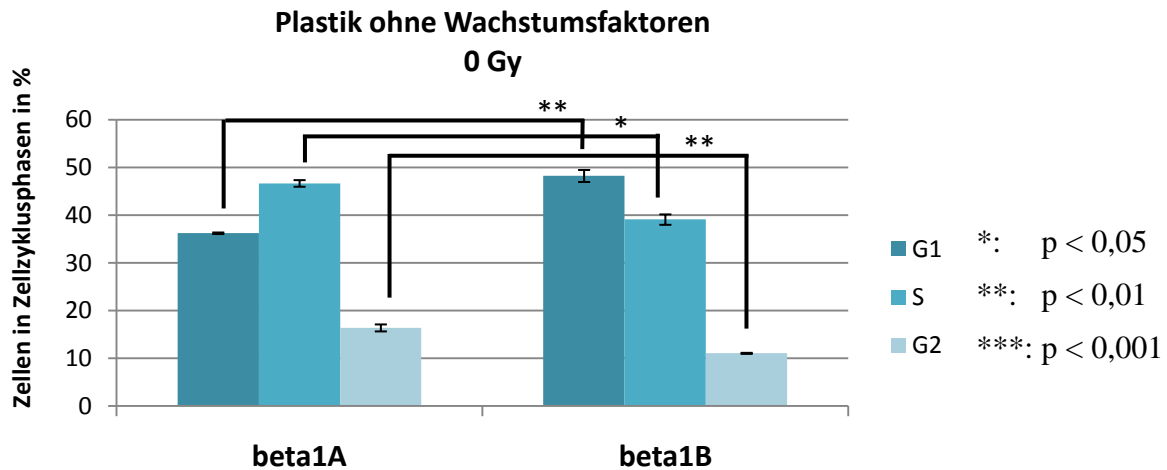


Abbildung 4.13 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Entzug von Wachstumsfaktoren ohne Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.14 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Entzug von Wachstumsfaktoren zwölf Stunden nach 6 Gy Bestrahlung. Auffällig sind bei GD25 $\beta$ 1A Zellen eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase um ca. 17%.

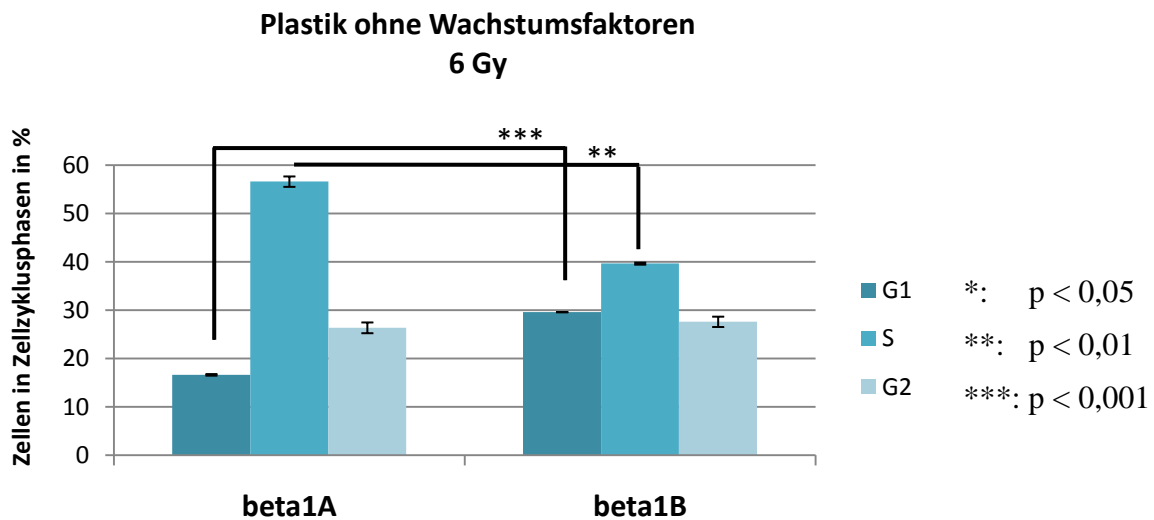


Abbildung 4.14 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Entzug von Wachstumsfaktoren nach 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

**4.2.2 Vergleich der Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Einfluss von PI3K-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren**

Die Signaltransduktionswege von β1-Integrin zum Einfluss auf den Zellzyklus werden durch die Aktivität von PI3-Kinase (PI3K) modifiziert. In diesem Abschnitt wird die Wirkung der PI3K die Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus untersucht. Dazu wurden GD25β1A und GD25β1B Zellen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 (Ly) versetzt, mit 6 Gy bestrahlt beziehungsweise kultiviert und die Zellzyklusphasen nach zwölf Stunden verglichen. Der Einfluss von Wachstumsfaktoren wurde dabei zusätzlich berücksichtigt.

Vergleich der Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Einfluss von PI3K-Inhibition, ionisierender Strahlung und Wachstumsfaktoren

Abbildung 4.15 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition durch LY294002. PI3K-Inhibition bewirkt eine deutliche Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase. Zudem zeigt sich eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase um ca. 15%.

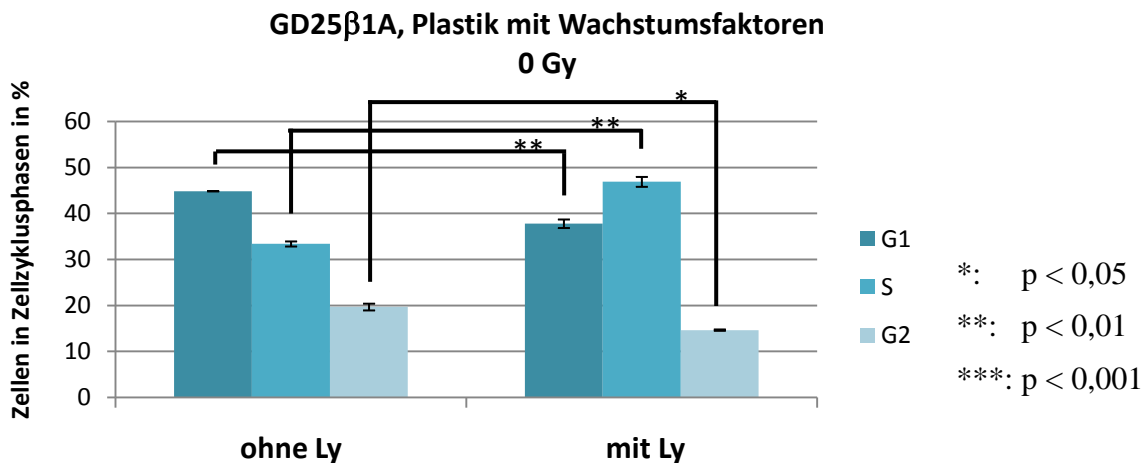


Abbildung 4.15 vergleicht die Verteilung von GD25β1A Zellen in den Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.16 vergleicht die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. PI3K-Inhibition bewirkt eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase. Auffällig ist dabei die Verringerung der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 25% in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Zudem zeigt sich eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase um ca. 20%.

## Ergebnisse

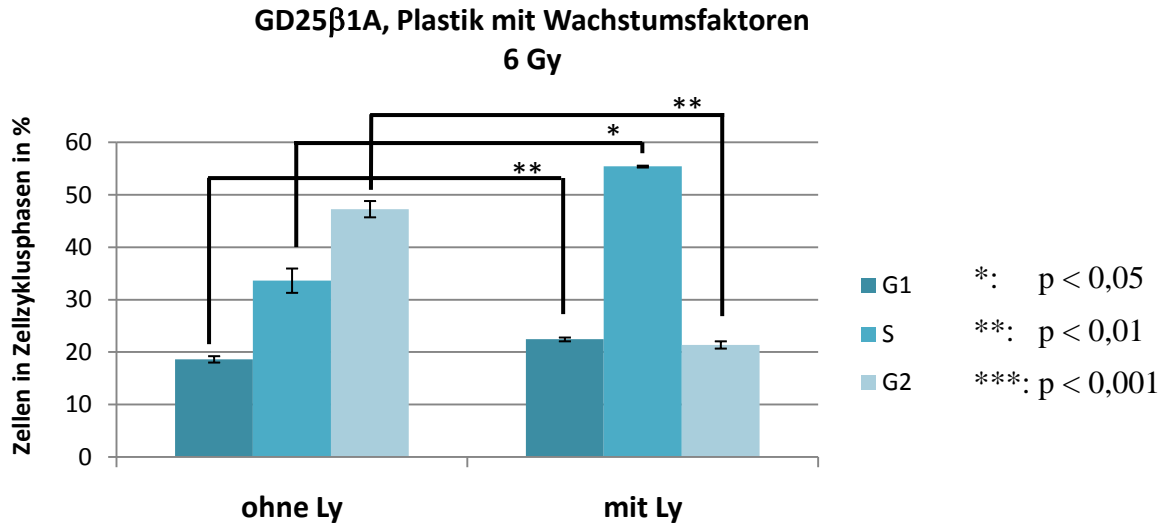


Abbildung 4.16 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.17 vergleicht die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Es zeigt sich eine geringe Zunahme der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase durch PI3K-Inhibition.

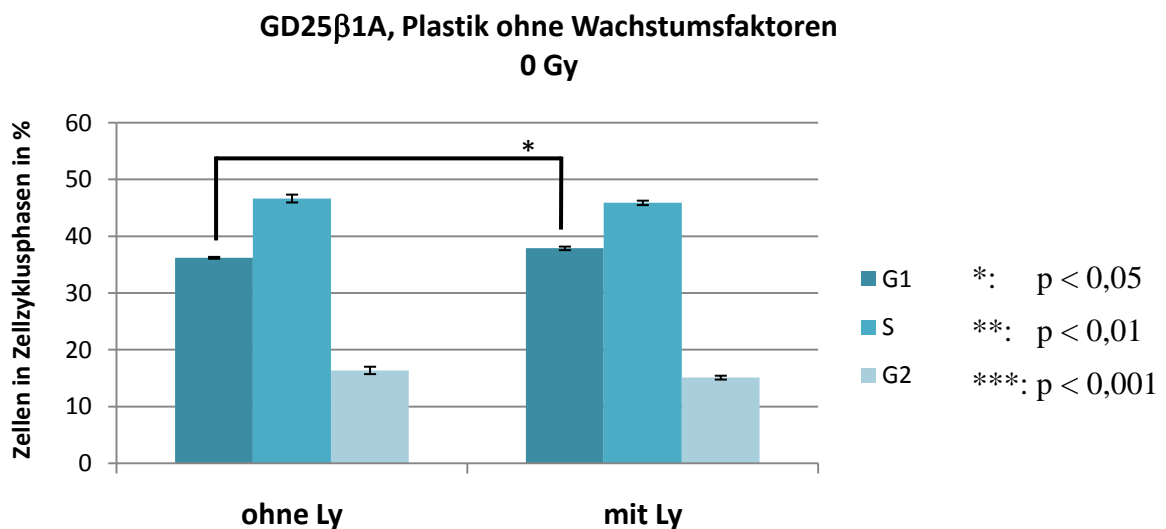


Abbildung 4.17 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.18 vergleicht die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Zellen wurden unter Entzug von Wachstumsfaktoren kultiviert und mit 6 Gy bestrahlt. PI3K-Inhibition bewirkt eine signifikante Zunahme von Zellen in der



## Ergebnisse

G<sub>1</sub>-Phase um ca. 20%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Es zeigt sich dazu eine signifikante Abnahme von Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase um ca. 10%.

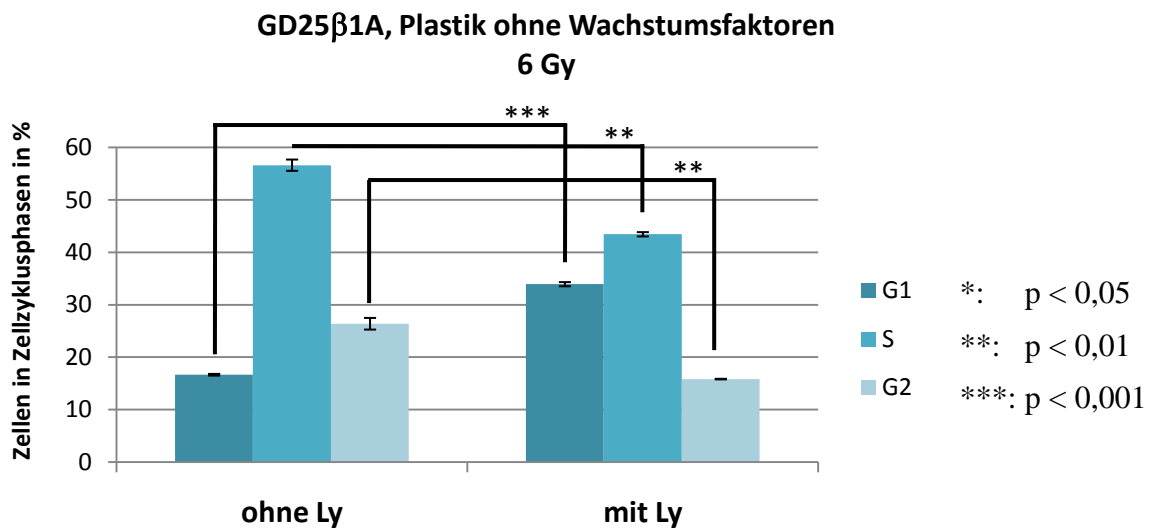


Abbildung 4.18 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition unter Entzug von Wachstumsfaktoren und nach 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

### Vergleich der Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Einfluss von PI3K-Inhibition, ionisierender Strahlung und Wachstumsfaktoren

Abbildung 4.19 zeigt die Verteilung von GD25β1B-Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition durch LY294002. PI3K-Inhibition bewirkt eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Zudem zeigt sich eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase.

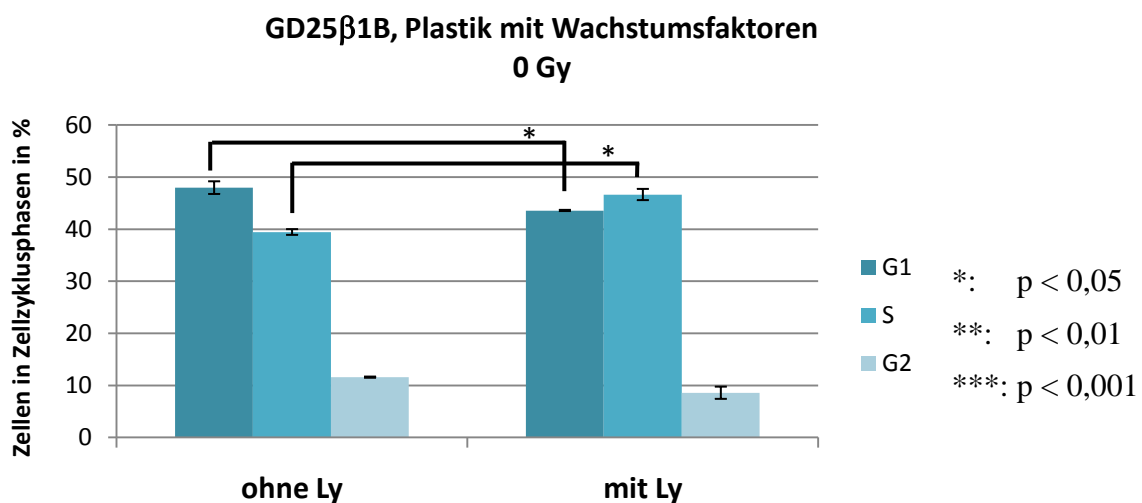


Abbildung 4.19

Abbildung 4.19 vergleicht die Verteilung von GD25β1B Zellen in den Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

## Ergebnisse

Abbildung 4.20 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Auffällig ist eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase um ca. 25%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Zudem zeigt sich eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 20%.

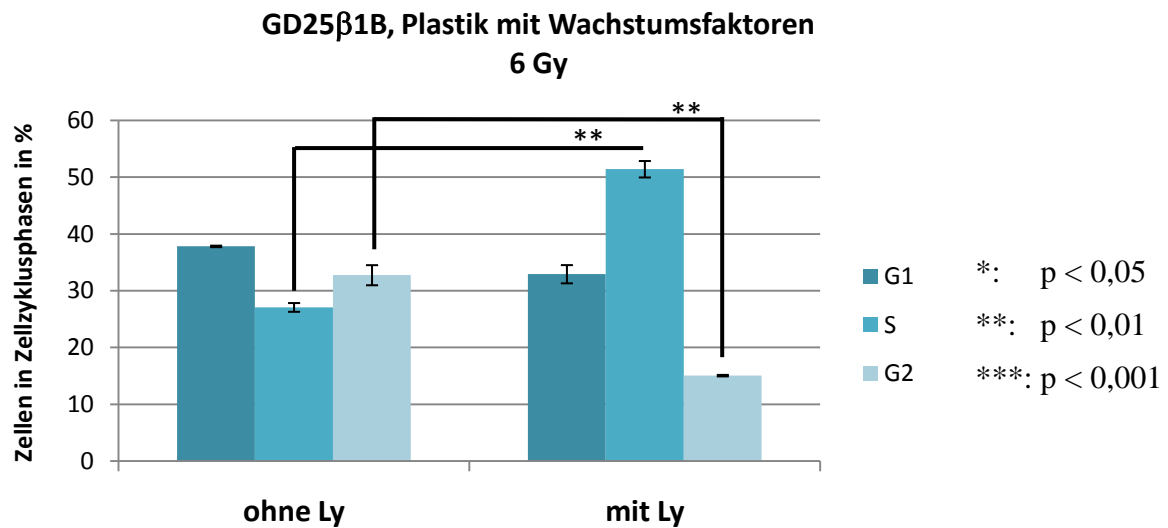


Abbildung 4.20 vergleicht die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen in den Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.21 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Auffällig ist eine geringe Zunahme von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Es zeigt sich eine mäßige Verringerung von Zellen in der S-Phase.

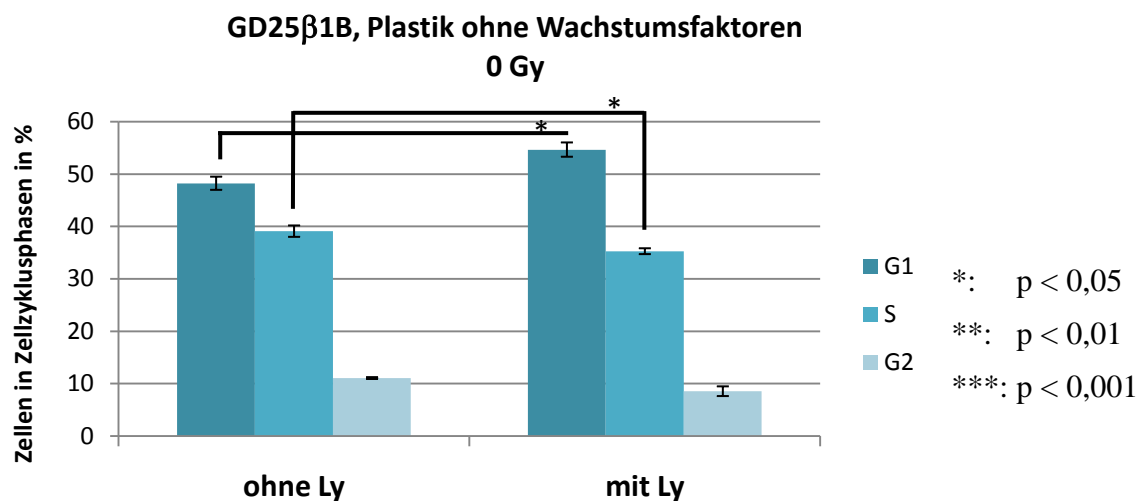


Abbildung 4.21 vergleicht die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B-Zellen in den Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## Ergebnisse

Abbildung 4.22 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. PI3K-Inhibition führt zur signifikanten Zunahme von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um fast 20%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Es zeigt sich eine mäßige Zunahme von Zellen in der S-Phase und eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um fast 20%.

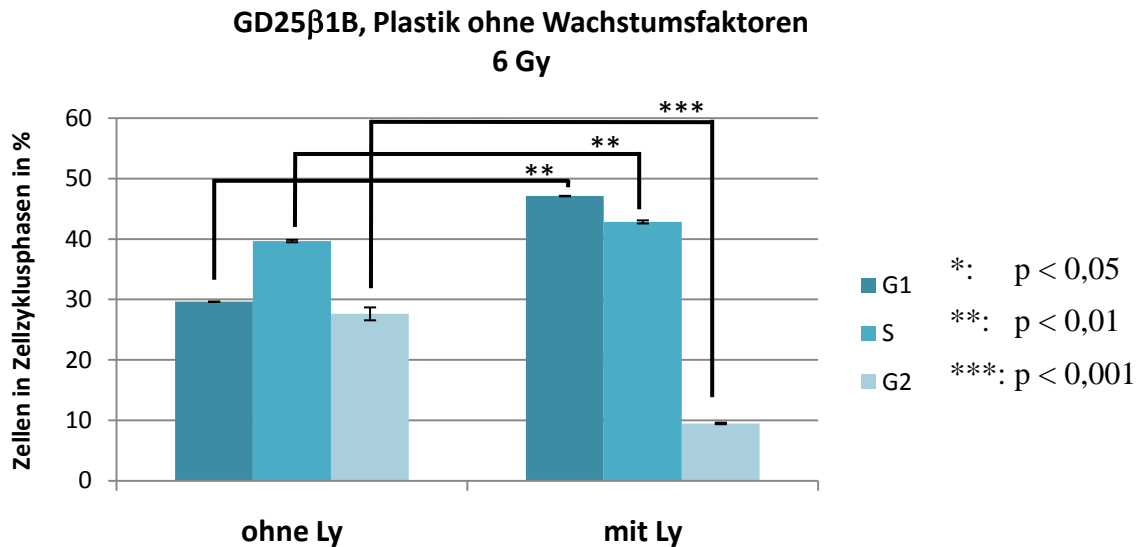


Abbildung 4.22 vergleicht die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen in den Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### Vergleiche der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Einfluss von PI3K-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren

Abbildung 4.23 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen, ist eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase auffällig. Der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase ist dafür signifikant erhöht.

## Ergebnisse

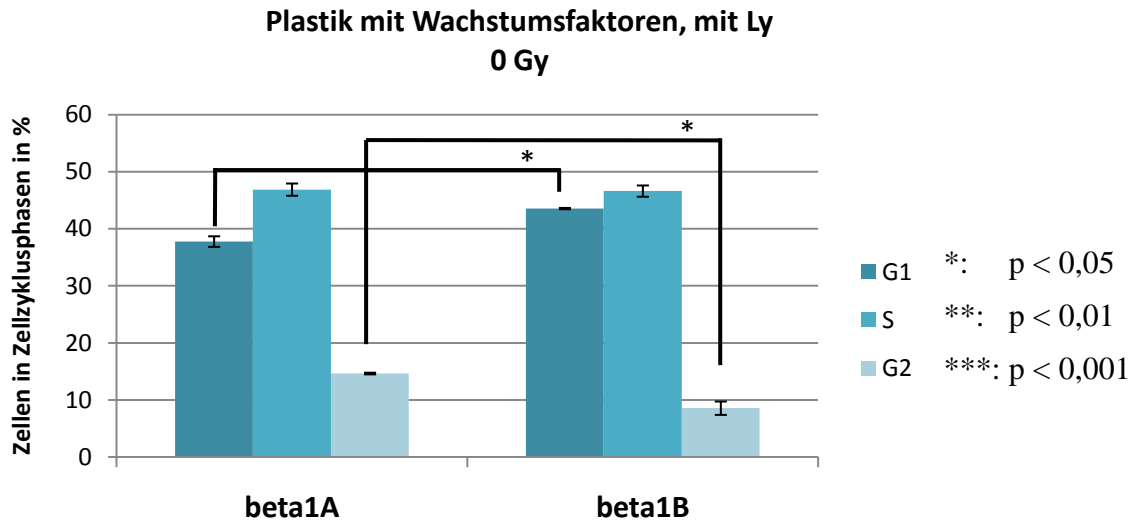


Abbildung 4.23 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.24 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist bei GD25β1A Zellen, im Vergleich zu GD25β1B Zellen, eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um ca. 10% bezogen auf die Gesamtzellzahl. Der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase ist dafür signifikant erhöht.

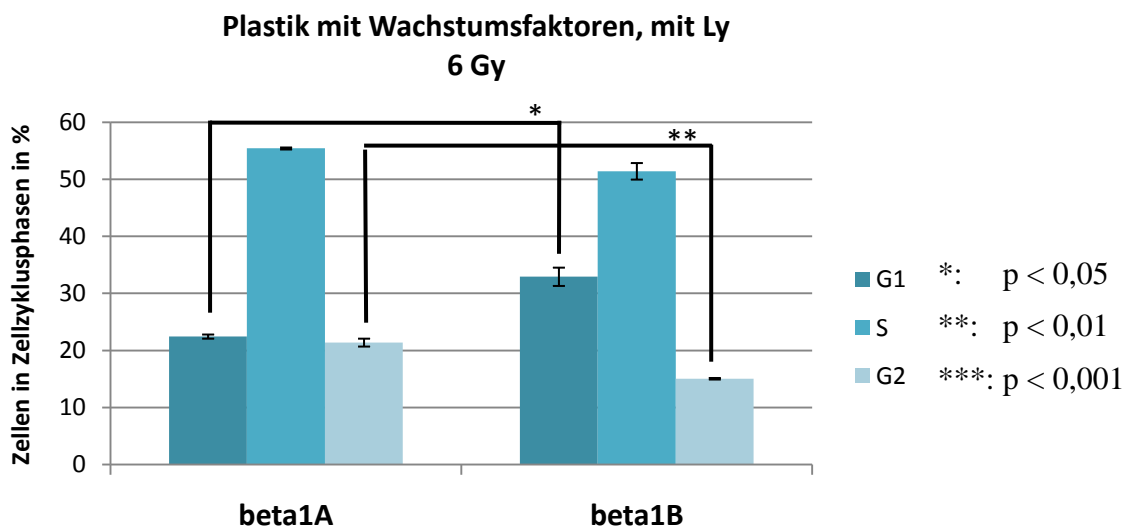


Abbildung 4.24 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.25 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte unter Entzug von

## Ergebnisse

Wachstumsfaktoren. Auffällig ist bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen, eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um fast 20% in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Die Anteile der Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase sind dafür signifikant erhöht.

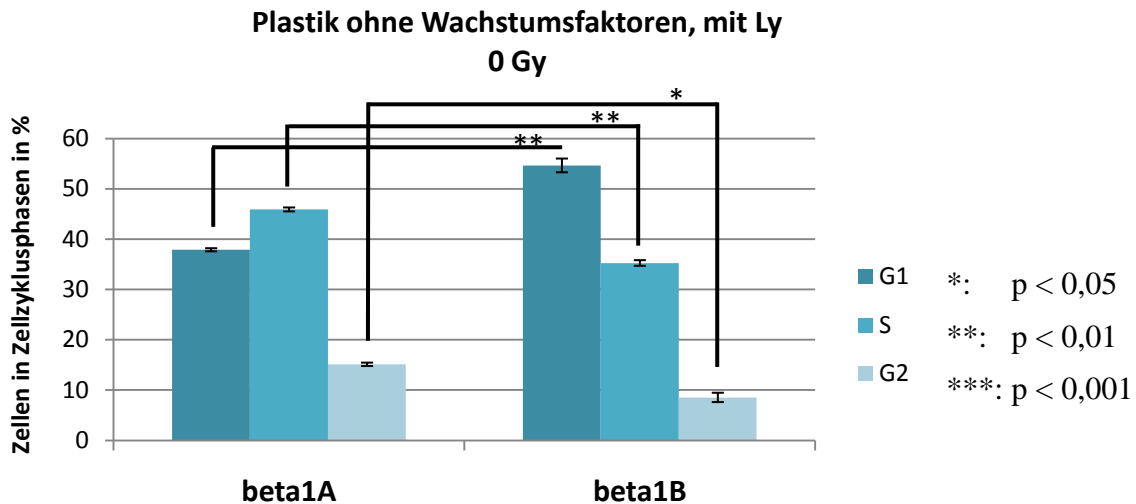


Abbildung 4.25 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition und unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

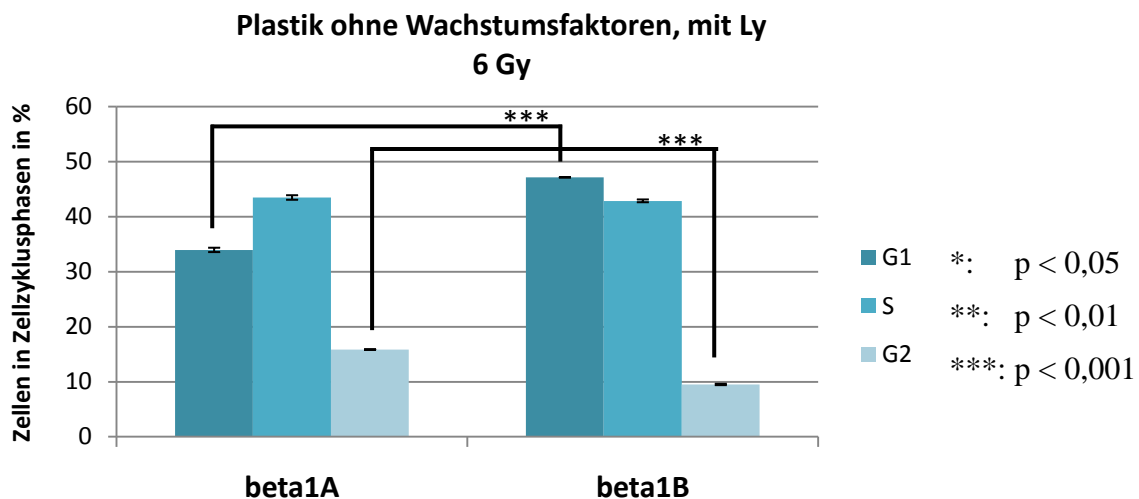


Abbildung 4.26 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition und unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.26 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen, eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um

ca. 10% in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase zeigt dabei eine mäßige Zunahme.

### ***4.2.3 Vergleiche der Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Einfluss von DMSO, mit und ohne Wachstumsfaktoren***

DMSO wurde als Lösungsmittel für BIBX1382BS (BIBX), einen Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) verwendet. Die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter DMSO, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen, ergaben keine signifikanten Unterschiede. Dies war unabhängig von Wachstumsfaktoren. Demnach konnte für DMSO kein Einfluss auf die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen nachgewiesen werden. Die Kontrollen enthalten im folgenden Abschnitt das für BIBX1382BS verwendete Lösungsmittel DMSO.

### ***4.2.4 Vergleiche der Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Einfluss von EGFR-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren***

Die Signalwege von Wachstumsfaktorrezeptoren sind mit den Signalwegen der β1-Integrine verschaltet und haben bedeutenden Einfluss auf die Progression der Zellen durch den Zellzyklus. Um den Einfluss des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) auf den Signalweg von β1-Integrin nach Bestrahlung zu untersuchen, wurde dieser durch den Einsatz von BIBX1382BS blockiert. Der Vergleich der Phasenverteilung von GD25β1A und GD25β1B unter BIBX1382BS nach Bestrahlung lässt die Bedeutung des EGFR auf den Signalweg von β1-Integrin und den Zellzyklus erkennbar werden.

### **Vergleiche der Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 0 Gy und 6 Gy Bestrahlung unter EGFR-Inhibition**

Die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen unter DMSO und unter Inhibition des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) durch BIBX1382BS, mit und ohne Wachstumsfaktoren, ergab ohne Bestrahlung keinen signifikanten Unterschied.

Abbildung 4.27 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne Inhibition des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) durch BIBX1382BS. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. EGFR-Inhibition bewirkt eine signifikante Zunahme

## Ergebnisse

von Zellen in der G<sub>1</sub>- und S-Phase. Zudem zeigt sich eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 20% in Bezug auf die Gesamtzellzahl.

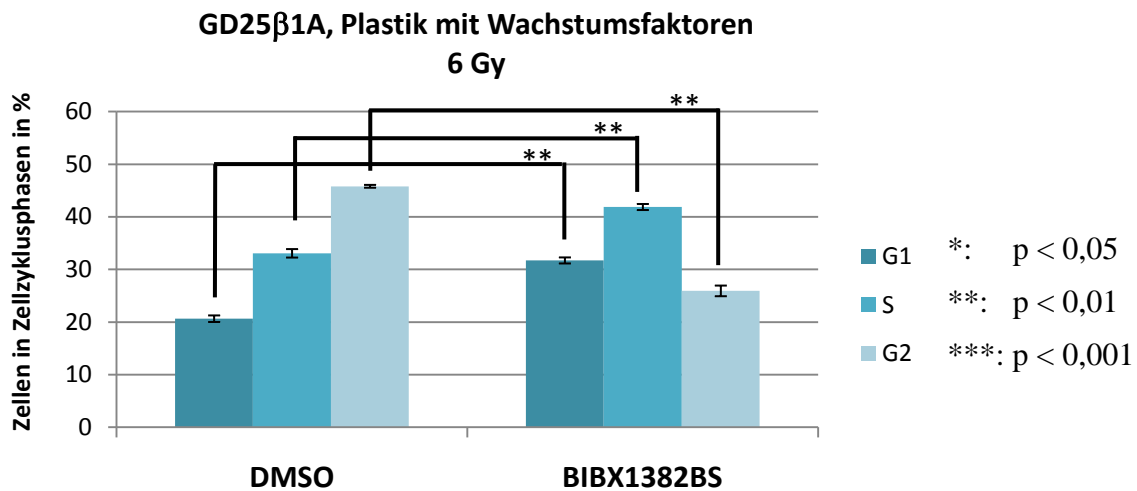


Abbildung 4.27 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.28 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne Inhibition des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) durch BIBX1382BS. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte unter Entzug von Wachstumsfaktoren. EGFR-Inhibition bewirkt eine signifikante Zunahme von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, ca. 12% in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Zudem zeigt sich eine signifikante Verringerung von Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase.

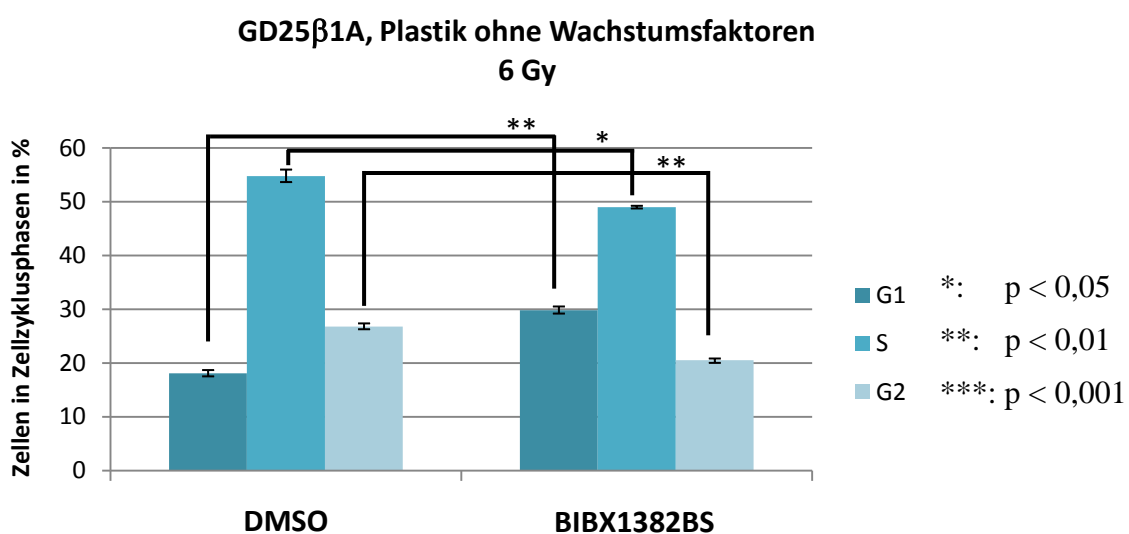


Abbildung 4.28 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

## Ergebnisse

### Vergleiche der Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 0 Gy und 6 Gy Bestrahlung unter EGFR-Inhibition

Die Verteilung der GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen zeigt unter EGFR-Inhibition durch BIBX1382BS, nach Kultivierung mit Wachstumsfaktoren, mit und ohne Bestrahlung keinen signifikanten Unterschied zur entsprechenden DMSO-Kontrolle.

Die Verteilung der GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen zeigt unter EGFR-Inhibition durch BIBX1382BS ohne Bestrahlung und unter Entzug von Wachstumsfaktoren keinen signifikanten Unterschied zur entsprechenden DMSO-Kontrolle.

Abbildung 4.29 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition durch BIBX1382BS. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte unter Entzug von Wachstumsfaktoren. EGFR-Inhibition bewirkt eine signifikante Zunahme von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Es zeigt sich eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 10%, in Bezug auf die Gesamtzellzahl.

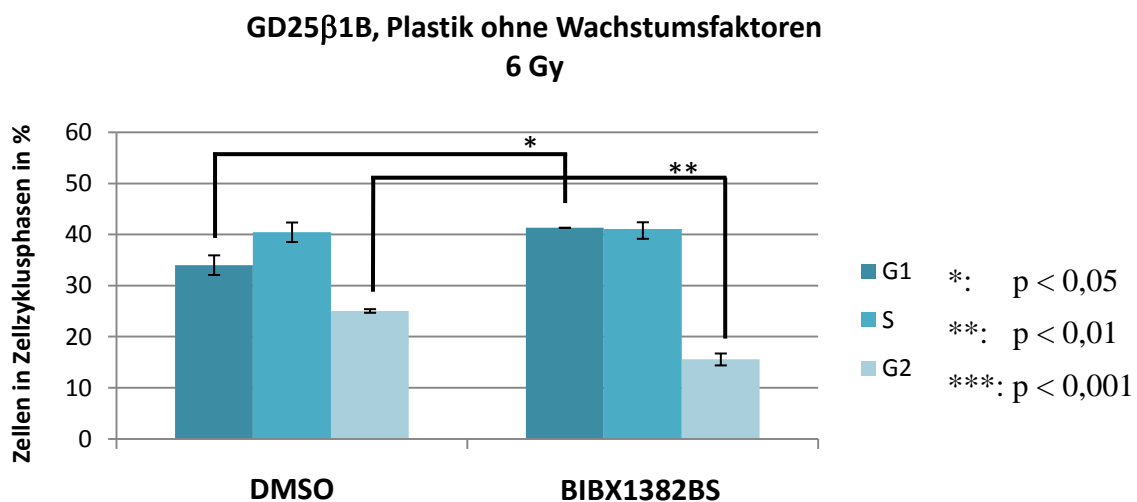


Abbildung 4.29 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### Vergleiche der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 0 Gy und 6 Gy Bestrahlung unter EGFR-Inhibition

Die Verteilung der GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen zeigt unter EGFR-Inhibition keine Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusphasen beider Zelllinien, verglichen mit der Phasenverteilung ohne EGFR-Inhibition. Dies war unabhängig von



## Ergebnisse

Wachstumsfaktoren. Die vorbestehenden Unterschiede in der Phasenverteilung abhängig der Zelllinie bleiben dabei bestehen.

Abbildung 4.30 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Beim Vergleich ist bei der Verteilung der GD25 $\beta$ 1A Zellen eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase auffällig. Es zeigt sich dabei eine Zunahme von Zellen in der S-Phase um fast 15% in Bezug auf die Gesamtzellzahl.

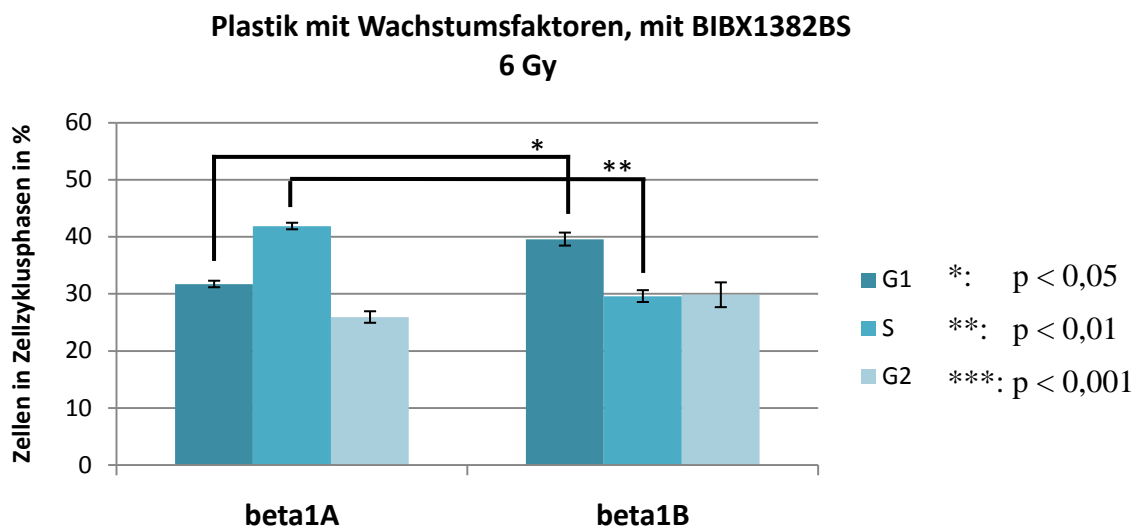


Abbildung 4.30 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.31 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Beim Vergleich ist bei der Verteilung der GD25 $\beta$ 1A Zellen eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase auffällig. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme von Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase.

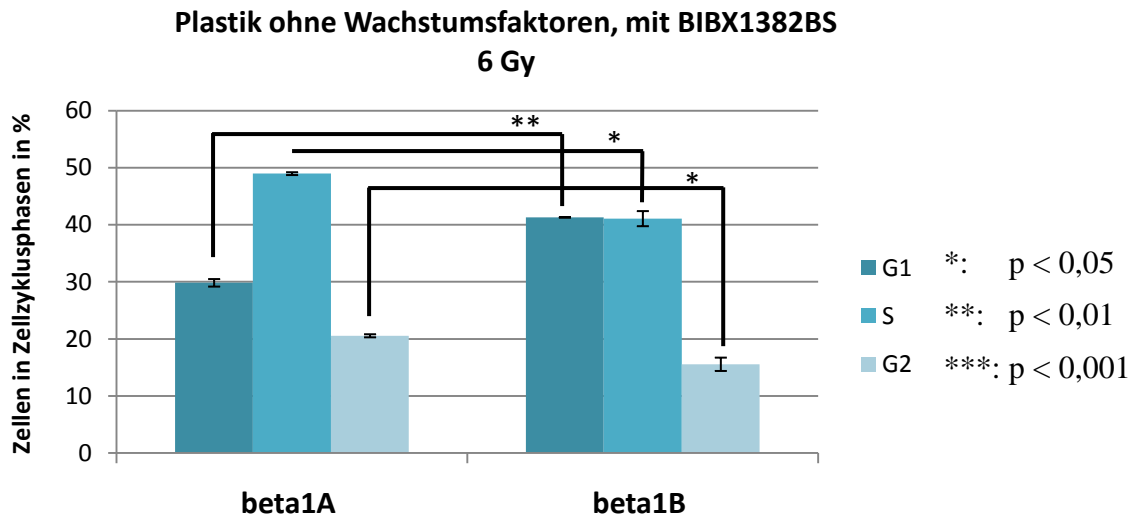


Abbildung 4.31 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition nach 6 Gy Bestrahlung. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### **4.3 Vergleiche der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Fibronectin, mit und ohne ionisierende Strahlung, Wachstumsfaktoren, PI3K- und EGFR-Inhibition**

Fibronectin ist ein  $\beta$ 1-Integrin-Ligand und Protein der extrazellulären Matrix. Fibronectin beeinflusst das zelluläre Überleben nach ionisierender Strahlung. Im folgenden Abschnitt werden dieselben Vergleiche wie im vorherigen Abschnitt aber unter Kultivierung auf Fibronectin aufgeführt. Es wird die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne Einfluss ionisierender Strahlung verglichen. Die Wirkungen von Wachstumsfaktoren, PI3K- und EGFR- Inhibition wurden erneut mit einbezogen.

#### ***4.3.1 Vergleiche der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Fibronectin unter Einfluss ionisierender Strahlung und Wachstumsfaktoren***

Die Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A Zellen zeigen nach Kultivierung auf Fibronectin verglichen mit den Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Plastik keinen relevanten Unterschied. Dies war unabhängig von Bestrahlung. Die Kultivierung erfolgte mit Wachstumsfaktoren.

## Ergebnisse

Der Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin und auf Plastik ohne Wachstumsfaktoren zeigte ohne Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 4.32 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Fibronectin und auf Plastik. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase sind nach Kultivierung auf Fibronectin gegenüber Plastik verringert.

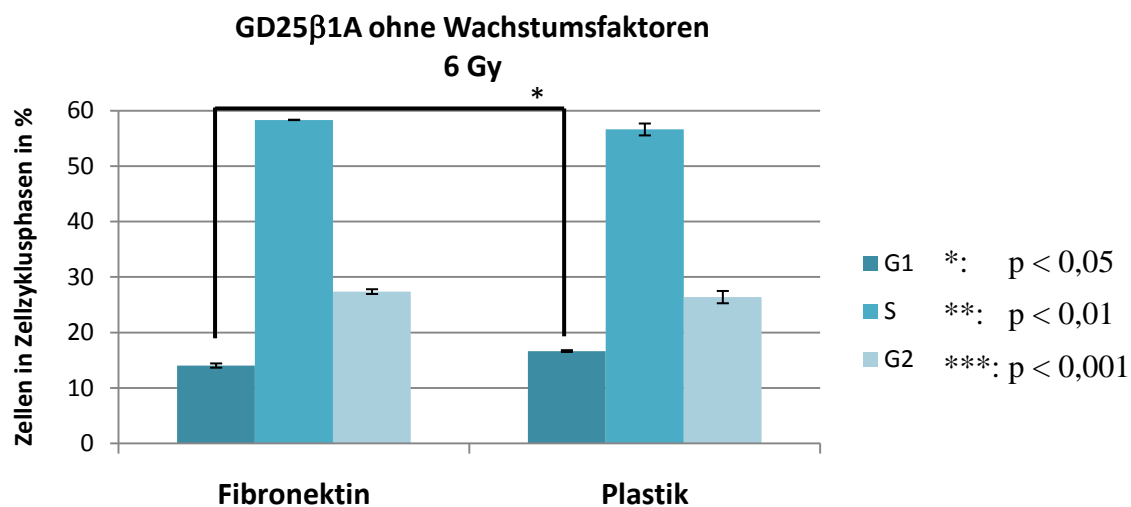


Abbildung 4.32 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Plastik und Fibronectin. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Der Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin gegenüber Plastik ohne und nach 6 Gy Bestrahlung mit Wachstumsfaktoren erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Der Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin gegenüber Plastik unter Entzug von Wachstumsfaktoren ohne Bestrahlung erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 4.33 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Fibronectin und auf Plastik. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Es zeigt sich eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase nach Kultivierung auf Fibronectin.

## Ergebnisse

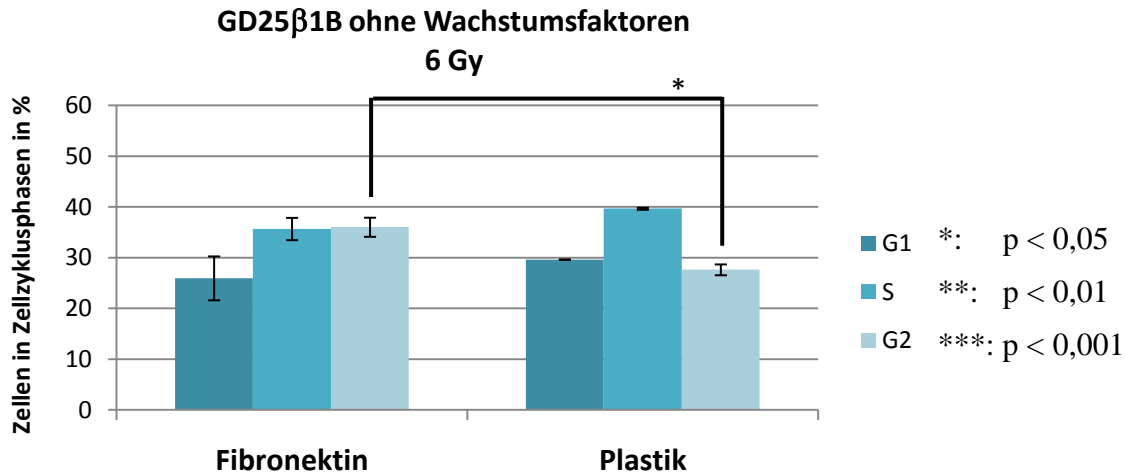


Abbildung 4.33 zeigt die Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Plastik und Fibronectin. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

### Vergleich der Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 6 Gy Bestrahlung nach Kultivierung auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren

Abbildung 4.34 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Fibronectin. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Es zeigt sich bei GD25β1A Zellen gegenüber GD25β1B Zellen eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase. Auffällig ist dabei eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase.

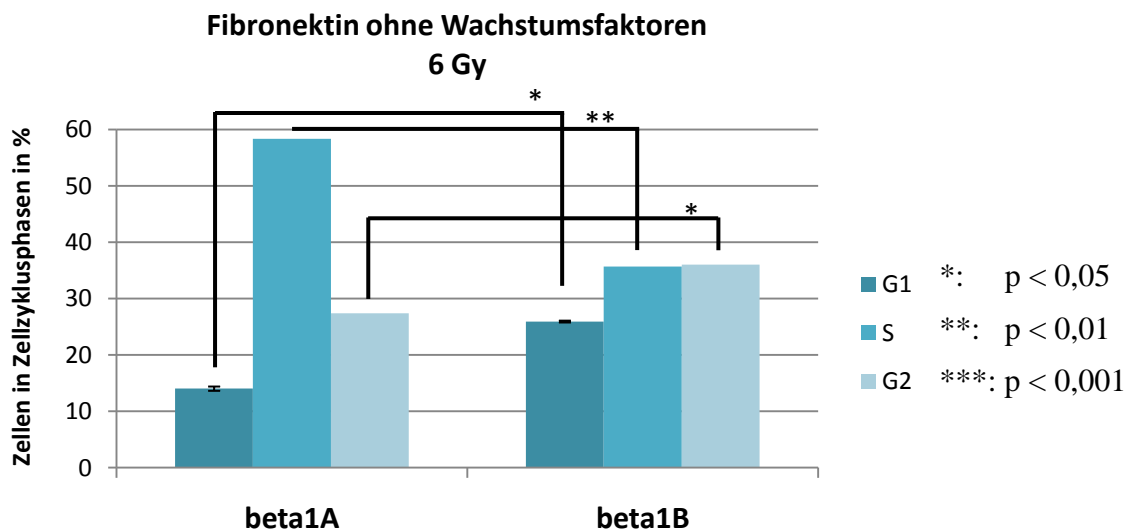


Abbildung 4.34 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Plastik und Fibronectin. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

**4.3.2 Vergleich der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter Einfluss von PI3K-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren nach Kultivierung auf Fibronectin**

Abbildung 4.35 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition durch LY294002. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Es zeigt sich unter PI3K-Inhibition eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase.

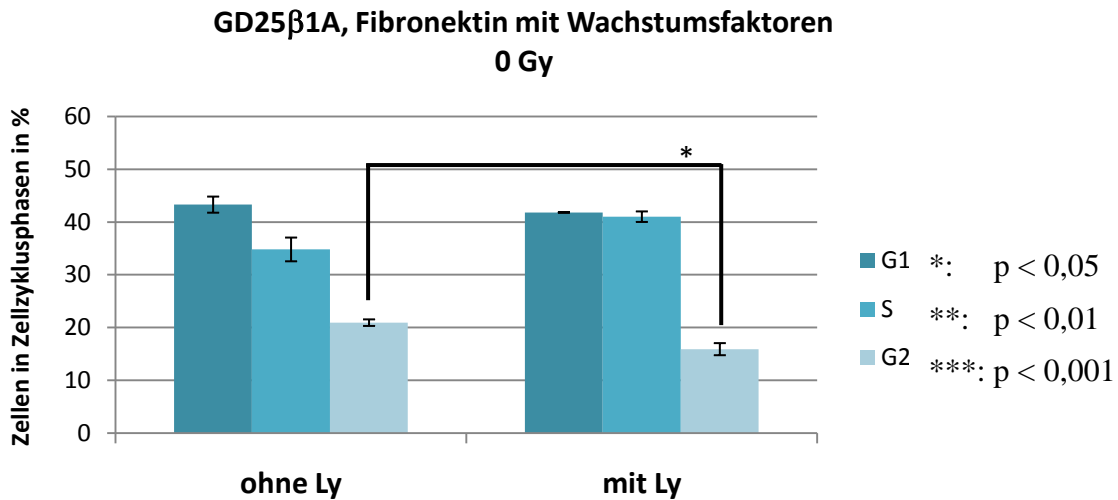


Abbildung 4.35 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.36 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist unter PI3K-Inhibition eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase. Es zeigt sich dazu eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase.

## Ergebnisse

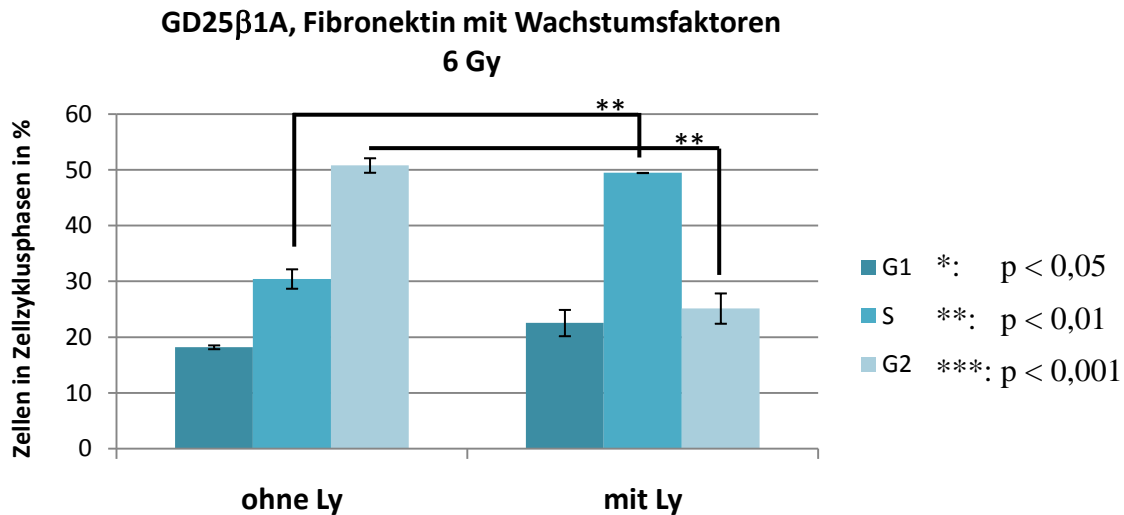


Abbildung 4.36 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.37 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Unter PI3K-Inhibition zeigt sich eine Reduzierung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase.

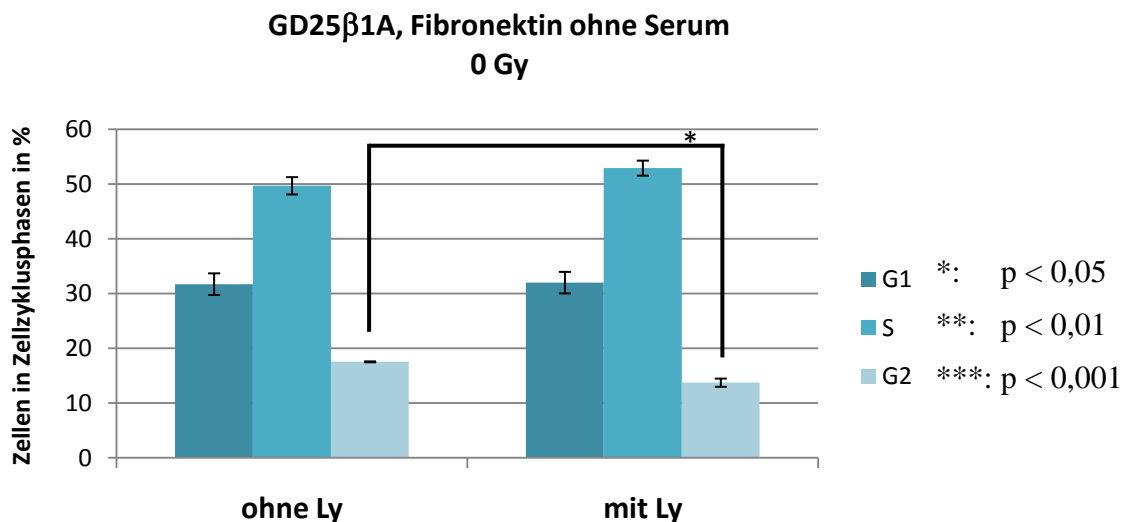


Abbildung 4.37 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.38 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Unter PI3K-Inhibition ist eine Zunahme von Zellen in

## Ergebnisse

der G<sub>1</sub>-Phase von ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl, auffällig. Es zeigt sich dazu eine Reduzierung von Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase.

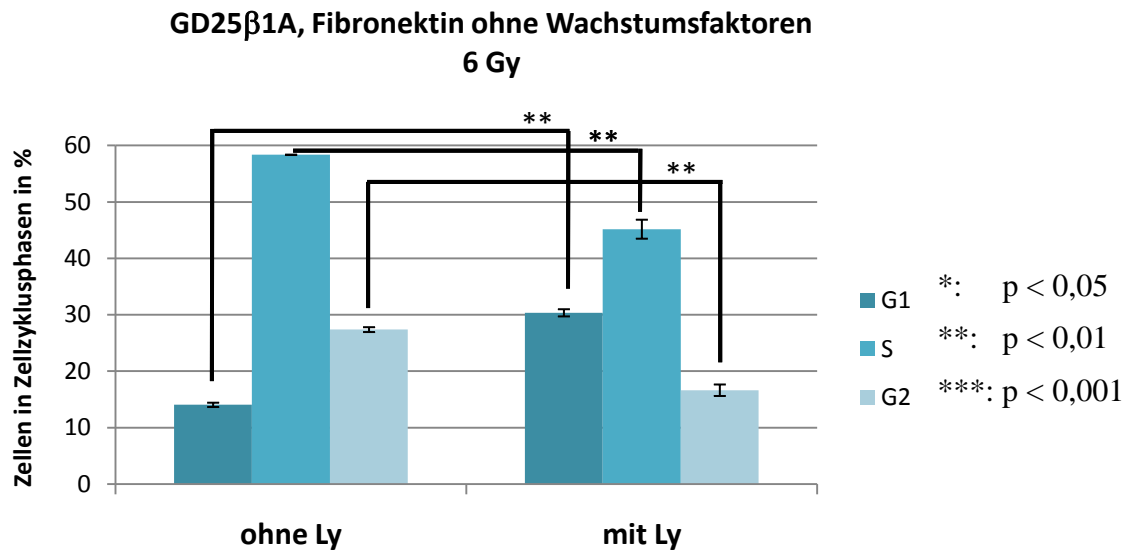


Abbildung 4.38 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.39 zeigt die Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Auffällig ist unter PI3K-Inhibition eine signifikante Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Es zeigt sich dazu eine Zunahme von Zellen in der S-Phase.

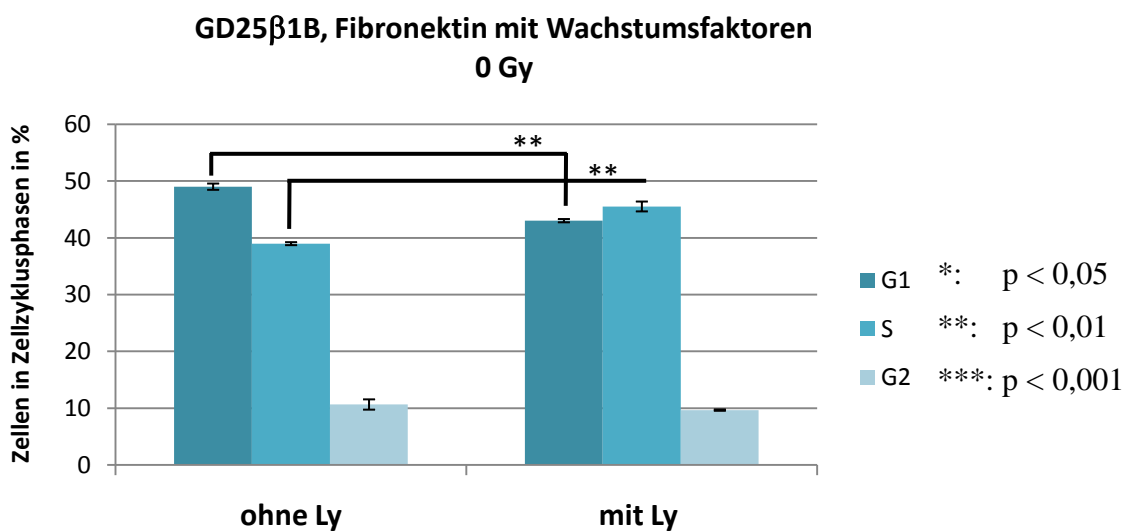


Abbildung 4.39: zeigt die Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

## Ergebnisse

Abbildung 4.40 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist unter PI3K-Inhibition eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase mit ca. 25%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Es zeigt sich dazu eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase mit jeweils ca. 10% bezogen auf die Gesamtzellzahl.

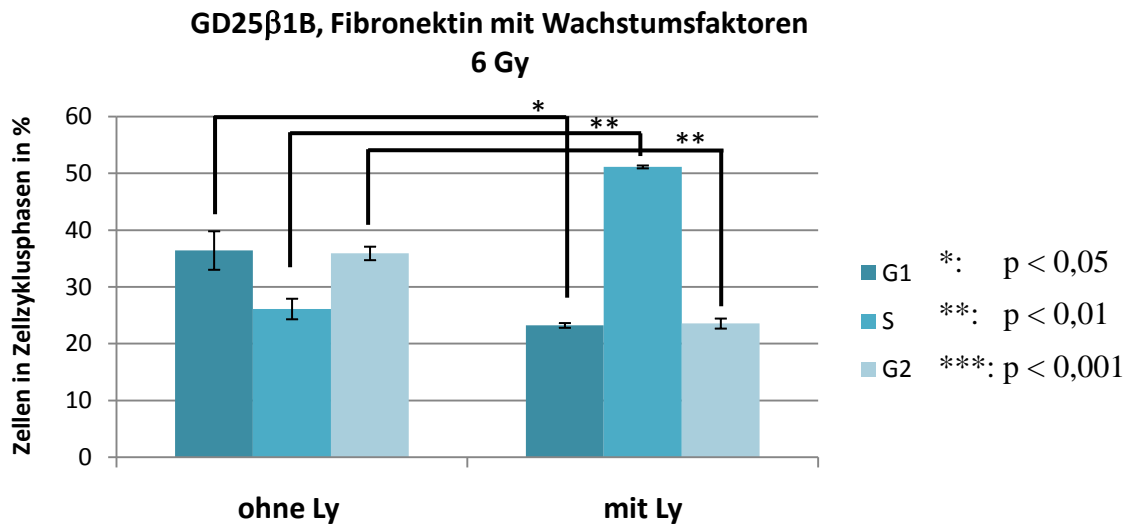


Abbildung 4.40 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.41 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Auffällig ist unter PI3K-Inhibition eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase mit ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Es zeigt sich dazu eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase.



## Ergebnisse

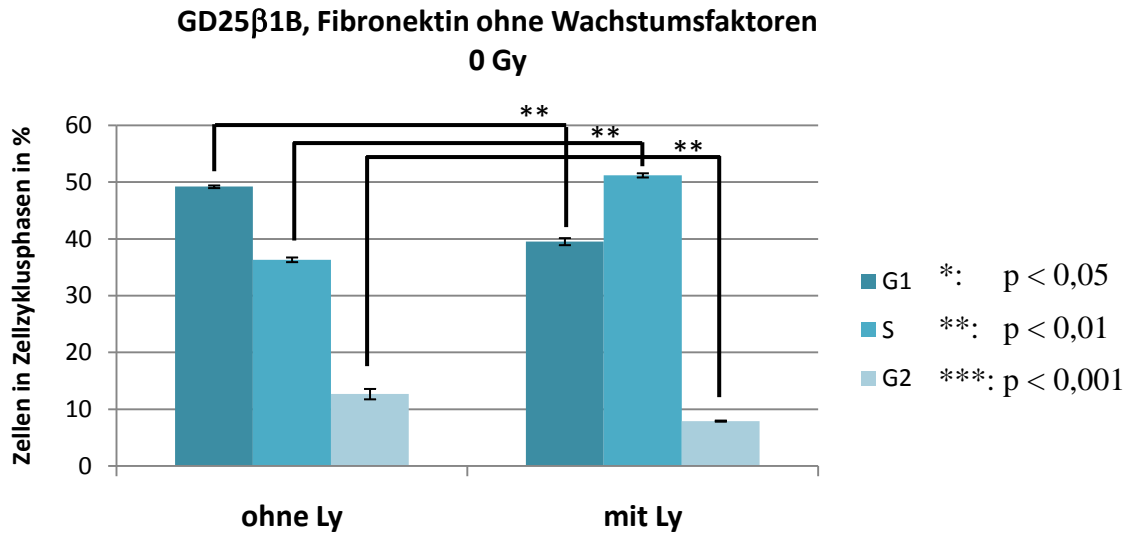


Abbildung 4.41 zeigt die Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.42 zeigt die Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist unter PI3K-Inhibition eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase, ca. 20%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Es zeigt sich dazu eine Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 20% bezogen auf die Gesamtzellzahl.

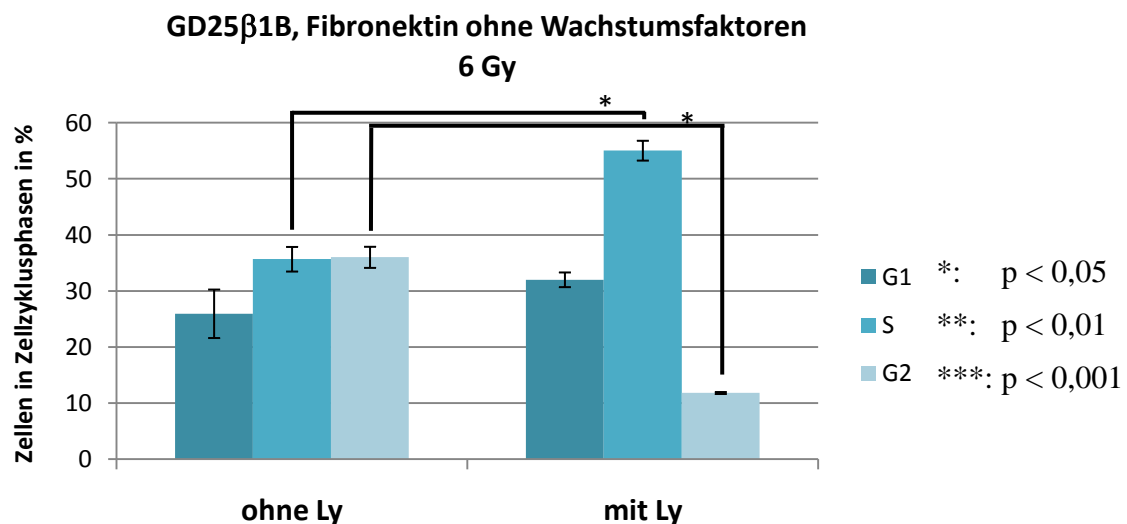


Abbildung 4.42 zeigt die Verteilung von GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

## Ergebnisse

### Vergleich der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach 0 Gy und 6 Gy Bestrahlung unter PI3K-Inhibition und nach Kultivierung auf Fibronectin

Abbildung 4.43 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin. Auffällig ist bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen, eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Es zeigt sich eine leichte Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und S-Phase.

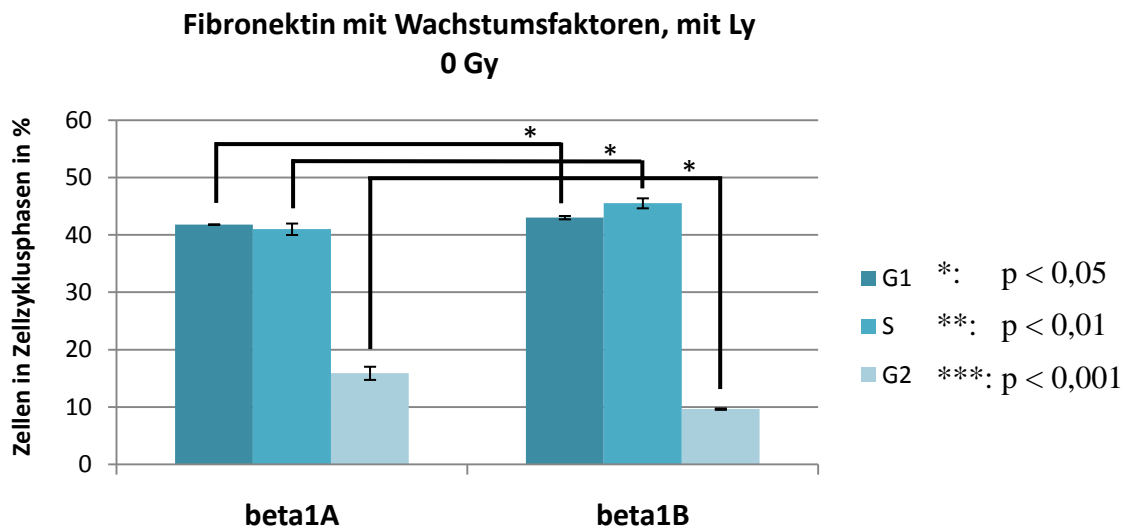


Abbildung 4.43 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition zeigte nach 6 Gy Bestrahlung insgesamt keine signifikanten Unterschiede. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren.

Abbildung 4.44 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Auffällig ist bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen, eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Es zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase.

## Ergebnisse

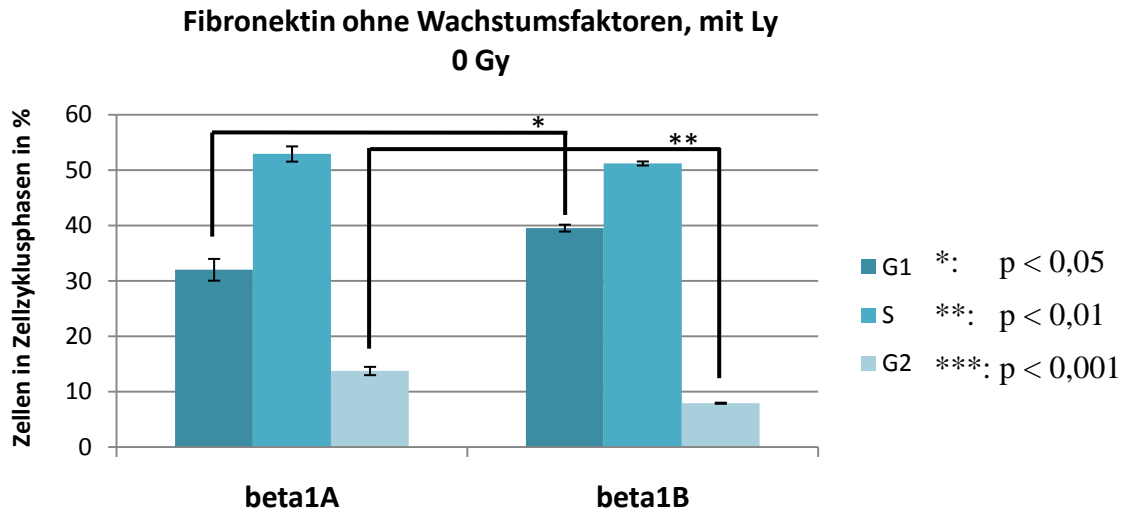


Abbildung 4.44 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.45 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen, eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Es zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der S-Phase um ca. 10%, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

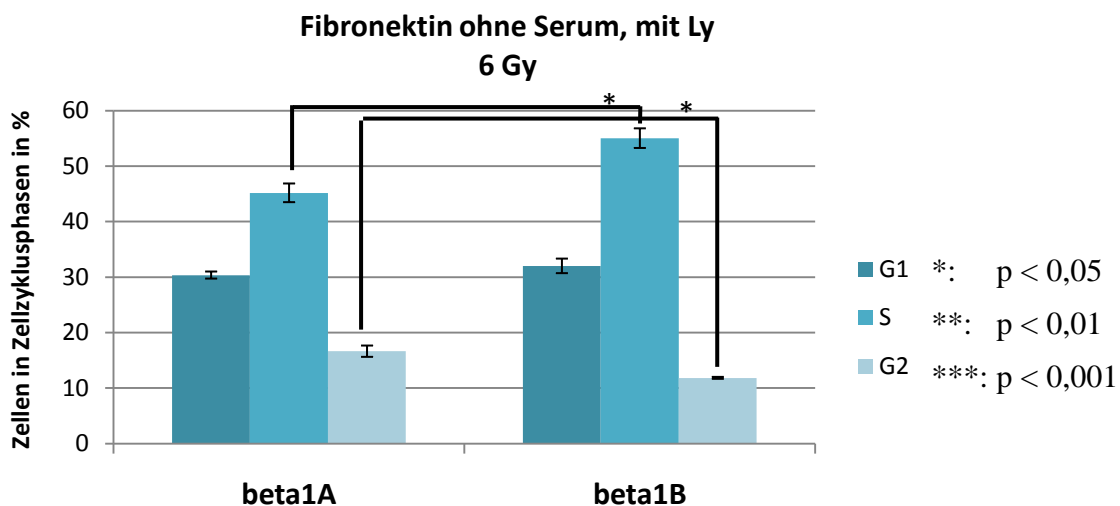


Abbildung 4.45 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter PI3K-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

#### ***4.3.3 Vergleiche der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronektin unter Einfluss von DMSO mit und ohne Wachstumsfaktoren auf Fibronektin***

DMSO wurde auch in diesem Abschnitt als Lösungsmittel für BIBX1382BS (BIBX), einen Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) verwendet. Durch den Lösungsstoff ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronektin.

Bestrahlung und Wachstumsfaktoren hatten auf dieses Ergebnis keinen Einfluss.

#### ***4.3.4 Vergleich der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Kultivierung auf Fibronektin unter Einfluss von EGFR-Inhibition, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren***

Im folgenden Abschnitt wird, wie zuvor nach Kultivierung auf Polystyrol, der Einfluss des EGF-Rezeptors zusammen mit der Signalfähigkeit  $\beta$ 1-Integrins auf die zelluläre Progression durch den Zellzyklus dargestellt.

Die Inhibition des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors durch BIBX erbrachte beim Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A Zellen nach Kultivierung auf Fibronektin mit und ohne Wachstumsfaktoren keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 4.46 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronektin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Unter EGFR-Inhibition ist eine Zunahme von Zellen in der G<sub>1</sub>- und S-Phase auffällig. Es zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

## Ergebnisse

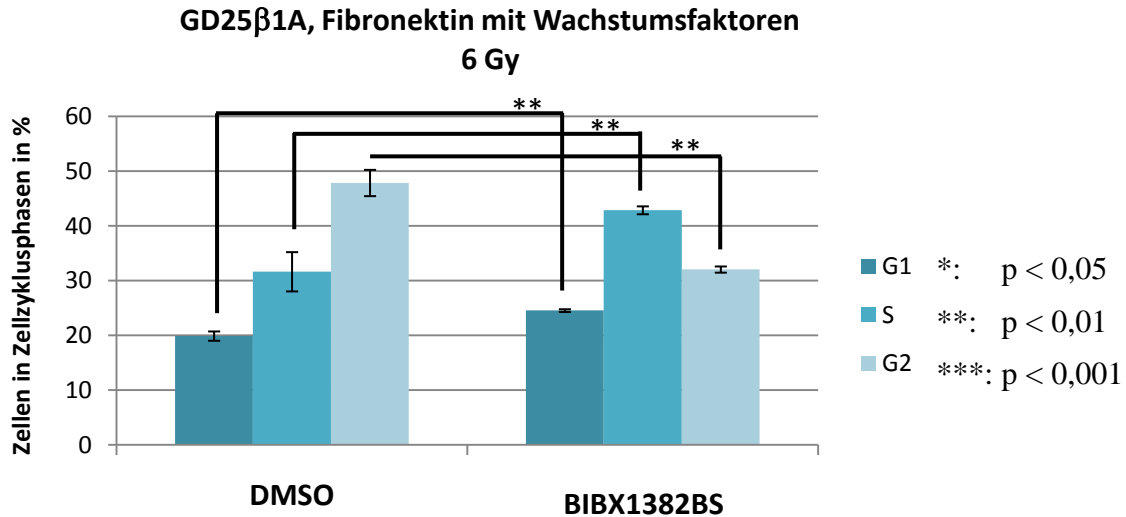


Abbildung 4.46 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.47 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Unter EGFR-Inhibition ist eine Zunahme von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase auffällig. Es zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase.

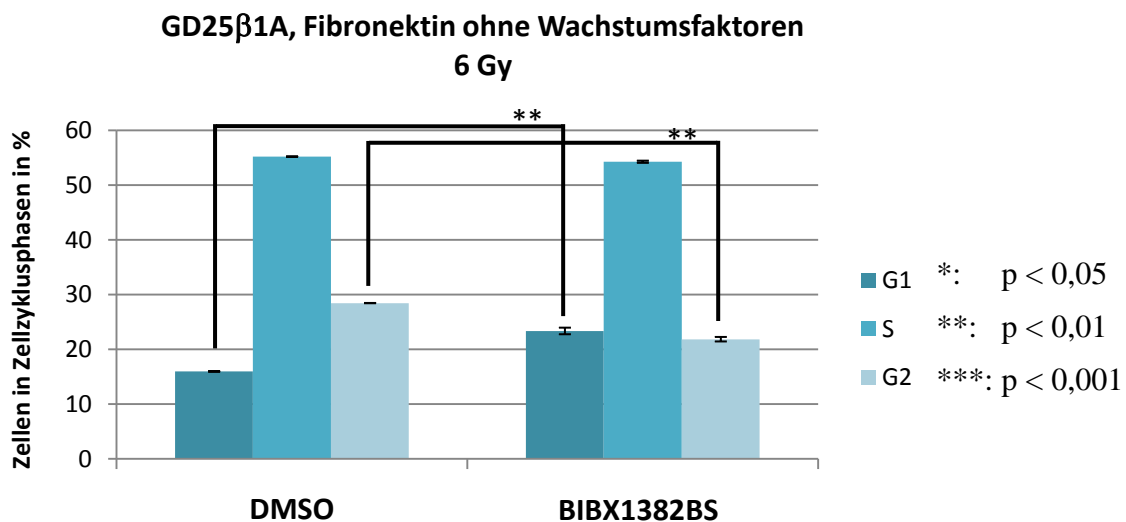


Abbildung 4.47 zeigt die Verteilung von GD25β1A Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

EGFR-Inhibition erbrachte beim Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25β1B Zellen nach Kultivierung auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren keine signifikanten Unterschiede.

## Ergebnisse

Abbildung 4.48 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronektin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Unter EGFR-Inhibition ist eine geringe Zunahme von Zellen in der S-Phase auffällig.

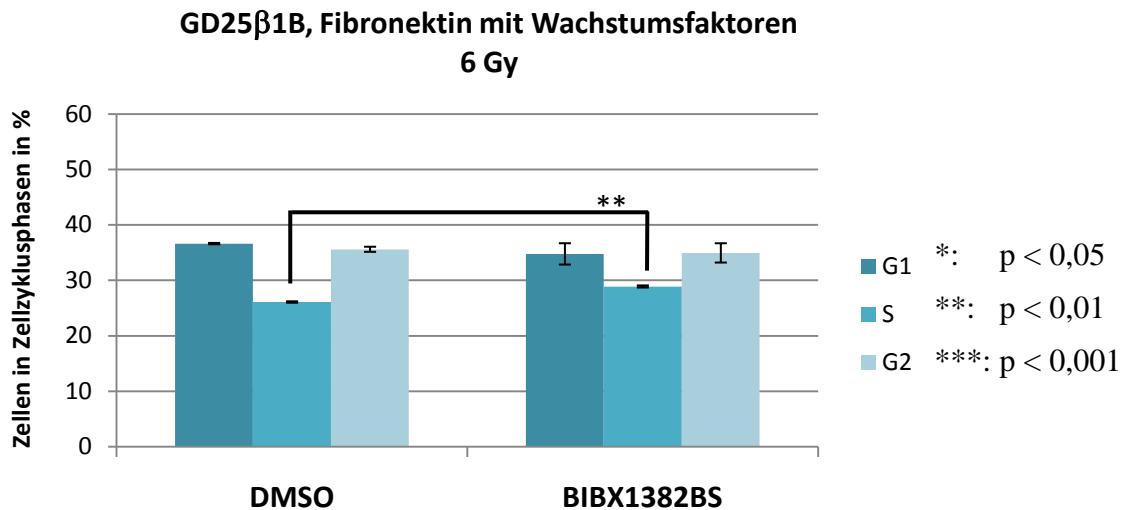


Abbildung 4.48 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronektin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

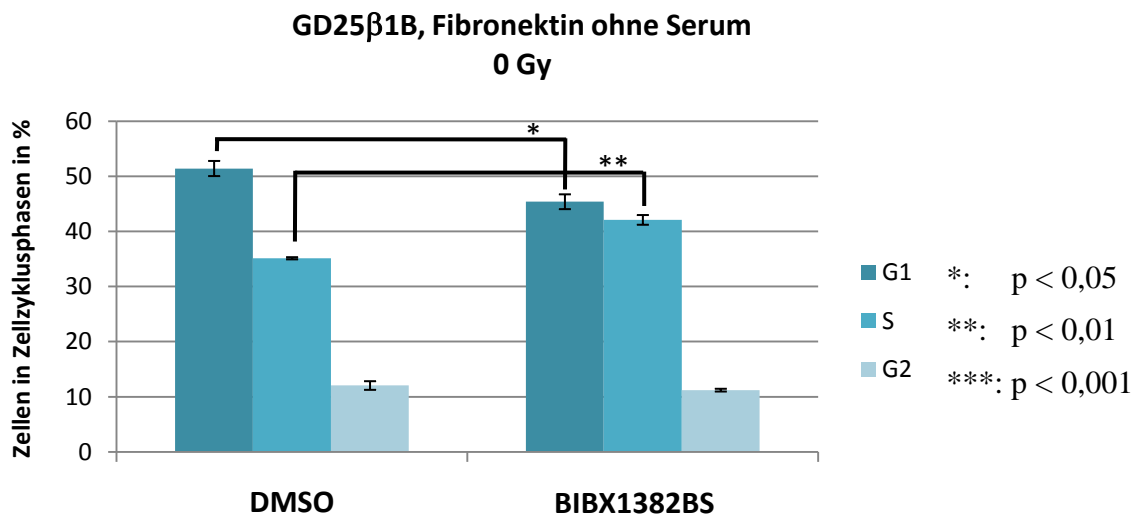


Abbildung 4.49 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B-Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronektin ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.49 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronektin ohne Wachstumsfaktoren. Unter EGFR-Inhibition ist eine Zunahme von Zellen in der S-Phase auffällig. Zudem zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase.

## Ergebnisse

Abbildung 4.50 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Unter EGFR-Inhibition ist eine Zunahme von Zellen in der S-Phase auffällig. Zudem zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase.

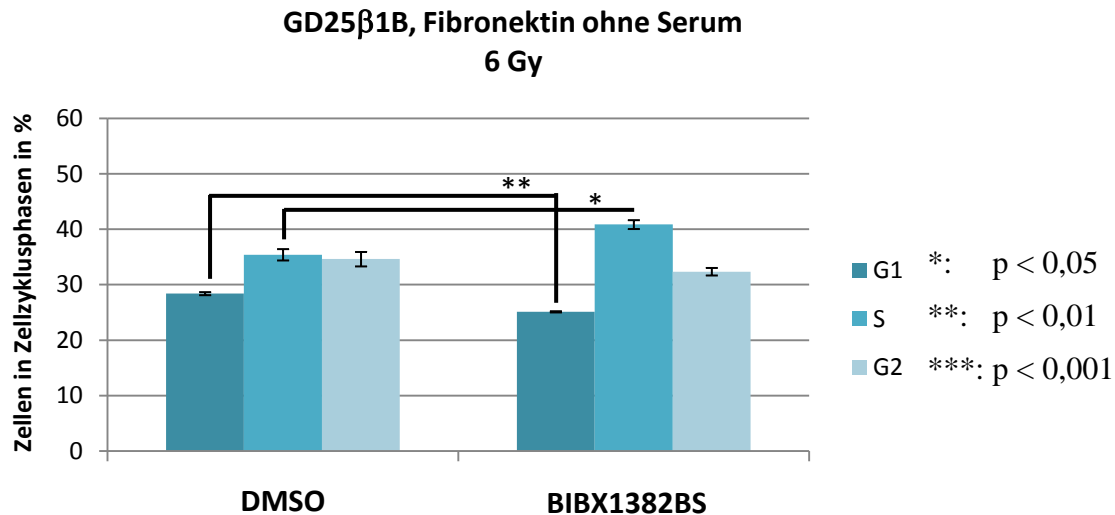


Abbildung 4.50 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit und ohne EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### Vergleich der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen mit Einfluss von 6 Gy Bestrahlung, EGFR-Inhibition, Wachstumsfaktoren und nach Kultivierung auf Fibronectin

EGFR-Inhibition und Kultivierung auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren erbrachte keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen im Vergleich nach Kultivierung auf Plastik.

Abbildung 4.51 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen, eine Zunahme von Zellen in der S-Phase um ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Es zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um ca. 10% bezogen auf die Gesamtzellzahl.

## Ergebnisse

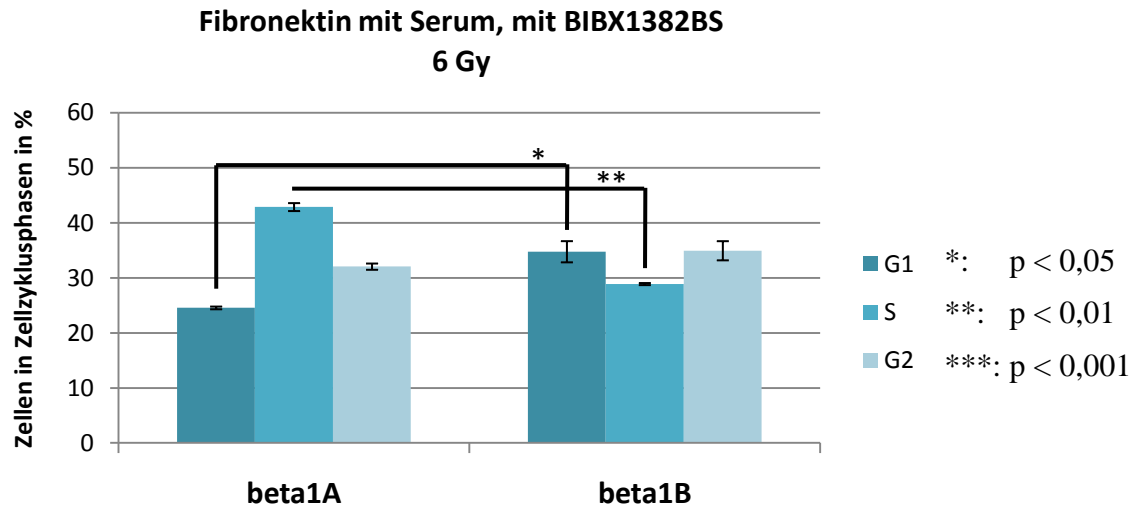


Abbildung 4.51 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.52 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Auffällig ist bei GD25β1A Zellen, im Vergleich zu GD25β1B Zellen, eine signifikante Zunahme von Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase. Es zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

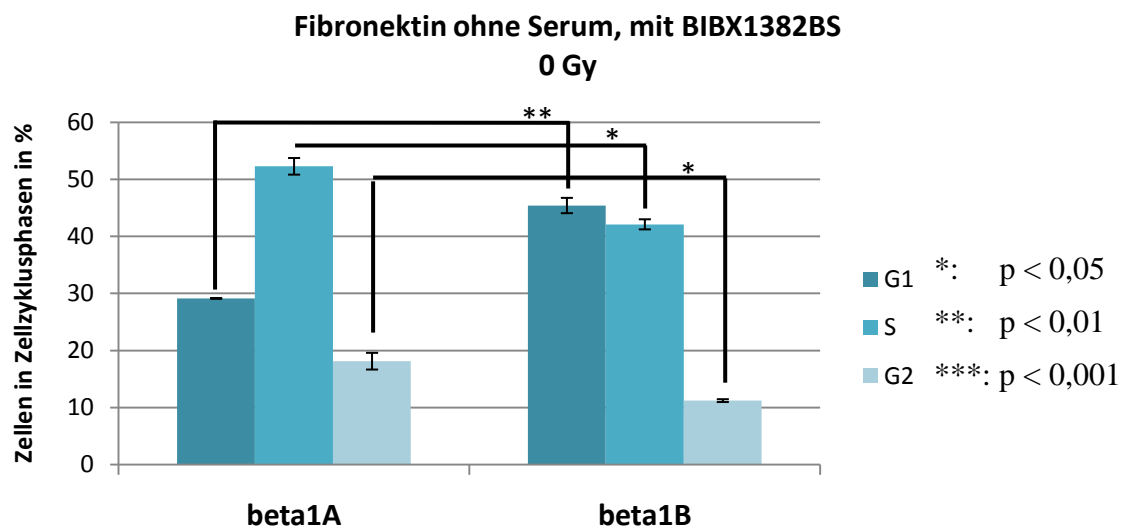


Abbildung 4.52 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.53 zeigt die Verteilung von GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin ohne



## Ergebnisse

Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen, eine signifikante Zunahme von Zellen in der S-Phase um ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Es zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 10%, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

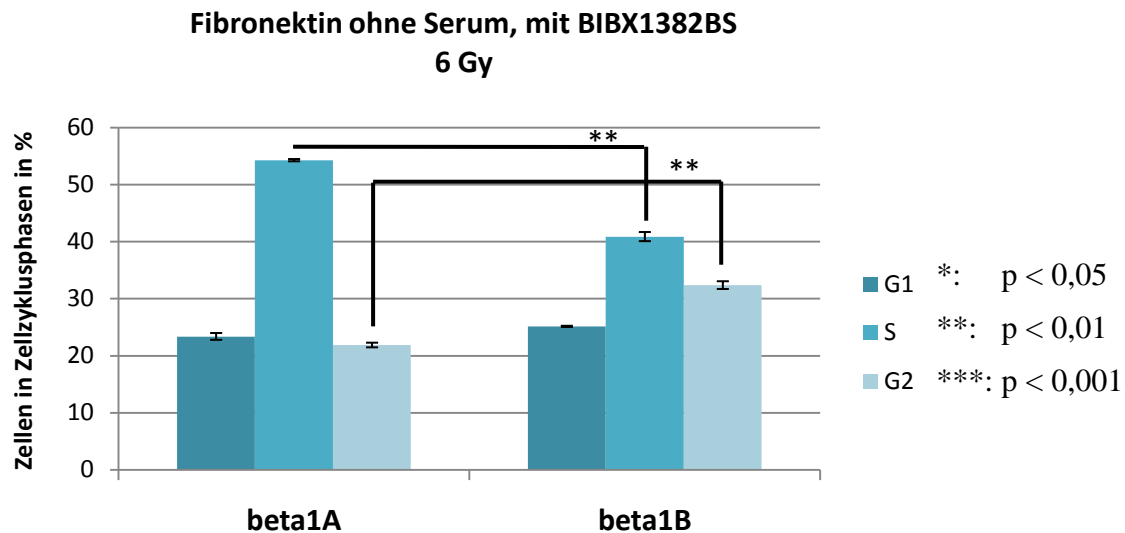


Abbildung 4.53 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen unter EGFR-Inhibition. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronektin ohne Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### **4.4 Vergleich der Verteilung von GD25, GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen ohne und nach 6 Gy Bestrahlung, nach Kultivierung auf Fibronektin und auf Plastik**

Im folgenden Abschnitt wurden die Zellverteilungen der drei Zelllinien GD25, GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B verglichen. Auch hier handelt es sich um eine Momentaufnahme, zwölf Stunden nach Bestrahlung beziehungsweise entsprechender Kultivierung. Wie im ersten Ergebnisabschnitt wird der Einfluss signalfähigen  $\beta$ 1-Integrins als auch der Einfluss fehlender  $\beta$ 1-Integrinexpression auf die Progression der Zellen durch den Zellzyklus dargestellt. Zudem wird die Auswirkung von signalunfähigem  $\beta$ 1-Integrin auf die Progression der Zellen durch den Zellzyklus gezeigt.

#### 4.4.1 Nach Kultivierung auf Plastik

Abbildung 4.54 zeigt die Verteilung von GD25, GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen. Die Kultivierung erfolgte mit Wachstumsfaktoren. Auffällig ist bei der Verteilung der GD25 $\beta$ 1A Zellen, verglichen mit den GD25 $\beta$ 1B Zellen eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Es fällt eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl auf. Bei der Verteilung der GD25 $\beta$ 1A Zellen, verglichen mit GD25 Zellen ist eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 8% bezogen auf die Gesamtzellzahl auffällig. Es zeigt sich eine diskrete Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase.

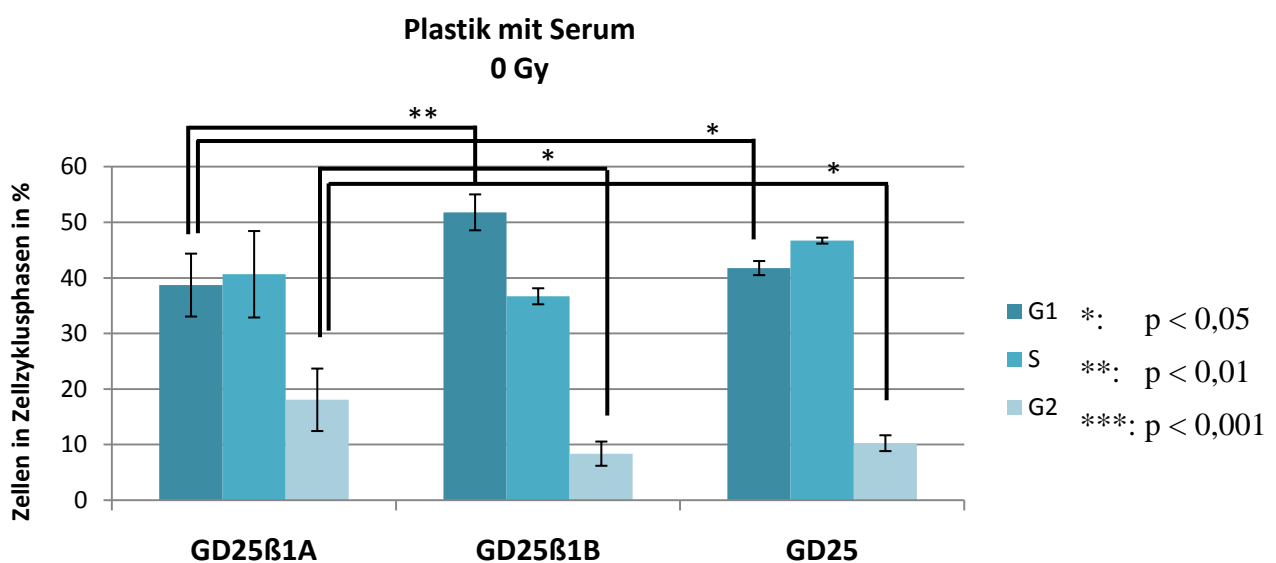


Abbildung 4.54 zeigt die Verteilung von GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1B und GD25 Zellen auf die Zellzyklusphasen. Die Kultivierung erfolgte auf Plastik mit Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.55 zeigt die Verteilung von GD25, GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen. Die Kultivierung erfolgte mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig sind bei der Verteilung der GD25 $\beta$ 1A Zellen, verglichen mit den GD25 $\beta$ 1B Zellen eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Zudem zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase um ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Bei der Verteilung der GD25 $\beta$ 1A Zellen, verglichen mit den GD25 Zellen ist eine Verringerung von Zellen in der S-Phase um ca. 10% bezogen auf die Gesamtzellzahl auffällig.

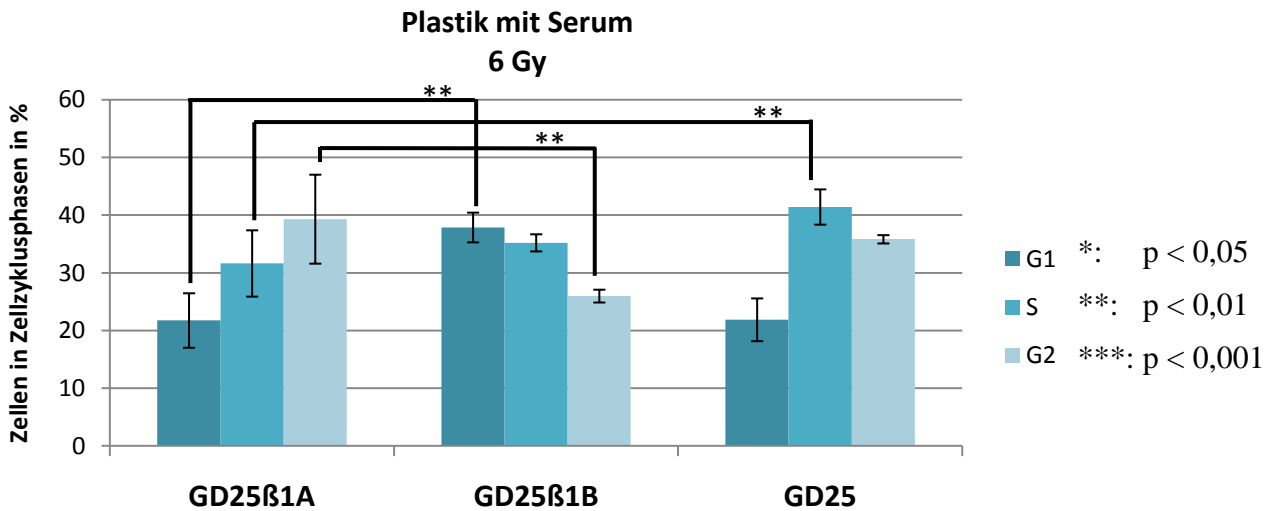


Abbildung 4.55 zeigt die Verteilung von GD25β1A, GD25β1B und GD25 Zellen auf die Zellzyklusphasen. Die Kultivierung erfolgte auf Plastik mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

#### 4.4.2 Nach Kultivierung auf Fibronectin

Abbildung 4.56 zeigt die Verteilung von GD25, GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Auffällig ist bei der Verteilung der GD25β1A Zellen, verglichen mit den GD25β1B Zellen, eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 15%, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

Bei der Verteilung der GD25β1A Zellen, verglichen mit den GD25 Zellen ist eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase um ca. 10%, bezogen auf die Gesamtzellzahl auffällig. Es zeigt sich eine Verringerung von Zellen in der S-Phase um ca. 13% bezogen auf die Gesamtzellzahl.

## Ergebnisse

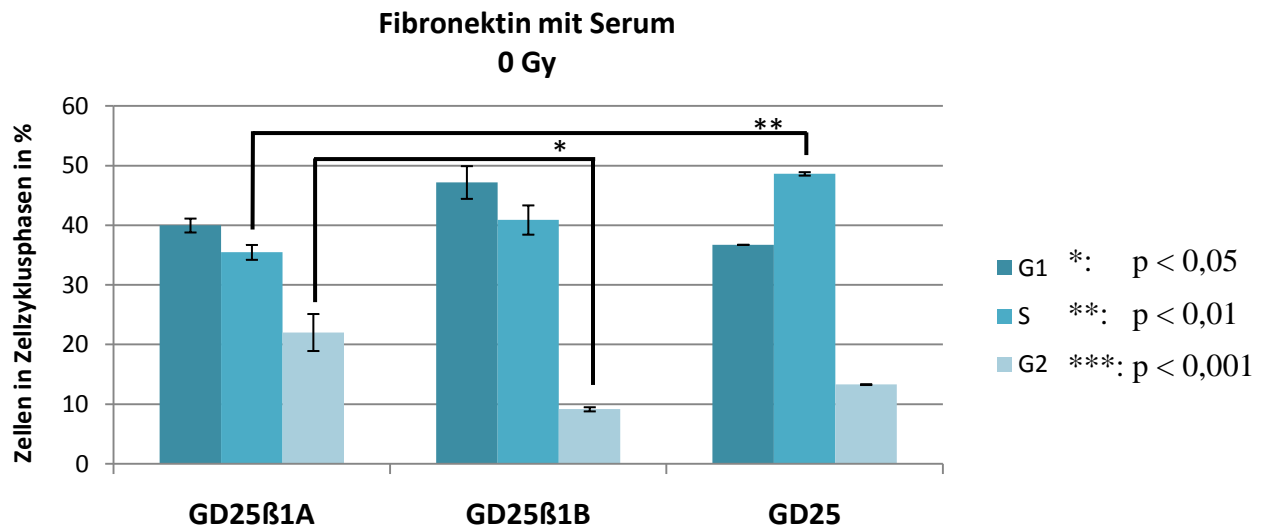


Abbildung 4.56 zeigt die Verteilung von GD25β1A, GD25β1B und GD25 Zellen auf die Zellzyklusphasen. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 4.57 zeigt die Verteilung von GD25, GD25β1A und GD25β1B Zellen auf die Zellzyklusphasen. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Auffällig ist bei der Verteilung der GD25β1A Zellen, verglichen mit den GD25β1B Zellen eine Zunahme von Zellen in der S-Phase (ca. 15%) und in der G<sub>2</sub>-Phase (ca. 7%) bezogen auf die Gesamtzellzahl.

Bei der Verteilung der GD25β1A Zellen, verglichen mit den GD25 Zellen ist eine Verringerung von Zellen in der S-Phase auffällig.

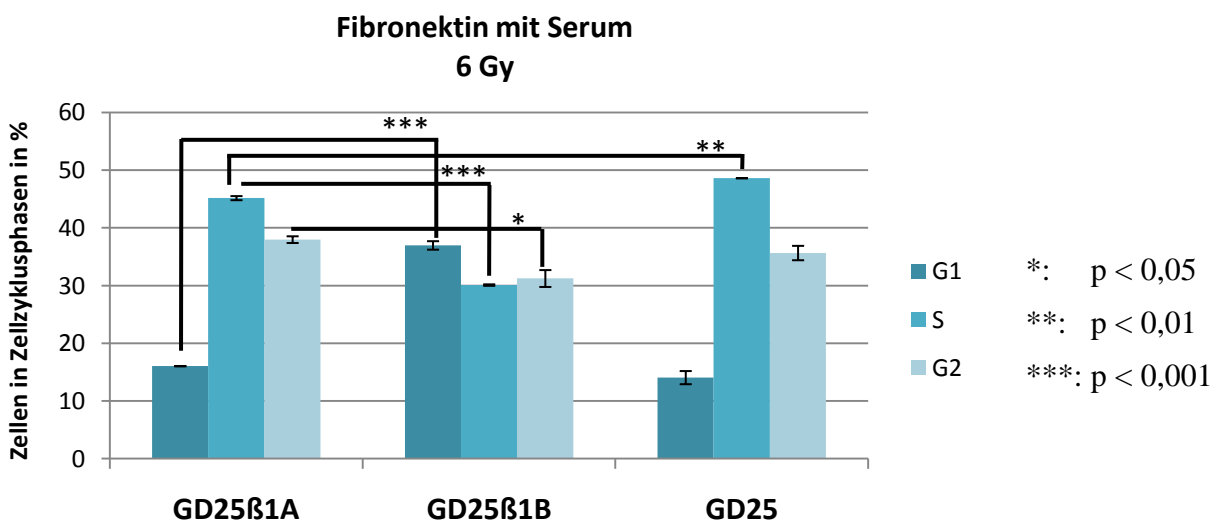


Abbildung 4.57 zeigt die Verteilung von GD25β1A, GD25β1B und GD25 Zellen auf die Zellzyklusphasen. Die Kultivierung erfolgte auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

## 5. Diskussion

### 5.1 Untersuchungen ohne Bestrahlung

#### 5.1.1 Voruntersuchungen ohne Wachstumsfaktoren

Bei den Voruntersuchungen ohne Wachstumsfaktoren zeigt sich durch die Signalfähigkeit  $\beta 1$ -Integrins durchweg eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase mit signifikant mehr Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase. Kultivierung auf Fibronectin, PI3K- und EGFR-Inhibition bewirken bei der Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen keine wesentliche Veränderung.

In der aktuellen Literatur wurde keine vergleichbare Untersuchung gefunden. Es werden verschiedene Signalwege beschrieben, welche die zelluläre Progression durch den Zellzyklus fördern. Miyamoto et al zeigte eine Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren mit deren Signalwegen durch  $\beta 1$ -Integrin-clustering auch ohne Wachstumsfaktoren. Dies ist abhängig von der Adhäsion  $\beta 1$ -Integrins an die extrazelluläre Matrix (EZM). Interessanterweise führt die Kultivierung von GD25 $\beta 1A$  auf Fibronectin in der vorliegenden Arbeit, im Vergleich zur Kultivierung auf Plastik, nicht zu einem weiteren Anstieg von Zellen in der S- oder G<sub>2</sub>-Phase. Uchida und Smilowitz zeigten dass kultivierte Fibroblasten Fibronectin und Prokollagen sezernieren und dadurch eine gegenseitige Aktivierung der Integrine bewirken [58]. Es besteht daher die Möglichkeit, dass auch bei Kultivierung auf Plastik zellulär gebildete Matrixproteine bereits Einfluss haben auf die Aktivierung von  $\beta 1$ -Integrin und dadurch die zelluläre Progression durch den Zellzyklus beeinflussen.

In der Literatur wurde für GD25 $\beta 1B$  Zellen neben Signalinkompetenz auch eine verringerte Adhäsionsfähigkeit berichtet. Nach Kultivierung auf den  $\beta 1$ -Integrin-Liganden Fibronectin wurden vorwiegend zwei Aspekte beschrieben. Entweder kein Integrin-Clustering [4] oder Clustering ohne Aktivierung von Signalproteinen [2]. Die in beiden Fällen fehlende Aktivierung von Wachstumsfaktor-Signalwegen könnte die in dieser Arbeit beobachtete höhere Zellzahl in der G<sub>1</sub>-Phase erklären.

Nach Kultivierung auf Fibronectin unter EGFR-Inhibition zeigen GD25 $\beta 1A$  Zellen im Vergleich zu GD25 $\beta 1B$  Zellen eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase mit Zunahme von Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase. Diese Beobachtung war nach Kultivierung auf Fibronectin verstärkt. Zum einen können  $\beta 1$ -Integrinsignale neben dem EGF-Rezeptor auch andere Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie PDGF-Rezeptoren und VEGF-Rezeptoren, ohne

Wachstumsfaktoren, adhäsionsabhängig aktivieren [18]. Dies wäre eine Erklärung für die zelluläre Progression durch die Zellzyklusphasen auch unter Inhibition von EGFR. Zum Anderen wird durch diese Beobachtung der Einfluss von Adhäsionsfähigkeit, der Integrin-Aktivierung und Integrin-Signalwegen unter Inhibition von EGFR deutlich.

In der aktuellen Literatur werden die proproliferativen Integrin- und Wachstumsfaktor-Signalwege überwiegend PI3K/AKT abhängig beschrieben [18], [52]. Der PI3K-AKT Signalweg kann unabhängig von Src aktiviert werden, also folglich ohne Wachstumsfaktoren [55]. Armulik et al gab eine vollständige Aufhebung der Phosphorylierung von AKT unter PI3K-Inhibition durch LY294002 an. Bei GD25 Zellen ohne  $\beta$ 1-Integrinexpression wurde eine Aktivierung des AKT Signalwegs über separate, noch unbekannte Mechanismen, unterhalb von gemeinsamen Integrin- und EGFR-Signalwegen nachgewiesen [59]. In der vorliegenden Arbeit haben GD25 $\beta$ 1A Zellen durch Expression signalfähigen  $\beta$ 1A-Integrins unter PI3K-Inhibition paradoxer Weise einen höheren Zellanteil in der S- und G<sub>2</sub>-Phase. Diese Beobachtung ist neu und wurde in der aktuellen Literatur noch nicht beschrieben. Damit bestehen möglicherweise noch weitere, bislang unbekannte, proproliferative  $\beta$ 1-Integrin-Signalwege, welche unabhängig von Wachstumsfaktoren und PI3K-Signalwegen bestehen.

### ***5.1.2 Untersuchungen mit Wachstumsfaktoren***

#### Vergleiche von GD25, GD25 $\beta$ 1A und GD25 $\beta$ 1B

Die Signalfähigkeit  $\beta$ 1A-Integrins führt nach Kultivierung mit Wachstumsfaktoren, im Vergleich zu GD25 Zellen, zu einer Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Diese Beobachtung zeigte sich auch durchweg in der 48 stündigen Untersuchung. Signalfähigkeit  $\beta$ 1A-Integrins kombiniert mit Wachstumsfaktoren fördert die zelluläre Progression durch den Zellzyklus. In der aktuellen Literatur fördert der Synergismus zwischen  $\beta$ 1-Integrin-Signalwegen und EGF-Rezeptor-Signalwegen nachweislich die Zellzyklusprogression [40]. Dies wird über eine Aktivierung von PI3K (möglicherweise über FAK), Shc, GEF, SOS, Rac1 und weiteren noch unbekanntem Signalproteinen mit anschließlicher Aktivierung von Cyclinen bewirkt [17].

Bei der 48 Stunden Untersuchung fiel nach 24 Stunden die Anzahl von Zellen in der S-Phase ab. Dies ist am ehesten durch die lange Gesamtkultivierungszeit (96 Stunden) mit dem

## Diskussion

Aufbrauchen der Wachstumsfaktoren als auch durch Kontaktinhibition durch Konfluenz der Zellen erklärbar.

Durch Fibronectin wird bei GD25 $\beta$ 1A Zellen, im Vergleich zu GD25 Zellen, in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren eine Verringerung von Zellen in der S-Phase mit starker Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase bewirkt. Der oben beschriebene proproliferative Synergismus zwischen Aktivierung von  $\beta$ 1-Integrin- und Wachstumsfaktor-Signalwegen scheint durch Kultivierung auf Fibronectin verstärkt zu werden. Armulik et al. zeigten bei GD25 $\beta$ 1A Zellen eine durch Fibronectin hervorgerufene starke Induzierung der Phosphorylierung und dadurch Aktivierung von AKT [3]. AKT ist ein Schlüsselprotein des  $\beta$ 1-Integrin Signaltransduktionsweges mit Einfluss auf viele essentielle Zellfunktionen wie Adhäsion, Überleben und Proliferation [14].

Der Vergleich der Verteilung von GD25 Zellen und GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen zeigte unabhängig von der Kultivierung auf Plastik und Fibronectin mit Wachstumsfaktoren jeweils dieselbe Tendenz. Durch Expression des defekten  $\beta$ 1B-Integrins gegenüber fehlender  $\beta$ 1-Integrinexpression befanden sich deutlich mehr Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase mit entsprechender Verringerung von Zellen in der S-Phase.

Die Expression des defekten  $\beta$ 1B-Integrins bewirkt gegenüber fehlender  $\beta$ 1-Integrinexpression (GD25-Zellen) eine geringere Progression der Zellen durch den Zellzyklus. Möglicherweise kann die Expression anderer  $\beta$ -Integrine, wie zum Beispiel  $\beta$ 4-Integrin, bei fehlender  $\beta$ 1-Integrin-Expression, dieses teilweise funktionell ersetzen. Die Expression des defekten  $\beta$ 1B-Integrins hat damit stärkere zellzyklushemmende Wirkung als das komplette Fehlen  $\beta$ 1-Integrins. In der Literatur wurde für GD25 $\beta$ 1B ein negativer Effekt auf Zelladhäsion, Zellausbreitung und Migration beschrieben, auch nach Kultivierung auf Fibronectin und Vitronectin [51]. Zudem zeigten Armulik et al dass die Expression von  $\beta$ 1B-Integrin in GD25 Zellen zu reduzierter Polymerisation von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin führt.  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin wird in allen Zelllinien exprimiert und beeinflusst Zelladhäsion, Zellausbreitung, Migration, Thyrosinphosphorylierung und Proliferation. Dies könnte die zellzyklushemmende Wirkung durch die Expression von  $\beta$ 1B-Integrin erklären [2].

Der Vergleich der Verteilung von GD25 $\beta$ 1A gegenüber GD25 $\beta$ 1B Zellen auf die Zellzyklusphasen erbrachte eine signifikant höhere Anzahl von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase mit deutlich weniger Zellen in der S-Phase. Diese Beobachtung war sowohl nach Kultivierung auf

## Diskussion

Plastik als auch nach Kultivierung auf Fibronectin mit Wachstumsfaktoren gleich. Die Inhibition des EGF-Rezeptors erbrachte keine wesentliche Veränderung der Zellverteilung in den Zellzyklusphasen. Demnach zeigt sich auch hier der positive Einfluss signalfähigen  $\beta$ 1A-Integrins auf die zelluläre Progression durch den Zellzyklus. Armulik et al gaben für GD25 $\beta$ 1B Zellen eine weniger suffiziente Interaktion zwischen dem  $\beta$ 1B-Defektintegrin und der  $\alpha$ -Integrin-Untereinheit im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1A Zellen an [2]. Diese Tatsache könnte zur verringerten zellulären Progression von GD25 $\beta$ 1B Zellen durch den Zellzyklus beitragen.

Unter PI3K-Inhibition bewirkt die Signalfähigkeit von  $\beta$ 1A-Integrin, in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase mit Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Durch Kultivierung auf Fibronectin wird zusätzlich eine Verringerung von Zellen in der S-Phase bewirkt. Wie zuvor beschrieben blockiert PI3K-Inhibition proliferative Signalwege  $\beta$ 1-Integrins. Auch Signalwege von Wachstumsfaktorrezeptoren werden dadurch eingeschränkt, da PI3K auch auf EGFR-Signale Einfluss hat. Möglicherweise bestehen in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren proliferative EGFR-Signale oder  $\beta$ 1-Integrin-Signale über einen PI3K-unabhängigen Signalweg.

Armulik et al haben für GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1B und GD25 Zellen nach Kultivierung mit Wachstumsfaktoren über 150 Stunden interessanterweise gleiche Wachstumskurven gefunden. Es wurde dabei für GD25 $\beta$ 1A Zellen kein Proliferationsvorteil festgestellt [2]. Dieses Ergebnis würde eine Verschiebung der Zellen innerhalb der Zellzyklusphasen ohne wesentliche Auswirkung auf die Proliferation bedeuten. In zahlreichen Quellen in der aktuellen Literatur wurde jedoch die Signalfähigkeit  $\beta$ 1-Integrins mit gesteigerter Proliferation diskutiert [13], [46].

Die Wirkung von  $\beta$ 1A-Integrin wird in der aktuellen Literatur zudem kontrovers diskutiert. Es ergeben sich Zelltypen spezifische Unterschiede, bei welchen ein proliferativer Effekt gegensätzlich diskutiert wird. Neben der häufigeren proliferativen Auswirkung findet sich zum Beispiel bei humanen hepatozellulären Karzinomzellen mit Überexpression vom  $\beta$ 1A-Integrin eine Hochregulation von p27. Bei diesen zeigte sich eine durch  $\beta$ 1A-Integrin hervorgerufene Inhibierung der Proliferation [23].



## 5.2 Untersuchungen mit ionisierender Strahlung ohne Wachstumsfaktoren

Bei den Experimenten mit ionisierender Strahlung entsteht durch Signalfähigkeit  $\beta$ 1-Integrins ohne Wachstumsfaktoren ein S-Phaseblock. Dieser ist unabhängig von der Kultivierung auf Fibronectin. GD25 $\beta$ 1B Zellen bilden diesen S-Phaseblock nicht aus. Diese Beobachtung ist neu und wurde in aktueller Literatur nicht gefunden. Signalfähigkeit von  $\beta$ 1-Integrin führt damit zur gezielten Arretierung des Zellzyklus auch ohne Wachstumsfaktoren. Die DNA-Reparatur nach genotoxischer Schädigung kann dadurch optimiert werden. Seidler et al haben die gleichen Zelllinien untersucht. Durch Signalkompetenz von  $\beta$ 1-Integrin fand sich ein gesteigertes postradiogenes Überleben der Zellen. Dies war unabhängig von Wachstumsfaktoren. Dieser Effekt war abhängig von PI3K, AKT und involvierte nachgeschaltete Signalproteine wie p130cas und Paxillin [14].

Entsprechend konnten GD25 $\beta$ 1A Zellen unter PI3K-Inhibition und Entzug von Wachstumsfaktoren keine adäquate zelluläre Antwort nach ionisierender Strahlung ausbilden. Es stellte sich kein Zellzyklusphasenblock dar. GD25 $\beta$ 1A Zellen zeigen auch bei diesen Untersuchungen signifikant weniger Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und mehr Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Dies deutet auf einen Progressionsvorteil der Zellen durch den Zellzyklus auch unter diesen Bedingungen hin. Dennoch ist die Bildung der adäquaten Zellantwort mit Ausbildung des postradiogenen G<sub>2</sub>-Phaseblocks abhängig von einer intakten Signaltransduktion  $\beta$ 1-Integrins. Interessanterweise bilden GD25 $\beta$ 1B Zellen durch Kultivierung auf Fibronectin unter Entzug von Wachstumsfaktoren und PI3K-Inhibition nach ionisierender Strahlung einen S-Phaseblock aus (mehr als 50% der Zellen). Dies entsteht durch eine Verschiebung von Zellen aus der G<sub>1</sub>-Phase. Dies ließ sich durch die aktuelle Literatur nicht erklären. GD25 $\beta$ 1B Zellen werden darin mit geringerer Adhäsion und signifikant reduziertem Überleben nach Bestrahlung beschrieben. Durch fehlende Expression  $\beta$ 1-Integrins entstehen möglicherweise Kompensationsmechanismen über andere Integrin-Untereinheiten, welche in Abhängigkeit von Fibronectin die S-Phaseblock-Bildung hervorrufen. In wie weit der S-Phaseblock ohne  $\beta$ 1-Integrinsignale Auswirkung hat auf die Progression von Zellen durch den Zellzyklus oder das zelluläre Überleben bleibt dabei unklar.

Unter Inhibition des EGF-Rezeptors mit BIBX 1382BS bewirken GD25 $\beta$ 1A Zellen durch Signalfähigkeit  $\beta$ 1-Integrins eine postradiogene Zellzyklusarretierung in der S-Phase. Durch Einfluss von Fibronectin wird dieser Effekt verstärkt zum ausgeprägten S-Phaseblock. Da dieser zuvor auch ohne EGFR Inhibition ausgebildet wurde, scheint EGFR zur Bildung des S-

Phaseblocks nicht notwendig zu sein. Da diese Untersuchung ohne Wachstumsfaktoren durchgeführt wurde, liegt es nahe, dass die Interaktion zwischen Integrin und Wachstumsfaktor-Signalwegen entscheidend ist für die Ausbildung einer adäquaten zellulären Strahlenantwort. GD25 $\beta$ 1B Zellen zeigen dabei keine wesentliche Arretierung des Zellzyklus nach Bestrahlung.

### **5.3 Untersuchungen mit ionisierender Strahlung mit Wachstumsfaktoren**

#### ***5.3.1 Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A mit GD25 Zellen über 48 Stunden***

Bei der 48 stündigen Beobachtung bewirkt die Expression von Wildtyp  $\beta$ 1A-Integrin gegenüber fehlender  $\beta$ 1-Integrinexpression nach 2 Gy Bestrahlung durchgehend einen signifikant höheren G<sub>2</sub>-Phase-Zell-Anteil. Es zeigte sich keine Zellzyklusphasen-Blockbildung. Untersuchungen von Cordes et al beschrieben eine strahleninduzierte vermehrte  $\beta$ 1-Integrinexpression mit möglicher Verstärkung von Zellsignalen [10]. Die gesteigerte zelluläre Progression durch den Zellzyklus bei GD25 $\beta$ 1A Zellen wäre somit, im Gegensatz zu GD25 Zellen, durch postradiogene Steigerung der Expression von  $\beta$ 1-Integrin erklärbar. Dadurch könnten proliferative Signale gesteigert werden.

Interessanterweise findet sich nach 6 Gy Bestrahlung hinsichtlich des Zellgehalts in den Zellzyklusphasen im Verlauf kein signifikanter Unterschied zwischen GD25 $\beta$ 1A und GD25 Zellen. Durch höhere Strahlendosis scheinen bei beiden Zelllinien unabhängig der  $\beta$ 1-Integrinexpression kompensatorische Mechanismen zur Transduktion des genotoxischen Schadens zu bestehen.

#### ***5.3.2 Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1A mit GD25 $\beta$ 1B Zellen***

GD25 $\beta$ 1A Zellen zeigen im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen nach 6 Gy ionisierender Strahlung einen G<sub>2</sub>-Phaseblock. Die Signalfähigkeit  $\beta$ 1-Integrins ist für die vollständige Ausbildung des postradiogenen G<sub>2</sub>-Phaseblocks essentiell. In dieser Arbeit zeigte sich der G<sub>2</sub>-Phaseblock sowohl nach Kultivierung auf Plastik als auch auf Fibronectin. Diese Beobachtung deckt sich teilweise mit den Ergebnissen von Cordes et al. Dieser zeigte an humanen Fibroblasten der Lunge gesteigertes postradiogenes Überleben und eine Akkumulation von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase ausschließlich nach Kultivierung auf Fibronectin [15]. Die teilweise Deckung der Ergebnisse liegt möglicherweise an zellspezifischen Unterschieden.

## Diskussion

Die Entstehung eines G<sub>2</sub>-Phase-Blocks nach ionisierender Strahlung stellt insgesamt die natürliche zelluläre Reaktion nach Bestrahlung dar [31], [37]. Mutierte Zellen, wie zum Beispiel bei *Ataxia Teleangiectasia* können keinen G<sub>2</sub>-Phase-Block ausbilden und keine suffiziente DNA-Reparatur durchführen [36]. Die Signalkompetenz von  $\beta$ 1-Integrin trägt möglicherweise, neben einer erhöhten Progression des Zellzyklus auch zu einer verbesserten Arretierung desselben nach Bestrahlung bei. Dadurch kann DNA-Reparatur optimiert und das zelluläre Überleben gesteigert werden. In aktueller Literatur wird eine  $\beta$ 1-Integrin vermittelte, erhöhte zelluläre Strahlenresistenz beschrieben [54], [27].

PI3K-Inhibition verhindert bei GD25 $\beta$ 1A Zellen nach 6 Gy Bestrahlung die Bildung eines postradiogenen G<sub>2</sub>-Phaseblocks. Es wird stattdessen ein S-Phase-Block ausgebildet. Dieser zeigt sich bei GD25 $\beta$ 1B Zellen unvollständig. Signalfähigkeit  $\beta$ 1-Integrins ist somit zur Ausbildung des S-Phaseblocks nach Kultivierung auf Plastik essentiell. Durch Kultivierung auf Fibronectin kommt es zu einer deutlichen Akkumulation von Zellen beider Zelllinien in der S-Phase. Es zeigen sich gleiche Zellzyklusphasenverteilungen. Die Bindung von Fibronectin an  $\beta$ 1-Integrin induziert damit eine starke Arretierung des Zellzyklus nach genotoxischer Schädigung. Gesteigerte Integrin vermittelte Zelladhäsion trägt möglicherweise zur Optimierung der DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung bei. Hazlehurst et al zeigten dazu eine erhöhte Integrität des Genoms nach ionisierender Strahlung in Abhängigkeit der  $\beta$ 1-Integrin-Signalfunktion [25]. Dabei werden DNA-Reparaturmechanismen über noch unbekannte Signalwege  $\beta$ 1-Integrin-vermittelt gesteigert.

Durch LY294002 wird in dieser Arbeit die Ausbildung des postradiogenen G<sub>2</sub>-Phaseblocks vollständig verhindert. In einer ähnlichen Untersuchung beschrieben Cordes et al bei humanen Fibroblasten einen durch LY294002 verhinderten postradiogenen G<sub>2</sub>-Phaseblock nach Kultivierung auf Polystyrol. Bei Kultivierung auf Fibronectin zeigten die humanen Fibroblasten auch unter PI3K-Inhibition die Ausbildung des G<sub>2</sub>-Phaseblocks [15]. Dies spricht für zelltypenspezifische Unterschiede hinsichtlich  $\beta$ 1-Integrin Wirkung nach ionisierender Strahlung. Die Funktionsfähigkeit von PI3K ist somit, zusammen mit der Signalkompetenz  $\beta$ 1-Integrins, für eine physiologische Reaktion der Fibroblasten auf ionisierende Strahlen essentiell.

Unter EGFR-Inhibition, Wachstumsfaktoren und Bestrahlung zeigt sich bei GD25 $\beta$ 1A Zellen im Vergleich zu GD25 $\beta$ 1B Zellen eine Zunahme von Zellen in der S-Phase mit einer Verringerung von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Durch Kultivierung auf Fibronectin werden bei beiden Zelllinien zusätzlich eine Verringerung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und eine Zunahme

von Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase bewirkt. Durch die Inhibition des EGF-Rezeptors kann der postradiogene G<sub>2</sub>-Phaseblock nicht ausgebildet werden. Bei dem Vergleich der entsprechenden Zellzyklusphasen ohne BIBX1382BS findet sich nur bei GD25β1A Zellen eine Reaktion auf die Inhibition des EGF-Rezeptors. Diese Beobachtung bestätigt mehrere Literaturquellen, welche den Synergismus zwischen β1-Integrinsignalwegen und EGF-Rezeptorsignalwegen belegt haben [55], [42]. Eke et al zeigten dazu eine ILK-Vermittelte gesteigerte zelluläre Strahlenempfindlichkeit unter Inhibierung der EGFR-Rezeptor Tyrosinkinase [20]. Zur adäquaten zellulären Reaktion auf ionisierende Strahlung sind damit sowohl β1-Integrin vermittelte Signaltransduktion als auch ein intakter EGF-Rezeptor notwendig.

Fibronectin trägt, wie oben beschrieben, bei beiden Zelllinien tendenziell zur physiologischen zellulären Strahlenreaktion bei. Mehrere Einflüsse können zu diesem Ergebnis beitragen. Für Fibronectin und allgemein für Zellmatrixproteine wurde in zahlreichen Quellen ein überlebens- und proliferationsfördernder Effekt nach ionisierender Strahlung und anderen genotoxischen Einflüssen beschrieben [29], [44]. Neben der strahleninduzierten erhöhten Expression von β1-Integrinen [10] werden möglicherweise noch andere β-Integrin-untereinheiten herauf reguliert. Beide Zelllinien sind adhäsionsfähig. Katsumi et al. beschrieben die Aktivierung proproliferativer Signalwege über mechanische Transduktion. Diese könnte ebenfalls Einfluss haben auf diese Beobachtung [34].

### **5.4 Vergleiche der drei Zelllinien**

GD25 Zellen zeigen nach Kultivierung auf Plastik und 6 Gy Bestrahlung gegenüber GD25β1A Zellen keinen G<sub>2</sub>-Phaseblock. Dies deutet auf den zellulären radioprotektiven Einfluss β1-Integrins nach ionisierender Strahlung hin. Park et al beschreiben dazu bei Mammakarzinomzellen ein schlechteres Ansprechen der Tumorzellen auf ionisierende Strahlung in Abhängigkeit erhöhter β1-Integrinexpression. Diese wurde dabei als möglicher Prognosefaktor des Therapieansprechens von Tumoren diskutiert [48]. Nach Kultivierung auf Fibronectin zeigen beide Zelllinien ähnliche Zellverteilungen auf die Zellzyklusphasen. Beide Zelllinien zeigen eine fast gleiche Verteilung von Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase ohne G<sub>2</sub>-Phaseblock. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vorherigen, nachvollziehbaren

## Diskussion

Ergebnissen dieser Arbeit. Nach Kultivierung auf Fibronectin zeigten GD25 $\beta$ 1A Zellen einen G<sub>2</sub>-Phaseblock. Möglicherweise liegt hier ein Versuchsfehler vor.

Der Vergleich der Zellzyklusphasen von GD25 $\beta$ 1B und GD25 Zellen zeigte deutlich mehr Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase mit entsprechend weniger Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase. Diese Tendenz wird durch Kultivierung auf Fibronectin noch verstärkt. Durch Expression von  $\beta$ 1B-Integrin gegenüber fehlender  $\beta$ 1-Integrinexpression erfolgt keine Akkumulation von Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase. GD25 Zellen akkumulieren vorwiegend in der S- und G<sub>2</sub>-Phase. Folglich könnten GD25 Zellen gegenüber GD25 $\beta$ 1B Zellen die zelluläre Progression durch den Zellzyklus nach ionisierender Strahlung besser arretieren. Möglicherweise blockiert die Expression des Defekt-Integrins radioprotektive Kompensationsmechanismen der Zelle gegenüber fehlender  $\beta$ 1-Integrinexpression.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Signalkompetenz von  $\beta$ 1-Integrin bedeutenden Einfluss auf die Verteilung muriner Fibroblasten auf die Zellzyklusphasen nach Bestrahlung hat. Dieser möglicherweise proproliferative Effekt ist von Bestrahlung, PI3K-Funktion und EGF-Rezeptorfunktion unabhängig. Wachstumsfaktoren verstärken diesen von der  $\beta$ 1-Integrinsignalkompetenz abhängigen Effekt. Entzug von Wachstumsfaktoren führte postradiogen regelmäßig zur Ausbildung eines S-Phaseblocks. Dieser war von der Signalfähigkeit  $\beta$ 1-Integrins abhängig. Fibronectin trägt zusätzlich, unabhängig von der Signalkompetenz  $\beta$ 1-Integrins, entscheidend zur Progression der Zellen durch den Zellzyklus bei.

In zahlreichen humanen Malignomen wurden Mutationen und Veränderungen der Expression von  $\beta$ 1-Integrin mit maligner Transformation und gesteigerter zelladhäsionsbedingter Radio- und Chemoresistenz beschrieben.  $\beta$ 1-Integrin stellt damit ein überaus bedeutendes Schlüsselprotein der onkomolekularen Forschung dar.  $\beta$ 1-Integrin ist ein äußerst vielversprechendes Zielprotein zur Entwicklung neuer molekular-therapeutischer Ansätze. Weitere intensivierete Untersuchungen zum Verständnis der mikromolekularen Zusammenhänge und zur gezielten Intervention Integrin vermittelter Signalwege können zukünftig zur Optimierung der Therapie von Krebserkrankungen beitragen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Addison LC. Future Oncol. Modulation of response to tumor therapies by the extracellular matrix. 2006 Jun;2(3):417-29.
- [2] Armulik A, Svineng G, Wennerberg K, Fässler R, Johansson S. Expression of integrin subunit beta1B in integrin beta1-deficient GD25 cells does not interfere with alphaVbeta3 functions. *Exp Cell Res* 10;254(1):55-63. Jan 2000.
- [3] Armulik A, Velling T, Johansson S. The integrin beta1 subunit transmembrane domain regulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate. *Mol Biol Cell* 15(6):2558-67. Jun 2004.
- [4] Baldwin G, Novitskaya V, Sadej R, Pochee E, Litynska A, Hartmann C, Williams J, Ashman L, Eble JA, Berditchevski F. Tetraspanin CD151 regulates glycosylation of (alpha)3(beta)1 integrin. *J Biol Chem*. 283(51):35445-54. Dec 2008.
- [5] Balzac F, Retta SF, Albin A, Melchiorri A, Koteliansky VE, Geuna M, Silengo L, Tarone G. Expression of beta 1B integrin isoform in CHO cells results in a dominant negative effect on cell adhesion and motility. *J Cell Biol*. 127(2):557-65. Oct 1994.
- [6] Carrano AC, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol*. 153(7):1381-90. Jun 2001.
- [7] Chicurel ME, Singer RH, Meyer CJ, Ingber DE. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature*.; 392(6677):730-3. Apr 1998.
- [8] Choi SH, Cho KJ, Nam SY, Lee SW, Kang J, Kim SY. Clinical significance of beta1 integrin expression as a prediction marker for radiotherapy in early glottic carcinoma. *Laryngoscope*. 116(7):1228-31. Jul 2006.
- [9] Collo G, Pepper MS. Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during migration in vitro. *J Cell Sci*. 112 (Pt 4):569-78. Feb 1999.
- [10] Cordes N, Blaese MA, Meineke V, Van Beuningen D. Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumour cell lines in vitro. *Int J Radiat Biol*. 78(5):347-57. May 2002.
- [11] Cordes N, Meineke V. Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR). Extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells in vitro. *Strahlenther Onkol*. 179(5):337-44. May 2003.
- [12] Cordes N, Meineke V. Integrin signalling and the cellular response to ionizing radiation. *J Mol Histol*. 35(3):327-37. Mar 2004.

## Literaturverzeichnis

- [13] Cordes N, Park CC. beta1 integrin as a molecular therapeutic target. *Int J Radiat Biol.* 83(11-12):753-60. Nov-Dec 2007.
- [14] Cordes N, Seidler J, Durzok R, Geinitz H, Brakebusch C. beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene.* 25(9):1378-90. Mar 2006.
- [15] Cordes N, van Beuningen D. Arrest of human lung fibroblasts in G2 phase after irradiation is regulated by converging phosphatidylinositol-3 kinase and beta1-integrin signaling in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58(2):453-62. Feb 2004.
- [16] Cordes N. Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity. *Cancer Res.* 64(16):5683-92. Aug 2004.
- [17] del Pozo MA, Alderson NB, Kiosses WB, Chiang HH, Anderson RG, Schwartz MA. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* 303(5659):839-42. Feb 2004.
- [18] Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene.* 26(9):1338-45. Feb 2007.
- [19] Eke I, Hehlhans S, Cordes N. There's something about ILK. *Int J Radiat Biol.* 85(11):929-36. Nov 2009.
- [20] Eke I, Sandfort V, Storch K, Baumann M, Röper B, Cordes N. Pharmacological inhibition of EGFR tyrosine kinase affects ILK-mediated cellular radiosensitization in vitro. *Int J Radiat Biol.* 83(11-12):793-802. Nov-Dec 2007.
- [21] Estrugo D, Fischer A, Hess F, Scherthan H, Belka C, Cordes N. Ligand bound beta1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. *PLoS One* 2(3):e269. Mar 2007.
- [22] Feldherr CM, Akin D, Cohen RJ. Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts. *J Cell Sci* 114(Pt 24):4621-7. Dec 2001.
- [23] Fu Y, Wang LY, Liang YL, Jin JW, Fang ZY, Zha XL. Integrin beta(1A) upregulates p27 protein amount at the post-translational level in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 38(8):523-30. Aug 2006.
- [24] Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol.* 149(2):431-46. Apr 2000.
- [25] Hazlehurst LA, Landowski TH, Dalton WS. Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene.* 22(47):7396-402. Oct 2003.



## Literaturverzeichnis

- [26] Hazlehurst LA, Valkov N, Wisner L, Storey JA, Boulware D, Sullivan DM, Dalton WS. Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells. *Blood*. 98(6):1897-903. Sep 2001.
- [27] Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta*. 1775(1):163-80. Jan 2007.
- [28] Hodgkinson PS, Elliott T, Wong WS, Rintoul RC, Mackinnon AC, Haslett C, Sethi T. ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. *Cell Death Differ*. 13(10):1776-88. Oct 2006.
- [29] Hodgkinson PS, Mackinnon AC, Sethi T. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Int J Radiat Biol*. 83(11-12):733-41. Dec 2007.
- [30] Huang S, Chen CS, Ingber DE. Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell*. 9(11):3179-93. Nov 1998.
- [31] Jeggo PA, Löbrich M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst)*. 5(9-10):1192-8. Sep 2006.
- [32] Jones SM, Kazlauskas A. Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Biol*. 3(2):165-72. Feb 2001.
- [33] Kasahara T, Koguchi E, Funakoshi M, Aizu-Yokota E, Sonoda Y. Antiapoptotic action of focal adhesion kinase (FAK) against ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 4(3):491-9. Jun 2002.
- [34] Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA. Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem*. 279(13):12001-4. Mar 2004.
- [35] Kim E, Kim JH, Kim HS, Ryu SH, Suh PG. Thimerosal stimulates focal adhesion kinase and cytoskeletal changes by redox modulation. *Biochim Biophys Acta*. 1593(1):9-15. Dec 2002.
- [36] Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(10):759-69. Oct 2008.
- [37] Lieberman HB. DNA damage repair and response proteins as targets for cancer therapy. *Curr Med Chem*. 15(4):360-7. 2008.
- [38] Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*. 25:619-47. 2007.

## Literaturverzeichnis

- [39] Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(3):849-54. Feb 1997.
- [40] Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem*. 276(30):27757-63. Jul 2001.
- [41] Mattila E, Pellinen T, Nevo J, Vuoriluoto K, Arjonen A, Ivaska J. Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat Cell Biol*. 7(1):78-85. Jan 2005.
- [42] Mettouchi A, Klein S, Guo W, Lopez-Lago M, Lemichez E, Westwick JK, Giancotti FG. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell*. 8(1):115-27. Jul 2001.
- [43] Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol*. 135(6 Pt 1):1633-42. Dec 1996.
- [44] Moschos SJ, Drogowski LM, Reppert SL, Kirkwood JM. Integrins and cancer. *Oncology (Williston Park)*. 21(9 Suppl 3):13-20. Aug 2007.
- [45] Müller DW, Bosserhoff AK. Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. *Oncogene* 27(52):6698-706. Nov 2008.
- [46] Nam JM, Chung Y, Hsu HC, Park CC. beta1 integrin targeting to enhance radiation therapy. *Int J Radiat Biol*. 85(11):923-8. Nov 2009.
- [47] Page K, Li J, Wang Y, Kartha S, Pestell RG, Hershenson MB. Regulation of cyclin D(1) expression and DNA synthesis by phosphatidylinositol 3-kinase in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 23(4):436-43. Oct 2000.
- [48] Park CC, Zhang HJ, Yao ES, Park CJ, Bissell MJ. Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 68(11):4398-405. Jun 2008.
- [49] Pu QQ, Streuli CH. Integrin control of cell cycle: a new role for ubiquitin ligase. *Bioessays*. 24(1):17-21. Jan 2002.
- [50] Renshaw MW, Ren XD, Schwartz MA. Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO J*. 16(18):5592-9. Sep 1997.
- [51] Retta SF, Balzac F, Ferraris P, Belkin AM, Fässler R, Humphries MJ, De Leo G, Silengo L, Tarone G. beta1-integrin cytoplasmic subdomains involved in dominant negative function. *Mol Biol Cell*. 9(4):715-31. Apr 1998.

## Literaturverzeichnis

- [52] Riesterer O, Tenzer A, Zingg D, Hofstetter B, Vuong V, Pruschy M, Bodis S. Novel radiosensitizers for locally advanced epithelial tumors: inhibition of the PI3K/Akt survival pathway in tumor cells and in tumor-associated endothelial cells as a novel treatment strategy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58(2):361-8. Feb 2004.
- [53] Schwartz MA. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* 11(12):466-70. Dec 2001.
- [54] Seidler J, Durzok R, Brakebusch C, Cordes N. Interactions of the integrin subunit beta1A with protein kinase B/Akt, p130Cas and paxillin contribute to regulation of radiation survival. *Radiother Oncol.* 76(2):129-34. Aug 2005.
- [55] Streuli CH, Akhtar N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J.* 418(3):491-506. Mar 2009.
- [56] Tamada M, Sheetz MP, Sawada Y. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev Cell.*; 7(5):709-18. Nov 2004.
- [57] Thews O, Lambert C, Kelleher DK, Biesalski HK, Vaupel P, Frank J. Impact of therapeutically induced reactive oxygen species and radical scavenging by alpha-tocopherol on tumor cell adhesion. *Oncol Rep.* 18(4):965-71. Oct 2007.
- [58] Uchida N, Smilowitz H, Ledger PW, Tanzer ML. Kinetic studies of the intracellular transport of procollagen and fibronectin in human fibroblasts. Effects of the monovalent ionophore, monensin. *J Biol Chem.* 255(18):8638-44. Sep 1980.
- [59] Velling T, Nilsson S, Stefansson A, Johansson S. beta1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO Rep.* 5(9):901-5. Sep 2004.
- [60] Velling T, Stefansson A, Johansson S. EGFR and beta1 integrins utilize different signaling pathways to activate Akt. *Exp Cell Res.* 314(2):309-16. Jan 2008.
- [61] Wennerberg K, Lohikangas L, Gullberg D, Pfaff M, Johansson S, Fässler R. Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J Cell Biol.* 132(1-2):227-38. Jan 1996.
- [62] Woo RA, Poon RY. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle.* 2(4):316-24. Jul-Aug 2003.
- [63] Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D, Park C. Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res.* 67(2):659-64. Jan 2007.

## Literaturverzeichnis

- [64] Zambruno G, Marchisio PC, Marconi A, Vaschieri C, Melchiori A, Giannetti A, De Luca M. Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol.* 129(3):853-65. May 1995.

## Abbildungsverzeichnis

- |   |    |
|---|----|
| 1.1 Übersicht zum Einfluss von $\beta$ 1-Integrin auf Zellzyklus und Überleben nach DNA-Schaden | 8  |
| 1.2 Übersicht von Interaktionen zwischen $\beta$ 1-Integrin und Wachstumsfaktor-Rezeptoren      | 11 |

## Abkürzungsverzeichnis

Abl	<i>engl.</i> cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AKT	Proteinkinase B/AKT
Bax	<i>engl.</i> , zur BH3-only Protein-Familie gehörend
Bcl-2	<i>engl.</i> B-cell lymphoma 2
BIBX1382BS	Pharmakologischer Inhibitor der Tyrosinkinase des EGFR
Bim	<i>engl.</i> , zur BH3-only Protein-Familie gehörend
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM-CR	<i>engl.</i> Cell adhesion-mediated chemoresistance
CAM-RR	<i>engl.</i> Cell adhesion-mediated radioresistance
CDK	<i>engl.</i> cyclin-dependent kinase
Crk	<i>engl.</i> CT10 Regulator of kinase
DNA	<i>engl.</i> desoxyribonucleinacid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
EGFR	<i>engl.</i> epidermal growth factor receptor
ERK	<i>engl.</i> Extracellular signal regulated kinase
ERK1/2	<i>engl.</i> extracellular signal-regulated kinase-1/2
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>engl.</i> fluorescence activated cell sorting
FAK	<i>engl.</i> focal adhesion kinase
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GEF	<i>engl.</i> guanine nucleotide exchange factor
GSK3 $\beta$	<i>engl.</i> glycogen synthase kinase 3 beta
Gy	Gray
ILK	<i>engl.</i> integrin-linked kinase
JNK	<i>engl.</i> jun amino-terminale kinase
LY294002	Pharmakologischer PI(3)-Kinase Inhibitor
MAPK	Mitogenaktivierte Protein Kinase
MEK	Mitogen-aktivierte, ERK-aktivierende Kinase
MMP-2	Matrix-Metalloprotease-2
mRNA	<i>engl.</i> messenger RNA
NPxY Motiv	Aminosäure-Sequenz: N= Asparagin, P= Prolin, x= beliebige AS, Y= Tyrosin
p130cas	<i>engl.</i> crk-associated substrate

## Abkürzungsverzeichnis

p21 <sup>CIP/WAF1</sup>	Inhibitor von Cyclin-abhängiger-Kinase
p27Kip1	Inhibitor von Cyclin-abhängiger-Kinase
PBS	<i>engl.</i> phosphate buffered saline
PDGF	<i>engl.</i> platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
pRB	<i>engl.</i> Phosphorylated retinoblastoma-Protein
Rac-1	Kleines G-Protein (GTPase)
Raf	<i>engl.</i> rapidly growing fibrosarkoma
Ras	<i>engl.</i> rat sarcoma
ROS	<i>engl.</i> Reactive Oxygen Species
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
Shc	<i>engl.</i> src homology domain containing phosphatase-2
SOS	<i>engl.</i> homologue of <i>Drosophila Melanogaster</i> "son of sevenless" protein
Src	<i>engl.</i> Sarcoma proteine
VEGFR	<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor receptor

# Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Nils Cordes für die Überlassung dieses interessanten und anspruchsvollen Themas. Ich danke ihm für seine mit Engagement durchgeführte Betreuung, für die Korrektur dieser Arbeit, seine Geduld und Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Molls diese Arbeit entscheidend mit gestaltet zu haben und seine Bereitschaft, diese Arbeit vor der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zu vertreten.

Die Experimente dieser Arbeit wurden am Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München durchgeführt. Ich danke dem Leiter dieses Instituts, Herrn Dr. med. V. Meineke für die Bereitstellung des Forschungslabors und der dafür nötig gewesenen Mittel.

Frau Bärbel Reinke, Frau Michaela Bartsch, Herrn Ralf Hartmann und Frau Monika Kraus danke ich für die freundliche, gewissenhafte Einführung in das experimentelle Arbeiten und Ihre hilfsbereite, empathische Unterstützung.

Für gegenseitige Anregungen und Unterstützung bedanke ich mich auch ganz herzlich bei meinen Mitdoktoranden Silke Frick, Doris Estrugo, Antje Mischkus, Franziska Hess, Iris Eke, Veit Sandfort und Alex Fischer. Besonderer Dank gilt auch meiner Kollegin Julia Seidler für ihre stete Hilfsbereitschaft, ihre Anregungen und Kritik zu dieser Arbeit.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Radiobiologie der Bundeswehr, auch wenn sie hier nicht namentlich erwähnt wurden, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern Joachim und Heidrun Durzok sowie meinem Ehemann Tobias Zettl. Mit ihrer liebevollen und materiellen Unterstützung, mit ihrem Verständnis und ihrer endlosen Geduld wurden mein Studium und die Durchführung dieser Arbeit erst möglich. Ihre moralischen Werte und ihr Glauben an mich haben mir immer Kraft gegeben.

# Lebenslauf

## Persönliche Information

Name Rita Anne Zettl, geborene Durzok

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 28.08.1979

Geburtsort: Guben

## Schulbildung

1986- 1991 Grund- und Hauptschule Holzkirchen

1991- 2000 Gymnasium Oberhaching

Abschluss Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulbildung

2000-2002 Studium Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt

LMU München

2002-2007 Studium Humanmedizin, klinischer Abschnitt

TU München

08.2003 1. Staatsexamen

03.2006 2. Staatsexamen

04.2007 3. Staatsexamen

05.2007 Approbation als Ärztin

## Famulaturen

03.2003 Radiobiologie an der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München

10.2003 Hämatologie/ Onkologie im KKH Aurich

09/2004 Chirurgie/ Unfallchirurgie in der Praxis von Dr. med. Winter,  
Holzkirchen

09/2005 Innere Medizin an der Uniklinik Sofia, Bulgarien



### **Praktisches Jahr**

04.-08.2006	Dermatologie, Klinik am Biederstein, München
08.-10.2006	Innere Medizin, Hämato-/Onkologie, Klinikum rechts der Isar, München
10.12.2006	Innere Medizin, Kardiologie, Deutsches Herzzentrum München
12.2006- 03.2007	Viszeral-/Unfallchirurgie, Klinikum rechts der Isar, München

### **Ärztliche Tätigkeit**

Seit 03/2008	Assistenzärztin der Inneren Medizin am Klinikum Fürstenfeldbruck
--------------	--